

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Výskyt *Campylobacter* spp.

Iva Juráková

Bakalářská práce

2012

Prohlášení:

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 22. 06. 2012

.....
Iva Juráková

Poděkování:

Ráda bych touto cestou poděkovala mé vedoucí bakalářské práce Ing. Petře Mořkové, Ph.D. za výběr tématu ke zpracování, za poskytnutí materiálů, ochotu a cenné rady, bez kterých by tato práce nevznikla. Dále bych chtěla poděkovat především svým blízkým, hlavně rodině, za jejich psychickou a nemalou finanční podporu během celého studia.

Anotace:

Bakalářská práce pojednává o výskytu rodu *Campylobacter*. V první části práce je charakterizován rod *Campylobacter*, druhá část popisuje výskyt jednotlivých druhů v prostředí vod, potravinách a u zvířat. Poslední část je zaměřena na detekci *Campylobacter* spp.

Klíčová slova: *Campylobacter* spp., výskyt, identifikace

Title: Occurrence of *Campylobacter* spp.

Annotation:

The thesis deals with the occurrence of *Campylobacter*. The first part characterizes the genus *Campylobacter*, the second part deals with the occurrence of individual species in the environment, water, food and animals. The last part is focused on the detection of *Campylobacter* spp.

Keywords: *Campylobacter* spp., occurrence, identification

Seznam zkratek

A	báze adeninová (Adenin base)
<i>A. castellanii</i>	<i>Acanthamoeba castellanii</i>
<i>AluI</i>	restriktáza získaná z <i>Azthrobacter luteus</i>
C	báze cytosinová (Cytosin base)
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
CDT	cytotoxin (cytolethal distending toxin)
CMS	selektivně diagnostický agar s aktivním uhlím podle Karmaliho (Charcoal- base selective medium dle Karmaliho)
CNW	kataláza negativní nebo slabě pozitivní druhy (Catalasa Negative or Weak positive strains)
EIA	enzymová imunoanalýza
ELISA	enzymová imunoanalýza na pevné fázi (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay)
FISH	fluorescenční in situ hybridizace (fluorescence in situ hybridization)
<i>Fla A</i>	flagelin A
G	báze guanidinu (Guanidin base)
<i>Hip O</i>	hipurikináza 47
ICG	plynová imunochromatografie
<i>map A</i>	membránový protein A
mCCDA	modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoloperazonem (Modified Charcol Cefoperazone Deoxycholate Agar)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)
<i>Omp 50</i>	protein vnější membrány
PCR	polymerázová řetězcová reakce (Polymerase Chain Reaction)
rRNA	ribozomální RNA (Ribosomal Ribonucleic Acid)
SDS	dodecylulfát sodný (sodium dodecylsulphate)

spp.	poddruh (subspecies)
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
T. pyriformis	<i>Tetrahymena pyriformis</i>
T	báze thymínová (Thymin base)
UV	ultrafialové záření (Ultraviolet)

Obsah

1. Úvod	9
2. Charakteristika rodu <i>Campylobacter</i>	10
2.1 Taxonomie	10
2.2 Patogeneze a projevy onemocnění	11
2.2.1 Antigeny na povrchu bakterií	13
2.2.2 <i>Campylobacter jejuni</i>	14
2.2.3 <i>Campylobacter coli</i>	14
2.2.4 <i>Campylobacter lari</i>	14
2.2.5 <i>Campylobacter upsaliensis</i>	15
2.2.6 Kampylobakterióza	15
2.3 Vlastnosti rodu <i>Campylobacter</i>	16
2.3.1 Morfologie	16
2.3.2 Biochemické vlastnosti	16
3. Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u různých matric	18
3.1 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u zvířat	18
3.1.1 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u drůbeže	18
3.1.2 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u skotu	19
3.1.3 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u koček a psů	20
3.1.4 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. u prasat	21
3.2. Kontaminace potravin rodem <i>Campylobacter</i>	22
3.2.1 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. v syrovém mléce	22
3.2.2 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. v mase	22
3.2.3 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. v ovoci a zelenině	22
3.2.4 Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. v mořských plodech	23
3.3 Snížení rizika kontaminace	23
3.4. Výskyt <i>Campylobacter</i> spp. ve vodě	24
4. Izolace kampylobakterů	25
4.1 Materiál	25
4.2 Průkaz kampylobakterů dle normy ČSN EN ISO 10272: 2006	25
4.2.1 Pomnožení a izolace kampylobakterů na selektivně diagnostických půdách	26
4.2.2 Konfirmace suspektních kolonií	27
4.3 Průkaz kampylobakterů pomocí filtrační metody	28

4.4 Moderní metody	29
4.4.1 Polymerázová řetězcová reakce	29
4.4.2 Real-time PCR	30
4.4.3 Multiplex PCR	31
4.4.4 Imunologické testy	32
4.5.4.1 Western Blot.....	32
4.5.4.2 Komerčně dodávané testy pro průkaz <i>Campylobacter</i> spp.....	33
4.5.4.3 Premier kempový a <i>Campylobacter</i> test	33
4.5.4.4 ImmunoCARD STAT	34
5. Závěr	35
Seznam použité literatury	36
Seznam obrázků	45
Seznam tabulek	46
Seznam grafů.....	47

1. Úvod

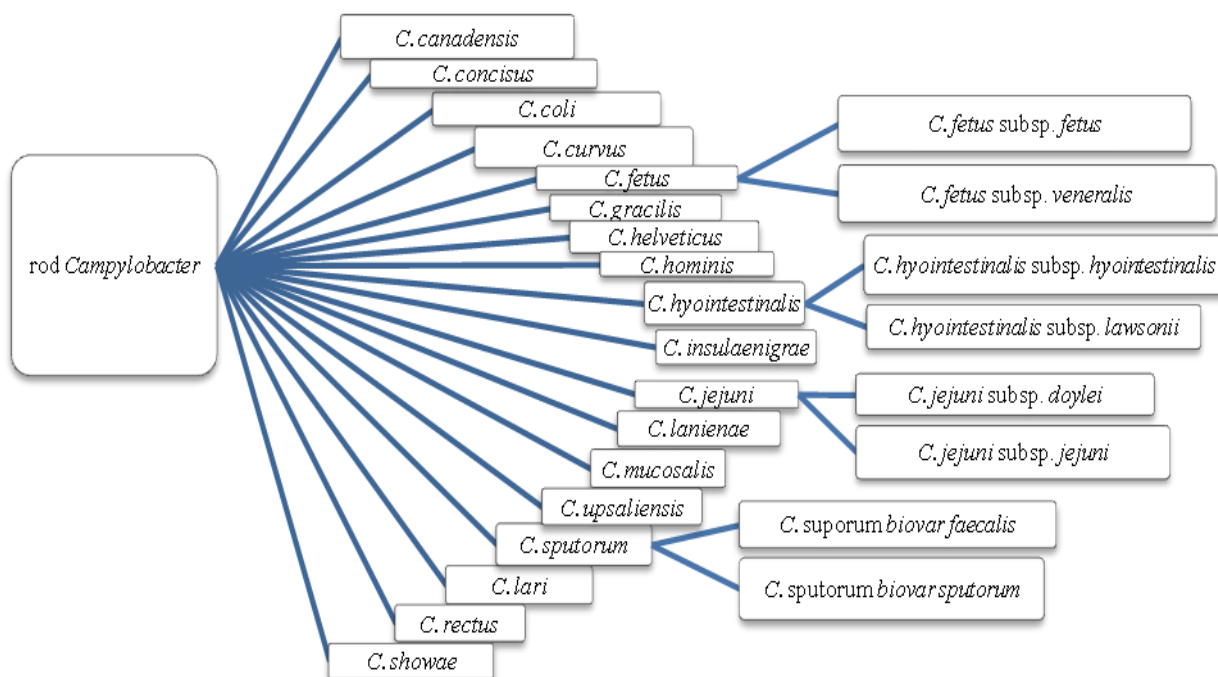
Campylobacter spp. je drobná bakterie rostoucí za mikroaerofilních podmínek a za vyšších teplot. Vyskytuje se nejčastěji jako přirozená mikroflóra střev kuřat, ale také se s bakteriemi rodu *Campylobacter* můžeme setkat ve vodách a potravinách. Ke kontaminaci člověka dochází nečastěji požitím kontaminované potraviny, ale existují i další cesty přenosu. K propuknutí infekce stačí pouze malá dávka bakterií. Příznaky kamylobakterové infekce jsou průjemy nebo u lidí se sníženou imunitou se objevují neurologické problémy.

V posledních 5 letech dochází ve vyspělých zemích ke zvýšenému výskytu kamylobakterií, což je způsobeno především stravováním v rychlém občerstvení, ale také díky pokroku detekčních metod pro *Campylobacter* spp.

2. Charakteristika rodu *Campylobacter*

2.1 Taxonomie

Kampylobaktery byly původně popsány jako zvířecí patogeny a byly zařazeny do rodu *Vibrio*. V roce 1947 Vinzent a kolektiv prokázali patogenitu těchto nových vibrií tím, že úspěšně izolovali *V. fetus* z krve gravidních žen, postižených dlouhodobým horečnatým onemocněním s následným spontánním potratem. O deset let později Kingová našla v krvi pacienta mikroorganismus, který morfoloicky odpovídal druhu *V. fetus*, avšak který se odlišoval svými biochemickými a antigenními vlastnostmi. Toto nové species označila termínem „related vibrio“. V roce 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*. 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*. Rod *Campylobacter* byl postupně rozšiřován a revidován, a v roce 1991 Vandamme a De Ley navrhli vytvořit novou čeleď *Campylobacteriaceae* (Hochel 2009; On 2001). Současná taxonomie zahrnuje do této čeledi 4 rody: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Dehalospirillum*, *Sulfurospirillum* (Sedláček 2007). Samotný rod *Campylobacter* je tvořen 18-ti genotypicky homologními druhy, zobrazení na obr. 1: *C. 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* (Hochel 2009).



Obrázek 1: Taxonomie rodu *Campylobacter* (upraveno dle Hochel 2009)

2.2 Patogeneze a projevy onemocnění

Rod *Campylobacter* způsobuje nejčastěji onemocnění přenášející se alimentárním způsobem. Toto onemocnění poškozuje převážně trávicí ústrojí. Hlavní cestu přenosu infekce je požití kontaminované potravy, mléka a masitých pokrmů. Tyto potraviny rychle procházejí kyselým prostředím žaludku, na které je *Campylobacter* spp. citlivý. Další možností přenosu infekce je kontakt s nakaženým zvířetem. Určité riziko hrozí i při cestování a ojediněle může k přenosu dojít sexuálním stykem (Bednář a kol. 1996; Greenwood et al. 1999; Durham 2006; Kalivodová 2011). Rozlišujeme kontaminaci primární - endogenní, kdy použitá potravina byla vyrobena z kontaminovaných surovin, např. masa nemocného zvířete a kontaminace sekundární - exogenní, kdy se mikroby do potravy dostali v průběhu zpracování (WHO 2011; Hrubý a kol. 1996).

Pokusy na dobrovolnících poukázaly na velmi nízkou infekční dávku, pohybující se v rozmezí již 8×10^2 buněk (Jičínská a Havlová 1995). Za běžnou infekční dávku je v dnešní době považován parametr 10^2 - 10^4 buněk.

Po průniku do trávicí soustavy putuje *Campylobacter* spp. do žluči, kde dochází k jeho pomnožení (Cupáková a kol. 2012). Flageární adhezín, virulenní faktor kamylobakterů způsobí přilnutí k epiteliálním buňkám v distální části slepého střeva a k tračníku v oblasti tlustého střeva. Díky spirálovitému tvaru *Campylobacter* spp. do buněk snadno pronikne a pomnoží se uvnitř epiteliálních vakuol. Zde začne produkovat

cytotoxin CDT (Ivanović 2008). Také hlavní imunogen buněčné stěny, membránový porin, se uplatňuje jako virulenční faktor (Ivanović 2008). Non-pohyblivé varianty *Campylobacter* spp. jsou mnohem méně virulentní (Bednář a kol. 1996; Cimolai 2001).

Výsledkem infekce rodem *Campylobacter* je poškození buněk, ztráta tekutin a vznik zánětu. Při závažných infekcích dochází k masivnímu krvácení do střeva (Bednář 1996). Projevem je nevolnost, bolesti svalů a hlavy, křeče obdobné jako u zánětu slepého střeva. Typickým projevem jsou střevní potíže, které můžeme řadit od lehkých sekrečních průjmů s vodnatou stolicí až k hemoragické kolitidě s horečkou, bolestmi břicha, stolicí s příměsí krve a hlenu, která může vést k masivnímu krvácení do střeva (Ambrožová 2010). Při histologickém vyšetření sliznice rekta a dolní části tlustého střeva je patrná infiltrace sliznice polymorfonukleárními leukocyty, edém a případně exulcerace (Bednář a kol. 1996; Cimolai 2001).

Někdy může alimentární nákaza vyústit i v sekundární neurologické problémy známé jako syndrom Guillian-Barré. Začíná několik týdnů po průjmových obtížích. Vznik syndromu Guillian-Barré spočívá v tom, že imunitní systém vytváří protilátky proti cizorodým buňkám *Campylobacter* spp., ale jelikož nervové buňky mají podobné chemické vlastnosti jako buňky *Campylobacter* spp., dochází k napadení a poškození vlastních struktur. Odhaduje se 1 případ na 1000 osob postižených kampylobakteriózou (Clark 2005). Dále se také může vyskytnout Miller Fisher syndrom, který se také řadí do skupiny neurologických postižení po kampylobakterové infekci. Do skupiny sekundárních problémů řadíme syndrom Reiterův způsobující zánět spojivek, močové trubice, pochvy a především reaktivní artritidu, která nejčastěji postihuje velké nosné klouby, jako jsou kolena a spodní část zad. Byly hlášeny případy meningitidy, cholecystitidy infekce močových cest a opakované záněty tlustého střeva (Kemp et al. 2005).

Doba trvání infekce je 3 – 5 dnů, někdy však až 10 dnů. V době zdánlivého ukončení může dojít k recidivě. Kampylobakter je vylučován stolicí ještě 6 týdnů po odeznění nemoci. Onemocnění se vyskytuje ve vyspělých zemích hlavně v létě a začátkem podzimu, ale můžeme se s ním setkat v průběhu celého roku (Havlík 2002). Onemocnění může končit úmrtím především u pacientů s oslabenou imunitou např. s onkologickým onemocněním, nemocemi jater a AIDS (Cupáková a kol. 2012; Clark 2005).

Infekce většinou sama odezní a nemusí být tedy léčena antibiotiky. Nicméně, můžeme podávat erytromycin pro zkrácení doby vylučování bakterií ve stolicí infikovaných lidí (U. S. Department 2012)

Zdroje kamylobakterů a nejčastěji vyvolaná onemocnění u člověka nebo zvířat uvádí tabulka 1.

Tabulka 1: Onemocnění vyvolaná, nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter* (Hochel 2009)

Tabulka I
Onemocnění vyvolaná, nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter*

Druh	Zdroj	Onemocnění	
		člověk	zvířata
<i>C. canadensis</i>	jeřáb bělohřbetý (<i>Grus americana</i>)	?	?
<i>C. coli</i>	prase, drůbež, skot, ovce ptáci	gastroenteritis, septikémie	gastroenteritis
<i>C. concisus</i>	člověk	nemoci dásní, gastroenteritis	žádné
<i>C. curvus</i>	člověk	nemoci dásní, gastroenteritis	žádné
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	skot, ovce	gastroenteritis, septikémie, potrat	spontánní aborty skotu a ovcí
<i>C. fetus subsp. venerealis</i>	skot	septikémie	infekční sterilita skotu
<i>C. gracilis</i>	člověk	nemoci dásní, empyema, absces	žádné
<i>C. helveticus</i>	kočka, pes	žádné	gastroenteritis
<i>C. hominis</i>	člověk	gastroenteritis	?
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	prase, skot, křeček, vysoká zvěř	gastroenteritis	enteritis prasat a skotu
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>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. lari</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	nemoci dásní	žádné
<i>C. showae</i>	člověk	nemoci dásní	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

2.2.1 Antigeny na povrchu bakterií

U rodu *Campylobacter* se můžeme setkat se dvěma typy antigenů a to somatickým O-antigenem a bičíkovým H-antigenem. Na základě Pennerova schématu zařazujeme kamylobaktéry podle lipopolysacharidového antigenu do 65 sérotypů. Termolabilní povrchové bílkovinné bičíkové antigeny tvoří základ Liorova schématu, tvořeného asi 100 skupinami. Pro jemnější rozlišení kmenů lze použít k určení sérotypu obě schémata nebo lze jedno z nich kombinovat s biotypizací či fenotypizací (Greenwood et al. 1999).

Isoláty *C. jejuni* a *C. coli*, produkují enterotoxin. Vznik a průběh tohoto toxinu není zatím objasněn (Wilson et al. 2008; Greenwood et al. 1999).

2.2.2 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni je nejčastějším původcem průjmového onemocnění v Evropě a ve Spojených státech (Friis et al. 2010). Poprvé byl tento druh izolován z lidské stolice v roce 1972 (Waage et al. 1999). Kromě endogenního a exogenního přenosu infekce se *Campylobacter jejuni* může přenést z matky na dítě během těhotenství a vést ke smrti plodu (Ivanović 2008). *Campylobacter jejuni* se vyskytuje ve vodách, půdách a je součástí přirozené střevní flóry teplokrevných zvířat, převážně drůbeže, která však nevykazuje žádné příznaky onemocnění. Při závažných infekcích jsou podávána antibiotika např. makrolidy, aminoglikosidy nebo tetracykliny, ke kterým je *Campylobacter jejuni* citlivý (Votava a kol. 2010).

2.2.3 *Campylobacter coli*

Campylobacter coli je druhým nejčastějším původcem infekce pro člověka. Vyskytuje se v mléce, sýrech a ve střevní flóře teplokrevných zvířat, především prasat. *Campylobacter coli* stejně jako *Campylobacter jejuni* nezpůsobují klinické příznaky u dospělých zvířat. Výjimkou jsou potraty u přežvýkavců a velmi vzácné případy hepatitidy u pštrosů (OIE 2008).

Na prasečích farmách se *Campylobacter* spp. vyskytuje ve 20-40% a z tohoto celku tvoří až 90% *C. coli* (Steinhauserová a Fotíková 1999).

Campylobacter coli se vyznačuje zvýšenou rezistencí vůči širšímu spektru antibiotik (Gebreyes 2005).

2.2.4 *Campylobacter lari*

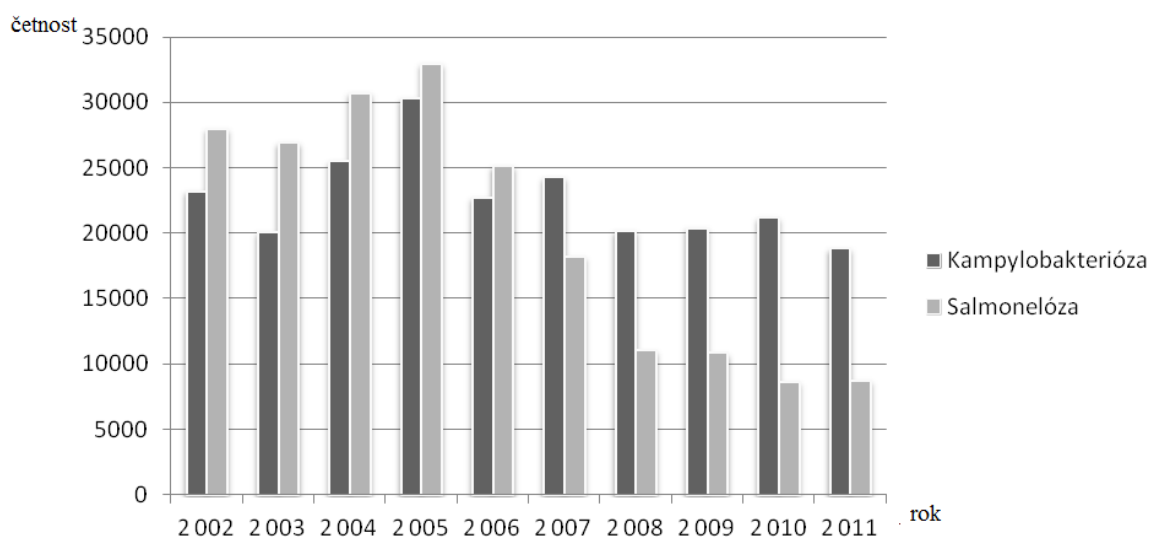
Dříve *Campylobacter laridis* patří do skupiny termofilních *Campylobacter* spp. a byl poprvé identifikován v roce 1980 ze vzorků získaných od racků. Druh *Campylobacter lari* může být izolován z vod a ze střevního obsahu ptáků, ale také z prasat, psů a jiných domácích i volně žijících zvířat. Výjimkou není ani výskyt u mořských živočichů, jako jsou mušle nebo ústřice. To může pro člověka představovat nebezpečí v případě konzumace produktů z těchto živočichů, pokud nebyly dostatečně tepelně ošetřeny. U člověka *Campylobacter lari* způsobuje nejčastěji enteritidy, gastroenteritidy a především u osob s oslabeným imunitním systémem i celková onemocnění (Steinhauserová et al. 2001).

2.2.5 *Campylobacter upsaliensis*

Byl poprvé izolován a popsán teprve v nedávné době. V roce 1983 byla zjištěna přítomnost nového kataláza negativního *Campylobacter* spp. u psů, kteří byli ošetřeni na veterinární klinice v Uppsale. Tento mikroorganismus byl původně zařazen do skupiny CNW (kataláza negativních nebo slabě pozitivních kmenů). V roce 1985 byly poprvé popsány CNW organismy i v lidské stolici. Na základě homologních studií bylo zjištěno, že se jedná o nový druh, který byl pojmenován podle místa, kde byl poprvé popsán, jako *Campylobacter upsaliensis*. V dalších letech byl *Campylobacter upsaliensis* stále častěji izolován od zvířat a zřídka z humánních vzorků a byl tedy potvrzen jako humánní enteropatogen (Steinhauserová a kol. 2001).

2.2.6 Kampylobakterióza

Kampylobakterióza je akutní střevní onemocnění, které je přenášeno na člověka ze zvířat nebo živočišných produktů. Nejčastějším původcem kampylobakterióz u člověka je *Campylobacter jejuni* (WHO 2011). Počet případů kampylobakterióz v České republice v roce 2007 stoupl natolik, že převýšil počet onemocnění způsobené rodem *Salmonella* (graf 1).

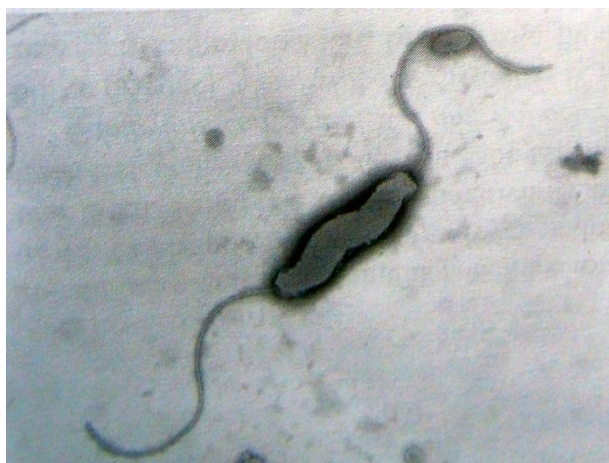


Graf 1: Hlášený výskyt kampylobakterióz a salmonelóz v letech 2002-2011 (EPIDAT 2012)

2.3 Vlastnosti rodu *Campylobacter*

2.3.1 Morfologie

Rod *Campylobacter* řadíme do čeledi *Campylobacteriaceae*. Jedná se o štíhlé zahnuté gramnegativní tyčinky ve tvaru písmena S o průměru 0.2 až 0.4 μm a o délce 1.5 až 5 μm (obr. 2). Většina kmenů má na povrchu několik polárních bičíků, které umožňují rotační pohyb a tím se řadí k nepohyblivějším bakteriím. Tento pohyb, spolu s tvarem buňky, usnadňuje průnik vrstvou hlenu na povrchu střev (Greenwood et al 1999). Ostatní druhy, jako je *C. gracilis*, jsou nepohyblivé, nebo jsou naopak vybaveny mnohonásobnými bičíky (*C. showae*). Nesporulují, za nepříznivých podmínek *Campylobacter* spp. získává kokoidní tvar (OIE 2008; FAO/WHO 2009; Hochel 2009).



Obrázek 2: *Campylobacter jejuni* v elektronoptickém znázornění s jedním polárním bičíkem; zvětšení 11500x (Greenwood et al. 1999).

2.3.2 Biochemické vlastnosti

Zástupci z rodu *Campylobacter*, nemají schopnost fermentace ani oxidace sacharidů, netvoří z tryptofanu indol, ale dokáží redukovat dusičnany, ne však dusitany (Cupáková a kol. 2012). Metabolismus je respiratorního typu, tvoří i katalázu (Greenwood et al. 1999). S výjimkou *Campylobacter gracilis* a některých kmenů *Campylobacter concisus* a *Campylobacter showae* vykazují pozitivní oxidázovou aktivitu. energii získávají z metabolismu aminokyselin a z metabolismu intermediátů trikarboxylových kyselin. Nehydrolyzují tyrosin, kasein, škrob, ani želatinu. Test na produkci acetoinu (Voges-Proscauer Test) a test na tvorbu kyseliny (Methyl Red Test) jsou negativní.

Campylobacter jejuni a některé kmeny *Campylobacter curvus* jsou schopny hydrolyzovat hippurát, což je velmi důležité k odlišení od ostatních kmenů. Žádný kmen rodu *Campylobacter* nevytváří pigment (Hochel 2009).

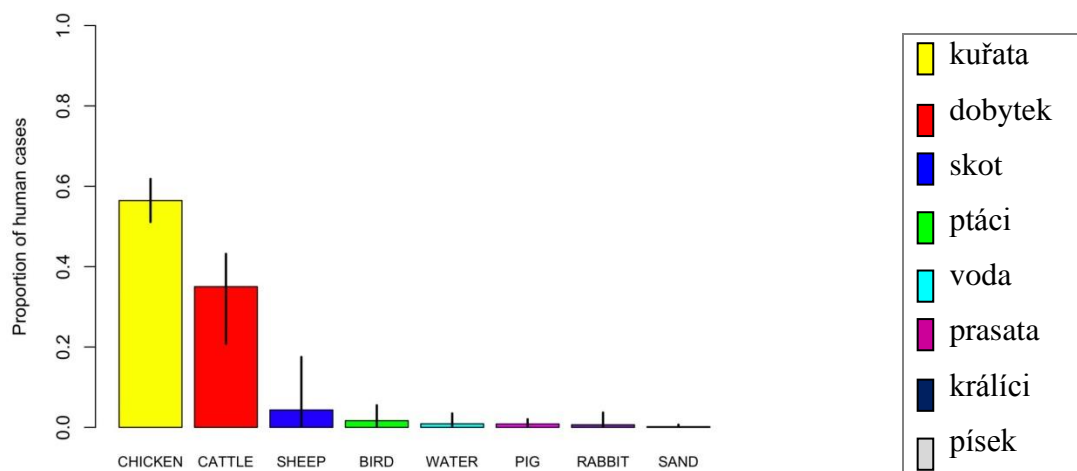
Rod *Campylobacter* je citlivý ke kyslíku a k superoxidům, kyslík však k růstu potřebují. Pro kultivaci musí být zajištěny mikroaerofilní podmínky. Optimální atmosféra, pro růst je směs 5% O₂, 10% CO₂ a 85% N₂. Optimální teplotou pro růst rodu *Campylobacter* je 37°C až 43°C. Nerostou při teplotě 25°C a minimální teplota růstu je 30°C. Nepřežívají pasterační záhřev po dobu 16.2 s při teplotě vyšší než 63°C. Při skladování potravin při ledničkové teplotě 4°C dochází ke snížení koncentrace bakterií ne však k vyhubení a zbavení životaschopnosti. Životaschopnost v potravinách při skladování při teplotě 4°C je v rámci několika týdnů a při zmrazení několik měsíců. Optimální pH je v rozmezí 6.5-7.5; minimální je pH 4.9. Při stejných hodnotách pH kyselina mléčná inhibuje růst *Campylobacter* spp. více než kyselina chlorovodíková (Cupáková a kol. 2012). *Campylobacter* spp. je vysoce náchylný k vyschnutí. Nerostou při koncentraci NaCl v prostředí 1,5 až 20% (Wilson et al. 2008; Eboer 2003; Cimolai 2001; FAO/WHO 2009). Celosvětově rozšířená rezistence k fluorochinolonům a makrolidům je především u izolátů *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* z drůbežích chovů (Cupáková a kol. 2012).

3. Výskyt *Campylobacter* spp. u různých matric

3.1 Výskyt *Campylobacter* spp. u zvířat

3.1.1 Výskyt *Campylobacter* spp. u drůbeže

Campylobacter spp. se vyskytuje běžně u zdravých domácích a divokých zvířat, včetně skotu, ovcí, koz, prasat, kuřat, kachen, hus a divokých ptáků, psů, koček, hlodavců a mořských savců. Bakterie obvykle žijí ve střevech jako přirozená flóra a jsou vylučovány ve stolici (Clark 2005). Drůbež a dobytek jsou nejčastějším zdrojem infekce pro lidi, zatímco divoká zvěř a prostředí představují nižší riziko infekce. Porovnání představuje graf 2. Příprava a konzumace kontaminovaného masa hospodářských zvířat a drůbeže je dominantní cestou přenosu. Drůbež odpovídá za 92% onemocnění (Wilson et al. 2008).



Graf 2: Onemocnění způsobené druhem *Campylobacter jejuni* z různých zdrojů (Wilson et al. 2008).

Brojleři, kuřata, kachny, husy a divocí ptáci jsou běžně považovány za přirozené hostitele pro patogenní druh *C. jejuni* a méně často *C. coli* (Clark 2005). V 1g stolice brojlerů je běžně kolem 10^7 buněk bakterií (Herman et al. 2011).

Drůbež se kontaminuje na farmách po požití vody nebo potravin, obsahující bakterii *Campylobacter jejuni*. Po požití tohoto kmene dochází k pomnožení v tenkém

střevě drůbeže po dobu 24 hodin. Nejčastěji jsou kolonizovány hejna od věku dvou až čtyř týdnů, protože do té doby jsou přítomny mateřské protilátky, které zajišťují imunitu proti kamylobakterům. Ke kolonizaci dochází během několika dnů a drůbež zůstane infikovaná až do porážky (Herman et al. 2011).

Ke kontaminaci drůbeže dochází při technickém zpracování, kde prvním krokem procesu představuje paření při teplotě vody kolem 60°C. Tato teplota však není dostatečná k usmrcení patogenních mikroorganismů. *Campylobacter* spp. je velmi citlivý k působení teploty, ale organické nečistoty jako krev, zbytky peří, trusu apod. působí na mikroorganismy jako ochranný obal a ty pak přežívají i vyšší teploty než za laboratorních podmínek. Poté následuje druhý technologický krok, který může být také rizikový a to škubání, při kterém je *Campylobacter* spp. rozšířen z povrchu drůbeže na prsty škubače. Škubač může jednak kontaminovat okolí, jednak vzniklý aerosol může představovat riziko onemocnění pro personál. Třetím rizikovým krokem může být odstranění vole, které je osídlováno *C. jejuni*, a tedy při odstranění této části může docházet ke kontaminaci povrchu. Asi třetina kuřat v obchodech je kontaminována kamylobaktery (Hermans et al. 2011; OIE 2008).

Dalším způsobem kontaminace je transport v přepravkách, které nebyly dostatečně desinfikovány (Humphrey et al. 2001). Na povrchu kuřat jsou vytvořeny vhodné podmínky pro přežívání *C. jejuni*. Jedná se především o pérové folikuly, které udržují vhodnou vlhkost a snížení přístupu kyslíku díky vakuovanému balení usnadňující přežívání tohoto patogenu (Steinhausarová a Bořilová 2008).

Hlavním rizikovým faktorem pro kontaminaci je nedodržení hygieny např. mytí a desinfekce rukou, nádobí a povrchů v průmyslovém zařízení pro zpracování produktů z drůbeže, ale i v kuchyních kde jsou zdroji kamylobakterů syrové maso, které není dostatečně tepelně upraveno a vnitřnosti především kuřecí játra (Humphrey et al., 2001; Greenwood et al. 1999).

Brojleři jsou ve vyspělých zemích zcela jistě nejvýznamnějším zdrojem lidských onemocnění.

3.1.2 Výskyt *Campylobacter* spp. u skotu

V menší míře můžeme ze stolice zdravých ovcí izolovat dva druhy, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, kteří způsobují sterilitu, potrat, úbytek na hmotnosti a poporodní úmrtnost ovcí (Clark 2005; Hvidalová 2005). Výskyt *Campylobacter* spp. u zdravých jehňat poukazuje na potenciální zdroj nákazy pro člověka (Ivanović 2008).

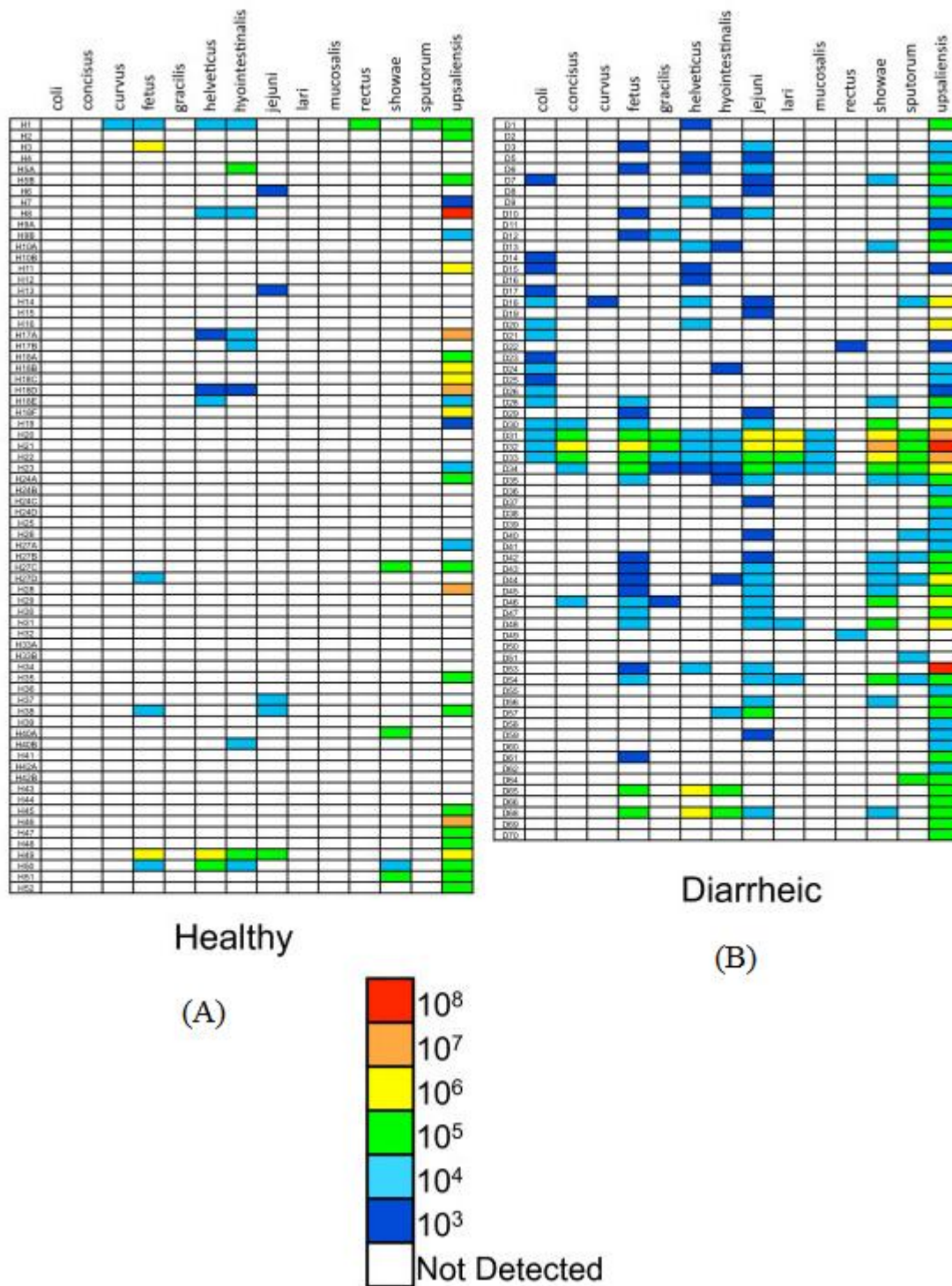
Campylobacter spp. můžeme naleznout v játrech a ve vnitřních částech klinicky zdravého jatečného jehněčího a *Campylobacter coli* ve hlubokých částech masa (Hvízdalová 2005).

Ke kontaminaci potravin dochází během porážky, technologického procesu, porcování, vykostování a skladování, kdy se pomnoží patogeny.

Člověk je kontaminován nejčastěji požitím kontaminovaného málo tepelně opracovaného jehněčího masa. Jisté riziko kontaminace představují profesionální nákazy pastevců a veterinářů způsobená přímým kontaktem s infikovaným nedonošeným ovčím plodem, plodovou vodou nebo infikovanou placentou (Hvízdalová 2005).

3.1.3 Výskyt *Campylobacter* spp. u koček a psů

Campylobacter uppsaliensis může být izolován z psů a koček (Havlík 2002). Při krmení domácích zvířat syrovým infikovaným masem, vzniká riziko kontaminace domácích zvířat (Hvízdalová 2005). Poté dochází k onemocnění lidí, především dětí, které si s těmito domácími mazlíčky hrají a přicházejí do velmi úzkého kontaktu. K vyvolání onemocnění kampylobakteriózou u dětí stačí také velmi nízká infekční dávka. *Campylobacter* spp. se vyskytují jak u psů bez příznaků kampylobakteriózy (obr. 3), tak u psů s příznaky kampylobakteriózy (Steinhauserová a kol. 2001, Chaban et al., 2010).



Obrázek 3: Výskyt jednotlivých druhů kampylobakterů u zdravých psů (A) a u psů s průjemem (B); (Chaban et al., 2010).

3.1.4 Výskyt *Campylobacter* spp. u prasat

Prasata jsou nejčastěji kontaminována kmeny *Campylobacter coli* a *Campylobacter hyointestinalis* (Havlík 2002). U klinicky zdravých prasat izolujeme *Campylobacter* spp.

ze slepého střeva, pobřišnice a žluče (Ivanović 2008). Ke kolonizaci střevní sliznice u selat dochází 24-48 dní po narození a ve věku 9-14 dní mohou již *Campylobacter* spp. vylučovat (Steinhauserová a kol. 2001).

Dosud není jasné, zda se *Campylobacter* spp. přenáší na selata stolicí nebo v souvislosti s kojením (Steinhauserová a kol. 2001). Ke snížení kontaminace rodem *Campylobacter* na jatkách se využívají chladírenské komory s teplotou -12°C , vzduchotechnikou s nedostatkem vlhkosti, která vede k sušení očištěné kůže (Ivanović 2008).

3.2. Kontaminace potravin rodem *Campylobacter*

3.2.1 Výskyt *Campylobacter* spp. v syrovém mléce

Ke kontaminaci syrového mléka dochází buď nepřímo při dojení, kdy se jedná o fekální znečištění z prostředí, nebo přímo z kampylobakterií zvaných zánětů vemene (Wilson et al. 2008; Eboer 2003). Vznik hromadného onemocnění může být také způsoben přenesením kampylobakterů do potravin a pokrmů, které se dále tepelně nezpracovávají, např. mléko a mléčné výrobky, uzeniny, zákusky, kozí sýry (Wilson et al. 2008; Havlík 2002). Jedná se obvykle o krátkodobou křížovou kontaminaci. *Campylobacter* spp. se při pokojové teplotě v potravině nepomnoží (Wilson et al. 2008).

Campylobacter spp. nenalezneme v sušených výrobcích jako například v sušeném mléce, neboť je citlivý na vyschnutí.

3.2.2 Výskyt *Campylobacter* spp. v mase

Maso jehněčí, vepřové a kuřecí je velmi často kontaminováno zástupci rodu *Campylobacter*. Ke kontaminaci masa dochází při křížové kontaminaci, stykem se znečištěným kuchyňským náčiním či vodou (Havlík 2002). K přenosu infekce na lidi pak dochází při požití málo tepelně opracovaného masa v rychlých občerstveních, jídelnách a kuchyních (Hvízďalová 2005; Cupáková a kol. 2012).

3.2.3 Výskyt *Campylobacter* spp. v ovoci a zelenině

Ke kontaminaci ovoce a zeleniny dochází vlivem znečištěné půdy prostřednictvím výkalů zvířat (Clark 2005; Havlík 2002).

3.2.4 Výskyt *Campylobacter* spp. v mořských plodech

Existuje jen málo údajů o výskytu *Campylobacter* spp. v akvakultuře, ačkoli používání surových hnojiv pro hnojení rybníků může představovat riziko pro veřejné zdraví ve vnitrozemských a pobřežních státech. *Campylobacter* spp. můžeme pozorovat u měkkýšů, krevet, ústřic a krabího masa (Steinhauserová 1998).

Výzkum, který se zabýval výskytem *Campylobacter* spp. u měkkýšů na území Irska poukázal na prevalenci 42% pozitivních výsledků z 380 měkkýšů (Feldhusen 2000). Ve většině případů se jednalo o nepatogenní kmeny, ale byly pozorovány i kmeny *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni*, které představují riziko onemocnění při konzumaci syrových produktů např. ústřic (Steinhauserová 1998).

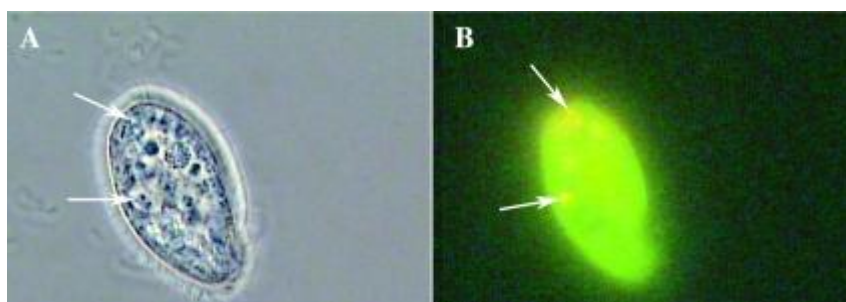
3.3 Snížení rizika kontaminace

Ve státech EU je vypracována koncepce snižování výskytu *Campylobacter* spp. na farmách, podobně jako je tomu u salmonel. Jedná se především o vypracování zásad správné výrobní praxe, důkladné dezinfekce a kontroly její účinnosti (Cupáková a kol. 2012). Důležitý je i systém vstupu pracovníků do hal, kde je chovaná drůbež. Do těchto prostor mají přístup jen zaměstnanci, kteří musí projít hygienickou smyčkou, aby se zabránilo přenosu původce na obuvi nebo oděvech pracovníků. Do prostorů hal nesmí mít přístup volně žijící nebo domácí zvířata a žádná jiná zvířata by se neměla chovat ani v blízkosti farmy. Důležitá je také kontrola pitné vody a zabránění přístupu hlodavcům a ptákům do hal. V okolí farem je nutné udržovat pořádek, což znamená, že nikde nesmí být zbytky krmiva, přístupové cesty musí být zpevněné a čistitelné, v okolí musí být vysekaná tráva (Hermans et al. 2011). Snížení kontaminace kampylobakterů lze dosáhnout sprchováním a chlazením drůbežích výrobků (OIE 2008). Ke snížení kontaminace v potravinách napomáhá také ozařování (Evens et al. 2003). K účinné inaktivaci kampylobakterů v mléce a výrobcích z pasterovaného mléka postačuje pasterizace s výdrží delší než 16.5 s při teplotě vyšší než 65°C (Wilson et al. 2008).

Syrové maso a drůbež by měli být dostatečně dlouhou dobu vařeny. Po manipulaci se syrovými potravinami je nutné dodržovat hygienické předpisy jako je důkladné mytí rukou mýdlem, mytí a desinfekce pracovní plochy a musí být vyhrazeny krájecí desky pouze pro zpracování syrového masa (Butzler 2004; Humphrey et al. 2001). *Campylobacter* spp. je citlivý k desinfekčním prostředkům obsahující chlornan sodný, fenolové směsi, amonné směsi, etanol a glutaraldehyd (Ivanocić 2008).

3.4. Výskyt *Campylobacter* spp. ve vodě

Voda, která je kontaminovaná rodem *Campylobacter*, přišla do kontaktu s lidskými nebo zvířecími výkaly či zbytky živočichů, kteří obsahovali patogenní bakterie (Kožíšek a kol. 2006). *Campylobacter* spp. může v mořských vodách přežít, ale jen velmi krátce. *Campylobacter* spp. byl detekován v řekách, mořích, podzemních pramenech, ale i v biologicky čištěných odpadních vodách (Baudišová a Benáková 2011). Zvýšený výskyt kampylobakterů ve vodě je v období pozdního jara a léta dále na začátku podzimu (Waage et al. 1999; Thomas et al. 2002). Kromě volných bakterií ve vodních systémech existují také bakterie přilnuté k sedimentu nebo pohlčené v biofilmu na ponořených površích (např. kámen). Biofilm se obvykle skládá z bakterií, hub, řas, prvoků (např. *T. pyriformis* a *A. castellanii*), které mohou obsahovat potenciální lidské patogeny, např. *C. jejuni* (obr. 4). *C. jejuni* obsažen v prvoku *T. pyriformis* je až 50x odolnější k desinfekci, než samotně se vyskytující *C. jejuni* ve vodách (Snelling et al. 2005).



Obrázek 4: Mikroskopický preparát *T. pyriformis* s *C. jejuni* obarvený barvivem Baclight (Snelling et al. 2005)

Popis obrázku: Zvětšení, 100 ×. Šipky ukazují vakuoly *T. pyriformis* obsahující životaschopné a neporušené buňky *C. jejuni* (A, B). Fluorescenční obraz životaschopných buněk *C. jejuni* (zelená barva) v *T. pyriformis* (B).

Kontaminaci vody lze snížit pomocí snížení pozemního hnojení. Doporučuje se pít balená voda, aby bylo sníženo riziko kontaminace (Chinivasagam et al. 2009; Evans et al. 2003).

4. Izolace kampylobakterů

4.1 Materiál

Pro průkaz *Campylobacter* spp. používáme materiál z rektálního výtěru klinicky nemocných psů, koček, prasat a také od pacientů trpících enteritidami. Získaný materiál transportujeme v Amies půdě. Prevalenci výskytu jednotlivých druhů znázorňuje tab. 2 (Steinhauserová a kol. 2001).

Tabulka 2: Izolace *Campylobacter* spp. z různých materiálů (Steinhauserová a kol. 2001).

	Celkem izolováno kmenů	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. upsaliensis</i>	<i>C. lari</i>
Z lidského materiálu	88	62	28		
Izolace ze psů a koček	51	27	9	13	2
Izolace z prasat	63	3	40	5	15

Pokud se objeví příznaky kampylobakteriózy u pacientů, dochází k sestavení harmonogramu, kterým odhalí, co kampylobakteriózu vyvolalo. Pokud se jedná o potraviny nebo vodu, musí se potravina, voda vyšetřit na přítomnost *Campylobacter* spp. a popřípadě dochází ke stažení výrobků z prodejních pultů. Hygienická služba provádí důkladné prošetření, zda ke kontaminaci nedošlo při zpracování.

Vzoroky musíme zpracovávat co nejdříve vzhledem ke speciálním nárokům na přežívání *Campylobacter* spp. (Bořilová a kol. 2008). Kampylobaktery je možné izolovat jednak filtrační metodou nebo kultivací na selektivních médiích, které jsou obohaceny antibiotiky a brání růstu doprovodné mikroflóry (Hochel 2009).

4.2 Průkaz kampylobakterů dle normy ČSN EN ISO 10272: 2006

Průkaz termotolerantních kampylobakterů se z potravin, krmiv, vzorků z prostředí potravinářských výroben i prostorů provádí podle normy ČSN EN ISO 10272: 2006 (Cupáková a kol. 2012; Bořilová a kol. 2008; EN ISO 2006; ISO/TS 10272: 2010).

4.2.1 Pomnožení a izolace kampylobakterů na selektivně diagnostických půdách

K pomnožení kampylobakterů využíváme selektivní tekuté bujóny podle Boltona obsahující 5% koňskou krev, vankomycin, trimetoprim a amfotericin B. Bujón s kulturou kultivujeme za mikroaerofilních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 4-6 hodin a poté při teplotě 41.5 °C po dobu 44-48 hodin (Hochel 2009; ISO/TS 10272: 2010, Vyletěllová a kol. 2011). Poté následuje naočkování a izolace pomnožené kultury z bujónu na selektivní kultivační média.

Můžeme použít dva typy selektivních médií. Prvním typem jsou selektivní půdy obohacené beraní nebo koňskou krví. Mezi tyto média řadíme selektivní médium podle Butzlera a krevní agar podle Skirrowa. Selektivní médium, podle Butzlera obsahuje 7% koňské krve a potlačení doprovodné flóry zajišťuje novobicin, kolistin, cefazolin, bacitracin a cykloheximid. Krevní agar podle Skirrowa obsahuje 5-7% koňské nebo 10% beraní krve a pro inhibici doprovodné flóry polymyxin B, vankomycin a trimethoprim.

Druhý typ selektivních půd představují mCCDA (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem) a CSM medium (selektivní médium s aktivním uhlím podle Karmaliho). Tyto média neobsahují krev ale jejich důležitou složkou je pyruvát sodný a aktivní uhlí, které zvyšuje toleranci izolovaných bakterií k toxickému účinku kyslíku a odstraňuje toxické metabolity. Selektivitu pro mCCDA médium zajišťuje deoxycholát sodný, cefoperazon, amfotericin B a u CSM média cefoperazon, vankomycin a cykloheximid (Votava 2010; Mosio 2012).

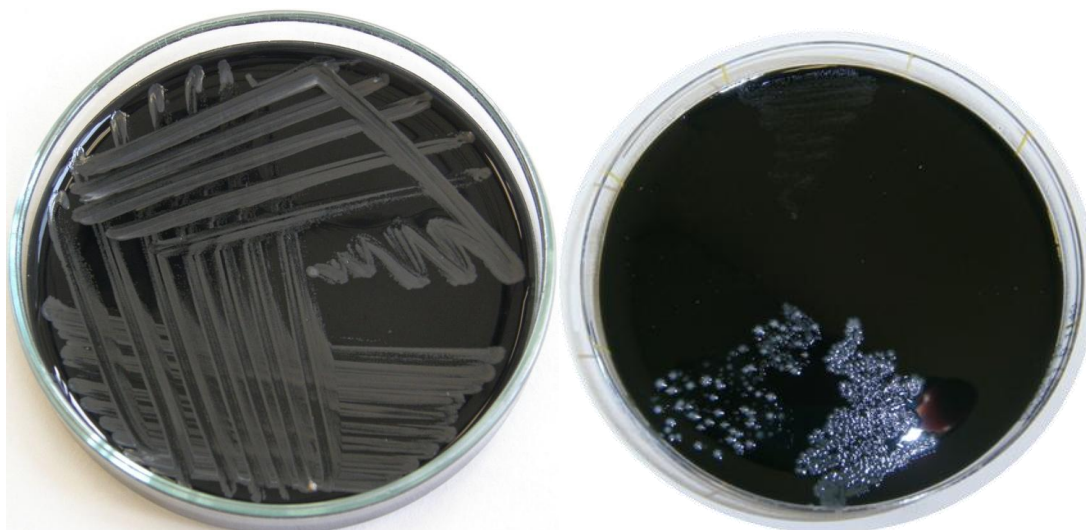
Bohužel žádné z těchto médií nepodporuje růst všech druhů kampylobakterů (Hochel 2009). Selektivní média nejsou vhodná pro izolaci *C. upsaliensis* (Steinhauserová a kol. 2001). Steinhauserová a kolektiv se v roce 2001 zabývali izolací a kultivací *C. upsaliensis* a zjistili, že je *C. upsaliensis* citlivý ke kyselině nalidixové a ve většině případů i k cephalotinu, který je součástí selektivních médií. *C. upsaliensis* je méně inhibován cefoperazonem než cephalotinem, a proto pro izolaci připravili médium obsahující cefoperazon (8 µg/ml), amfotericin (10 µg/ml) a teicoplanin (4 µg/ml), které se přidává do základu mCCDA média. Citlivost média závisí na hodnotě MIC (minimální inhibiční koncentrace) jednotlivých kmenů k cefoperazonu.

Půdy s kulturou se inkubují v anaerostatu, který zajišťuje mikroaerofilní prostředí 5 % O₂, 10 % CO₂ a 85 % N₂. Teplota pro inkubaci termofilních kampylobakterií je 42°C a pro mezofilní druhy 37°C. Kultivace trvá 44 ± 4 hodiny (Cupáková a kol. 2012; Bořilová a kol. 2008; Hochel 2009).

Campylobacter spp. na selektivních půdách roste v drobných, šedých, mírně slizovitých koloniích o průměru 1 až 3 mm. (Whittier et al. 2010; Hughes et al. 2009). Morfologii kolonií lze využít, jako vodítko k identifikaci druhu.

Kmeny *Campylobacter jejuni* vytvářejí šedé, vlhké ploché plazovitě se táhnoucí kolonie. Některé kmeny mohou mít suchý vzhled, nebo mohou být bez kovového lesku. *Campylobacter coli* roste na selektivním médiu v drobných koloniích, které mají krémově šedou barvu. Jsou vlhké a jsou mírně vypouklé (Speegle et al. 2009).

Izolované kolonie jsou pak dále charakterizovány pomocí předepsaných biochemických testů (Hochel 2009).



Obrázek 5: Kultivace *Campylobacter* spp.

Popis obrázku: *Campylobacter* spp. na mCCDA agaru (vlevo), *Campylobacter* spp. na Karmaliho agaru (vpravo); (Whittier et al. 2010; Hughes et al. 2009)

4.2.2 Konfirmace suspektních kolonií

Campylobacter spp. lze barvit metodou dle Grama, kdy pod světelným mikroskopem vidíme bakterie jako gram negativní, červené tyčinky tvaru písmena S a v zástinové mikroskopii lze pozorovat jejich pohyblivost. Další identifikací je pozitivní průkaz oxidázy, neschopnost růstu za mikroaerofilních podmínek při teplotě 25 °C nebo neschopnost růstu v aerobních podmínkách za teploty 42 °C. K druhové identifikaci lze využít průkaz katalázy, stanovení citlivosti ke kyselině nalidixové a cephalotinu, průkaz hydrolýzy hippurátu sodného a indoxyl acetátu, produkce sirovodíku na TSI médiu

jak uvádí tabulka 3 (Cupáková a kol. 2012; Bořilová a kol. 2008; Steinhauserová a kol. 2001).

Biochemická aktivita je slabá a správná diagnostika na základě fenotypových znaků je tedy dosti problematická (Steinhauserová a kol. 2001). Nejdůležitějším fenotypovým rozlišovacím testem je schopnost hydrolýzy hippurátu, který je pozitivní pouze u *C. jejuni* (Steinhauserová a kol. 2001).

Tabulka 3: Biochemická a kultivační odlišnost jednotlivých druhů *Campylobacter* spp. (Eboer 2003; Holt 1994).

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Růst při 25°C	-	-	-	-
Růst při 42°C	+	+	+	+
Růst při 15°C	-	-	-	-
Hydrolýza hippurátu sodného	+	-	-	-
Kataláza	+	+	+	-
Hydrolýza indoxyl acetát	+	+	-	+
Kyselina nalidixová	C	C	R	C
cephalotin	R	R	R	C
NaCl 1.5%	-	-	+	-
Produkce H ₂ S	-	-		-

Pozitivní +, negativní -, C – citlivý, R – rezistentní

Nevýhodou kultivační metody je rychlost samotné detekce, která je časově náročná, v řádu několika dní. Proto jsou vyvíjeny a validovány rychlé molekulárně-genetické metody, umožňující detekci patogenních mikroorganismů bez nutnosti jejich izolace, pouze na základě přítomnosti jeho DNA (případně mRNA) ve vzorku.

4.3 Průkaz kampylobakterů pomocí filtrační metody

Filtrační metody jsou používány především pro testování klinického materiálu, který je bohatý na vitální buňky kampylobakterií. Využívá se aktivní pohyb a morfologie štíhlých tyčinek, které snadno projdou filtrem, zatímco jiné mikroorganismy jsou zachycovány na filtru. Sterilní filtr je zhotoven z acet-celulózy a velikost pórů je 0.45 µm – 0.65 µm (ISO/TS 10272-3: 2010; Hochel 2009,

Speegle et al. 2009). Vzniklý filtrát je naočkován na Petriho misku se selektivním nebo neselektivním médiem (Granato et al. 2010).

Druhým typem membránové filtrace je umístění filtru na neselektivní popř. selektivní krevní agar. Na filtr se aplikuje 10-12 kapek vzorku rozmělněného ve fyziologickém roztoku (Hochel 2009). Médium se inkubuje za mikroaerofilních podmínek (24 hodin při 42°C) a poté provádíme konfirmační testy (oxidáza a kataláza). Mikroskopicky ověřujeme typický pohyb kamylobakterů v zástinu. Vybrané izoláty dále ověřujeme metodou fluorescenční in situ hybridizace (FISH), se sondou 5'-GCC CTA AGC GTC CTT CCA-3'. Odpadní voda obsahuje průměrně stovky termofilních kamylobakterů v 1 ml, biologicky čištěná odpadní voda zhruba o dva řády méně.

4.4 Moderní metody

4.4.1 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) využívá amplifikace (zmnožení) hledané DNA. Metoda je založena na opakovaných cyklech tří jednoduchých reakcí.

Prvním krokem je rozpletení dvojité šroubovice hledané DNA na jednotlivá izolovaná vlákna pomocí zahřátí (denaturace) při teplotě okolo 94°C. Po ochlazení následuje druhý krok v podobě připojení dvou syntetických krátkých vláken (primery) na vlákno při teplotě v rozmezí nejčastěji 50-60°C. Primery jsou komplementární ke specifickým místům na vláknech DNA a dochází tak k ohraničení místa, které má být amplifikováno. Třetím a zároveň posledním krokem v cyklu je prodlužování vlákna a vytváří se tak kopie DNA. Tento děj probíhá v přítomnosti enzymu *Taq* polymerázy a přebytku příslušných deoxyribonukleotidtrifosfátů při teplotě 72°C (Keramas et al. 2004; Votava a kol. 2010).

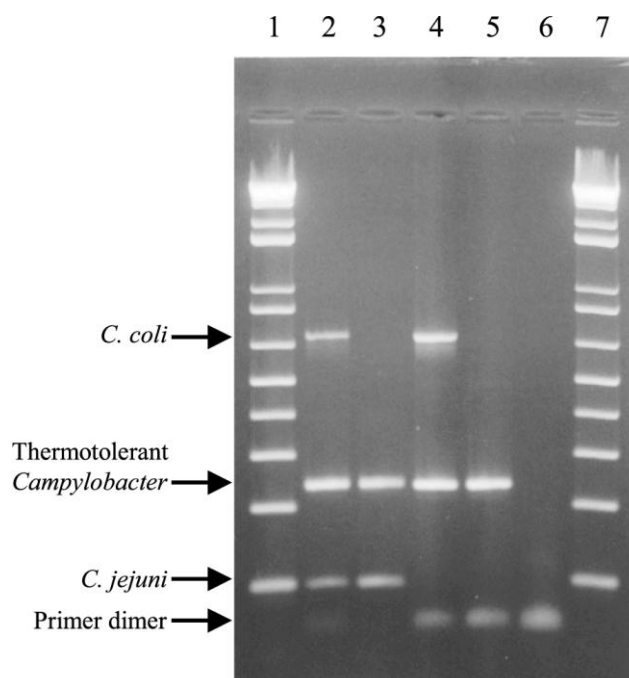
Všechny tři kroky probíhají v jedné zkumavce. Vzniklé kopie vláken slouží ke vzniku nových kopií při dalším cyklu. Amplifikovaná DNA je separovaná a vizualizována pomocí elektroforézy na agarosovém gelu s následným obarvením etidiumbromidem nebo jiným fluorescenčním barvivem (obr. 6). Gel prohlížíme pod UV světlem při vlnové délce 312 nm (Hochel 2009; Steinhauserová a kol. 1999; Votava a kol. 2010).

Pro diagnostiku se používá celá řada druhově nebo i rodově specifických primerů (Steinhauserová a kol. 2001). 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 nebo *mapA* pro membránový protein a technika PCR je pak založena na primerech odvozených z genu *flaA* kódující flagelin (Hochel 2009, Wang et al. 2002). Štěpení ampliconů *C. jejuni* pomocí *Alu I* prokázalo značný polymorfismus v délce restričních fragmentů.

Výhodou metody PCR je možnost prokázat antigeny přímo z potravin, menší časová náročnost a vysoká citlivost. Identifikace infekčního agens přímo z potravin je omezena, neboť složení potravin komplikuje izolaci bakteriální DNA (Steinhauserová a kol. 1999). Další výhodou metody PCR je možnost detekovat nejen živé bakterie, ale také nekultivované formy *Campylobacter* spp. a lze ji také využít při nejednoznačné typizaci (Steinhauserová a kol. 2001; Keramas et al. 2004). Metoda PCR má také svou nevýhodu a to díky vysoké citlivosti, kdy detekuje i mrtvé *Campylobacter* spp., které však infekci již nemůžou způsobovat.

V běžné praxi a diagnostice se však více využívají klasické fenotypové a kulturační metody a PCR metoda je pouze doplňkovou (Steinhauserová a kol. 2001).



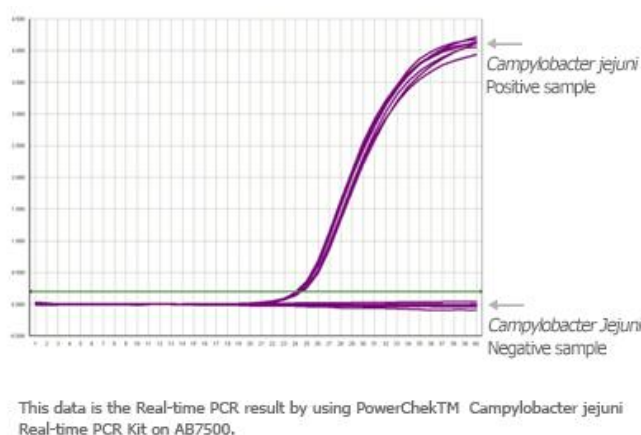
Obrázek 6: Vyhodnocení amplifikace fragmentů multiplex PCR (Wong et al. 2004).

4.4.2 Real-time PCR

Metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuální kvantifikaci DNA během každého cyklu (u klasického PCR se detekuje finální produkt elektroforézou). Amplifikovanou DNA detekujeme pomocí fluorescenčních sond

či barviv např. SYBR Green. Sada oligonukleotidových primerů a sond zesiluje reakci cílového genu (Snelling et al. 2005). Výsledkem reakce je intenzivní fluorescence, kterou detekujeme pomocí fotometru, který je zabudován v termocykléru (Whittier et al. 2010, Mičuda a kol. 2006).

Hlavní výhodou metody oproti "klasickému" PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj. z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství (obr. 7). Další výhodou je vysoká specifita a citlivost metody Real-time PCR (Mičuda a kol. 2006).

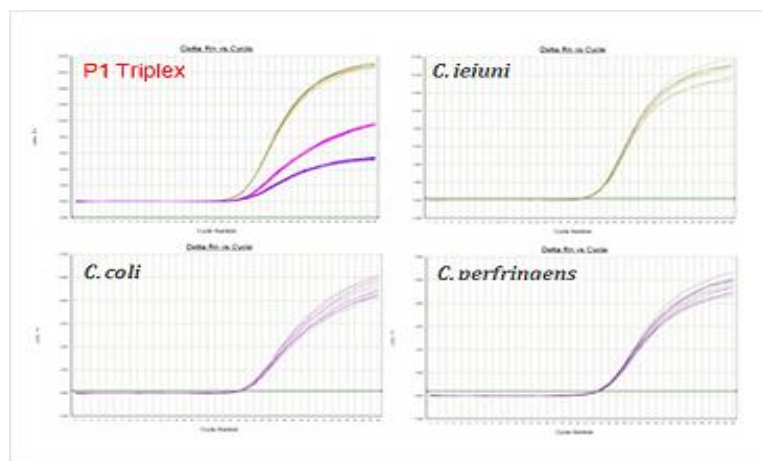


Obrázek 7: Záznam výsledku při použití Real-time PCR Kit, PowerChek™
Campylobacter jejuni;

<http://www.kogene.co.kr/eng/product/bacteria1.html> [cit. 8. 6. 2012]

4.4.3 Multiplex PCR

Metoda je založena na klasické PCR. Tato metoda využívá více druhově specifických genů, jako *omp 50*, 16S rRNA, 23S rRNA, *hip O*, *map A* pro odlišení jednotlivých druhů. Metoda je velmi rychlá z důvodu amplifikace v jedné zkumavce, kde několik párů primerů reaguje najednou a výsledkem je několik produktů najednou (Jamshidi et al. 2008).



Obrázek 8: Záznam výsledku při použití Real-time PCR kitu, PowerChek™ *Campylobacter* Triplex (*Campylobacter* spp., *jejuni*, *coli*);
http://www.kogene.co.kr/eng/product/bacteria3_1.html [cit. 8. 6. 2012]

4.4.4 Imunologické testy

Imunochemické metody představují alternativní techniky pro detekci kampylobakterů. Výhodou těchto metod je jejich jednoduchost, nízké náklady a možnost testovat velký počet vzorků. Jsou založeny na interakci antigenu se specifickou protilátkou. Všechny využívají latexových částic s imobilizovanými imunoglobuliny (Hochel 2009). Pro průkaz *Campylobacter* spp. jsou metody založeny na imunologických technikách např. enzymové imunoanalýze (EIA), enzymové imunoanalýze na pevné fázi (ELISA) imunochromatografii (ICG) a imunoanalytické technice Western blot (Velusamy et al. 2010).

4.5.4.1 Western Blot

Western blot je biochemická analytická metoda, která se používá k identifikaci specifického proteinu v komplexní směsi. Vazba protilátka-antigen umožňuje identifikaci jediného proteinu v heterogenní směsi bílkovin. Jedná se o komerčně dodávanou soupravu, která obsahuje potřebné reagenty a proužky obsahující antigen (Kalabusová 2009).

Proužek obsahující antigen se zhotovuje složitou cestou. Prvním krokem je rozdělení hrubého mikrobiálního antigenního preparátu na řadu složek. Antigenní preparát, který představuje ultrazvukem rozbitou suspenzi bakterií, se zahřívá s detergentem např. dodecylsulfátem sodným (SDS). SDS rozštěpí komplexní mikrobiální protein na jednotlivé polypeptidy a glykopeptidy. Tyto frakce se poté dělí na základě své molekulové hmotnosti pomocí elektroforézy v polyakrilamidovém gelu. V gelu tak vznikají okem neviditelné polypeptidové pruhy, odpovídající jednotlivým frakcím. Poté dochází k vlastnímu blotingu

(přenesení) polypeptidových pruhů z gelu na nitrocelulosovou membránu. Membrána je poté nastříhána napříč separovaným pruhům na proužky, které jsou pevnými nosiči na nichž jsou pevně přichyceny separované antigeny.

Samotný proces průkazu protilátek proti *Campylobacter* spp. spočívá v nanesení zředěného pacientova séra na pásek. Pokud je přítomna protilátka ze séra dochází k navázání na příslušnou antigenní frakci. Následuje důkladné promytí od nenavázaných protilátek a přidá se anti-lidský imunoglobulin, který obsahuje křenuvou peroxidázu. Výsledkem vazby protilátky na antigen se projeví zabarvením příslušného (Votava 2010; Abuon et al. 2005; Qian et al. 2008).

4.5.4.2 Komerčně dodávané testy pro průkaz *Campylobacter* spp.

V poslední době existuje několik komerčně dostupných imunologických testů, které byly vyvinuty pro přímou detekci antigenu *C.jejuni* a *C. coli* ve stolici. Běžně dostupné jsou Primer kempový test, *Campylobacter* test a ImmunoCard STAT (Granato et al. 2010).

4.5.4.3 Premier kempový a *Campylobacter* test

Tento test je založen na EIA metodách, které jsou spojeny s pevnou fází nejčastěji mikrotitrační destičkou. Nejznámější metodou je ELISA (enzymová imunoanalýza na pevné fázi), která využívá reakci enzymem značené protilátky se sorpcí reakční složky na pevném povrchu. K průkazu protilátek existuje několik druhů ELISA metod.

Jednou z modifikací může být nekompetitivní (sendvičová) ELISA. Principem metody je adsorpce polyklonální králičí protilátky anti-*Campylobacter* spp. na dno jamky mikrotitrační destičky. Do jamky se k protilátce přidá vzorek stolice předem suspendovaný v rozpouštědle. Následuje inkubační doba, během které se uskuteční zachycení jakéhokoliv antigenu rodu *Campylobacter* pomocí polyklonální protilátky. Mikrotitrační destička je poté promyta a tím dochází k odstranění nenavázaného materiálu, následně je do jamky přidána enzymem značená protilátka. Následuje další inkubace a promývání. Jako poslední látku přidáváme do mikrotitrační destičky barevný substrát. Výsledkem reakce je navázání substrátu na komplex a tím dochází k intenzivnímu zbarvení. Pokud není antigen rodu *Campylobacter* přítomný, barevný substrát se nemůže navázat a nedochází k barevné reakci. Barevná intenzita je měřena pomocí spektrofotometru. Touto metodou lze kamylobaktery ve vzorku stanovit za méně než 2 hodiny.

Výhodou metody ELISA je možnost její automatizace, má však nevýhody a to relativně nákladné přístrojové vybavení, vysoká cena komerčně dodávaných souprav.

Nevýhodou je také bezmyšlenkovité spoléhání se na vytištěné výsledky, které lékař dostává k interpretaci laboratorního nálezu (Granato et al. 2010, Votava a kol. 2010).

4.5.4.4 ImmunoCARD STAT

Tento test je založen na imunochemotografické reakci. Princip ImmunoCARD STAT testu spočívá v imobilizaci specifických monoklonálních protilátek druhu *C. jejuni* a *C. coli* na povrchu porézní membrány. Test využívá komerčních kitů obsahující umělohmotnou kartičku, v níž je malý otvůrek, do kterého se kápneme vyšetřovaný vzorek. Vyšetřovacím vzorkem je stolice rozmělněná v rozpouštědle. Dno komůrky tvoří nitrocelulosa nebo nylonová membrána pokrytá protilátkou. Porézní podklad pod membránou nasaje poměrně velký objem vzorku, jenž může obsahovat hledaný antigen rodu *Campylobacter*.

Antigen ve vzorku se váže na monoklonální protilátku a přidáním druhé enzymem značené protilátky vzniká komplex protilátky s antigenem a značenou protilátkou. Tento komplex dává vzniku barevné změně membrány v podobě růžovo-červeného proužku. (obr. 9). Není-li ve vzorku přítomen antigen rodu *Campylobacter*, komplex nevzniká a netvoří se červeno-růžový proužek na membráně.

Výhodou tohoto testu je rychlost detekce, která trvá méně než 30 min a jednoduchost provedení díky zabudované kontrole na jiném místě membrány. Díky jednoduchosti testu ho lze provádět přímo v ordinaci, kde však mikrobiologická laboratoř není zárukou správné interpretace nálezu (Granato et al. 2010; Bessede et al. 2011; Votava a kol. 2010).



Obrázek 9: ImmunoCARD STAT

http://www.oriondiagnostica.se/nyheter_se?id=17566997 [cit. 8. 6. 2012]

Popis obrázku: pozitivní reakce při použití ImmunoCARD STAT na přítomnost *Campylobacter* spp. ve vzorku

5. Závěr

V této práci jsem se zabývala především výskytem patogenních druhů *Campylobacter* spp. a jejich vlivem na zdraví lidí.

Nejčastějším patogenem pro člověka je *Campylobacter jejuni*, který kolonizuje trávicí trakt drůbeže. Člověk se nejčastěji nakazí kontaktem nebo konzumací tepelně neopracované drůbeže. Infekce způsobená rodem *Campylobacter* nemá zatím vysoké procento mortality, avšak procento výskytu kampylobakteriózy každým rokem stoupá.

Proto je nutné se zaměřit na dodržování správné hygienické a výrobní praxe při zpracování potravin a postupovat dle platných norem a nařízení EU.

Seznam použité literatury

- ABUOUN, M., G. MANNING, S. A. CAWTHRAW, A. RIDLEY, I. H. AHMED, T. M. WASSENAAR a D. G. NEWELL. Cytolethal Distending Toxin (CDT)-Negative *Campylobacter jejuni* Strains and Anti-CDT Neutralizing Antibodies Are Induced during Human Infection but Not during Colonization in Chickens. *Infection and Immunity*. 2005, 73(5): 3053-3062 s. ISSN 0019-9567.
- AMBROŽOVÁ, H. Salmonelózy a kampylobakteriόzy. *Zdravotnické noviny*. 2010, 13: 12-14 s. ISSN 0044-1996.
- BEDNÁŘ, M., FRANKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A. a VÁVRA, J.. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 2.vyd. Praha: MARVIL, 1996. 558 s. ISBN 10: 80-2380-297-6.
- BAUDIŠOVÁ, D. a A. BENÁKOVÁ. Detekce patogenních bakterií v odpadních vodách. *VTEI: Vodohospodářské technicko-ekonomické informace*. Praha: Vodní hospodářství, 2011, 53: 1-20 s. ISSN 0322-8916.
- BUTZLER, J. P. *Campylobacter*, from obscurity to celebrity. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004, 10 (10): 868-876 s. ISSN 1198-743x.
- BOŘILOVÁ, G., I. SVOBODOVÁ, I. STEINHAUSEROVÁ a L. GALLAS. Výskyt vybraných intestinálních patogenů u jatečných kuřat. *Zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinářské kliniky*. 2008, 58: 721-725 s.
- BESSEDE, E., A. DELCAMP, E. SIFRE, A. BUISSONNIERE a F. MEGRAUD. New Methods for Detection of *Campylobacter* in Stool Samples in Comparison to Culture. *Journal of Clinical Microbiology*. 2011, 49 (3): 941-944 s. ISSN 0095-1137.
- CIMOLAI, N.. *Laboratory diagnosis of bacterial infections*. New York: Marcel Dekker, 2001, 922 s. ISBN 08-247-0589-0.

- CUPÁKOVÁ, Š., L. NECIDOVÁ a R. KARPÍŠKOVÁ. VETERINÁRNÍ A FARMACEUTICKÁ UNIVERZITA BRNO. *Termotolerantní druhy Campylobacter spp.* [online]. Veterinární a farmaceutická univerzita Brno. Brno, 2012. Dostupné z: <<http://cit.vfu.cz/alimentarni-onemocneni/>>. [cit. 17. 6. 2012]
- CHABAN, B., M. NGELEKA a J.E HILL. Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiology* [online]. 2010, 10 (1): 73 s. ISSN 1471-2180.
- CLARK, M. What Is *Campylobacter*?. MARLER CLARK THE FOOD SAFETY LAW FIRM. *Marler Clark The Food Safety Law Firm* [online]. Seattle: OutBreak, Inc, 2005.
- CHINIVASAGAM, H. N., T. TRAN, L. MADDOCK, A. GALE a P. J. BLACKALL. Mechanically Ventilated Broiler Sheds: a Possible Source of Aerosolized *Salmonella*, *Campylobacter*, and *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*. 2009, 75 (23): 7417-7425 s. ISSN 0099-2240.
- DURHAM, S. Progress Made in Reducing *Campylobacter* in Poultry. *United States Department of Agriculture* [online]. 2006 [cit. 3. 5. 2012]. Dostupné z: <<http://www.ars.usda.gov/is/pr/2006/060217.htm>>.
- EBOER. *Campylobacter Risk Management and Assessment: Campylobacter*. In: *Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu*. vyd. Bilthoven [online]. 2003 [13. 6. 2012]. Dostupné z: <<http://www.rivm.nl/carma/overcarma/bijeenkomsten/EnnedeBoer/sld001.htm>>.
- EN ISO 10272-1:2006. *Mikrobiologie potravin a krmiv - ČSN: Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp.- Část 1: Metoda průkazu*. Český normalizační institut. 2006.

- EPIDAT, Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2002-2011 - absolutně: Hlášený výskyt vybraných infekčních nemocí v České republice v EPIDATU v letech 2002-2011 - absolutně - předběžná data. PROCHÁZKA, B., Č. BENEŠ a H. ŠEBESTOVÁ. STÁTNÍHO ZDRAVOTNÍHO ÚSTAVU. *Zprávy Centra Epidemiologie a Mikrobiologie* [online]. Praha. [cit. 17. 6. 2012]. Dostupné z: <<http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-1998-2007-absolutne>>.

- EVANS, M. R., C. D. RIBEIRO a R. L. SALMON. Hazards of Healthy Living: Bottled Water and Salad Vegetables as Risk Factors for *Campylobacter* Infection. *Emerging Infectious Diseases*. 2003, 9 (10): 1219-1225 s. ISSN 1080-6040

- FELDHUSEN, Frerk. The role of seafood in bacterial foodborne diseases. *Microbes and Infection* [online]. 2000, 2 (13): 1651-1660 s. ISSN 12864579.

- FRIIS, C., T. M. WASSENAAR, M. A. JAVED, L. SNIPEN, K. LAGESEN, P. F. HALLIN, D. G. NEWELL, M. TOSZEGHY, A. RIDLEY, G. MANNING, D. W. USSERY a I. FRIEDBERG. Genomic Characterization of *Campylobacter jejuni* Strain M1. *PLoS ONE* [online]. 2010, 5 (8): e12253 s. ISSN 1932-6203

- FAO/WHO [Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization]. 2009. *Risk assessment of Campylobacter spp. in broiler chickens: Technical Report. Microbiological Risk Assessment Series No 12. Geneva. 132pp.* [cit. 17. 6. 2012]. Dostupné z: <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/MRA12_En.pdf>.

- GREENWOOD, D., SLACK R.C. a PEUTHERER J.F.. *Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie*. 1. vyd. Překlad Jiří Schindler. Praha: Grada, 1999, 686 s. ISBN 80-716-9365-0.

- GEBREYES, W. A. *Campylobacter coli*: prevalence and antimicrobial resistance in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, 56 (4): 765-768 s. ISSN 0305-7453.

- GRANATO, P. A., L. CHEN, I. HOLIDAY, R. A. RAWLING, S. M. NOVAK-WEEKLEY, T. QUINLAN a K. A. MUSSER. Comparison of Premier CAMPY Enzyme Immunoassay (EIA), ProSpecT *Campylobacter* EIA, and ImmunoCard STAT! CAMPY Tests with Culture for Laboratory Diagnosis of *Campylobacter* Enteric Infections. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010, 48 (11): 4022-4027 s. ISSN 0095-1137.
- HOCHTEL, I. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* spp. *Chemické listy*. 2009, 103 (10): 814 – 822 s. ISSN 1213-7103.
- HAVLÍK, J. Onemocnění vyvolaná kampylobaktery. *Zdravotnické noviny*. 2002, 7: 717-719 s. ISSN 0044-1996.
- HERMANS, D., Kim V. D., A. MARTEL, F. V. IMMERSEEL, W. MESSENS, M. HEYNDRICKX, F. HAESEBROUCK a F. PASMANS. Colonization factors of *Campylobacter jejuni* in the chicken gut. *Veterinary Research*[online]. 2011, 42 (1): 82 s. ISSN 1297-9716.
- HRUBÝ, S. a B. TUREK. Mikrobiologická problematika ve výživě. IDVPZ: BRNO. 1996. ISNB 80-7013-232-2.
- HUMPHREY, T.J., K.W. MARTIN, J. SLADER a K. DURHAM. *Campylobacter* spp. in the kitchen: spread and persistence. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90 (6): 115-120 s. ISSN 1364-5072.
- HUGHES, L. A., M. BENNETT, P. COFFEY, J. ELLIOTT, T. R. JONES, R. C. JONES, A. LAHUERTA-MARIN, A. H. LEATHERBARROW, K. MCNIFFE, D. NORMAN, N. J. WILLIAMS a J. CHANTREY. Molecular Epidemiology and Characterization of *Campylobacter* spp. Isolated from Wild Bird Populations in Northern England. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009, 75 (10): 3007-3015 s. ISSN 0099-2240.
- HVÍZDALOVÁ, I. Výskyt mikroorganismu *Campylobacter* spp. v jehněčím mase a v jehněčích játrech. *Agronavigátor*. [online] 2005, 5: 34–36 s. [cit. 17. 6. 2012]. Dostupné z: <http://www.agronavigator.cz/default.asp?ch=13&typ=1&val=41822&ids=154>.

- HOLT, J. G. *Bergey`s manual of determinative bacteriology*. 9th ed. Baltimore: Williams and Wilkins, c1994, xviii, 787 s. ISBN 06-830-0603-7.
- IVANOVIĆ, S. *Campylobacter* soo. Zoonotski mikroorganizam. *Biotechnology in animal husbandry = biotehnologija u stočarstvu*. 2008, 155-162 s. ISSN 1450-9156.
- ISO/TS 10272-3:2010. *Předběžná Česká technická norma: Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp. – Část 3: Semikvantitativní metoda*. Evropský výbor pro normalizaci. 2010.
- JAMSHIDI, A., M. R. BASSAMI a T. FARKHONDEH. Isolation and identification of *Campylobacter* spp. and *Campylobacter coli* from poultry carcasses by conventional culture method and multiplex PCR in Mashhad, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Research*. 2008, roč. 9 (2): 132-137 s.
- JIČÍNSKÁ, E. a J. HAVLOVÁ. *Patogenní mikroorganismy v mléce a mlékárenských výrobcích*. 1. vyd. Praha: ÚZPI-Ústav zemědělských a potravinářských informací, 1995, 106 s. ISBN 80-851-2047-X.
- KALABUSOVÁ, M. *Interakce intracelulárního patogena Francisella tularensis LVS s myši monocyto - makrofágovou linií J774.2*. Pardubice, 2009. Diplomová práce. Univerzita Pardubice.
- KALIVODOVÁ, D. Sledování charakteristiky izolátů humánních kamylobakterů V Jihomoravském regionu. In: *IV. KONFERENCE STUDENTSKÉ VĚDECKÉ A ODBORNÉ ČINNOSTI z oblastí "Veterinární hygiena, veterinární ekologie, bezpečnost a kvalita potravin" Konference se koná při příležitosti Světového veterinárního roku*. Brno, 2011, 1-22 s.
- KOŽÍŠEK, F., J. KOS a P. PUMANN. *Hygienické minimum pro pracovníky ve vodárenství*. Státní zdravotní ústav, Krajská hygienická stanice Středočeského kraje. Praha: SLOVAK, 2006.

- KEMP, R., A. J. H. LEATHERBARROW, N. J. WILLIAMS a Et. ALL. Farming Area 100-Square-Kilometer Predominantly Dairy Water Samples from a *Campylobacter* spp. in Environmental Prevalence and Genetic Diversity of. [online]. 2005, 1876-1882 s.
- KERAMAS, G., D. D. BANG, M. LUND, M. MADSEN, H. BUNKENBORG, P. TELLEMAN a C. B. V. CHRISTENSEN. Use of Culture, PCR Analysis, and DNA Microarrays for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Chicken Feces. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42 (9): 3985-3991 s. ISSN 0095-1137.
- MIČUDA, S., L. FUKSA, E. BRČÁKOVÁ, J. CERMANOVÁ a V. GERŠL. ÚSTAV FARMAKOLOGIE. *Molekulárně biologické metodiky ve farmakologii: Real-time PCR* [online]. Ústav farmakologie, Univerzita Karlova v Praze, Lékařská fakulta v Hradci Králové. 2006. [cit. 12. 5. 2012].
Dostupné z: <<http://www.lfhk.cuni.cz/farmakol/interakce/micuda/6.htm>>.
- MOSIO, Petra. Atlas bakterií. Vyd. 1. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2012. 90 s. ISBN 978-80-7395-467-3.
- OIE, World Organisation for Animal Health. *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals: mammals, birds, and bees*. 6th ed. Paris: Office international des épizooties, 2008, 1185-1191 s. ISBN 978-92-9044-718-4.
- ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 90 (6): 1-15 s. ISSN 1364-5072.
- QIAN, H., E. PANG, Q. DU, J. CHANG, J. DONG, S. L. TOH, F. K. NG, A. L. TAN a J. KWANG. Production of a Monoclonal Antibody Specific for the Major Outer Membrane Protein of *Campylobacter jejuni* and Characterization of the Epitope. *Applied and Environmental Microbiology*. 2008, 74 (3): 833-839 s. ISSN 0099-2240.
- SEDLÁČEK I, Taxonomie prokaryot. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007, 270 s. ISBN 80-210-4207-9.

- SNELLING, W. J., J. P. MCKENNA, D. M. LECKY a J. S. G. DOOLEY. Survival of *Campylobacter jejuni* in Waterborne Protozoa. *Applied and environmental microbiology*. 2005, 71 (9): 5560-5571 s. ISSN 0099-2240.
- SPEEGLE, L., M. E. MILLER, S. BACKERT a O. A. OYARZABAL. Use of Cellulose Filters To Isolate *Campylobacter* spp. from Naturally Contaminated Retail Broiler Meat. *Journal of food protection*. 2009, 72: 2592-2596 s. ISSN 0362-028x.
- STEINHAUSEROVÁ, I., K. FOJTÍKOVÁ a J. ČEŠKOVÁ. Problémy s izolací a identifikací termofilních *Campylobacter* spp. *Zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinární klinika* [online]. 2001, 51: 51-54 s. ISSN 1214-7648.
- STEINHAUSEROVÁ, I., K. FOJTÍKOVÁ a J. MATIAŠOVIC. Subtyping of *Campylobacter* spp. strains and their incidence in piglets. *Acta Vet.* 2001, 70: 197–201 s.
- STEINHAUSEROVÁ, I. a G. BOŘILOVÁ. Hodnocení antibiotické rezistence kmenů *Campylobacter coli* izolovaných z člověka, drůbeže a prasat. *Zpravodaj časopisů Veterinářství a Veterinární klinika*. 2008, 58: 315-318 s. ISSN 1214-7648.
- STEINHAUSEROVÁ, I. a K. FOJTÍKOVÁ. Serotyping and identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains of human and animal origin using the PCR metod. *University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences*. 1999, 68: 149–154 s.
- STEINHAUSEROVÁ, I. *Campylobacter* spp. v prostředí a v potravinách živočišného původu. 1. vyd. Brno: LAST, 1998, 110 s. ISBN 80-900-2605-2.
- THOMAS, C., D. HILL a M. MABEY. Culturability, injury and morphological dynamics of thermophilic *Campylobacter* spp. within a laboratory-based aquatic model system. *Journal of Applied Microbiology*. 2002, 92 (3): 433-442 s. ISSN 1364-5072.

- U. S. DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES. *BBB - Campylobacter jejuni: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook Campylobacter jejuni* [online]. New Hampshire Avenue, 2012, 2012 [cit. 2. 6. 2012]. Dostupné z: <<http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodborneIllness/FoodborneIllnessFoodbornePathogensNaturalToxins/BadBugBook/ucm070024.htm>>.
- VELUSAMY, V., K. ARSHAK, O. KOROSTYNSKA, K. OLIWA a C. ADLEY. An overview of foodborne pathogen detection: In the perspective of biosensors. *Biotechnology Advances*. 2010, 28 (2): 232-254 s. ISSN 07349750.
- VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun, 2010, 495 s. ISBN 978-80-86850-04-7.
- VYLETĚLOVÁ, M., P. ROUBAL, R. KARPÍŠKOVÁ, H. VLKOVÁ, O. HANUŠ a M. BUBÍKOVÁ. Mikrobiologická kvalita mléka z jesenických mléčných automatů. *Mlékařské listy*. 2011, 126: 17-21 s.
- WAAGE, A. S., T. VARDUND, V. LUND a G. KAPPERUD. Assay and Food Samples by a Seminested PCR coli Cells in Environmental Water, Sewage, *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter* Detection of Small Numbers of. *Applied and environmental microbiology*. 1999, 65 (4): 1636-1643 s. ISSN 0099-2240.
- WANG, G., C. G. CLARK, T. M. TAYLOR, C. PUCKNELL, C. BARTON, L. PRICE, D. L. WOODWARD a F. G. RODGERS. Colony Multiplex PCR Assay for Identification and Differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002, 40 (12): 4744-4747 s. ISSN 0095-1137.
- WILSON, D. J., E. GABRIEL, A. J. H. LEATHERBARROW, J. CHEESBROUGH, S. GEE, E. BOLTON, A. FOX, P. FEARNHEAD, C. A. HART, P. J. DIGGLE a D. S. GUTTMAN. Tracing the Source of *Campylobacteriosis*. *PLoS Genetics*. 2008, 4 (9): 1000203 s. ISSN 1553-7404.

- WHITTIER, C. A., M. R. CRANFIELD a M. K. STOSKOPF. Real-time PCR detection of *Campylobacter* spp. in freeranging mountain gorillas (gorilla Beringei Beringei). *Journal of wildlife diseases*. 2010, 46 (3): 791–802 s. ISSN 0090-3558.
- WHO, *Campylobacter*. In: *World Health Organization: WHO Media centre* [online]. 2011
- WONG, T. L., M. L. DEVANE, J. A. HUDSON, P. SCHOLE, M. G. SAVILL a J. D. KLENA. Validation of a PCR method for detection on poultry packs. *British Food Journal*. 2004, 106 (9): 642-650 s. ISSN 0007-070x.

Seznam obrázků

Obrázek 1: Taxonomie rodu <i>Campylobacter</i>	11
Obrázek 2: <i>Campylobacter jejuni</i> v elektronoptickém znázornění	16
Obrázek 3: Výskytu jednotlivých druhů kampylobakterů u zdravých psů a u psů s průjmem	21
Obrázek 4: Mikroskopický preparát <i>T. pyriformis</i> s <i>C. jejuni</i>	24
Obrázek 5: Kultivace <i>Campylobacter</i> spp.	27
Obrázek 6: Vyhodnocení amplifikace fragmentů multiplex PCR	30
Obrázek 7: Záznam výsledku při použití Real-time PCR Kit	31
Obrázek 8: Záznam výsledku při použití Real-time PCR kitu. tripletu.....	32
Obrázek 9: ImmunoCARD STAT.	34

Seznam tabulek

Tabulka 1: Onemocnění vyvolaná, nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu <i>Campylobacter</i>	13
Tabulka 2: Izolace <i>Campylobacter</i> spp. z různých materiálů.....	25
Tabulka 3: Biochemická a kultivační odlišnost jednotlivých druhů <i>Campylobacter</i> spp. ..	28

Seznam grafů

Graf 1: Hlášený výskyt kampylobakterióz a salmonelóz v letech 2002-2011	15
Graf 2: Onemocnění způsobené druhem <i>Campylobacter jejuni</i> z různých zdrojů.....	18