

Diagnostika *Campylobacter* spp. metodou Real-Time PCR

Bc. Miroslava Janečková

Diplomová práce
2013

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2012/2013

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Miroslava JANEČKOVÁ**
Osobní číslo: **T11156**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Diagnostika Campylobacter spp. metodou Real Time PCR**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika Campylobacter spp.
2. Metody laboratorní diagnostiky kampylobakterů
3. Metoda Real Time PCR

II. Praktická část

1. Analýza vybraných vzorků metodou Real Time PCR

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

1. VOTAVA, M. a kol., Lékařská mikrobiologie speciální, Neptun, Brno 2003
2. ZIMA, J., MACHOLÁN, M., MUNCLINGER, P., PIÁLEK, J., Genetické metody v zoologii, Karolinum, Praha 2004
3. LOGAN, J., EDWARDS, K., SANDERS, N.A., Real-Time PCR Current Technology and Applications, Caister Academic, Norfolk 2009
4. LÜBECK, P.S., WOLFFS, P., ON, S.L.W., AHRENS, P., RADSTRÖM, P., HOORFAR, J., Toward an International Standard for PCR-Based Detection of Food-Borne Thermotolerant Campylobacters: Assay Development and Analytical Validation, 2003, vol. 69, no. 9

Vedoucí diplomové práce:

MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

11. února 2013

Termín odevzdání diplomové práce:

17. května 2013

Ve Zlině dne 11. února 2013


doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan




doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby ¹⁾;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 13.5.2013

.....

¹⁾ zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevydělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

²⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

³⁾ zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Diplomová práce je zaměřena na identifikaci *Campylobacter* spp. u drůbeže na základě analýzy DNA. Teoretická část popisuje charakteristiku jednotlivých druhů *Campylobacter* spp., onemocnění způsobená tímto mikroorganismem a jejich výskyt. Další část práce je věnována metodám diagnostiky a metodě Real-Time PCR. V praktické části bylo analyzováno 20 vzorků kuřat se zaměřením na detekci *Campylobacter* spp. metodou Real-Time PCR.

Klíčová slova: *Campylobacter* spp., kampylobakteriózy, Real-Time PCR

ABSTRACT

The thesis focuses onto identification *Campylobacter* spp. in poultry based on DNA analysis. The theoretical section describes characteristics of each individual species *Campylobacter* spp., disease that these microorganisms cause and their occurrence. Another section of the thesis is devoted to diagnostic and the Real-Time PCR method. There were 20 chicken specimens analysed in the practical section with focus on detecting *Campylobacter* spp. using the Real-Time PCR.

Keywords: *Campylobacter* spp., campylobacteriosis, Real-Time PCR

Touto cestou bych chtěla vyjádřit poděkování svému vedoucímu diplomové práce MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D. za vynikající vedení mé práce, odborné rady, literaturu, trpělivost a čas, který mi věnoval.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 CHARAKTERISTIKA <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.	12
1.1 HISTORIE.....	12
1.2 MORFOLOGIE	12
1.3 PATOGENITA	13
1.4 JEDNOTLIVÉ DRUHY <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	14
1.4.1 <i>Campylobacter jejuni</i>	14
1.4.2 <i>Campylobacter coli</i>	15
1.4.3 <i>Campylobacter lari</i>	15
1.4.4 <i>Campylobacter upsaliensis</i>	16
1.4.5 <i>Campylobacter fetus</i>	16
1.4.6 <i>Campylobacter concisus</i>	17
1.4.7 <i>Campylobacter gracilis</i>	17
1.5 VLV TECHNOLOGICKÝCH PROCESŮ NA <i>CAMPYLOBACTER</i> SPP.....	18
2 GASTROENTERITIDA	20
2.1 KAMPYLOBAKTERIÓZY	21
2.2 KOMPLIKACE PŘI ONEMOCNĚNÍ.....	23
3 VÝSKYT KAMPYLOBAKTERIÓZ V ČR A VE SVĚTĚ	25
3.1 VÝSKYT KAMPYLOBAKTERIÓZ U DRŮBEŽE V ČR	27
4 METODY DIAGNOSTIKY	30
4.1 METODA PRŮKAZU TERMOTOLERANTNÍCH DRUHŮ RODU <i>CAMPYLOBACTER</i>	31
4.1.1 Pomnožení v selektivní tekuté půdě.....	31
4.1.2 Vyočkování na tuhé selektivní půdy a výběr pro confirmaci	31
4.1.3 Confirmace.....	32
4.2 DALŠÍ METODY PRŮKAZU KAMPYLOBAKTERŮ	33
5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE S DETEKČÍ V REÁLNÉM ČASE – REAL-TIME PCR	35
5.1 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR)	35
5.2 REAL-TIME PCR	35
II PRAKTICKÁ ČÁST	37
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE	38
7 MATERIÁL A METODIKA	39
7.1 PŮVOD VZORKŮ.....	39
7.2 POUŽITÉ PŘÍSTROJE, ZAŘÍZENÍ A CHEMIKÁLIE	41
7.3 IZOLACE DNA.....	42
7.3.1 Příprava vzorků kuřat	42
7.3.2 Izolace DNA pomocí kitu	42
7.4 PCR AMPLIFIKACE.....	43
7.4.1 Příprava reakční směsi	43
7.4.2 Použité primery	44
7.4.3 Amplifikace nukleových kyselin.....	45

7.5	ELEKTROFORETICKÁ DETEKCE AMPLIKONŮ KLASICKÉ PCR	45
8	VÝSLEDKY	47
8.1	VÝSLEDKY GELOVÉ ELEKTROFORÉZY	47
8.2	REAL-TIME PCR	48
8.3	VÝSLEDKY REAL-TIME PCR.....	48
9	DISKUZE	51
	ZÁVĚR	55
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	56
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62
	SEZNAM OBRÁZKŮ	63
	SEZNAM TABULEK.....	64

ÚVOD

Mikrobiální kontaminace a rizika spojená s konzumací potravin jsou v současnosti předmětem častých diskuzí.

Onemocnění kampylobakteriózou patří v řadě rozvojových i rozvinutých zemí mezi nejčastější onemocnění z potravin. *Campylobacter* spp. může přežívat především v syrovém mase, mléce, popř. ve vodě a při nevhodné manipulaci sekundárně kontaminovat již hotové potraviny. Přesný mechanismus šíření *Campylobacter* spp. v chovech zvířat, přenosu ze zvířat, resp. z potravin na člověka je předmětem řady studií a není doposud spolehlivě vysvětlen.

Významným zdrojem *Campylobacter* spp. pro člověka je drůbež [1].

V této práci byly zkoumány vzorky kůže drůbeže pomocí metod PCR, a to metodou PCR pomocí elektroforetické separace v agarózovém gelu a Real-Time PCR. Vzorky drůbeže pocházely z chovů na podestýlce a chovů produkující kuřata z ekologického zemědělství vzhledem k narůstajícímu zájmu veřejnosti o tzv. „bio“ potraviny.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA *CAMPYLOBACTER* SPP.

Zástupci rodu *Campylobacter* se vyznačují ekologickou diverzitou a byli izolováni z mnoha přírodních zdrojů (např. z kořenů některých rostlin, z anaerobního prostředí bahna, z pitné vody aj.), z plazů, ptáků, savců a také z člověka.

Taxonomicky rod *Campylobacter* spolu s rody *Arcobacter* a *Sulfurospirillum* tvoří čeleď *Campylobacteraceae*. Do rodu *Campylobacter* dnes patří řada druhů s různým patogenním významem pro člověka a zvířata [2].

1.1 Historie

Theodor Escherich již v roce 1880 popsal jako první spirálovité bakterie získané ze stolice při infekčních onemocnění kojenců, které nepovažoval za patogenní. *Campylobacter* (původně *Vibrio fetus*) byl poprvé izolován v roce 1913 ve spojitosti s infekční infertilitou a aborty u ovcí a krav. V roce 1963 došlo k vytvoření samostatného rodu *Campylobacter*. Sebald a Véron převedli dva z druhů *Vibrio* jako *Campylobacter bubulus* a *Campylobacter fetus* [3,4,5].

V současné době rod *Campylobacter* zahrnuje 16 druhů a 6 poddruhů. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter upsaliensis* a *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter gracilis*, *C. sputorum*, *C. hominid*, *C. mucosalis*, *Campylobacter fetus*, *C. hyointestinalis* a *C. lanienae*. [6]

1.2 Morfologie

Kampylobaktery jsou zakřivené, případně až spirálovité gramnegativní, mikroaerofilní bakterie, poměrně čile se pohybující díky polárně situovanému bičíku. Buňky jsou na jednom nebo obou koncích vybaveny bičíkem, což jim umožňuje vývrtkovitý pohyb. Tvar bakteriální buňky a pohyblivost usnadňují průnik vrstvou hlenu. Zakřivené nebo i rovné tyčinky široké 0,2 až 0,9 μm a dlouhé 0,2 až 5 μm . Tyčinky mají spirálovitý, esovitý tvar, někdy připomínají písmeno „V“ nebo mohou tvořit delší řetízky [7,8,9,4,10].

Všechny kampylobaktery mají pozitivní katalázovou i oxidázovou reakci. Nefermentují ani neoxidují sacharidy. Všechny kampylobaktery mají v cytoplazmatické membráně zabudovaný lipopolysacharidový a proteinový antigen. Rovněž bičík skrývá důležitý protein, využívaný pro typizaci (umožňuje rozlišit přes 110 serotypů). Podle lipopolysacharidového

antigenů se rozeznává kolem 65 sérotypů. V běžné diagnostice se však těchto skutečností nevyužívá [7,9].

1.3 Patogenita

Patogenní kampylobaktery produkují enterotoxiny podobné cholеровému toxinu (u *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*), dále pak cytotoxiny a cytoletální toxin. Hlavním faktorem virulence jsou bičíky, jejichž geny vytváří velký počet modifikací a tyto představují různé antigenní varianty. Hlavní látka, která se podílí na rozdílné antigenní výbavě je glykosylatin, který obsahuje kyselinu sialovou.

I když mechanismus onemocnění ještě není plně objasněn, předpokládají se 3 základní typy. Při prvním typu buňky *Campylobacter* spp. mohou pronikat a proliferovat v buňkách střevního epitelu a poškozovat buňky. Nejčastěji bývá postižena spodní část ilea a tlusté střevo. Při biopsiích byl zjištěn pokles počtu epitelálních buněk, pokles produkce mukózy, poškození střevních krypt a infiltrace lamina propria neutrofilními leukocyty a lymfocyty. Tato forma se vyskytuje asi u 20 – 30 % případů onemocnění a výsledkem jsou krvavé průjmy. Kmeny, které způsobují tuto formu onemocnění, tvoří cytotoxiny.

Při vzniku druhého patogenního mechanismu *Campylobacter* spp. může pronikat střevní mukózou s minimálním povrchovým poškozením střeva do lamina propria a mezenterálních mízních uzlin. Tento způsob patogenního mechanismu se vyskytuje především u dětí a mladých osob a často imituje zánět slepého střeva.

Třetím patogenním mechanismem je produkce enterotoxinů podobných cholеровému toxinu anebo termolabilnímu toxinu *E. coli*. Výsledkem pak bývají typické vodnaté průjmy [9,4].

Infekce nastává požitím infikované potravy nebo vody, ale i kontaktem s nakaženými zvířaty eventuálně sexuálním stykem. Při požití je infekční dávka větší než 10^4 mikrobů. Obsah $10^6 - 10^9 \text{ g}^{-1}$ mikrobů dochází ke vzniku vodnatých průjmů, které mohou být i krvavé a dyzenterické [9,11].

Tab. 1. Rozdělení lékařsky důležitých druhů kampylobakterů [8, 9].

Druh	Rezervoár	Onemocnění u člověka
<i>Campylobacter jejuni</i>	Mnoho zvířat a ptáků	Průjmy (časté)
<i>Campylobacter coli</i>	Vepř	Průjmy
<i>Campylobacter lari</i>	Zvířata a ptáci	Průjmy
<i>Campylobacter fetus</i>	Dobytěk, ovce	Septikémie
<i>Campylobacter hyointestinalis</i>	Zvířata	Proctitis (u homosexuálních mužů)
<i>Campylobacter concisus</i>	Člověk	Gastroenteritidy, paradontózy
<i>Campylobacter curvus</i>	Člověk	Gastroenteritidy, paradontózy
<i>Campylobacter gracilis</i>	Člověk	Abscesy, empyém
<i>Campylobacter helveticus</i>	Kočky, psi	Žádné v současné době
<i>Campylobacter hyoilei</i>	Vepř	Žádné v současné době
<i>Campylobacter rectus</i>	Člověk	Paradontózy
<i>Campylobacter mucosalis</i>	Vepř	Žádné v současné době
<i>Campylobacter showae</i>	Člověk	Paradontózy
<i>Campylobacter hominis</i>	Lidé	Gastroenteritidy

1.4 Jednotlivé druhy *Campylobacter* spp.

1.4.1 *Campylobacter jejuni*

Gramnegativní, uni- nebo bipolární bičíky, štíhlé 0,2-0,5 μm široké a 1,5-5 μm dlouhé, nesportující tyčinky zakřiveného nebo spirálovitého tvaru, které se s přibývajícím věkem nebo vysokou koncentrací kyslíku mění na koloidní formu. Roste v mikroaerobním prostředí (5 % O₂, 10 % CO₂ a 85 % N₂), na krevním agaru nebo na speciálních selektivních

médiích za 72-96 hodin inkubace při 37-42 °C. Termolabilní a termostabilní povrchové antigeny umožňují rozdělit kmeny s rozdílnou virulencí na různé sérovary. Virulentní izobáty jsou invazivní a produkují cytotoxin anebo termolabilní enterotoxin, který svým účinkem velmi připomíná toxin *Vibrio cholerae*. *C. jejuni* přežívá v povrchových vodách, trusu, podestýlce, na napáječkách, transportních bednách aj. při teplotě prostředí 25 °C max. 2-3 týdny; při teplotách 4 °C je jeho vitalita delší. Přenos vzduchem je možný, vertikální přenos zatím nebyl prokázán. *C. jejuni* má široké hostitelské spektrum, vyskytuje se v trávicím traktu nejen u člověka, ale téměř všech domácích a u velkého počtu divoce žijících zvířat. Existence dvou subtypů u člověka a jen jednoho z nich u drůbeže naznačuje další možný zdroj infekce pro lidi. Pro optimální růst vyžaduje pH v rozmezí 6,8-7,2 [8,12].

1.4.2 *Campylobacter coli*

Campylobacter coli je součástí normální střevní flóry skotu, ovcí, prasat, ptáků a psů a může způsobovat onemocnění člověka. Roste v mikroaerobním prostředí při teplotách 37 °C a 42 °C, kataláza a oxidáza pozitivní. Vyvolává akutní střevní infekce. *C. coli* nehydrolyzuje hippurát [4,8,9].

C. coli jsou malé, pevně svinuté spirály, ve tvaru písmene S nebo zakřivené, 0,2 - 0,3 μm široké a 1,5 - 5 μm dlouhé. Se vzrůstajícím věkem nebo vystavení vyšším koncentracím kyslíku přechází v koloidní tvar. Kolonie o průměru 1-2 mm jsou hladké, vypouklé a lesklé. Na vlhkých médiích jsou kolonie ploché a šedavé. Většina kmenů je nehemolytická. Obsah guaninu a cytosinu v molekule DNA je v rozmezí 31 - 35 mol. % [12].

C. coli způsobuje průjemy, septikémie a občas i aborty u lidí. Může být příčinou průjmů u prasat a opic a potratů u hlodavců. Bývá spojován s hepatitidou u některých druhů ptáků. Některé kmeny jsou spojovány s proliferativními enteritidami u prasat [12].

1.4.3 *Campylobacter lari*

Campylobacter lari dříve *Campylobacter laridis* byl izolován u racků v roce 1980. Vyskytuje se také ve vodě, střevním obsahu ptáků, prasat, psů a jiných domácích i divokých zvířat, u mořských živočichů (mušle, ústřice). Předpokládá se, že měkkýši byli kontaminováni výkaly racků z vody, ve které byli pěstováni. *C. lari* je spojován s chronickými průjemy u novorozenců, u dospělých mohou nastat komplikace po léčbě enteritidy ve formě infekční artritidy [8,3,4].

1.4.4 *Campylobacter upsaliensis*

Campylobacter upsaliensis je kataláza negativní kamylobakter, v roce 1983 byl izolován z trusu psů v Uppsale. Je to humánní enteropatogen. Kromě lidských enteritid může způsobovat potraty, bakteriemie, hemoliticko-uremický syndrom a Guillain-Barré syndrom. Nejpravděpodobnější přenos je z domácích zvířat na člověka, méně často z potravin. *C. upsaliensis* je mikroaerofilní, termotolerantní, zakřivená gramnegativní tyčinka. Organismus má jeden nebo bipolární bičík, je 0,3 až 0,4 μm široký a 1,2 až 3 μm dlouhý. Tvoří hladké, našedlé nebo průsvitné kolonie na krevním agaru. Tato bakterie je oxidáza pozitivní, redukce dusičnanů pozitivní a hippurát negativní. *C. upsaliensis* je citlivý na nalidixovou kyselinu a obvykle na cephalothin. *C. upsaliensis* lze odlišit *C. jejuni* nedostatečnou produkcí katalázy a neschopností hydrolyzovat hippurát. Produkce H_2S na TSI agaru je pozitivní [8,3,13,4].

1.4.5 *Campylobacter fetus*

Tento druh má dva poddruhy: *C. fetus* subsp. *fetus* a *C. fetus* subsp. *venerealis*. Oba jsou spojovány především se zvířaty, jsou příčinou sporadických abortů u skotu, neplodností a aborty u ovcí a vzácně i lidských chorob. U člověka může *C. fetus* subsp. *fetus* způsobit horečnatá onemocnění s nespecifickými symptomy. Meningitida je další nejčastěji diagnostikovaná nemoc, ale infekce *C. fetus* subsp. *fetus* mohou vést k perikarditidě, zánětu pobřišnice, salpingitidě, septické artritidě a abscesům. *C. fetus* subsp. *fetus* byl příčinou předčasného porodu a novorozenecké sepse a v této souvislosti byl izolovaný z plodové vody. *C. fetus* subsp. *fetus* je spojován s rakovinou. *C. fetus* subsp. *fetus* byl získán od pacientů s rakovinou podstupující nutriční léčbu vyžadující konzumaci syrových hovězích jater, které byly kontaminovány tímto organismem. *C. fetus* subsp. *venerealis* je hlavní příčinou bovinní genitální kamylobakteriémie, toto infekční onemocnění se převážně týká jatečně zpracovaného skotu. Výzkumem se prokázalo, že *C. fetus* subsp. *venerealis* nalezený na předkožce asymptomatického býka, který byl přenašečem bakterie, a ty vyvolaly chronické záněty pohlavních orgánů u samic a následnou neplodnost [3,4,14].

C. fetus jsou gramnegativní, zakřivené tyčinky, které jsou oxidáza a kataláza pozitivní, H_2S a hippurát negativní, indoxyl acetát pozitivní, rostou na médiu obsahujícím 1 % glycin a roste dobře při 25 °C a při 35 °C, avšak při 42 °C roste špatně nebo vůbec, v atmosféře mikroaerofilní. Všechny izoláty jsou odolné vůči kyselině nalidixové a cephalothinu. Rostou na mCCD agaru a McConkey agaru. Štíhlé zakřivené tyčinky, které jsou 0,2 – 0,3 μm

široké a 1,5 – 5 μm dlouhé. Staré kultury mají kulatý až koloidní tvar a mohou být dlouhé až 8 μm . Buňky jsou velmi pohyblivé s charakteristickým přímým pohybem nebo spirálovitým. Pohyblivost a otáčení buněk je tak rychlé, že zakřivení buněk můžeme přehlédnout. Nejlépe se pozorují s použitím fázového kontrastního mikroskopu [15,4,12].

1.4.6 *Campylobacter concisus*

Campylobacter concisus patří k původcům akutních enteritid stejně jako *C. jejuni* a *C. coli*. Avšak se srovnáním s *C. jejuni*, lze *C. concisus* obtížněji izolovat, neboť je citlivý k selektivní antimikrobiálními látkám běžně používaných u konvenčních izolačních médií a vyžaduje atmosféru obohacenou o vodík a delší inkubační dobu pro růst. *C. concisus* byl původně izolován z parodontálních lézí, nacházíme ho v dutině ústní jako patogen a byl izolován z výkalů pacientů s průjmami. Je také často izolován ze stolice asymptomatických pacientů, což vede k závěru, že může být součástí běžné střevní mikroflóry. Některé důkazy naznačují, že *C. concisus* může být oportunistický patogen. Například Engberg a kol. poznamenal, že *C. concisus* byl převážně izolován od dětských pacientů, starších lidí a imunokompromitovaných pacientů, na rozdíl od *C. jejuni* a *C. coli*, které jsou obvykle izolovány od pacientů s průjmami všech věkových kategorií [16].

Buňky jsou malé a zakřivené, 0,5 μm široké a 4 μm dlouhé se zaoblenými konci. Rychle se pohybují pomocí jednoho polárního bičíku. Kolonie jsou konvexní, průsvitné s rovnými okraji o průměru 1 mm. Nerostou v mikroaerobním prostředí na agarech v atmosféře bez vodíku, na polotekutém médiu (0,16 % agaru), na vzduchu nebo atmosféře obsahující O_2 5 %, CO_2 10 % a N_2 85 %. Anaerobní růst je možný na médiích, která obsahují formiát a fumarát. Kmeny nerostou na McConkey agaru nebo na médiu obsahující 3,5 % NaCl, 32 mg/l cefalotinu, 64 mg/l cefoperazonu nebo 0,04 % trifenyl tetrazolia chloridu [12].

1.4.7 *Campylobacter gracilis*

C. gracilis se podílí na paradentóze a bylo prokázáno, že je příčinou infekce u zubních implantátů. Neexistuje přesvědčivý důkaz, že je příčinou lidských enteritid. Buňky *C. gracilis* jsou nepohyblivé, roste za mikroaerobních podmínek, je schopen růst i za anaerobních podmínek. Produkce katalázy negativní, redukce dusičnanů pozitivní, hydrolýza indoxyl acetátu negativní, hydrolýza hippurátu negativní, rezistentní k nalidixové kyselině a na TSI agaru produkuje H_2S . Všechny druhy *Campylobacter* jsou oxidáza pozitivní s výjimkou *C. gracilis* a sporadicky patogenní *C. concisus* a *C. showae* [3,12,13].

1.5 Vliv technologických procesů na *Campylobacter* spp.

Campylobacter spp. je citlivý k tepelnému opracování, většina buněk odumírá při 100 °C a při teplotách vhodných pro tepelné opracování a pasterizaci je hodnota D_{55} , což znamená, že většina buněk hyne za 1 minutu při 55 °C. Při teplotách 48 °C již začíná u *C. jejuni* rychlý úbytek živých buněk a hodnota D při této teplotě 7,2 až 12,8 minut. Při teplotě 60 °C byla tato hodnota pod 1 minutu. Nerostou při teplotě pod 30 °C. Jejich životaschopnost zhoršuje chladírenské či mrazírenské zpracování, mohou však v těchto podmínkách přežít delší dobu; přežití bylo zaznamenáno v mléce a ve vodě při teplotě 4 °C po několika týdnech skladování a u mražené drůbeže po několika měsících. Studie v Norsku prokázaly, že kmeny *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* byly životaschopné v nechlorované tekoucí vodě při 4 °C po dobu 15 dnů (10 dnů při 12 °C) a 10-15 dní v znečištěné říční vodě při stejné teplotě (6-12 dní při 12 °C) [11,4].

Tab. 2. Termorezistence kmenů *Campylobacter jejuni*

hodnocená v různých prostředích [3].

Prostředí	D_{55} °C (min)
Odstředěné mléko	0,74 – 1,00
1 % peptonová voda	0,64 – 1,09
Mléko	1,10
Fyziologický roztok	1,14

Campylobacter spp. roste nejlépe v atmosféře obsahující 5-10 % oxidu uhličitého a 3-5 % kyslíku, není schopen přežít v prostředí při běžné koncentraci kyslíku. Aby nedošlo k poškození buněk, jsou mikroorganismy schopny vytvářet ochranné mechanismy, které eliminují toxické efekty oxidačních produktů. Klíčový význam mezi těmito mechanismy mají enzymy kataláza a superoxidová dismutáza, která katalyzuje přeměnu peroxidu vodíku na kyslík a vodu. Schopnost vytvářet tyto enzymy do jisté míry ovlivňuje možnosti delšího přežívání v prostředí [11,4].

Chlorid sodný je jedním z nejpoužívanějších přípravků ke konzervaci potravin. Kampylobaktery reagují na podmínky, které slouží k uchovávání potravin. *C. jejuni* roste nejlépe při koncentracích 0,5 % NaCl a teplotě 42 °C. Kmeny *C. jejuni* mohou růst za stejných podmínek a koncentraci 1,5 %, avšak koncentrace 2 % již působí toxicky a nejsou schopny růstu. Snížením teploty na 25 °C se zvyšuje schopnost mikroorganismů snášet vyšší koncentrace solí. Například snížením teploty ze 42 °C na 25 °C se zvýšila tolerance *C. jejuni* ke koncentraci 4,5 % NaCl a při teplotě 4 °C a koncentraci soli 6,5 % byly buňky životaschopné ještě po 3 týdnech. *C. jejuni* může přežít i chladírenské teploty a v přítomnosti 4,5 a 6,5 % soli. Při teplotě 25 °C a za přítomnosti 4,5 % NaCl byl *C. jejuni* schopen přežít pouze 3 až 5 dnů [17].

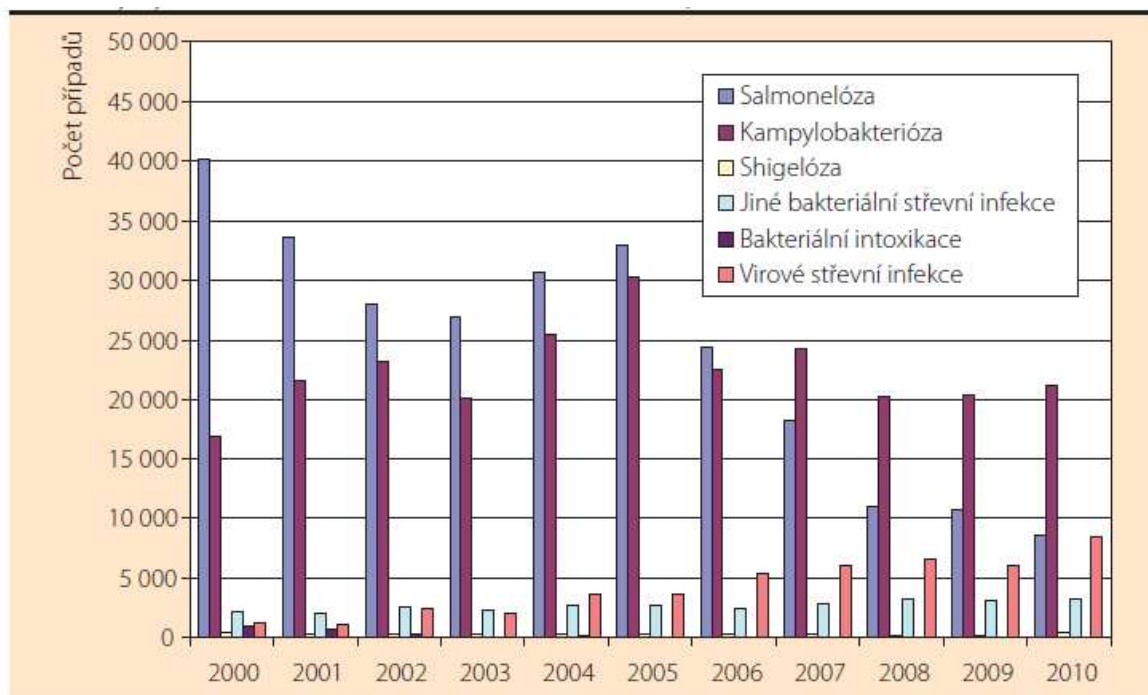
Jsou velmi citlivé i na jiné nepříznivé podmínky jako je sušení a nízké pH. Optimální pH pro růst *C. jejuni* se pohybuje v rozmezí 6,5 – 7,5, ale všechny kmeny dobře rostou při pH 5,5 – 8,0. Při pH 5,0 již po 24 hodinách nebyl zjištěn výskyt *C. jejuni* a při pH 9,0 byl zjištěn rychlý pokles mikrobů. Několik studií prokázalo citlivost *Campylobacter* spp. k silným kyselinám jako je kyselina octová, mravenčí kyselina, kyselina askorbová a kyselina mléčná [18,11].

Vodní aktivita je faktor s významným selektivním vlivem na růst mikroorganismů. Pro mikroorganismy je důležitá voda, kterou mohou využít pro svou činnost. Měřítkem dostupnosti vody v potravinách bývá nejčastěji hodnota vodní aktivity (a_w). *C. jejuni* je velmi citlivý na nízkou hodnotu aktivity vody. Pro svůj růst vyžaduje minimální hodnotu a_w 0,96–0,97. Při nízkých hodnotách a_w dochází k jeho devitalizaci v závislosti na teplotě prostředí [4].

Neionizující – ultrafialové záření má účinnost na mikroorganismy při vlnové délce 228 – 365 nm. *Campylobacter jejuni* byl zkoumán při vlnové délce 254 nm. UV dávka potřebná k inaktivaci 99,9 % *C. jejuni* je 1,8 mWs/cm². Ve srovnání s *E. coli* je *C. jejuni* citlivější na UV záření než řada patogenů a může být snadno inaktivován při běžně dostupným UV zařízením. Kapacita většiny komerčně dostupných UV zařízení (30 mWs/cm²) je více než dostačující, aby účinně inaktivovaly tyto bakterie [4,19].

2 GASTROENTERITIDA

Gastroenteritida je velmi časté onemocnění trávicího traktu. Běžně se vyskytují i epidemie. Přenos se děje kontaminovanou potravou a vodou a při zanedbání hygienických návyků i fekálně-orální cestou. Infekce postihuje žaludek a tenké střevo. Inkubační doba je krátká, obvykle několik hodin až 3 dny. Nejčastější příznaky jsou nevolnost, zvracení, průjem, břišní dyskomfort. Teplota může být zvýšená, někdy i horečka přes 38 °C. Průběh je většinou bez komplikací, pacient se rychle uzdraví. Komplikace nastávají při silném zvracení a průjmu, kdy může velmi rychle dojít k dehydrataci (hlavně u malých dětí a starších a oslabených osob), salmonelózu někdy komplikuje sepsa a mohou se vyskytovat sekundární abscesy, u yersiniózy se může vyskytnout apendicitida a postižení kloubů [20].



Obr. 1: Graf výskytu jednotlivých bakteriálních onemocnění za rok 2000 – 2010 [21].

Bakteriálními původci gastroenteritid jsou nejčastěji rody *Campylobacter* a *Salmonella*, dále *Yersinia enterocolitica* a enteropatogenní *E. coli*, vzácně *Plesiomonas* spp., *Aeromonas* spp. a necholerová vibria [20].

2.1 Kampylobakteriomy

Onemocnění způsobené *Campylobacter* spp. je považováno za jedno z nejčastějších alimentárních onemocnění v rozvinutých zemích [4].

Většina alimentárních onemocnění probíhá ve formě sporadických případů nebo rodinných výskytů, při kterých nejsou dostupné relevantní informace o vehikulech (potvrzených kultivačně). Pouze malý podíl těchto onemocnění je hlášen v epidemické souvislosti (do 10%), kdy bývají k dispozici konkrétní informace o vehikulech přenosu nákazy a jen u několika epidemií ročně se vehikulum daří potvrdit i kultivačně. V roce 2009 ve studii zaměřené na bakteriologickou analýzu potravin byl sledován výskyt vybraných patogenních agens v potravinách z tržní sítě [22].

Přítomnost termotolerantních kampylobakterů byla sledována u syrového masa, čerstvé a mražené zeleniny a čerstvého ovoce. Celkem bylo vyšetřeno 204 vzorků potravin, u 30 (14,7%) vzorků byl prokázán pozitivní nález. Jednalo se o 17 vzorků drůbežího masa, 10 vzorků drůbežích drobů, 2 vzorky vepřových jater a jeden vzorek králičího masa. Na základě druhové identifikace byl nejčastěji detekovaným zástupcem kampylobakterů určen druh *C. coli* (7,8%), dále *C. jejuni* (5,9%) a směsná kultura *C. jejuni* a *C. coli* (1,0%). Ve vzorcích zeleniny a ovoce nebyla přítomnost bakterií rodu *Campylobacter* potvrzena. Tabulka 3 uvádí přehled vyšetřených vzorků podle komodit [22].

Termofilní druhy rodu *Campylobacter* spp., zejména *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsou nejčastěji považovány za původce akutních bakteriálních gastroenteritid u lidí. Dalšími druhy, které byly prokázány za lidské patogeny způsobující kampylobakteriomy, jsou *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. fetus* a *C. sputorum* biovar *sputorum*. Převážná většina kympylobakterióm je vyvolána *C. jejuni*, méně často *C. coli*, další sérotypy způsobují spíše systémové infekce (*C. fetus*) [23,24].

V současné době jsou *Campylobacter* spp. izolovány častěji než *Salmonella* spp. u pacientů s gastroenteritidou [3].

Kmapylobakteriomy je řazena mezi zoonomy, tedy onemocnění, které může být přenosné ze zvířat na člověka. Mezi zvířaty je nejčastější forma přenosu fekálně – orální cestou. Bakterie vyskytující se ve výkalech nakaženého zvířete a následným požitím jiným zvířetem. Dalším způsobem je přijímání potravy nebo vody, které bylo kontaminováno výkaly infikovaného zvířete. Kuřata chovaná ve velkochovech a určená do maloobchodní sítě jsou

chována v klecích velmi blízko sebe, je zde více než 50 % pravděpodobnost kontaminace a stává se primárním zdrojem kampylobakterií u lidí. Ačkoli přenašečů bakterií rodu *Campylobacter* je mnoho, zahrnující zvířata jako je dobytek, psi, volně žijící ptáci, kuřata a krůty, je infekce spojována především s potravinami [25].

Tab. 3. Přehled vyšetřených vzorků a pozitivní nálezy kampylobakterů podle komodit [22].

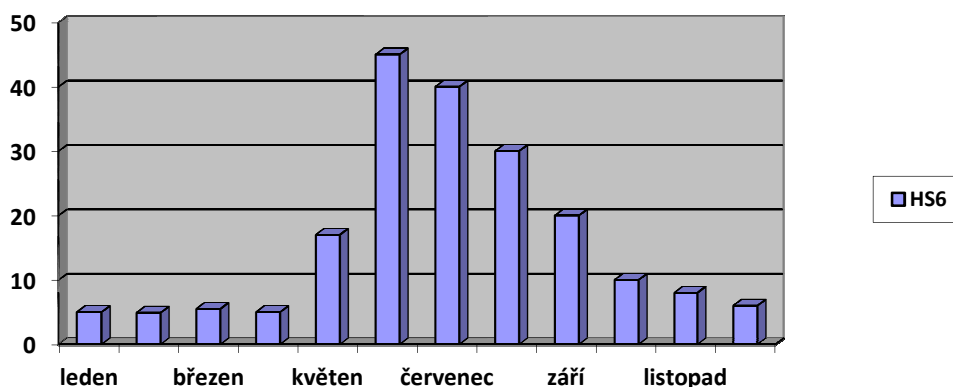
Komodita	Počet vzorků				
	vyšetřených	pozitivních (%)			
		celkem	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni + C. coli</i>
Drůbeží maso	36	17	9	8	0
Drůbeží droby	12	10	3	5	2
Játra vepřová	12	2	0	2	0
Maso králíci	12	1	0	1	0
Maso rybí	24	0	0	0	0
Zelenina čerstvá	60	0	0	0	0
Zelenina mražená	36	0	0	0	0
Ovoce	12	0	0	0	0
Celkem	204	30 (14,7)	12 (5,9)	16 (7,8)	2 (1,0)

Hlavními rizikovými komoditami jsou drůbež, nepasterizované mléko a neupravená voda. Došlo také k onemocnění spojeným s chovem domácích zvířat a přenosem infikovaných kojenců a dětí na rodiče, ale faktem zůstává, že kampylobakterií je především alimentární onemocnění [25].

Dalším způsobem přenosu může být nevhodná manipulace s potravinami, kdy může dojít k sekundární kontaminaci. Častou příčinou onemocnění jsou však různé cesty sekundární kontaminace hotových potravin. Nejrozšířenější způsob je sekundární kontaminace již hotových tepelně ošetřených potravin porušováním hygienických pravidel v domácnostech nebo veřejném stravování [26,3].

V létě podléhají potraviny v horkém počasí dříve zkáze, často se podávají v improvizovaných podmínkách, a proto v nich snadno může dojít k rychlému pomnožení bakterií. V létě je i hlavní sezóna grilování a nedostatečně tepelně zpracované maso může být zdrojem bakteriálního průjmu, především kampylobakterií a salmonelózy [24].

Obrázek 2 uvádí výskyt *C. jejuni* HS6 dle sezónního charakteru. Z grafu je zřejmé, že výskyt *C. jejuni* sérotypu HS6 je nejvyšší od května do září, kdy je největší nebezpečí nákazy.



Obr. 2: Sezónní výskyt *C. jejuni* sérotyp HS6 [26; upraveno].

Konkrétní příznaky a symptomy u jednotlivců se mohou lišit pravděpodobně kvůli variabilitě hostitele a infikujících organismů. Po inkubační době, která je zpravidla mezi 24 až 72 hodinami, se projevují akutní průjmová onemocnění. Mohou následovat nespecifické syndromy jako je horečka, zimnice, svalové křeče a bolesti hlavy. Křeče břicha a horečka často doprovází průjem. Pacienti mají vodnaté průjmy, které jsou velmi časté a může se vyskytovat i krev ve stolici [27].

Onemocnění trvá zpravidla 2-5 dní, v těžších případech až 10 dní. U většiny pacientů dojde ke spontánnímu uzdravení bez nutnosti podávání antibiotik. Asi u 10 % pacientů však bolesti břicha a mírné enteritidy přetrvávají i několik týdnů. Pacienti mohou vylučovat *C. jejuni* asi 1 až 2 týdny v množství 10^6 až 10^8 v 1 gramu stolice [4].

Stejně jako u ostatních patogenů infekční dávka bude záviset na řadě faktorů včetně virulence kmene, vehikula, citlivosti jedince a jak byl patogen přijat. Mládež (15 – 24 let) a malé děti (1 – 4 roky) jsou považováni za zvláště citlivé. V chlapecké škole v Anglii při byl zjištěn jako důvod onemocnění kontaminace vody v nádrži ptačím trusem, kdy byla infekční dávka odhadnuta na 500 buněk [11]. Studie, kde bylo podáváno mléko se stejným počtem buněk, zaznamenala onemocnění u všech dobrovolníků [11]. Motilita, chemotaxe a spirálovitá morfologie buněk jsou důležitými faktory virulence *Campylobacter*, umožňující buňkám proniknout viskózním hlenem, který pokrývá epiteliální povrch střeva [11].

2.2 Komplikace při onemocnění

Komplikace po prodělané infekci *C. jejuni* nebývají příliš časté. Mohou se vyskytnout Guillain-Barré syndrom, reaktivní artritida a další komplikace. Kampylobaktery mohou

způsobit zánět slepého střeva nebo infikují určité části těla, včetně břišní dutiny, srdce, centrálního nervového systému, žlučníku, močových cest nebo krevního oběhu [4,28].

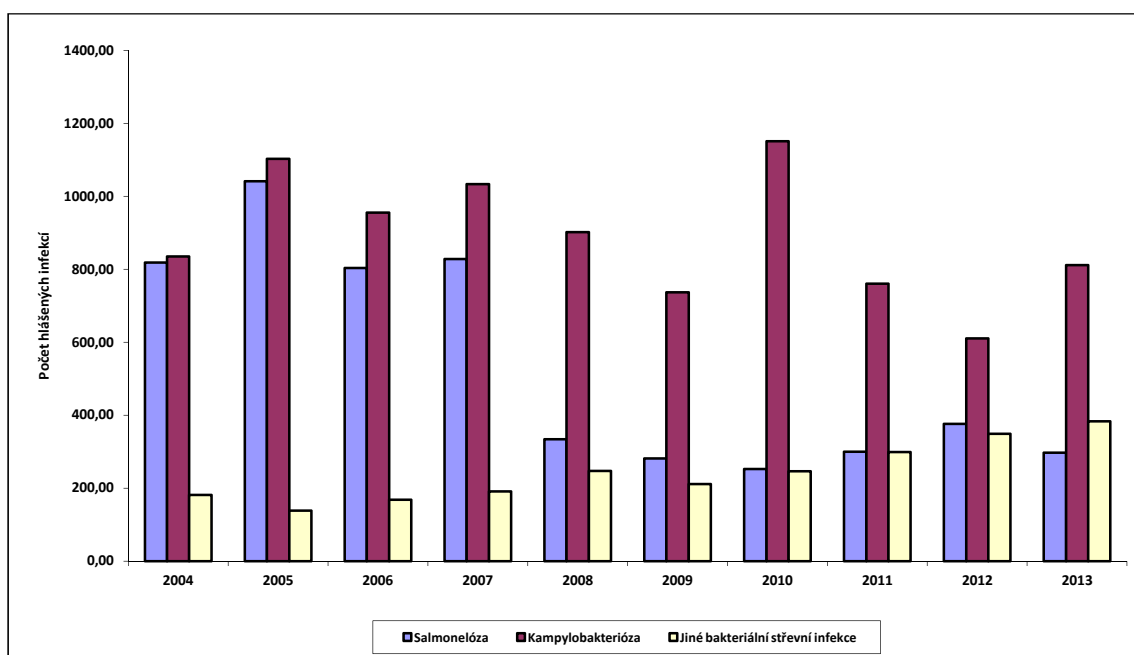
Nejčastěji se objevuje reaktivní artritida, která postihuje především klouby a je diagnostikována především u mladých lidí. Symptomy zahrnují zánět kloubů, očí nebo reprodukčních a močových orgánů. Příznaky se objevují 18 dní po infekci [4,28].

Další komplikací bývá Guillain-Barré syndrom (GBS), který byl ve spojitosti s kampylobakteriózou poprvé popsán v roce 1982. Některé studie v průmyslově vyspělých zemích prokázaly, že předchůdce GBS byly kampylobakteriózy u 20 – 50 % pacientů [29]. Jedná se o akutní paralytické onemocnění, které má autoimunní etiologii. Příznaky se objeví několik týdnů po průjmovém onemocnění. Pacienti obvykle popisují vzestupnou slabost a smyslové poruchy, které se v průběhu několika dní vyvíjejí; v průběhu akutní fáze přibližně jedna třetina pacientů vyžaduje podporu plicní ventilace. Tento stav je přechodný, avšak pro 3-10 % pacientů má fatální následky [29]. Výskyt GBS připadá přibližně na 1 z 1000 hlášených případů onemocnění kampylobakterióz. Pro příklad na Novém Zélandu za období 1988 – 2010 bylo hospitalizováno 2056 pacientů s GBS, průměrně za rok činilo 2,32 onemocnění na 100 000 obyvatel [29]. Ne všechny kmeny *C. jejuni* jsou zřejmě schopny vyvolat Guillain-Barré syndrom, velmi často se jednalo o serotyp 19, který je poměrně častý v populaci *C. jejuni*. Variantou GBS je Miller-Fisher syndrom, který má podobnou etiologii a je charakterizován descendentní paralýzou [4,28,29].

3 VÝSKYT KAMPYLOBAKTERIÓZ V ČR A VE SVĚTĚ

V posledních několika letech dochází ke změně spektra patogenů. Dříve velmi časté salmonelózy a kojenecké infekce vyvolané enteropatogenními kmeny *Escherichia coli* ustupují do pozadí, výrazně ubylo i bacilárních dyzenterii a začínají dominovat kampylobakteriόzy a virové průjmy. Je tomu tak zřejmě proto, že na jedné straně se zvýšila konzumace kuřat a zlepšila se diagnostika kampylobakteriů, na druhé straně hygienická opatření Evropské unie ve stravovacích provozech a drůbežárnách vedla k dramatickému snížení počtu salmonelóz [30,21]. Srovnání výskytu vybraných střevních infekcí v ČR znázorněno na obrázku 3 také jednoznačně vyplívá dominance kampylobakteriόz v posledních letech.

Podrobný výskyt kampylobakteriόz v České republice podle databáze Státního zdravotního ústavu EPIDAT v letech 2003 až 2012 uvádí tabulka 4.



Obr. 3: Graf - výskyt vybraných infekcí v ČR v únoru 2013 a porovnání se stejným měsícem v letech 2004-2012 [31, upraveno].

Každý rok jsou alimentární patogeny následkem přibližně 76 miliónů onemocnění ve Spojených státech. *Campylobacter* je nejčastější příčinou bakteriálních gastroenteritid a odhaduje se na 2,5 milionů případů ve Spojených státech a 54 tisíc případů ve Spojeném království ročně [32].

Tab. 4. Výskyt kampylobakterióz v ČR v letech 2003 – 2012 [33,34; upraveno].

Rok	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012
Chorobnost na 100 tis. obyvatel	196,7	249,8	295,8	221,2	235,0	193,4	194,2	201,2	180,0	175,3
Počet případů	20063	25492	30268	22713	24254	20175	20371	21164	18811	18412

Za rok 2004 byl výskyt kampylobakterióz 12,9 případů na 100 000 osob. Až v 95 % je *C. jejuni* nejčastější příčinou onemocnění [32].

Z průzkumu ve Velké Británii byl *C. jejuni* identifikován v 91,9 % případů a *C. coli* v 7,9 %. Údaje infekcí hlášené v Anglii a Walesu od roku 1990 do roku 2007 byly následující. Výskyt infekcí vyvrcholil v roce 2000 na 58 236 případů, rychlý pokles byl zaznamenán v letech 2000 a 2004 z 57 674 na 44 294 případů, snížení o 24 %. V roce 2007 se výskyt zvýšil na celkem 51 758 případů [32,35].

V EU je kampylobakterióza nejčastěji hlášeným onemocněním s četností výskytu 44,4 potvrzených případů na 100 000 obyvatel v roce 2010 a odhaduje se, že existuje 9 miliónů případů ročně [36]. Podle údajů z tabulky 5 byla tato četnost v období let 2000 – 2005 vyšší, a to 51,6 případů na 100 000 osob. Z toho lze usoudit, že hygienická opatření EU z posledních let jsou v tomto ohledu efektivní a dochází ke snižování výskytu kampylobakterióz.

Nejčastěji jsou spojovány s výskytem onemocnění 3 druhy *Campylobacter* a to *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*. Z 246 055 případů potvrzených v letech 2008 a 2010 byl *C. jejuni* potvrzen u 230 108, což činí 93 %, *C. coli* u 14 615 (6 %) a *C. coli* u 1332 (0,5 %) případů z celkového počtu [36].

Tab. 5. Kampylobakteriózy ve světě v období 2000 – 2005 [37, 38; upraveno].

Země	Počet hláš. příp. za rok						Nemocnost na 100 000 obyvatel
	2000	2001	2002	2003	2004	2005	
Belgie	6 682	7 357	7 354	6 556	6 716	6 879	65,8
Dánsko	4 386	4 620	4 385	3 537	3 724	3 677	68,0
Estonsko	-	113	114	98	124	124	9,2
Finsko	3 327	3 969	3 738	3 190	3 583	4 002	76,4
Francie	378	203	1 353	1 997	2 127	2 049	3,3
Irsko	1 613	1 286	1 336	1 568	1 711	1 803	43,7
Německo	30 876	54 410	56 350	47 876	55 745	62 114	75,3
Nizozemí	3 474	3 682	3 421	2 805	3 273	3 761	46,2
Polsko	-	-	-	-	24	47	0,1
Rakousko	3 458	3 919	4 446	3 926	5 365	5 065	61,7
Slovensko	-	1 353	1 267	1 195	1 691	2 204	40,9
Španělsko	6 113	6 149	5 051	6 048	5 958	5 513	12,8
Švédsko	7 646	7 845	7 137	7 149	6 167	6 811	66,2
V. Británie	63 371	62 052	54 372	52 126	50 388	52 686	88,5
Norsko	2 326	2 889	2 192	2 270	2 275	2 631	57,1
EU celkem	131527	157631	150332	139581	183480	197363	51,6

3.1 Výskyt kampylobakterióz u drůbeže v ČR

Sledování zoonóz a původců zoonóz se provádí na základě Metodického návodu SVS ČR, který stanovuje pravidla pro pravidelné mikrobiologické vyšetření původců zoonóz, prováděné státním veterinárním dozorem v podnicích podle vyhlášky č. 356/2004 Sb., o sledování (monitoringu) zoonóz a původců zoonóz. Za rok 2012 bylo v rámci monitoringu zo-

onóz odebráno a vyšetřeno celkem 11 862 vzorků, v roce 2011 13 825 vzorků, v roce 2010 13 612 vzorků a v roce 2009 12 241 vzorků [39].

Vzorky na průkaz salmonel a kampylobakterů se odebírají na určených porážkách vždy 1 x měsíčně, vzorky na průkaz shigatoxinogenní *E. coli* se odebírají v červnu, červenci a srpnu.

Na průkaz *Campylobacter* spp. se odebírá 10 slepých střev kuřecích brojlerů, která tvoří 1 směsný vzorek. Z hlediska druhového zastoupení dominuje dlouhodobě u drůbeže v ČR jednoznačně druh *C. jejuni*. V 9 % pozitivních případů jsou zjišťovány současně *C. jejuni* a *C. coli* [39].

Tab. 6. Zhodnocení výskytu *Campylobacter* spp. v potravinách živočišného původu od roku 2007 do roku 2012 [39].

Rok	Počet vyšetřených vzorků	Počet pozitivních nálezů	% pozitivních	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i>
2012	125	75	60 %	53	18	4
2011	145	92	63,4 %	58	26	8
2010	134	97	72,4 %	63	19	15
2009	32	25	78,1 %	20	5	0
2008	422	258	61,1 %	199	41	18
2007	246	111	45,1 %	-	-	-

V roce 2009 proběhla také studie ke sledování *Campylobacter* spp. a *Salmonella* spp. v mase brojlerů v tržní síti ČR. Od února do konce listopadu 2009 bylo odebráno a vyšetřeno celkem 120 vzorků chlazené a 120 mražené drůbeže. Vzorky byly odebírány v tržní síti supermarketů 8 největších měst [39].

Z výsledků je zřejmé, že mražení má vliv na devitalizaci kampylobakterů, protože u vzorků odebraných za stejných podmínek byla kontaminace kampylobaktery u mražené drůbeže poloviční ve srovnání s drůbeží chlazenou. Převažoval *C. jejuni*, vyskytly se také přípa-

dy duální kontaminace *C. jejuni* a *C. coli*. Výsledky šetření jsou znázorněny v tabulce 7 [39].

Tab. 7. Vyhodnocení výsledků sledování *Campylobacter* spp. v mase brojlerů v tržní síti ČR v roce 2009 [39].

Druh vzorku	Celkem vyšetřeno vzorků	Pozitivní nález <i>Campylobacter</i> spp.	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i>	Prevalence
Chlazená drůbež	120	90	64	15	11	75 %
Mražená drůbež	120	44	30	9	5	36,7 %

V roce 2008 byl monitoring upraven a rozšířen. K vyšetření se odebírala slepá střeva a celá těla brojlerů ve stáří cca 35 až 40 dnů na schválených jatkách v rámci celé ČR [39].

Pro pokrytí sezónního výskytu byly vzorky na jatkách odebírány vždy jedenkrát měsíčně po celý kalendářní rok. Z jedné jatečné partie (jedna farma) bylo odebráno vždy 10 vzorků slepých střev a jedno celé jatečně opracované tělo brojlera, vždy od náhodně vybraných ptáků v rámci této partie. Ze vzorků kůže se provádělo jak kvalitativní tak i kvantitativní vyšetření na termotolerantní kampylobaktery, ze střev se prováděl pouze průkaz. Výsledky jsou uvedeny v tabulce 8 a svědčí o křížové kontaminaci povrchu brojlerů na jatkách [39].

Tab. 8. Výsledky výskytu *Campylobacter* spp. v roce 2008 u jatečně opracovaných těl brojlerů [39].

Druh vzorku brojlerů	Celkem vyšetřeno vzorků	Pozitivní nález <i>Campylobacter</i> spp.	Prevalence	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. jejuni</i> a <i>C. coli</i>
Kůže	422	295	69,9 %	226	44	25
Slepá střeva	422	258	61,1 %	199	41	18

4 METODY DIAGNOSTIKY

Kampylobaktery jsou chemoorganotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny fermentovat ani oxidovat sacharidy. energii získávají z metabolismu aminokyselin a z metabolismu intermediátů trikarboxylových kyselin. Nehydrolyzují tyrosin, kasein, škrob, ani želatinu. Test na produkci acetoinu a test na methylčerveň jsou negativní. Redukují dusičnany, avšak nikoliv dusitany. *C. jejuni* a některé kmeny *C. curvus* jsou schopny hydrolyzovat hippurát. Tohoto testu se v diagnostice používá k diferenciaci klinicky nejvýznamnějších druhů *C. jejuni* a *C. coli*. Žádný druh nevytváří pigmenty. Obsah guaninu a cytosinu v molekule DNA se pohybuje v rozmezí od 29 do 47 mol. %. S výjimkou *C. gracilis* a některých kmenů *C. concisus* a *C. showae* vykazují oxidázovou aktivitu [40].

Jsou oxidáza pozitivní s negativní reakcí na indol. K termotolerantním kampylobakterům (schopnost růstu při 42 °C) patří *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* a *C. lari* [41].

Minimální teplota růstu kampylobakterů je 32 °C, maximální 45 °C, optimální teplota růstu je 42 °C. Hraniční hodnota aktivity vody pro množení kampylobakterů je od 0,98. Rozmezí hodnot pH při kterých se mohou pomnožovat je 4,9 – 9,0 s optimem při neutrálním pH, koncentrace solí nad 1,5 % působí baktericidně. Optimální složení atmosféry pro růst kampylobakterů je 5 % O₂ + 10 % CO₂ + 85 % N [41].

Kampylobaktery se množí mnohem pomaleji než ostatní střevní bakterie a proto je nutné kultivační média doplnit antibiotickými suplementy, které brzdí růst kontaminující mikroflóry. Suspektní kolonie jsou potvrzovány biochemicky (kataláza, oxidáza, produkce H₂S), dále podle schopnosti růstu při 25 °C a za aerobních podmínek při 42 °C. Druhové zařazení je prováděno podle rezistence izolátů k cefalotinu a ke kyselině nalidixové, počet rezistentních kmenů však v posledních letech stoupl natolik, že toto stanovení ztrácí diagnostický význam. Odlišení epidemiologicky nejvýznamnějšího druhu *C. jejuni* se provádí na základě hydrolýzy hippurátu [41].

Podle ČSN ISO 10272-1 jsou *Campylobacter* spp. mikroorganismy, které po inkubaci v mikroaerobní atmosféře při teplotě 41,5 °C, ale nikoli při teplotě 25 °C, vytvářejí na tuhých selektivních půdách charakteristické kolonie a vykazují charakteristickou pohyblivost a popsané biochemické a růstové vlastnosti [42].

4.1 Metoda průkazu termotolerantních druhů rodu *Campylobacter*

Průkaz v potravinách zahrnuje 3 po sobě jdoucí stupně: jednotlivé pomnožení v tekuté selektivní půdě, izolaci a konfirmaci [41].

4.1.1 Pomnožení v selektivní tekuté půdě

Pomnožovací půdy, jak již sám název napovídá, jsou určeny pro pomnožení a případnou resuscitaci malých množství buněk nebo buněk nějakým způsobem poškozených. Pro kultivaci *Campylobacter* spp. má význam používání pomnožovacích médií především při izolaci z potravin nebo vody, protože v těchto substrátech očekáváme spíše menší množství buněk *Campylobacter* spp. a vysoký počet ostatní mikroflóry [4].

Zkušební vzorek se inokuluje do tekuté pomnožovací půdy a v ní se homogenizuje. Inkubuje se v mikroaerobní atmosféře při 37 °C po dobu 4 h až 6 h a poté při 41,5 °C po dobu 44 h ± 4 h [42]. Nejčastěji používanou pomnožovací půdou je bujon podle Boltona.

4.1.2 Vyočkování na tuhé selektivní půdy a výběr pro konfirmaci

Získaná kultura ze selektivního pomnožení se inokuluje na dvě tuhé půdy:

- na modifikovaný dezoxycholátový agar a aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCD agar)
- na jakoukoli další tuhou selektivní půdu založenou na jiném principu než mCCD agar (agar podle Karmaliho nebo agar podle Prestona) [42,41].

Obě půdy se inkubují při 41,5 °C v mikroaerobní atmosféře a po inkubaci 44 h ± 4h se zjišťuje přítomnost kolonií, které jsou podle svých znaků suspektní jako kolonie příslušníků rodu *Campylobacter* [42].

Typické kolonie na agaru mCCD jsou našedlé, často s kovovým leskem, ploché a hladké s tendencí se rozrůstat. Na povrchu předsušených agarových ploten se kolonie rozrůstají méně. Mohou se vyskytovat rovněž jiné formy kolonií [42].



Obr. 4: Ukázka růstu kolonií *Campylobacter* na mCCD agaru [43].

4.1.3 Konfirmace

Kolonie suspektní jako kolonie příslušníků rodu *Campylobacter* se subkultivují na neselektivní krevní agar Columbia a poté se konfirmují podle mikrobiologického obrazu a vhodných biochemických a růstových testů. Volitelná je identifikace druhů *Campylobacter* specifickými biochemickými testy a testy citlivosti k antibiotikům [42].

Pro konfirmaci se vybere z každé plotny obou izolačních půd nejméně jedna kolonie typická nebo suspektní jako kolonie příslušníků rodu *Campylobacter* a další čtyři kolonie, pokud konfirmace první kolonie poskytne negativní výsledek [42].

Každá z vybraných kolonií se samostatně inokuluje na plotnu krevního agaru Columbia tak, aby se umožnil vývoj dobře izolovaných kolonií. Plotny se inkubují v mikroaerobní atmosféře při teplotě 41,5 °C po dobu 24 h až 48 h. Čisté kultury se použijí k testování morfologie, pohyblivosti, růstu v mikroaerobní atmosféře při 25 °C, aerobního růstu při 41,5 °C a k průkazu oxidázy [42].

Přítomnost *Campylobacter* spp. se konstatuje, pokud alespoň jedna z testovaných kolonií vykazuje uvedené znaky. Znaky uvádí tabulka 9.

Tab. 9. Znaky *Campylobacter* spp. [42].

morfologie	drobně zahnuté tyčinky
pohyblivost	charakteristická
růst v mikroarobní atmosféře při 25 °C	-
růst za aerobních podmínek při 41,5 °C	-
oxidáza	+

4.2 Další metody průkazu kampylobakterů

Ve vzorcích potravin mohou být kampylobaktery v malém množství a jsou poměrně citlivé na vnější faktory jako je atmosférický kyslík, nízké pH, vysušení a teplotu. Účinné metody pro průkaz těchto bakterií v potravinách jsou důležitým faktorem pro ochranu veřejného zdraví, ale detekce *Campylobacter* standardními metodami je problematická. Dalším problémem je, že se může počet životaschopných buněk rychle a podstatně snížit během skladování nebo přepravy vzorků potravin do zkušební laboratoře. Použitím metod detekce jako je polymerázová řetězová reakce (PCR) může přispět k překonání výše uvedených problémů [44].

Existuje celá řada testů pro potvrzení *Campylobacter* podle rodu a druhu. Patří mezi ně biochemické, genetické, imunochemické, chemotaxonomické profilování mastných kyselin, metody gelové elektroforézy a měření molekulové hmotnosti druhově specifických proteinových biomarkerů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. [45,40].

Imunologické metody představují alternativní techniky detekce kympylobakterů v různých typech vzorků. Jsou založeny na interakci antigenu se specifickou protilátkou. Aglutinační reakce se stala základem několika komerčně dostupných testů. Všechny využívají latexových částic s imobilizovanými imunoglobuliny, které byly připraveny proti: 1) antigenům různých druhů rodu *Campylobacter* tj. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. fetus* subsp. *fetus* (Campyslide, BBL Crystal Microbiology System); 2) různým sérotypům *C. jejuni* (Microscreen, Mercia Diagnostics); 3) flagelárnímu antigenu *C. jejuni* (Meritec-Campy, Meridian Diagnostics) [40].

Nejznámější a nejvyužívanější molekulárně biologickou metodou je v současnosti polymerázová řetězová reakce neboli PCR (z anglického „*P*olymerase *C*hain *R*eaction“). Slouží ke zmnožení neboli amplifikaci specifických úseků DNA a využívá procesů denaturace, hybridizace a syntézy (replikace) DNA. V současné době široce využívána jak pro detekci kampylobakterií v různých typech vzorků, tak pro další charakterizaci izolovaného mikroorganismu. 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 úseky genu *hipO* pro hippurikasu nebo *mapA* pro membránový protein A [46,40].

Biotypizačních schémat pro identifikaci *Campylobacter* spp. je několik, ale všechny používají kombinaci několika biochemických testů. Nejpoužívanější schéma je podle Liora, které sleduje 3 základní reakce (hippurát, produkci sirovodíku a hydrolýzu DNA). Uvedené Liorovo schéma dělí termofilní *Campylobacter* spp. do 8 skupin. Čtyři biotypy představuje *C. jejuni* a po dvou biotypech je rozdělen *C. coli* a *C. lari*. Biotypizace se spíše využívá jako doplňkový test spolu s dalšími metodami [4].

Tab. 10. Biotypizační schéma pro termofilní *Campylobacter* spp.[4].

Mikroorganismus	Biotyp	Hydrolýza hippurátu	Produkce H ₂ S	Hydrolýza DNA
<i>C. jejuni</i>	I	+	-	-
	II	+	-	+
	III	+	+	-
	IV	+	+	+
<i>C. coli</i>	I	-	-	-
	II	-	-	+
<i>C. lari</i>	I	-	+	-
	II	-	+	+

5 POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE S DETEKČÍ V REÁLNÉM ČASE – REAL-TIME PCR

5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce (*polymerase chain reaction*, PCR) je elegantní a jednoduchá metoda, která umožňuje amplifikovat *in vitro* požadovaný specifický úsek DNA prakticky v neomezeném množství, přičemž množství původního vzorku DNA může být extrémně malé (teoreticky ho může představovat jediná molekula). Navíc díky tomu, že syntetizovaná DNA obsahuje prakticky výhradně sledovanou sekvenci, není ji zpravidla nutno dále typizovat [47].

5.2 Real-Time PCR

Real-Time PCR umožňuje zjistit syntézu cílového produktu během každého jednotlivého kroku. Real-Time PCR samozřejmě vyžaduje speciální cykler, který dokáže změřit množství fluorescence pocházející buď z barviva (Ethidiumbromid, SYBR Green I) anebo značených sond navázaných na fragmenty DNA, které vznikají během amplifikačních cyklů. Výsledek se jeví ve formátu křivky, která v případě amplifikace pozvolna stoupá až do momentu exponenciální fáze, která nastupuje kolem 5 – 15 cyklu PCR a včasnost jejího nástupu je závislá od množství cílové DNA v analyzovaném vzorku. Právě to umožňuje kvantifikaci srovnáním s křivkami vzorků se známou koncentrací templátové DNA a sestavením kalibrační křivky pomocí softvéru je možné velmi přesně určit množství DNA (nebo případně RNA), která vstoupila do reakce (tedy množství původního templátu), přestože se často jedná i jen o několik molekul [47].

Přesná kvantifikace amplikonů je možná pomocí sondy označené fluorescenčním barvivem. Tato sonda musí být sestavena tak, aby hybridizovala s vyšetřovanou DNA za stejných podmínek jako primery. Po denuraci se sonda navázána k templátové DNA v místě, které leží mezi sekvencemi, k nimž nasedají oba protisměrně orientované primery. Termostabilní DNA-polymeráza, která připojuje ke každému primeru další nukleotidy, narazí při syntéze komplementárního vlákna na navázanou sondu. V této fázi enzym projeví exonukleázovou aktivitu. Znamená to, že pokračuje v syntéze nového komplementárního vlákna, přičemž sondu postupně odbourává a na její místo zařazuje nukleotidy z reakční směsi (stejného principu se také využívá při nick-translačním zařazení sond). Při odbourávání se jednotlivé nukleotidy tvořící původní řetězec sondy do roztoku. Některé z těchto

nukleotidů jsou označeny specifickým fluorescenčním barvivem, které však nefluoreskuje, pokud je navázáno na sondu. Jakmile se ovšem uvolní do roztoku, schopnost fluorescence se obnoví. V průběhu PCR tak pokračuje uvolňování přímo úměrný množství ampliconů, které při reakci vznikají [46].

Výše popsaný postup je zjednodušenou ukázkou jedné z mnoha modifikací kvantitativní PCR v reálném čase. V tomto případě obsahuje použitá sonda kromě fluorescenčního barviva kovalentně navázaný zhášecí tj. molekulu, v jejíž přítomnosti k fluorescenci nedochází. Uvolněním nukleotidu s navázaným barvivem (při exonukleázové reakci) se však kontakt fluorescenčního barviva se zhášecím přerušuje a při ozáření UV světlem dojde k indukci fluorescence [46].

Kromě uvedeného postupu se používají i jiné techniky, které naopak využívají specifických barviv (např. Ethidiumbromid, SYBR Green I), jež fluoreskují pouze při vazbě na dvouřetězcovou dsDNA, zatímco v přítomnosti jednořetězcové (denaturované) ssDNA k fluorescenci nedochází. Nárůst ampliconů tvořených dsDNA se tak (stejně jako v předchozím případě) projeví zvýšením fluorescenční intenzity reakční směsi [46].

Pro kvantitativní PCR v reálném čase se používají speciální termocyklery (tzv. světelné termocyklery), v jejichž nitru je vzorek ozařován excitačním UV zářením, které indukuje fluorescenci příslušného barviva. Po každém cyklu změří intenzitu fluorescence speciální detektor, jenž převádí výsledky do počítače. Specializovaný program pak zaznamenává průběžně neboli v reálném čase koncentraci fluorescenčního barviva, které odpovídá množství vzniklého ampliconu. Často lze relevantní výsledky odečíst dříve, než proběhnou všechny naprogramované cykly [46].

Popsaná technika výrazně urychluje vyšetření, která by jinak vyžadovala zdlouhavou elektroforézu a následnou detekci ampliconu na gelu. Užitečná je především v případech, kde potřebujeme znát přesné množství vstupní templátové DNA (tedy úseku, jenž hodláme amplifikovat) [46].

Tuto metodu lze využít k detekci enteropatogenních mikroorganismů (*E. coli* O157:H7, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, atd.) v potravinách a nápojích (např. hovězí maso, kuřecí maso, mléko, nápoje sycené oxidem uhličitým, aj.), i když není běžně využívána vzhledem k vysoké nákladovosti. Kromě detekce patogenů je metoda Real-Time PCR použita k detekci rezistence vůči antibiotikům a toxinových genů u mikrobiálních patogenů [48].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo detekovat *Campylobacter* spp. na povrchu kůže jatečně opracovaných těl brojlerových kuřat chovaných na farmách v rámci ekologického zemědělství a chovu na podestýlce. Průkaz kampylobakterů byl proveden pomocí metody Real-Time PCR.

7 MATERIÁL A METODIKA

7.1 Původ vzorků

Celá chlazená kuřata byla zakoupena na farmách, které jsou zaměřeny na chov selské drůbeže a brojlerů tzv. „prodej ze dvora“ a chov drůbeže z ekologického zemědělství, dále ve velkoobchodu MAKRO Olomouc, která také pochází z ekologického zemědělství.

Selská drůbež a brojleři na farmě Klokočí jsou chovaná tradičním způsobem a porážena v místě výkrmu, nejsou převážena na jatka nebo zpracovatelských závodů a je eliminován předporážkový stres. „Prodej ze dvora“ je oficiální a zákonem stanovené označení pro přímé dodávání malých množství masa a živočišných produktů, prodej ve svém hospodářství přímo spotřebiteli, anebo v tržnici nebo na tržišti nejbližších k jeho hospodářství. Veterinární požadavky stanovuje vyhláška č. 289/2007 Sb. O veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy ES [49].

Bioprodukt je surovina rostlinného nebo živočišného původu nebo hospodářské zvíře získané v ekologickém zemědělství. Drůbež z ekologického zemědělství je chovaná na základě přirozeného chování a v souladu s přírodou, cílem je vytvářet dobré životní podmínky zvířat a to v souladu se zákonem 242/2000 Sb. O ekologickém zemědělství a Nařízení rady (ES) č. 853/2007 o ekologické produkci a označování ekologických produktů. Osoba, která uvádí na trh výrobky označené jako „bio“ musí být evidována a registrována podle zákona 242/2000 Sb. [50].

Byla odebrána celá jatečně opracovaná těla. K analýze byla použita křídla, která byla sterilně odebrána do mikroténových sáčků a odvezena do laboratoře.

Tabulka 11 uvádí původ odebraných vzorků.

Tab. 11. Původ odebraných vzorků 1-20.

Číslo vzorku	Původ odebraného vzorku
1	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
2	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
3	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
4	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
5	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
6	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
7	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství
8	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
9	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
10	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství
11	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
12	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství
13	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství
14	MAKRO Olomouc – prodejce kuřat z ekologického zemědělství
15	MAKRO Olomouc – prodejce kuřat z ekologického zemědělství
16	MAKRO Olomouc – prodejce kuřat z ekologického zemědělství
17	MAKRO Olomouc – prodejce kuřat z ekologického zemědělství
18	Farma Klokočí, Lipník nad Bečvou – prodej ze dvora
19	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství
20	Farma Miroslav Strachota, Štíty – ekologické zemědělství

7.2 Použité přístroje, zařízení a chemikálie

Automatické mikropipety NICHIPET EX, Japonsko

Špičky různých velikostí

Laboratorní sklo – odměrný válec, zkumavky, pipety 10 ml

Eppendorfové zkumavky

Termoblok BIO TDB-100 Dry Block Heating Thermostat-Biosan Ltd., Litva

Ultracentrifuga laboratorní chlazená MR 23i, TRIGON PLUS, spol. s r.o., Praha

Centrifuga MiniSpin plus, Eppendorf AG, Německo

Chladnička kombinovaná CSA 31020 BEKO, BEKO s.r.o., Praha

Digitální váha KB800 Kern&Sohn GmbH, Německo

Termocykler CFX 96 Real-Time Systém BIO RAD, USA

Stomacher 001 – Seward

Bio Vortex V1 dotykový, BioTech Praha

UV-transluminátor SYNGENE/INGENIUS LHR, UK

Zdroj napětí MP3 – 300N – MAJOR SCIENCE, Taiwan

Elektroforéza horizontální model 4, OWL Separation System Inc., USA

PCR Tube Strips, Flat Cap Strips, Bio-Rad, Čína

Agaróza SeaKem LE Agarose, Lonza, USA

High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche, Německo

Ethidiumbromid 10 mg / ml, SERVA Electrophoresis GmbH, Německo

TAE pufr (Tris, kyselina octová, EDTA)

Isopropanol, Lachema, ČR

Fyziologický roztok

iQ™ SYBR Green supermix, BioRad, USA

PCR vkladací pufr, Top - Bio s.r.o., Praha

MgCl₂, Top – Bio s.r.o., Praha

dNTP mix (mix dATP, dCTP, dGTP, dTTP), Top – Bio s.r.o., Praha

Taq DNA polymeráza, Top – Bio s.r.o., Praha

Primery, Integrated DNA Technologies IDT (složení viz Tab. 16)

DNA molekulový standard (100bp), New England Biolabs

sterilní RO voda, Milipore

7.3 Izolace DNA

7.3.1 Příprava vzorků kuřat

Z každého vzorku bylo sterilně naváženo 10 g kůže do označeného polyetylenového sáčku a přidáno 100 ml fyziologického roztoku. Kůže byla oddělena pomocí sterilních nůžek a pinzet, sterilní odběr byl zajištěn pomocí plamene plynového kahanu. Sáček i s obsahem byl homogenizován ve Stomacheru po dobu 1-2 minut. Po homogenizaci bylo odebráno 10 ml do předem označených zkumavek.

7.3.2 Izolace DNA pomocí kitu

Izolace DNA ze vzorku byla provedena pomocí komerční izolační sady High Pure PCR Template Preparation Kit firmy Roche. Umožňuje rychlou a účinnou izolaci DNA z nejrůznějších vzorků materiálu (např. krev, buňky v kultuře, tkáně).

Pracovní postup:

Ze zkumavek po 5 minutách bylo odebráno 200 μ l vzorku, ke kterému bylo přidáno 200 μ l lyzačního pufru (Tissue-Lysis Buffer) a 40 μ l Proteinázy K. Směs byla řádně protřepána na Vortexu a následně vytemperována po dobu 10 minut při teplotě 70 °C v termostatu. Po temperaci bylo přidáno 100 μ l isopropanolu a následně centrifugováno po dobu 5 minut při 4000 otáček za minutu a teplotě 22 °C.

Lyzační směs byla přenesena na kolonky se speciálním filtrem společně se sběrnými zkumavkami a bylo přidáno 200 μ l vazného pufru (Binding Buffer) a centrifugováno 1 minutu při 8000 otáčkách za minutu při 5 °C.

Filtrát byl odstraněn a kolonky umístěny do sběrných zkumavek, poté bylo přidáno 500 μ l speciálního pufru na odstranění inhibitorů (Inhibitor removal Buffer) a provedena centrifugace při 8000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty při 5 °C.

Filtrát byl opět odstraněn a kolonky umístěny do sběrných zkumavek a bylo napipetováno 500 μl promývacího pufru (Washing Buffer) a centrifugováno při 8000 otáčkách za minutu po dobu 1 minuty při 5 °C. Filtrát byl odstraněn a opět bylo přidáno 500 μl promývacího pufru (Washing Buffer) a centrifugováno při 8000 ot./min. a teplotě 5 °C po dobu 1 min.

Po odstranění filtrátu a umístění kolonky do eppendorfky bylo přidáno 200 μl elučního pufru (Elution Buffer), který byl vytemperován při 70 °C a provedena centrifugace při 8000 ot./min. při 22 °C.

7.4 PCR Amplifikace

7.4.1 Příprava reakční směsi

Ve stojanu byly seřazeny všechny komponenty pro PCR reakci. Do eppendorfkové zkumavky bylo napipetováno množství jednotlivých PCR komponent podle tabulky 12. Po smíchání byla směs připravena.

Připravená směs byla přidána v objemu 45 μl do předem připravených tenkostěnných mikrozkuvek o objemu 0,2 ml, ve které bylo již napipetováno 5 μl izolované DNA + 1 vzorek negativní kontrola a 1 vzorek pozitivní kontrola. Takto připravené reakční směsi byly vloženy do termocyklu.

Tab. 12. Složení a výchozí koncentrace reakční směsi PCR.

PCR komponenta	Výchozí koncentrace	Pro 1 vzorek [μl]	Pro 22 vzorků [μl]
PCR pufr	10 x	5	110
MgCl ₂	25 mM	6	132
dNTP	2 mM	5	110
Primer 1	0,1 mM	1	22
Primer 2	0,1 mM	1	22
Taq DNA polymeráza	5 U / μl	0,4	8,8
Vzorek DNA	cca 500 $\mu\text{g/ml}$	---	---
Voda	---	26,6	585,2

Pro Real-Time PCR bylo použito druhé reakční směsi s fluorescenčním barvivem iQ™ SYBR Green supermix pro detekci množství produktu PCR během reakce dle tabulky 15. Do eppendorkové zkumavky bylo napipetováno 525 µl směsi iQ™ SYBR Green supermix, 10,5 µl primeru 1, 10,5 µl primeru 2 a 294 µl destilované vody. Směs SYBR GREEN SUPERMIX obsahuje všechny PCR komponenty kromě primerů.

Tab. 13. Složení a výchozí koncentrace reakční směsi Real-Time PCR.

Komponenta	Výchozí koncentrace	Pro 1 vzorek [µl]	Pro 22 vzorků [µl]
iQ™ SYBR Green supermix	1 x	25	550
Primer 1	100 nM - 500 nM	0,5	11
Primer 2	100 nM - 500 nM	0,5	11
Vzorek DNA	-----	---	----
Destilovaná voda	-----	14	308

Do připravených tenkostěnných mikrozkuvek o objemu 0,2 ml bylo napipetováno 10 µl izolované DNA a 40 µl připravené směsi a mikrozkuvky byly uzavřeny a vloženy do naprogramovaného termocyklu Real-Time PCR.

7.4.2 Použité primery

Pro analýzu *Campylobacter* spp. byly použity primery komplementární k úseku DNA kódujícímu 16S rRNA. Velikost produktu amplifikace je 124 bp. Sekvence primerů jsou uvedeny v tabulce 14. Primery, které byly použity, byly vybrány na základě referencí mezinárodní validační studie, ve které bylo posuzováno 19 primerů a jejich 26 kombinací [44].

Tab. 14. Použité primery pro detekci *Campylobacter* spp. [44].

Primer	Oblast	Sekvence
18-1	16S	5'- TTCTGACGGTACCTAAGGAA
OT1559	16S	5'- TGCTTAACACAAGTTGAGTAGG

7.4.3 Amplifikace nukleových kyselin

Amplifikace byla provedena v termocykleru Real-Time PCR CFX 96 (Bio-Rad, USA).

Termocykler byl nastaven a spuštěn dle programu uvedeného v tabulce 15.

Tab. 15. Podmínky amplifikační reakce [44].

Úvodní denaturace	94 °C	2 minut
Denaturace DNA	94 °C	30 sekund
Annealing	58 °C	15 sekund
Syntéza nových řetězců	72 °C	30 sekund
Opakování cyklů	30 x	

7.5 Elektroforetická detekce amplikonů klasické PCR

Nejčastěji se produkt PCR analyzuje pomocí elektroforetické separace v agarózovém gelu po obarvení ethidiumbromidem. Velikost DNA fragmentu produktu amplifikační reakce se porovnává se standardem, který obsahuje fragmenty DNA o známé velikosti. Do jedné dráhy gelu se vloží standard, do vedlejší dráhy se vloží ukončená PCR reakce a oba vzorky se nechají určitý čas putovat v gelu. Jednotlivé fragmenty DNA se uspořádají na gelu podle svých velikostí (délek) a jsou detekované ve formě proužků. Pokud je produkt PCR tvořený DNA fragmentem, kterého velikost odpovídá očekávané velikosti (počet nukleotidových párů od jednoho primeru k druhému), výsledek je pozitivní – došlo k amplifikaci specifického produktu [51].

Amplifikovaná DNA byla analyzována ve 2 % agarózovém gelu v prostředí TAE pufru a vizualizována barvením ethidiumbromidem pomocí UV-záření na transluminátoru.

Tab. 16. Příprava agarózového gelu pro elektroforetickou detekci při koncentraci 2 %.

Komponenty	Množství
Agarosa	3 g
Ethidiumbromid	8 μ l
TAE pufr	147 ml

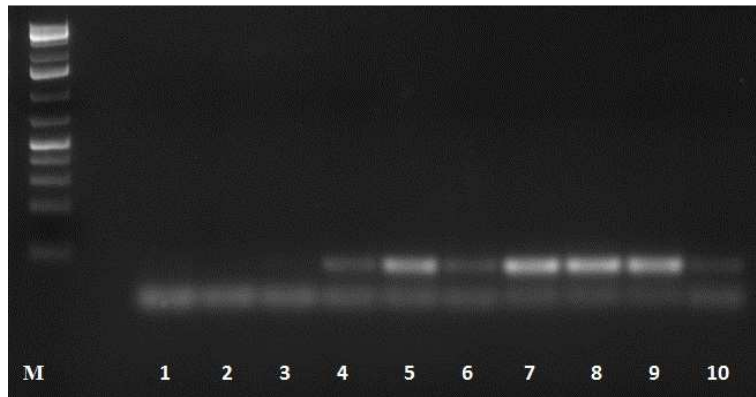
Bylo naváženo 3 g agarózy do erlenmayerovy baňky, k navážce bylo přidáno 147 ml TAE pufru a směs byla rozpuštěna v mikrovlnné troubě. Po rozpuštění byl roztok zchlazen a přidán ethidiumbromid v objemu 8 μ l, který je toxický a mutagenní, proto bylo nutné další operace provádět s gumovými rukavicemi. Do sestavené elektroforetické aparatury s destičkou byl vlit připravený roztok. K vytvoření jamek byl použit hřeben úměrný objemu nanášeného vzorku DNA. Gel se nechal vychladit při laboratorní teplotě a po ochlazení byl vysunut hřeben a destička s gelem byla vložena do elektroforetické aparatury a zalit TAE pufrům tak, aby roztok přesahoval gel.

Pro elektroforézu bylo použito 10 μ l amplifikovaného PCR vzorku a 2 μ l nanášecího pufru, které byly naneseny na mikrotitrační destičku, ve které byly rozmíchány a nanášeny na gel vždy zleva doprava. Do první jamky byl vždy nanesen marker v objemu 10 μ l. Aparatura byla připojena na zdroj napětí. Elektroforetická separace trvala 45 minut při napětí 120 V. Po dokončení elektroforézy byl gel vložen do transluminátoru a pomocí UV-záření bylo možné sledovat fluorescenci.

8 VÝSLEDKY

8.1 Výsledky gelové elektroforézy

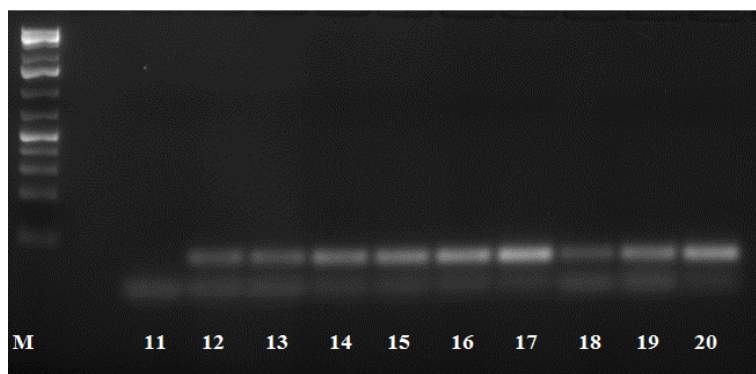
Výsledky gelové elektroforézy jsou znázorněny na obrázcích 5 a 6. Agarózový gel obsahuje 11 drah celkem, na první je nanesen DNA marker s fragmenty DNA o známé velikosti.



Obr. 5: Agarózová gelová elektroforéza, vzorky 1-10,

M- marker 100 bp.

Z obrázku je patrné, že pozitivní vzorky byly detekovány u vzorků 4-10, kde se nachází fragment DNA o velikosti mírně nad 100 bp.



Obr. 6: Agarózová gelová elektroforéza, vzorky 11-20,

M- marker 100bp.

Z druhé skupiny vzorků byl tentýž fragment DNA zaznamenán u vzorků 12 – 20.

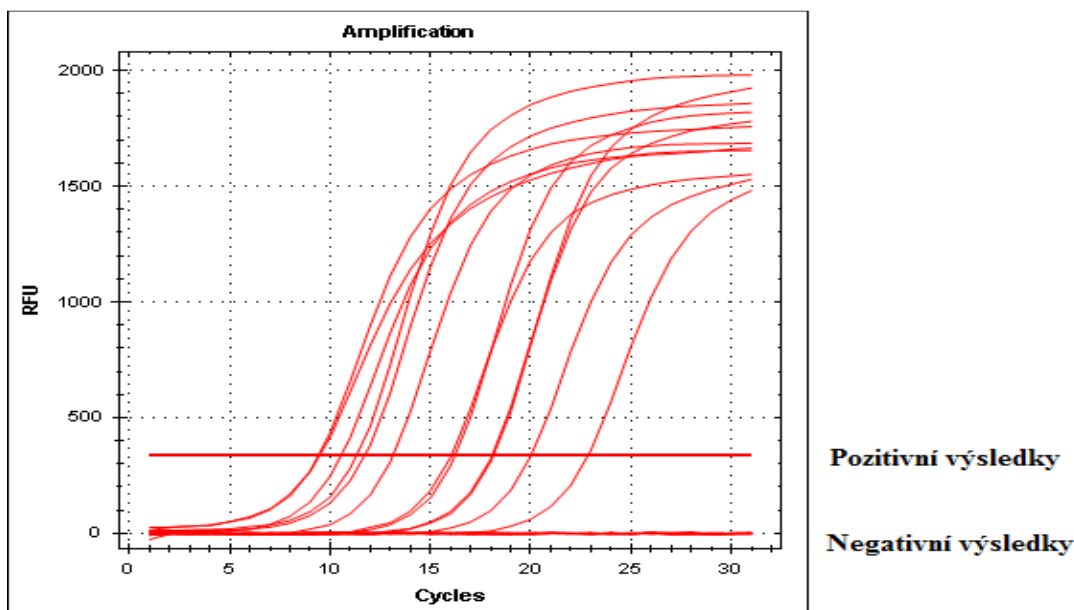
Z obrázků je patrné, že vzorky 4-10 a 12-20 obsahovaly zkoumaný mikroorganismus patřící do rodu *Campylobacter* spp. Metodou PCR byl *Campylobacter* spp. prokázán u 16-ti vzorků.

8.2 Real-Time PCR

Real-time PCR umožňuje přímou vizualizaci PCR produktu v průběhu reakce. Výhodou metody je, že zahrnuje jak amplifikaci, tak i detekci.

8.3 Výsledky Real-Time PCR

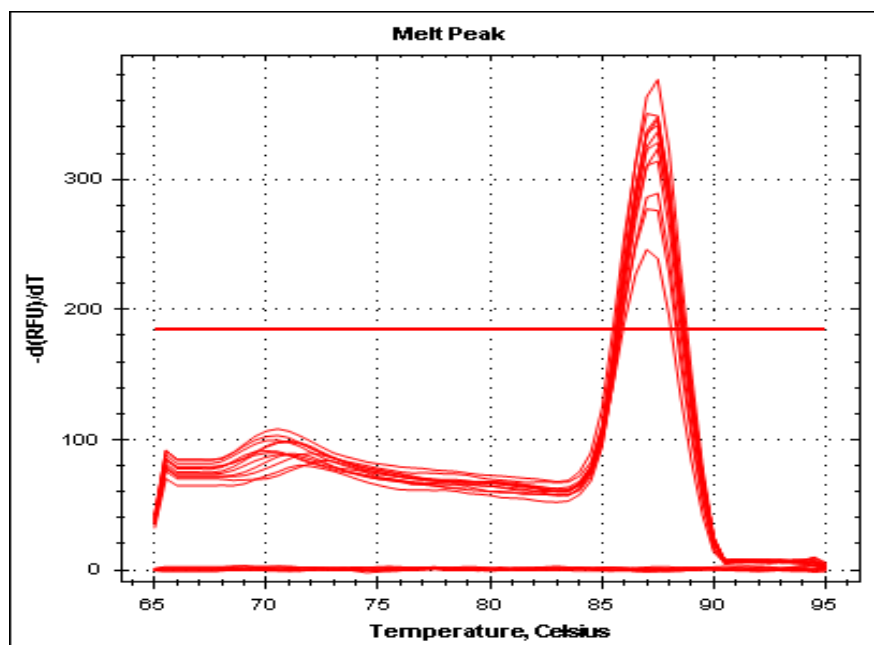
Pozitivních bylo celkem 16 vzorků s různým obsahem DNA *Campylobacter* spp. K nástupu exponenciální fáze amplifikace došlo mezi 9. a 23. cyklem.



Obr. 7: Výsledky detekce metodou Real-Time PCR.

Ke zjištění povahy produktů PCR se používá analýza křivky tání tzv. melting analýza po ukončení Real-Time PCR. Účelem je identifikace PCR produktů založené na odlišných teplotách tání závislé od primární struktury DNA, tzn., že u stejných PCR produktů je tep-

lota tání stejná. Když se tato teplota liší, znamená to odlišnost v sekvenci DNA a tím pádem se nejedná o identický DNA fragment.



Obr. 8: Melting analýza PCR produktu.

Melting analýza potvrdila specifitu amplifikace se stejnou teplotou tání PCR produktu u všech 16-ti pozitivních vzorků (86,5 °C).

Provedené analýzy metodami PCR a Real-Time PCR potvrdili pozitivitu u 16-ti vzorků z 20-ti celkem, což představuje 80%. Melting analýza potvrdila specifitu amplifikace, kde teplota tání všech PCR produktů je 86,5°C.

Z tabulky 17 je patrné, že výsledky dosažené klasickou PCR a Real-Time PCR vzájemně korespondují. Tím se ověřila možnost použití Real-Time PCR pro průkaz *Campylobacter* spp. jako metody rychlejší a adekvátně spolehlivé jako klasická PCR.

Tab. 17. Porovnání výsledků dvou použitých metod.

Původ vzorku	Číslo vzorku	Výsledek klasické PCR	Výsledek Real-Time PCR
Farma Klokočí	3	-	-
Farma Klokočí	5	+	+
Farma Klokočí	6	+	+
Farma Klokočí	9	+	+
Farma Klokočí	2	-	-
Farma Klokočí	8	+	+
Farma Klokočí	11	-	-
Farma Klokočí	18	+	+
Farma Klokočí	4	+	+
Farma Klokočí	1	-	-
Makro	16	+	+
Makro	17	+	+
Makro	14	+	+
Makro	15	+	+
Farma Strachota	20	+	+
Farma Strachota	13	+	+
Farma Strachota	12	+	+
Farma Strachota	19	+	+
Farma Strachota	7	+	+
Farma Strachota	10	+	+

+ pozitivní nález *Campylobacter* spp., – negativní nález *Campylobacter* spp.

9 DISKUZE

Práce byla zaměřena na průkaz termofilních kampylobakterů (*C. jejuni*, *C. coli*) vyskytujících se převážně u drůbeže.

Na základě vyšetření odebraných vzorků bylo zjištěno, že z 20-ti vzorků bylo 16 pozitivních a 4 negativní, což představuje 80 % -ní výskyt *Campylobacter* spp. u zkoumané drůbeže. Nejčastější záchyt byl pozorován u vzorků z ekologických chovů, ať už se jednalo o kuřata zakoupená přímo u chovatele nebo pocházející z velkoobchodu Makro. Zkoumaný byl povrch těl jatečně opracovaných kuřat po vykuchání a z výsledků je zřejmé, že drůbež je velmi významným zdrojem sledovaného mikroorganismu a tedy i kampylobakterií. Rizikovým faktorem je nejen transport zvířat z farem, ale také následující operace související s kuchyňskou přípravou masa. Zvýšená pozornost by se proto měla věnovat nejen dezinfekci přepravního materiálu, ale i způsobu přípravy masa v zařízeních veřejného stravování a domácnostech. Technologické operace související s přípravou by měly být dodržovány striktně a měla by se věnovat pozornost prevenci rizika sekundární kontaminace.

V této práci byly použity metody molekulární biologie, metody polymerázové řetězové reakce PCR s elektroforetickou detekcí na agarózovém gelu a Real-Time PCR. Tyto metody v porovnání s metodami kultivačními jsou relativně krátké v rámci celého procesu diagnostiky. Klasická kultivační technika trvá od 2 dnů při negativním výsledku až do 6-ti dnů u pozitivních nálezů. Délka PCR diagnostiky je maximálně 6 hodin. Citlivost PCR metod je vysoká, a proto potřeba zkoumaného množství materiálu je malá. Na druhou stranu vysoká citlivost se může stát nevýhodou, kdy mohou nastat případy falešné positivity.

Podle výzkumu z roku 2005 se výskyt *Campylobacter* spp. pohybuje od 0,2 % do 85,2 % na farmách chovajících brojlerů v Evropě [38].

Podle tabulky 11, kde je uveden původ vzorků, můžeme přesně identifikovat pozitivní a negativní vzorky. Negativní výsledky odpovídají vzorkům 1-3, a 11, které pocházející z farmy Klokočí. Pozitivní výsledky u vzorků 4-6 a 8-9 odpovídají vzorkům kuřat odebraných z farmy Klokočí. Vzorky 7, 10, 12 a 13 pocházející z ekologického chovu z farmy Strachota Miroslav Štítý jsou všechny pozitivní. Pozitivní vzorky 14-16 taktéž pocházející z ekologického chovu a byly zakoupené ve velkoobchodu Makro. Můžeme konstatovat, že prevalence u vzorků z ekologického zemědělství činí 100 % a u vzorků, které byly pořízeny z farmy Klokočí, činí 60 %.

V dánské studii byly kampylobaktery nalezeny ve všech 22 vzorcích (100 %) z ekologického chovu, pro srovnání z konvenčního chovu ze 79 vzorků pouze 29 pozitivních (36,7 %). Což znamená, že výskyt *Campylobacter* spp. byl významně vyšší u ekologického chovu [52].

V americké studii bylo odebráno 198 vzorků z ekologického chovu a 61 vzorků z konvenčního chovu, které byly odebrány ze tří maloobchodních prodejen běžných a tří prodejen zaměřených na biopotraviny. Pozitivních vzorků bylo 76 % z ekologického zemědělství a 74 % z konvenčního chovu [53].

Z výsledků naší analýzy a srovnáním s výše uvedenými analýzami můžeme konstatovat podobnost výsledků.

Důvodů vyššího výskytu kampylobakterů je mnoho, ale především mezi ně patří technologické zpracování drůbeže, a to riziko kontaminace patogenními mikroorganismy ze střevního obsahu. Dalšími faktory ovlivňující kontaminaci jsou teplota masa při bourání, porcování a balení masa, skladování, doprava a manipulace s jatečně opracovanými těly zvířat při přepravě. Výsledky ukazují na chybu při výrobní a hygienické praxi jatečně opracovaných těl drůbeže.

Za jednu z hlavních příčin vzniku kampylobakterií je považována zvyšující se konzumace drůbežního masa. Doporučení pro prevenci vzniku kampylobakterií, která je typickou zoonózou, je preventivní opatření a seznámení lidí, kteří pracují s potravinami živočišného původu se základními pravidly pro přípravu a podávání pokrmů. Mezi základní zásady prevence patří níže uvedené body, které by měli dodržovat lidé pracující v zařízeních veřejného stravování, ale lidé, kteří připravují pokrmy z drůbežního masa v domácnostech.

Zásady prevence vzniku kampylobakterií:

- v prostorách, kde se manipuluje s potravinami, nesmí pracovat lidé se střevními obtížemi,
- používat pouze pasterované mléko a pitnou vodu z bezpečných zdrojů,
- zamezit sekundární kontaminaci již připravených pokrmů,
- dodržování systému HACCP při přípravě pokrmů,
- důkladná dezinfekce, dezinfekce a deratizace všech prostor,
- nástroje, plochy a zařízení udržovat v dokonalé čistotě,

- při tepelné úpravě masa udržovat teplotu nad 60 °C, při regeneraci pokrmu záhřev nejméně na 70 °C ve všech částech,
- mytí rukou před a po manipulaci s potravinami, čistý pracovní oděv a obuv.

Způsoby přenosu bakteriálních agens na farmách mohou být různé. Vertikální přenos prostřednictvím kontaminované skořápky vajec na kuřata, tak jak je pozorován u přenosu salmonel, je nepravděpodobný. Přirozená infekce vaječného obsahu, pokud k němu dojde, je v první řadě v důsledku fekálního znečištění vnějšího povrchu a proniknutí přes povrchové praskliny ve skořápce. Za nejvýznamnější příčinu infekce *C. jejuni* v hejnech je obecně považován horizontální přenos. Mezi běžné rizikové faktory patří špatná údržba prostor, nedostatečné čištění a dezinfekce, možnost kontaminace od jiných zvířat ustájených v blízkosti chovu, kontaminovaná napájecí zařízení a voda jimi protékající. Dalšími zdroji mohou být krmivo a podestýlka, zaměstnanci, vzduch, divoká zvířata, hmyz, hlodavci [54].

Vzhledem k tomu, že kampylobaktery nebyly izolovány z čisté a suché podestýlky a suchých krmiv lze tuto cestu přenosu vyloučit. Kampylobaktery však byly izolovány z napájecích zařízení a vody a byly totožné s těmi, které byly izolovány z trusu kuřat. Z různých studií je prokázáno, že *C. jejuni* může přežívat ve vodě v závislosti na teplotě až 4 měsíce. Dezinfekce zařízení a chlorování vody výrazně snižuje riziko kontaminace, z těchto důvodů voda představuje nízké riziko kontaminace [54].

Zavedením preventivního režimu lze výrazně snížit počet kusů kolonizovaných *C. jejuni*. Při experimentu se díky opatřením podařilo redukovat množství nosičů *C. jejuni* z 80 % na 20 % [4].

Biologickou bezpečnost na farmách je velmi obtížné dodržet. Standardní pracovní postupy k minimalizaci rizikových faktorů, vzdělávání a motivování zaměstnanců k dodržení mikrobiální bezpečnosti na vyšší úrovni přispívá ke snížení pozitivních výskytů v hejnu [54].

Dalším rizikovým faktorem je porážka a transport drůbeže. Na základě vyšetření odebraných vzorků byly zjištěny významné záchyty *Campylobacter* spp. u drůbeže a na drůbežích porážkách. Z celkem 700 vzorků bylo zjištěno 292 kmenů *C. jejuni* a *C. coli*, což představuje téměř 42 % záchyt. Nejčastější záchyt byl na povrchu kusů před vykucháním, kdy bylo izolováno 77 kmenů, což představuje 51 % výskyt z celkového počtu stěrů kusů před vykucháním. Po sprchování bylo prokázáno 39 kmenů *Campylobacter* spp. (39 % výskyt) a po vychlazení bylo kontaminováno *Campylobacter* spp. 26 % odebraných vzor-

ků. Ze stěrů ze škubačů byl zjištěn 30 % výskyt, z povrchu kuchacího pásu byl 50 % výskyt [55].

Před porážkou by se měl u drůbeže snížit příjem krmiva a obsah zažívacího traktu, při vykrvování by neměly být nadměrné pohyby těla, aby se krev nedostala mimo plochu určenou k vykrvení. Pařící lázně by měly být pravidelně vyměňovány, vzhledem k hromadění exkrementů, peří a zbytků krve či tkání, teplota by měla být okolo 58 – 60 °C. Při škubání se využívá škubacích strojů, které po dokončení by měly být dezinfikovány. Odstraněné peří by mělo být odvezeno do kafilérie. Po oškubání je povrch těla očištěn sprchováním. Po vykuchání následuje prohlídka, po které musí být všechny části vychlazené nejpozději do 2 hodin po porážce, při teplotě pod +4 °C. Nejlepší systém z mikrobiologického hlediska je chlazení vzduchem. Po všech procesech musí být všechny prostory, stroje a nářadí řádně dezinfikovány. Dezinfekce by měla být provedena několikrát denně, vždy po skončení práce.

ZÁVĚR

Kampylobakterióza patří mezi nejčastěji hlášené alimentární onemocnění. Veřejnost není dostatečně seznámena s kampylobaktery, tak jako je tomu u salmonel nebo jiných veřejnosti více mediálně známých mikroorganismů. Z tohoto důvodu výsledky studií zaměřených na výskyt kampylobakterióz početně převyšují výskyt salmonelóz a jiných bakteriálních střevních infekcí. Monitorování a pravidelná kontrola potravinového řetězce dozorovacími orgány přispívá k prevenci a zamezení šíření infekcí. Výrobce potravin, ale i prodejce, by měl jak po legislativní, tak po praktické stránce dodržovat základní hygienickou praxi. Základním principem pro kontrolu a zamezení proniknutí zdravotně závadné potravin do oběhu je systém analýzy rizika a stanovení kritických kontrolních bodů.

Ke vzniku onemocnění dochází příčinou nedostatečně tepelně opracovaného masa, konzumací syrového mléka či pitné vody z neznámého zdroje, dalším způsobem je sekundární kontaminace často se vyskytující u domácí přípravy jídel, ale opomíjeným vehikulem mohou být zvířata chovaná v domácnostech, jako jsou psi, kočky a jiná zvířata.

Cílem diplomové práce bylo detekovat *Campylobacter* spp. na povrchu kůže jatečně opracovaných těl brojlerových kuřat.

Výsledky v praktické části byly z 80-ti % pozitivní a proto i riziko spojené s konzumací kuřat je vysoké.

Výsledky ukazují na chybu při manipulaci s těly jatečně opracované drůbeže, jedná se o kroky související s porážením a chlazením drůbeže. Tyto kroky při jatečném zpracování drůbeže jsou největším rizikem kontaminace.

Metody použité v této práci umožňují přesnou diagnostiku *Campylobacter* spp., ať už se jedná o kvantifikaci či kvalifikaci zkoumaných bakterií.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] STEINHAUSEROVÁ, I. a M. NEBOLA. Je drůbež nejčastější příčinou onemocnění kamylobakteriózou u člověka?. *Veterinářství*. 2002, roč. 52, s. 63-65.
- [2] JEŽEK, P., Petr PETRÁŠ, Pavel ŠVEC a Helena ŠIMKOVÁ. Fatální septikémie u člověka vyvolaná *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Zprávy centra epidemiologie a amikrobiologie (SZÚ, Praha)*. 2012, roč. 21, č. 4, s. 144-148.
- [3] ROWE, M. T. a H. R. MADDEN. *Campylobacter*/Introduction. ROBINSON, R. K. *Encyclopedia of Food Microbiology*. London: Academic Press, 2000, s. 335-340. ISBN 0-12-227070-3.
- [4] STEINHAUSEROVÁ, I. *Campylobacter sp. v prostředí a v potravinách živočišného původu*. 1. vyd. Brno: Vydavatelství potravinářské literatury LAST, 1998. ISBN 80-900260-5-2.
- [5] NACHAMKIN, I., Christine M. SZYMANSKI a Martin J. BLASER. *Campylobacter*. 3. vyd. Washington: ASM Press, 2008. ISBN 978-1-55581-437-3.
- [6] ON, S. L. W. Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter* and related bacteria: current status, future prospects and immediate concerns. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 90, č. S6, s. 1S-15S.
- [7] VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun, 2006. ISBN 80-902896-6-5.
- [8] JURAJDA, V. *Veterinární lexikon ptáků*. Brno: Noviko, 2010. ISBN 978-80-86542-23-2.
- [9] BEDNÁŘ, M., Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996.
- [10] HUMPHREY, T., Sarah O'BRIEN a Mongens MADSEN. *Campylobacters as zoonotic pathogens: a food production perspective*. Belgium: ILSI Europe, 2006. ISBN 90-78637-01-3.
- [11] ADAMS, M. R. a Maurice O. MOSS. *Food Microbiology*. 3 vyd.. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008, ISBN 978-0-85404-284-5.
- [12] VANDAMME, P., Floyd E. DEWRIST, Bruce J. PASTER a Stephen L. W. ON. Genus I. *Campylobacter*. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: The Proteobacteria*. 2.

vyd. New York: Springer Science Business Media, Inc., 2005, s. 1147-1160. ISBN 978-0387-24145-6.

[13] BOURKE, B., Voon Loong CHAN a Philip SHERMAN. *Campylobacter upsaliensis*: Waiting in the Wings. *Clin. Microbiol. Rev.*. 1998, roč. 11, č. 3. s. 440-447. ISSN 0893-8512.

[14] PENNER, J. L. The genus *Campylobacter*: a decade of progress. *Clin. Microbiol. Rev.* 1988, roč. 1, č. 2. s. 157-172. ISSN 0893-8512. DOI: 10.1128/CMR.1.2.157.

[15] RENNIE, R. P., D. STRONG, D. E. TAYLOR, S. M. SALAMA, C. DAVIDSON a H. TABOR. *Campylobacter fetus* diarrhea in a Hutterite colony: epidemiological observations and typing of the causative organism. *Journal of Clinical Microbiology*. 1994, roč. 32, č. 3, s. 721-724. ISSN 0095-1137.

[16] KALISCHUK, L. D. a G. Douglas INGLIS. Comparative genotypic and pathogenic examination of *Campylobacter concisus* isolates from diarrheic and non-diarrheic humans. *BMC Microbiology*. 2011, roč. 11, č. 53. s. 13. DOI:10.1186/1471-2180-11-53.

[17] DOYLE, M. P. a D. J. ROMAN. Response of *Campylobacter jejuni* to sodium chloride. *Appl. Environ. Microbiol.* 1982, roč. 43, č. 3, s. 561-565. ISSN 0099-2240.

[18] MURPHY, C., C. CARROLL a K. N. JORDAN. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Applied Microbiology*. 2006, roč. 100, č. 4. s.623-632.

[19] BUTLER, R. C., V. LUND a D. A. CARLSON. Susceptibility of *Campylobacter jejuni* a *Yersinia enterocolitica* to UV Radiation. *Applied and Environmental Microbiology*. 1987, roč. 53, č. 2. s. 375-378. ISSN 0099-2240.

[20] JURÁNKOVÁ, J. a kol. *Klinická mikrobiologie v laboratorní praxi*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2011, 72 s. ISBN 978-80-210-5657-2.

[21] AMBROŽOVÁ, H. Akutní infekce trávicího traktu. *Interní med.* 2011, roč. 13, č. 7, s. 288-291

[22] RUPRICH, J. et al. Bakteriologická analýzy potravin. IV *Dietární expozice člověka – MIKROMON, SZÚ* [online]. 2009, s. 7 [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://czvp.szu.cz/monitor/tds09c/2%20MIKROMON%2009.pdf>.

[23] TAZUMI, A., Yuki KAKINUMA, Naoaki MISAWA, John E. MOORE, Beverly C. MILLAR a Motoo MATSUDA. Identification and characterization of intervening sequences within 23S rRNA genes from more than 200 *Campylobacter* isolates from seven spe-

cies including atypical campylobacters. *BMC Microbiology*. 2009, roč. 9, č. 256, s. 10. DOI:10.1186/1471-2180-9-256.

[24] AMBROŽOVÁ, H. Letní průjmy. *Med. praxi*. 2011, roč. 8, č.5, 214-218.

[25] LAW, B. a I. Edward ALCAMO. *Campylobacteriosis*. 1. vyd. USA: Chelsae House, 2004. ISBN 0-7910-7899-X.

[26] FROST, J. A. Current epidemiological issues in human campylobacteriosis. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, roč. 90, č. S6, 85S-95S.

[27] KETLEY, J. M. a Michael E. KONKEL. *Campylobacter: Molecular and cellular biology*. Norfolk: Horizon Bioscience, 2005. ISBN 1-904933-05-X.

[28] Foodborne Illness. In: [online]. [cit. 2013-04-08]. Dostupné z: http://www.foodborneillness.com/campylobacter_food_poisoning/

[29] BAKER, M. G., Amanda KVALSVIG, Jane ZHANG, Rob LAKE, Ann SEARS a Nick WILSON. Declining Guillain-Barré Syndrome after Campylobacteriosis Control, New Zealand, 1988-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, roč. 18, č. 2, s. 226-233. ISSN 1080-6040.

[30] AMBROŽOVÁ, H. Průjmová onemocnění z pohledu klinika. *Interní med*. 2009, roč. 11, č. 9, s. 380-383.

[31] Výskyt vybraných hlášených infekcí v České republice v únoru 2013 – porovnání se stejným měsícem v letech 2004-2012. In: [online]. [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vyskyt-vybranych-hlasenych-infekci-v-ceske-republice-v-unoru>.

[32] THAKUR, S. a Wondwossen A. GEBREYES. *Campylobacter coli* in Swine Production: Antimicrobial Resistance Mechanisms and Molecular Epidemiology. *J. Clin. Microbiol.* 2005, roč. 43, č. 11, s. 5705-5714. ISSN 0095-1137. DOI: 10.1128/JCM.43.11.5705-5714.2005.

[33] Vybrané infekční nemoci v letech 2003-2012 - relativně. In: [online]. [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-relativne>

[34] Vybrané infekční nemoci v letech 2003-2012 - absolutně. In: [online]. [cit. 2013-04-12]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>.

- [35] GILLESPIE, I. A., Sarah J. O'BRIEN a Frederick J. BOLTON. Age Patterns of Persons with Campylobacteriosis, England and Wales, 1990-2007. *Emerging Infectious Diseases*. 2009, roč. 15, č. 12, s. 2046-2048. ISSN 1080-6040. DOI: 10.3201/eid1512.090280.
- [36] Scientific Opinion on the public health hazards to be covered by inspection of meat (poultry). *EFSA Journal* [online]. 2012, roč. 10, č. 6 [cit. 2013-05-09]. DOI: 10.2903/j.efsa.2012.2741. Dostupné z: www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- [37] *Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Antimicrobial Resistance in the European Union in 2004*. [online]. EFSA Journal, 2006, roč. 310 [cit. 2013-04-08]. ISBN 92-9199-016-7. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/310ar.pdf>.
- [38] *The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonose, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005*. [online]. European Food Safety Authority, 2007, roč. 94 [cit. 2013-04-08]. ISSN 978-92-9199-046-7. Dostupné z: <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/94r.htm>
- [39] Monitoring zoonóz. In: *Státní veterinární správa* [online]. 2013 [cit. 2013-04-21]. Dostupné z: <http://www.svscr.cz/index.php?art=4613>
- [40] HOCHÉL, I. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp.. *Cemické listy*. 2009, roč. 103, s. 814-822.
- [41] CUPÁKOVÁ, Š., Renáta KARPÍŠKOVÁ a Lenka NECIDOVÁ. *Mikrobiologie potravin – praktická cvičení II*. 1. vyd. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2010. ISBN 978-80-7305-126-6.
- [42] ČSN ISO 10272-1. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp. - Část 1: Metoda průkazu*. Praha: Český normalizační institut, 2006, 20 s.
- [43] STEINHAUSEROVÁ, I a Gabriela BOŘILOVÁ. *Kampylobaktery v potravním řetězci*. In: [online]. [cit. 2013-04-08]. Dostupné z: www.bezpecnakrmiva.cz/soubory/steinhauserova.ppt.
- [44] LÜBECK, P. S., P. WOLFFS, S. L. W. ON, P. AHRENS, P. RÅDSTRÖM a J. HOORFAR. Toward and International Standard for PCR-Based Detection of Food-Borne Thermotolerant Campylobacters: Assay Development and Analytical Validation. *Applied and Environmental Microbiology*. 2003, roč. 69, č. 9. s. 5664-5669. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.69.9.5664-5669.2003.

- [45] MANDRELL, R. E., Leslie A. HARDEN, Anna BATES, William G. MILLER, William F. HADDON a Clifton K. FAGERQUIST. Speciation of *Campylobacter coli*, *C. jejuni*, *C. helveticus*, *C. lari*, *C. sputorum*, and *C. upsaliensis* by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 10. s. 6292-6307. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.71.10.6292-6307.2005.
- [46] KOČÁREK, E. *Molekulární biologie v medicíně*. 1. vyd., 2007, Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 978-80-7013-450-4.
- [47] ZIMA, J., Miloš MACHOLÁN, Pavel MUNCLINGER a Jaroslav PIÁLEK. *Genetické metody v zoologii*. 1.vyd. Praha: Karolinum. 2004, ISBN 80-246-0795-6.
- [48] LOGAN, J., Kristin EDWARDS a Nick SAUNDERS. *Real-Time PCR Current Technology and Applications*. Norfolk: Caister Academic, 2009. ISBN 978-1-904455-39-4.
- [49] Vyhláška č. 289/2007 Sb., o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství [online]. 2007 [cit. 2013-05-11]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_vyhlaska-2007-289-veterinarnipece.html.
- [50] Zákon č. 242/2000 Sb., o ekologickém zemědělství [online]. 2000 [cit. 2013-05-11]. Dostupné z: http://eagri.cz/public/web/mze/legislativa/pravni-predpisy-mze/tematicky-prehled/Legislativa-MZe_uplna-zneni_zakon-2000-242-viceoblasti.html.
- [51] ČIKOŠ, Š., Juraj KOPPEL a Mária KANTÍKOVÁ. *Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike*. Košice: Ústav fyziologie hospodárskych zvierat SAV. 2001, ISBN 80-968618-0-8.
- [52] HEUER, O. E., K. PEDERSEN, J. S. ANDRESEN a M. MANDSEN. Prevalence and antimicrobial susceptibility of thermophilic *Campylobacter* in organic and conventional broiler flocks. *Letters in Applied Microbiology*. 2001, roč. 33, č. 4, s. 269-274.
- [53] CUI, S., Beilei GE, Jie ZHENG a Jianghong MENG. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Campylobacter* spp. and *Salmonella* Serovars in Organic Chickens from Maryland Retail Stores. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005, roč. 71, č. 7, s. 4108-411. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.71.7.4108-4111.2005.

[54] NEWELL, D. G. a C. FEARNLEY. Sources of *Campylobacter* Colonization in Broiler Chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, roč. 69., č. 8, s. 4343-4351. ISSN 0099-2240. DOI: 10.1128/AEM.69.8.4343-4351.2003.

[55] STEINHAUSEROVÁ, I., L. POVOLNÁ a Š. HEJLOVÁ. Výskyt termofilních *Campylobacter* sp. na porážce a u porážené drůbeže. *Veterinářství.* 2002, roč. 52, s. 553-556.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

bp	Párů bází
ČSN	Česká státní norma
D55	Decimal reduction value
dATP	Deoxyadenizintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanozinrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
dsDNA	Dvouřetězová molekula DNA
dTTP	Deoxytymidintrifosfát
EU	Evropská Unie
GBS	Guillan-Barré syndrom
H ₂ S	Sulfan
ISO	International Organization for Standardization
mCCD	Modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem
MgCl ₂	Chlorid hořečnatý
PCR	Polymerázová řetězová reakce
pH	Power of hydrogen
RNA	Riboxynukleová kyselina
rRNA	Ribozomální ribonukleová kyselina
spp.	Species
ssDNA	Jednořetězová molekula DNA
SVS	Státní veterinární správa
TAE	Tris-acetát-EDTA

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Graf výskytu jednotlivých bakteriálních onemocnění za rok 2000 – 2010</i>	21
Obr. 2. <i>Sezónní výskyt C. jejuni sérotyp HS6</i>	23
Obr. 3. <i>Graf – výskyt vybraných infekcí v únoru 2013 a porovnání se stejným měsícem v letech 2004 – 2012</i>	25
Obr. 4. <i>Ukázka růstu kolonií Campylobacter na mCCD agaru</i>	32
Obr. 5. <i>Agarózová gelová elektroforéza, vzorky 1-10, M – marker 100 bp</i>	47
Obr. 6. <i>Agarózová gelová elektroforéza, vzorky 11-20, M – marker 100 bp</i>	47
Obr. 7. <i>Výsledky detekce metodou Real-Time PCR</i>	48
Obr. 8. <i>Melting analýza PCR produktu</i>	49

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Rozdělení lékařsky důležitých druhů <i>Campylobacter</i> ů	14
Tab. 2. Termorezistence kmenů <i>Campylobacter jejuni</i> hodnocená v různých prostředích	18
Tab. 3. <i>Campylobacter spp.</i> – přehled a počet vyšetřených vzorků a pozitivní nálezy podle komodit	22
Tab. 4. Výskyt <i>Campylobacterií</i> v ČR v letech 2003 – 2012	26
Tab. 5. <i>Campylobacterií</i> ve světě v období 2000 – 2005	27
Tab. 6. Zhodnocení výskytu <i>Campylobacter spp.</i> v potravinách živočišného původu od roku 2007 až do roku 2012	28
Tab. 7. Vyhodnocení výsledků sledování <i>Campylobacter spp.</i> v mase brojlerů v tržní síti ČR v roce 2009	29
Tab. 8. Výsledky výskytu <i>Campylobacter spp.</i> v roce 2008 u jatečně opracovaných těl brojlerů	29
Tab. 9. Znaky <i>Campylobacter spp.</i>	33
Tab. 10. Biotypizační schéma pro termofilní <i>Campylobacter spp.</i>	34
Tab. 11. Původ odebraných vzorků	41
Tab. 12. Složení a výchozí koncentrace reakční směsi PCR	44
Tab. 13. Složení a výchozí koncentrace reakční směsi Real-Time PCR	45
Tab. 14. Použité primery pro detekci <i>Campylobacter spp.</i>	45
Tab. 15. Podmínky amplifikační reakce	46
Tab. 16. Příprava agarózového gelu pro elektroforetickou detekci při koncentraci 20 %	47
Tab. 17. Výsledky použitých metod	52