

# **Nově se objevující patogenní mikroorganismy přenosné potravinami**

Jarmila Šuláková

---

Bakalářská práce  
2020



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická  
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2019/2020

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Jarmila Šuláková**  
Osobní číslo: **T17059**  
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**  
Forma studia: **Kombinovaná**  
Téma práce: **Nově se objevující patogenní mikroorganismy přenosné potravinami**

### Zásady pro vypracování

1. Významné patogenní mikroorganismy v potravinách a pitných vodách a možnosti jejich detekce
2. Nově se objevující a neobvyklé patogenní mikroorganismy v potravinách
3. Rizika výskytu nově se objevujících patogenních mikroorganismů v potravinách
4. Možnosti prevence výskytu nových patogenů v potravinách

Forma zpracování bakalářské práce: **Tištěná/elektronická**

**Seznam doporučené literatury:**

- [1] SMITH, J.L., FRATAMICO, P.M. Emerging and re-emerging foodborne pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*, 15: 737-757. 2018.
- [2] ADAMS, M.R., MOTARJEMI, Y. Emerging foodborne pathogens. Cambridge: Woodhead Publishing, 2006, 634 s.
- [3] BLACKBURN, C. DE W. Foodborne pathogens: hazards, risk analysis and control. Boca Raton, CRC Press, 2002, 521 s.
- [4] FRANZ, C.M.A.P., DEN BESTEN, H.M.W., BOHNLEIN, C. ET AL. Microbial food safety in the 21st century: Emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria. *Trends in Food Science and Technology*, 81: 155-158. 2018.
- [5] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **doc. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**  
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **17. února 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **22. května 2020**

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

**doc. RNDr. Iva Burešová, Ph.D.**  
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2020

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji 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;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – 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);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem 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.

### **Prohlašuji,**

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## **ABSTRAKT**

Bezpečnost potravin je celosvětové téma, které nabývá na významu vlivem zkracování vzdáleností, globalizací zemědělství a centralizací výroby potravin. Tato práce se věnuje mikrobiologickým rizikům, popisuje nejčastěji se vyskytující patogenní mikroorganismy v potravinách a pitných vodách, které jsou zodpovědné za nejrůznější nemoci lidstva. Je zaměřena především na výskyt nových nebo nově se objevujících patogenních mikroorganismů, jako jsou např. *Cronobacter sakazakii*, *Arcobacter butzleri*, *Salmonella* Vari, nové druhy stafylokoků, virus hepatitidy E, *Toxoplasma gondii*, původce nové varianty Creutzfeldt-Jakobovy nemoci nebo nově se objevující toxické metabolity mikromycet. Práce se věnuje také metodám jejich detekce a možnostem prevence.

Klíčová slova: Patogenní mikroorganismus, potravin, infekce, onemocnění, kontaminace, bakterie, plíseň, virus, prion, parazit

## **ABSTRACT**

Food safety is a global issue that is gaining in importance due to the shortening of distances, the globalization of agriculture and the centralization of food production. This work deals with microbiological risks, it describes the most common pathogenic microorganisms in food and drinking water, which are responsible for various diseases of mankind. It focuses mainly on the occurrence of new or emerging pathogenic microorganisms, such as *Cronobacter sakazakii*, *Arcobacter butzleri*, *Salmonella* Vari, new species of staphylococci, hepatitis E virus, *Toxoplasma gondii*, the causative agent of a new variant of Creutzfeldt-Jakob disease or emerging toxic metabolites of micromycetes. The project also deals with the methods of their detection and the possibilities of prevention.

Keywords: Pathogenic microorganism, food, infection, disease, contamination, bacteria, fungus, virus, prion, parasite

Každý, kdo se přestane učit, je starý, ať je mu 20 nebo 80. Každý, kdo se stále učí, zůstává mladý. Je nejlepší v životě zůstat mladý.

Henry Ford

### **Poděkování**

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucí své práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a náměty, poskytnuté zdroje informací a také připomínky, ochotu a vstřícnost při vypracování mé bakalářské práce. Dále děkuji svým kolegům a rodině za pomoc, podporu a trpělivost během mého studia.

# OBSAH

ÚVOD.....	8
<b>1 TAXONOMIE MIKROORGANISMŮ.....</b>	<b>9</b>
<b>2 VÝZNAMNÉ A NOVĚ SE OBJEVUJÍCÍ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH .....</b>	<b>10</b>
2.1 BAKTERIE.....	14
2.1.1 Obecná charakteristika bakterií.....	14
2.1.2 Významné a nově se objevující patogenní bakterie v potravinách a jejich detekce.....	15
2.1.2.1 Rod Staphylococcus.....	15
2.1.2.2 Rod Clostridium.....	20
2.1.2.3 Rod Bacillus.....	23
2.1.2.4 Rod Listeria.....	24
2.1.2.5 Rod Salmonella.....	26
2.1.2.6 Rod Shigella.....	29
2.1.2.7 Rod Escherichia .....	31
2.1.2.8 Rod Yersinia .....	33
2.1.2.9 Rod Cronobacter .....	35
2.1.2.10 Rod Campylobacter.....	36
2.1.2.11 Rod Arcobacter .....	37
2.1.2.12 Rod Vibrio.....	38
2.1.2.13 Rod Francisella.....	40
2.1.2.14 Rod Pseudomonas .....	42
2.1.2.15 Rod Mycobacterium.....	43
2.1.2.16 Rod Helicobacter.....	45
2.2 MIKROMYCETY .....	46
2.2.1 Obecná charakteristika mikromycet.....	46
2.2.2 Rody mikromycet významné z hlediska tvorby toxinů.....	47
2.2.2.1 Rod Aspergillus .....	47
2.2.2.2 Rod Penicillium .....	49
2.2.2.3 Rod Fusarium.....	50
2.2.3 Nově se objevující toxické metabolity mikromycet.....	50
2.3 VIRY.....	51
2.3.1 Obecná charakteristika virů.....	51
2.3.2 Významné a nově se objevující viry přenosné potravinami .....	52
2.3.2.1 Virus hepatitidy A.....	52
2.3.2.2 Virus hepatitidy E .....	53
2.3.2.3 Virus klíšťové encefalitidy .....	53
2.3.2.4 Rotaviry .....	54
2.3.2.5 Caliciviry .....	55
2.3.2.6 Astroviry .....	56
2.3.2.7 Adenoviry .....	57
2.3.2.8 Polioviry.....	57
2.4 PRIONY.....	58
2.4.1 Obecná charakteristika prionů.....	58
2.4.2 Priony přenosné potravinami .....	58

2.4.2.1	Creutzfeldt -Jakobova nemoc (nová varianta) .....	58
2.4.2.2	Kuru .....	59
2.5	PARAZITIČTÍ PRVOCI .....	59
2.5.1	Obecná charakteristika prvoků.....	59
2.5.1.1	Rod Giardia.....	60
2.5.1.2	Rod Entamoeba.....	61
2.5.1.3	Rod Toxoplasma.....	63
2.5.1.4	Rod Cyclospora.....	65
2.5.1.5	Rod Cryptosporidium .....	67
2.5.1.6	Rod Balantidium.....	69
<b>3</b>	<b>RIZIKA VÝSKYTU NOVĚ SE OBJEVUJÍCÍCH PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH .....</b>	<b>70</b>
3.1	ZMĚNA KLIMATU.....	70
3.2	HROMADNÁ VÝROBA A GLOBALIZACE POTRAVIN A PŘENOS PATOGENŮ DO NOVÝCH OBLASTÍ .....	70
3.3	ZVÝŠENÁ MIGRACE OBYVATELSTVA A MĚNÍCÍ SE CHARAKTER POPULACE .....	71
<b>4</b>	<b>MOŽNOSTI PREVENCE VÝSKYTU NOVÝCH PATOGENŮ V POTRAVINÁCH.....</b>	<b>72</b>
4.1	NOVÉ METODY VÝROBY POTRAVIN .....	72
4.2	AKTIVNÍ A INTELIGENTNÍ SYSTÉMY BALENÍ POTRAVIN .....	73
4.3	NOVÉ METODY DETEKCE MIKROORGANISMŮ .....	73
4.4	RASFF - SYSTÉM RYCHLÉHO VAROVÁNÍ PRO POTRAVINY A KRMIVA .....	74
4.5	SYSTÉM HACCP.....	75
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>77</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>78</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>84</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>86</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>87</b>



## ÚVOD

Vznik nebo znovuobjevení potravinových patogenů je problémem pro oblast veřejného zdraví, potravinářský průmysl i spotřebitele. Mezi faktory, které se podílí na jejich vzniku nebo znovu objevení patří zejména hromadná výroba a globalizace dodávek potravin, migrace osob, ať už v důsledku ekonomických problémů nebo válečných konfliktů, nebo za účelem podnikání či zábavou. Dále je to měnící se charakter populace, která stárne a zvyšuje se tak počet osob se sníženým imunitním systémem. Změny životního stylu a zvýšený cestovní ruch přispívají ke zvýšené konzumaci hotových jídel v jídelnách, restauracích nebo i na tržnicích od různých pouličních prodejců, což může vést až ke vzniku epidemií. Znamé a uznané patogeny se mohou šířit do nových geografických oblastí díky migraci osob a výměnou komodit. Také změny klimatu a evoluční vývoj mohou vést ke změnám virulence patogenů, které pak mohou vést až ke vzniku zcela nových patogenních druhů.

Vývoj a pokroky v metodách detekce a vývoj molekulárních technologií umožňují rozpoznání nových patogenů. Veliký pokrok v taxonomii přinesly například analýzy DNA. Mikroorganismy, které se značně liší obsahem jednotlivých purinových a pyrimidinových bází v DNA, nemohou být příslušníky téhož druhu a na druhé straně mikroorganismy, které mají téměř totožný obsah jednotlivých bází v DNA, nemusí být vždy blízké příbuzné, protože záleží i na pořadí těchto bází. Jedná se o velmi složitou problematiku, proto dochází v určitých časových úsecích k revizi systému mikroorganismů.

Hlavním faktorem ovlivňujícím bezpečnost potravin jsou průmyslově vyráběné potraviny, velkochovy hospodářských zvířat a výroba krmiv a s tím spojené problémy s likvidací odpadů a šířením nákaz.

Nejúčinnějším nástrojem pro zajištění zdravotní nezávadnosti potravin je v současní době systém HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), který lze aplikovat nejen při výrobě potravin, ale i při výrobě zemědělských produktů nebo v oblasti veřejného stravování. Tento systém spočívá v analýze systematicky shromažďovaných dat o příčinách a podmínkách, které vedly k onemocnění z určitého druhu potravin. Jedná se o aktivní přístup, který dokáže odhalit podmínky kontaminace a ihned je odstranit.

## 1 TAXONOMIE MIKROORGANISMŮ

Taxonomie mikroorganismů je značně složitá a dynamicky se rozvíjející. V současné době již nestačí zařazovat mikroorganismy na základě jejich fyziologických a biochemických vlastností. Pro přesné zařazení mikroorganismů je nutný polyfázový přístup, což znamená využití všech dostupných metod biochemických, molekulárně biologických (analýza DNA), sérologických a chemotaxonomických (chemická analýza buněčné stěny, stanovení proteinů, polysacharidů, izoprenoidních chinonů, polárních lipidů, polyamidů, mastných kyselin atd.) Polyfázová taxonomie má výhodu v tom, že charakterizuje mikroorganismus porovnáním vlastností popsaných řadou postupů. Tento přístup je podstatně přesnější než charakteristika na základě výsledků jedné nebo dvou metod. Stále je však nutné mít na paměti, že mikroorganismy jsou velmi dynamické, snadno se přizpůsobují vnějšímu prostředí, a to se pak může odrazit ve výsledcích jakékoliv analýzy (Němec a Matoulková, 2015).

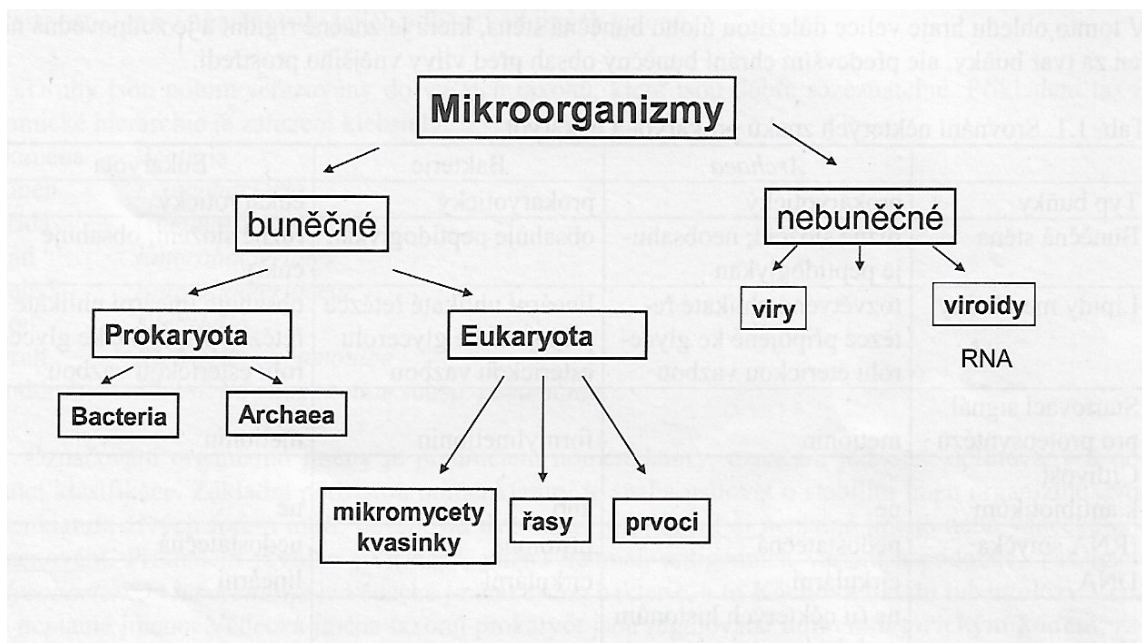
Základní taxonomickou jednotkou je druh. Jedná se o seskupení mikroorganismů, které se vyznačují vysokou mírou podobnosti a zároveň se významně liší od seskupení jiného druhu v tom samém rodu. Některé druhy mohou být členěny ještě do poddruhů. Ty se liší jen některými fenotypovými vlastnostmi v rámci téhož druhu. Poddruh je taxonomická jednotka, která má oficiální postavení v nomenklatuře. Tím se liší od vnitrodruhových pojmů, variet, které využívají pouze „užitečné“ znaky, ale v příbuznosti na základě DNA se neliší. Nesou příponu -typ nebo -var, například sérovar znamená rozlišující antigenní vlastnosti, patovar zase patogenní vlastnosti pro různé hostitele. Je potřebné zmínit ještě genomospecies, to jsou druhy rozeznatelné pouze porovnáním nukleových kyselin, u kterých nebyly zjištěny nějaké fenotypicky rozdílné vlastnosti, které by umožňovaly jejich odlišení od jiných taxonů (Němec a Matoulková, 2015).

Má-li být izolovaný organismus zařazen do odpovídajícího druhu, je nutné porovnat jeho vlastnosti s typovou kulturou, což je čistá, nekontaminovaná kultura, označená jako typový kmen. Kultura typového kmene musí být uložena nejméně ve dvou veřejných trvalých sbírkách kultur mikroorganismů a slouží jako referenční kultura pro přímé srovnávání s nově izolovanými kmeny. Sbírký mikroorganismů jsou organizovány ve Světové federaci sbírek kultur (WFCC), která sdružuje 577 sbírek z 68 zemí světa. Sbírký v ČR a SR jsou sdruženy do Federace československých sbírek mikroorganismů (FCCM) (Němec a Matoulková, 2015).

## 2 VÝZNAMNÉ A NOVĚ SE OBJEVUJÍCÍ PATOGENNÍ MIKROORGANISMY V POTRAVINÁCH

Nově se objevující patogenní mikroorganismy přenosné potravinami jsou takové mikroorganismy, které se objevily nebo byly objeveny teprve nedávno nebo takové, které jsou dobře známé, ale jejich výskyt roste nebo se rozšířil jejich geografický rozsah (Motarjemi a Adams, 2006). Jsou často zoonotického původu (Smith a Fratamico, 2018)

Většinu mikroorganismů lze charakterizovat jako jednobuněčná individua, která jsou v přírodě schopná samostatné existence a rozmnožování. Mezi mikroorganismy jsou zařazeny prokaryotické organismy bez morfologicky diferencovaného jádra (bakterie, cyanobakterie, *Archea*) a eukaryotické organismy s diferencovaným jádrem (houby, zelené řasy, prvoci). K mikroorganismům jsou zařazeny i viry, přestože nesplňují základní podmínku organismu – autoreprodukci (Němec a Matoulková, 2015).



Obrázek 1 Základní dělení mikroorganismů (Němec a Matoulková, 2015)

Výsledek vzájemného působení patogenních mikroorganismů a člověka, to znamená vznik a průběh infekčního onemocnění závisí od vlastností mikroorganismů, ke kterým patří:

- patogenita – schopnost způsobit specifické onemocnění
- virulence – míra patogenity určitého kmene pro určitý živočišný druh
- infekční dávka – množství mikroorganismů, které pronikly do organismu

- invazivita – schopnost pronikat do organismu, množit se v něm a poškozovat ho
- toxogenita – schopnost produkovat toxiny (Šulcová, 2018)

Patogenní mikroorganismy mohou být patogenní pro omezený počet hostitelů (např. člověk) nebo pro široký okruh hostitelů (např. všichni teplokrevní živočichové) (Bednář, 1996). Potravinu nesmějí obsahovat mikroorganismy nebo jejich toxiny či metabolity v množstvích, která představují nepřijatelné riziko pro lidské zdraví (Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005).

Kmeny mohou být vysoce virulentní, virulentní a avirulentní. Vysoce virulentní kmen usmrtí většinu citlivých hostitelů a tím ztrácí možnost dalšího šíření. Méně virulentní v populaci přežívá, množí se a může infikovat další jedince. Tak, jak je rozdílná virulence kmenů téhož patogenního druhu, tak také může být rozdílná vnímavost hostitelského organismu. Z tohoto pohledu můžeme rozdělit mikroorganismy na primárně patogenní a podmíněně patogenní. Za primární patogeny považujeme pouze takové druhy, které jsou schopné vyvolat onemocnění u zdravého jedince. Takových druhů není mnoho, očkuje se proti nim a jsou úspěšně kontrolovány. Druhy zařazené do podmíněně patogenních jsou schopny být původci onemocnění jen tehdy, když jsou poškozené přirozené obranné mechanismy a je snížena funkce imunitního systému (Bednář, 1996).

Potravinu mohou být kontaminované mikroorganismy primárně nebo sekundárně. K primární kontaminaci dochází v době před dodáním ke zpracování do potravinářského závodu nebo kulinářského zařízení. U mléka je to už ve vemeně, při jeho dojení, případně kontaminací z nádob a potrubí se kterými přichází do styku při jeho prvním ošetření ještě v zemědělském závodě. U masa je to už před porážkou nemocných hospodářských zvířat intravitálně nebo u zdravých zvířat po jejich porážce. Rostlinné potraviny jsou primárně kontaminované už před nebo po dobu sběru mikroorganismy z půdy, prachu nebo poléváním kontaminovanou vodou. K sekundární kontaminaci potravin většinou dojde při jejich zpracování a finalizaci stykem s kontaminovaným nádobím a zařízením. Významnou roli zde hrají i nemocní lidé a bacionosiči, kteří mohou kontaminovat potraviny přímo nebo nepřímo mikroorganismy z fekálií, vlasů, nehtů, hnisavých ran, sliznic a jiných. K sekundární kontaminaci se počítá i množení patogenních mikroorganismů v polotovarech a hotových výrobcích při jejich nevhodném skladování (Görner a Valík, 2004).

Definice potravin vypracovaná Komisí pro Codex Alimentarius programu FAO/WHO pro normalizaci potravin: Potravina je jakákoliv látka určená k lidskému požívání, ať již zpracovaná, polorozpracovaná nebo nezpracovaná včetně látek, které se užívají při přípravě,

zpracování a jiném ovlivňování potravin. Podle ČSN je poživatina látka požívaná lidmi ústy za účelem plnění potřeby výživy (Vítová, 2004).

Velmi významnou jakostní charakteristikou každé potraviny je její mikrobiální profil. Mikrobiální profil není nikdy statický. Zahrnuje nejen počáteční mikrobiální kontaminaci, ale také další vlivy včetně technologických, které na danou potravinu působily. O tom, které mikroorganismy se v potravinech rozmnoží a změní tak její vlastnosti rozhoduje:

- složení potraviny a její fyzikálně-chemické vlastnosti
- vlastnosti vnějšího prostředí, kterým je potravina vystavena
- růstové nároky, schopnosti a tolerance samotných mikroorganismů

Potraviny, které svými vlastnostmi (chemické složení, pH,  $a_w$ , Eh) podporují růst a rozmnožování patogenní mikroflóry a tvorbu toxinů označujeme jako vulnerabilní potraviny. Tyto potraviny vyžadují zvláštní hygienickou pozornost při výrobě i zpracování.

Typy vulnerabilních potravin:

- maso a masné výrobky, drůbež, vejce a vaječné výrobky – hlavně syrové nebo nedostatečně tepelně upravené
- ryby a jiní vodní živočichové konzumovaní tepelně neupravení
- mléko a mléčné výrobky – hlavně nepasterované
- konzervy – především podomácku vyrobené nebo s defektem na obalu
- cukrářské výrobky a zmrzlina vyrobené za špatných hygienických podmínek
- zelenina a ovoce konzumované syrové a hlavně nemyté (Vítová, 2004)

Hlavní vlastností mikroorganismů je schopnost zachovat si v potravinech životaschopnost a virulenci. Dále je to schopnost množit se v potravinech a vlastnit specifické faktory patogenity: jako je schopnost tvorby toxinů (toxogenita), případně schopnost zachytit se, množit se a šířit v tkáních vnímavého jedince (invazivita) (Görner a Valík, 2004).

Tabulka 1 Přehled potravin a patogenních mikroorganismů, které se v nich nejčastěji vyskytují (Hrubý a Turek, 1996).

potravina	patogenní mikroorganismy
maso	<i>Salmonella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , fekální koliformní mikroorganismy, enterokoky, <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Toxoplasma gondii</i>
sterilované konzervy	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Staphylococcus aureus</i>
drůbež	<i>Salmonella</i> spp., <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
mléko	<i>Mycobacter, bovis</i> , <i>Mycobacterium avium</i> , <i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Brucella suis</i> , <i>Coxiella burnetii</i> , <i>Streptococcus pyogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , koliformní mikroorganismy, <i>Salmonella</i> spp. <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Listeria monocytogenes</i>
zmrzlina	<i>Salmonella</i> spp. <i>Staphylococcus aureus</i>
sýry	<i>Brucella abortus</i> , <i>Brucella melitensis</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Schigella</i> spp., <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Salmonella</i> spp.
vejce	<i>Salmonella</i> spp.
ryby a vodní živočichové	<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Vibrio parahemolyticus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Erysipelotrix rhusiopathiae</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Schigella</i> spp., <i>E.coli</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , viry, parazité
zelenina	Virus infekční hepatitidy A, <i>Salmonella</i> spp., <i>Schigella</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , koliformní mikroorganismy, <i>Bacillus cereus</i> , viry, parazité
ořechy	Toxinogenní plísně, <i>Salmonella</i> spp.
koření	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , toxinogenní plísně, <i>Salmonella</i> spp.
minerální vody	<i>E. coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Vibrio cholerae</i>

Pro život a zdraví lidstva hraje nezastupitelnou úlohu voda. Je to základní potravina a také prostředek hygieny, a proto jsou na její hygienické zabezpečení kladeny vysoké nároky a v celosvětovém měřítku je neustále zdokonalován systém kontroly hygienického zabezpečení vodních zdrojů. U nás jsou požadavky na jakost pitné vody zakotveny v ČSN 830611, podle které nesmí voda používaná jako pitná obsahovat žádné patogenní mikroorganismy (Ottová, Häusler a Kunc, 1991).

Tabulka 2 Nejvýznamnější patogenní mikroorganismy, na jejichž přenosu se významně podílí voda (Ottová, Häusler a Kunc, 1991).

bakterie	rod <i>Salmonella</i> , rod <i>Schigella</i> , <i>Leptospira icterorhaemorrhagie</i> , <i>Bacillus anthracis</i> , brucely, <i>Mycobacterium tuberculosis</i> , <i>Vibrio cholerae</i> , podmíněně patogenní rody <i>Proteus</i> , <i>Yersinia</i> , <i>Serratia</i> , <i>Acinetobacter</i> , <i>Cronobacterium</i> , koliformní bakterie
viry	hepatitida typu A, E; virus obrny
fungi	rod <i>Candida</i> , <i>Trichophyton</i>
parazitě	prvoci rodů <i>Naegleria</i> , <i>Entamoeba</i> , trichomonády, <i>Lambliia intestinalis</i>

Vzhledem ke stále stoupajícímu znečištění povrchových vod a časté kontaminaci podzemních vod vodami odpadními, stává se nutností co nejspolehlivější stanovení potenciálního nebezpečí výskytu nejen patogenů a podmíněně patogenních druhů, ale i stanovení stupně jejich virulence v závislosti na podmínkách prostředí (Ottová, Häusler a Kunc, 1991).

## 2.1 Bakterie

### 2.1.1 Obecná charakteristika bakterií

Bakterie jsou buněčné organismy patřící mezi prokaryota. Rozvoj elektronové mikroskopie vyústil v jednoznačný závěr, že buňka bakterií, sinic a archeí se velmi výrazně liší od buňky všech ostatních mikroorganismů svojí podstatně jednodušší strukturou. Kromě rozpustné cytoplazmy má jen 4 struktury: jádro, ribozomy, cytoplazmatickou membránu a buněčnou stěnu. Nejdůležitějším rozdílem je struktura buněčného jádra, které není odděleno od cytoplazmy jadernou membránou, nemá stálý tvar a zaujímá asi 15 % objemu buňky (Bednář,

1996). Genetický materiál leží v cytoplazmě ve formě nukleoidu. Typickou strukturou bakterií je buněčná stěna, která jim uděluje charakteristický tvar a zároveň představuje osmotickou a mechanickou bariéru. Složení stěny je charakteristické pro jednotlivé skupiny a má praktický význam v diagnostice bakterií. Podle složení, struktury a barvitelnosti se rozlišují 3 typy bakteriální stěny, které jsou typické pro:

- Grampozitivní bakterie – barví se podle Grama krystalovou violetí modře, základem je peptidoglykan, stěna obsahuje kyseliny teichoové
- Gramnegativní bakterie – barví se podle Grama červeně, vnější membrána složená z lipopolysacharidů, tenčí stěna neobsahuje kyseliny teichoové
- Acidorezistentní bakterie – nebarví se podle Grama, ale podle Ziehl-Neelsena, v peptidoglykanu převládá spíše kyselina N-glykolylmuramová, stěna má vysoký obsah lipidů, typické pro mykobakteria (Buchta, 1998)

## 2.1.2 Významné a nově se objevující patogenní bakterie v potravinách a jejich detekce

### 2.1.2.1 Rod *Staphylococcus*

Stafylokoky jsou nesporulující, nepohyblivé, většinou fakultativně anaerobní, kultivačně nenáročné většinou neopouzdržené  $G^+$  koky. Velké množství druhů, z nichž některé jsou častou součástí flóry lidského těla, je možné rozdělit přibližně na koaguláza-negativní a koaguláza-pozitivní (Julák, 2006). V roce 1975 byl popsán objev sedmi koaguláza-negativních stafylokoků. Od té doby byl téměř každý rok objeven další nový stafylokokový druh nebo poddruh. V roce 1976 popsal prof. Václav Hájek z Lékařské fakulty univerzity Palackého v Olomouci druhý koaguláza-pozitivní druh stafylokoka *Staphylococcus intermedius*, který je nejčastější příčinou infekcí psů, ale může se vyskytnout i u člověka (Pantůček, 2007). Koaguláza-negativní stafylokoky jsou příležitostné patogeny vyvolávající nejružnější onemocnění u predisponovaných osob především tvorbou biofilmů. Z koaguláza pozitivních stafylokoků je *Staphylococcus aureus* jedním z nejčastějších lidských patogenů, který vyvolává řadu hnisavých infekcí a toxikóz (Julák, 2006).

#### *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* je grampozitivní kok o průměru 0,8 – 0,12  $\mu\text{m}$ , netvoří spory, je nepohyblivý, fakultativně anaerobní, roste v intervalu 6,5 – 46  $^{\circ}\text{C}$ , nejlépe však při optimální



teplotě 35-37 °C (Görner a Valík, 2004). Je relativně odolný vůči podmínkám vnějšího prostředí, snáší vysoušení potravin, poměrně značné výkyvy teploty i pH. Odolný je i vůči vyššímu osmotickému tlaku. Není inaktivován ani v dosti hypertonickém prostředí cukerného roztoku nebo 15% roztoku NaCl (Komprda, 2004).

Svazky buněk, které připomínají hrozny, poprvé popsal v roce 1882 britský chirurg Alexander Ogston jako příčinu lidských infekcí. Krátce poté v roce 1884 identifikoval tytéž bakterie Victor Vaughan jako zodpovědné za nemoc způsobenou sýrem a později zmrzlinou v Michiganu (Blackburn a McClure, 2009).

Bakterie produkuje několik faktorů virulence: enzymy stafylokinázu, hyaluronidázu, fosfatázu, koagulázu, hemolyziny a také termostabilní enterotoxin. Tento enterotoxin není inaktivován ani působením teploty 100 °C po dobu 20 minut. Symptomy otravy stafylokokovým enterotoxinem jsou vyvolány dávkou menší než 1 µg na 1 kg potravin. Pro vytvoření této dávky stačí množství 10 buněk *Staphylococcus aureus* na 1 g potravin. Obecně lze konstatovat, že častou příčinou otrav stafylokokovým enterotoxinem je potravina vyžadující rozsáhlejší opracování v průběhu více technologických kroků, po přípravě uchovávána při mírně zvýšené teplotě. Při uchovávání ohřáté potravin při pokojové teplotě může dojít k vytvoření účinné dávky již za 10 hodin. Pro stafylokokovou enterotoxikózu je typická velice krátká inkubační doba. Příznaky se objevují již za 2-3 hodiny po konzumaci kontaminované potravin. Projevují se nevolností, zvracením a silnými křečemi v břiše (Komprda, 2004). Příznaky zřídka přetrvávají i po 24 hodinách, zotavení bývá obvykle rychlé. Může však dojít k závažné dehydrataci, což může v některých případech vést k šoku, který může vyžadovat hospitalizaci, obvykle krátkodobou. Smrt je vzácná, může však nastat u oslabených jedinců nebo osob trpících jinými chorobami (Blackburn a McClure, 2002).

20-50 % podle některých autorů až 80 % kmenů plazmokoagulázo-pozitivních kmenů *Staphylococcus aureus* produkuje za vhodných podmínek extracelulární enterotoxiny, sérologicky rozlišitelných typů A, B, C, D, E, nejnověji až R, kromě F. Z hlediska alimentárních intoxikací jsou nejvýznamnější typy A až E. Jeden kmen produkuje většinou jen jeden typ enterotoxinu, výjimečně 2 a jen vzácně 3. Tvorba enterotoxinu A je v poměru k ostatním nejméně citlivá vůči nepříznivým podmínkám prostředí. Tato skutečnost je pravděpodobně důvodem toho, že stafylokokové enterotoxikózy způsobuje nejčastěji právě enterotoxin typu A, méně často B a D a jen příležitostně E (Görner a Valík, 2004).

Seznam rizikových potravin je poměrně rozsáhlý. Patří do něho maso, masné výrobky včetně mletého masa a solených a nakládaných mas a masných výrobků, zvěřina, drůbež, vejce, saláty na bázi vajec, ryb, kuřecího masa, brambor a těstovin, pekařské produkty, pečivo s náplní, cukrářské výrobky, mléko a mléčné výrobky včetně mléka sušeného sekundárně kontaminovaného (Komprda, 2004).

*Staphylococcus aureus* velmi rychle získal rezistenci proti všem třídám používaných antibiotik jedním ze dvou různých mechanismů: mutacemi existujících bakteriálních kmenů nebo horizontálním přenosem genů z jiných bakterií téhož nebo jiného druhu. Je dokázáno, že *Staphylococcus aureus* má modulární genom. Kromě standardní složky genomu obsahuje řadu variabilních genetických elementů, z nichž některé jsou mobilní a mohou být přenášeny horizontálně, tedy ne po dědičné linii. V roce 1960 byl uveden na trh meticilin a už za půl roku byly hlášeny první izoláty meticilin-rezistentního *Staphylococcus aureus* (MRSA) v jižní Anglii. Po několika letech se situace ve výskytu MRSA začala dramaticky měnit a multirezistentní MRSA se běžně vyskytovaly v Dánsku, Švýcarsku, Anglii, Francii a Austrálii. Např. v letech 1967 až 1971 bylo v Dánsku 15 % všech izolátů kombinovaně rezistentních k meticilinu, streptomycinu, tetracyklinu a erytromycinu. V roce 1997 se objevily první kmeny se sníženou citlivostí k vankomycinu a v současné době je již v USA popsáno několik kmenů rezistentních k vankomycinu (VRSA), které získaly rezistenci konjugativním přenosem prostřednictvím plazmidu od enterokoků (Pantůček, 2007).



Obrázek 2 *Staphylococcus aureus* (<https://biologywise.com/anaerobic-bacteria>)

### Metody detekce *Staphylococcus aureus*

a) Stanovení *Staphylococcus aureus* počítáním kolonií na selektivně diagnostické agarové půdě (ČSN EN ISO 6888:1999).

Norma se skládá ze dvou částí: Část 1: Technika s použitím agarové půdy podle Baird-Parkera a Část 2: Technika s použitím agarové půdy s králičí plasmou a fibrinogenem. První část specifikuje horizontální metodu stanovení počtu koaguláza-pozitivních stafylokoků ve výrobcích pro lidskou výživu nebo ke krmení zvířat založenou na počítání kolonií vyrostlých na pevném médiu (Baird-Parkerově půdě) po aerobní kultivaci při 35 °C nebo 37 °C. Druhá část specifikuje horizontální metodu stanovení počtu koaguláza-pozitivních stafylokoků ve výrobcích pro lidskou výživu nebo ke krmení zvířat založenou na počítání kolonií vyrostlých na pevném médiu (agarová půda s králičí plasmou a fibrinogenem) po aerobní kultivaci při 35 °C nebo 37 °C. Tato metoda se využívá přednostně pro vyšetření potravin s předpokladem kontaminace stafylokoky, které tvoří na Baird-Parkerově agaru atypické kolonie. Norma tedy stanovuje některé metody zjišťování (ověřování) kvalitativních znaků jakosti významných pro hygienu výživy.

Mikroorganismy *Staphylococcus aureus* tvoří typické nebo atypické kolonie na povrchu selektivního média a vykazují silně pozitivní plazmakoagulázovou reakci. Tyto metody nerozlišují enterotoxigenní kmeny od virulentních. Potravinářské výrobky se posuzují pouze na základě přítomnosti/nepřítomnosti nebo počtu *Staphylococcus aureus*. Ředěné vzorky se očkují na povrch selektivně diagnostického média a inkubují se přesně stanovených podmínek. Počet potvrzených typických a atypických kolonií, které vyrostly na miskách s požadovaným počtem kolonií, se přepočte na počet *Staphylococcus aureus* v 1 g nebo 1 ml vzorku. Norma využívá následující selektivní a selektivně diagnostické půdy:

- Selektivně diagnostická agarová půda Baird – Parker (BP)
- Bujon z extraktu z telecího mozku a hovězího srdce (BHI)
- Králičí plazma pro plazmakoagulázový test
- Agar s mannitolem a vyšší koncentrací NaCl
- Agar s DNA (deoxyribonukleová kyselina) a toluidinovou modří pro termonukleázový test
- Agar s krystalovou violetí

S charakteristickými koloniemi se provedou identifikační testy dle tabulky č. 3.

Tabulka 3 Potvrzení příslušnosti k *Staphylococcus aureus*

Test <sup>*)</sup>	Výsledek testu		Výsledek typický pro <i>S. aureus</i> <sup>§)</sup>
	pozitivní (+)	negativní (-)	
Morfologie	Koky (0,5-1,0)µm jednotlivé, dvojice, hroznovité shluky	jiná morfologie	+
Pohyblivost	nepohyblivé buňky	pohyblivé buňky	-
Barvení dle Grama	gram-pozitivní	gram-negativní	+
Tvorba katalázy	bublínky plynu v suspenzi	bublínky se netvoří	+
Plazmakoaguláza	koagulum zaujímá nejméně 75 % objemu tekutiny (stupeň 3+)	koagulum se netvoří nebo zaujímá menší objem	+
Termonukleáza	růžová zóna kolem jamky (1 mm nebo více)	beze změny zabarvení kolem jamky	+
Hemolýza	kolem kolonií nebo podél okraje souvislého růstu průsvitná nebo bezbarvá zóna	vzhled média nezměněn nebo se vytváří hnědozelená neprůsvitná zóna	+
Fermentace mannitolu	kolonie nebo porost jsou světlé žluté, po 48 hod. sytě žluté	neroste nebo médium beza změny zabarvení	+
Růst na agaru s krystalovou violetí	dobrý růst, zežloutnutí média kolem růstu	neroste nebo barva kolem růstu nezměněna	+
Shlukovací faktor CF	v suspenzi se tvoří shluky buněk	suspenze zůstává homogenní	+

Nejdůležitější důkaz příslušnosti k *Staphylococcus aureus* je silně pozitivní reakce v plazmakoagulázovém testu.

#### b) Kultivace *Staphylococcus aureus* na krevních agarrech

Krevní agary se využívají v praxi vedle standardních metod, které předepisují ke kultivaci *Staphylococcus aureus* Baird-Parkerův agar. Mají tu výhodu, že typické kolonie *Staphylococcus aureus* na nich vykazují 2 znaky (pigmentaci a hemolýzu), které jsou v úzké korelaci s patogenezí a produkcí koagulázy, takže podle některých autorů typické kolonie už další potvrzení koagulázovým testem nepotřebují. Používají se především u vzorků s nízkou kontaminací doprovodnou mikroflórou (Jičínská a Havlová, 1996).

#### c) Komerční testy

Byly vyvinuty rychlé metody detekce buněk *Staphylococcus aureus* soustředěné především na detekci toxinů. Jednalo se o dvě techniky založené na detekci proteinu A bioluminiscenčním enzymovým imunotestem. Pro detekci enterotoxikóz bylo vyvinuto množství sérologických metod. Pro analýzu v reálném čase se používají biosenzory a povrchová plazmo-

nová rezonance detekce SE (stafylokokový enterotoxin) (Blackburn a McClure, 2002). Komerčně se vyvíjí metodika polymerázové řetězové reakce (PCR), kterou je možné detekovat 1 až 10 buněk enterotoxigenních *Staphylococcus aureus* (A, D a E) v 1 g analyzované potraviny (Jičínská a Havlová, 1996).

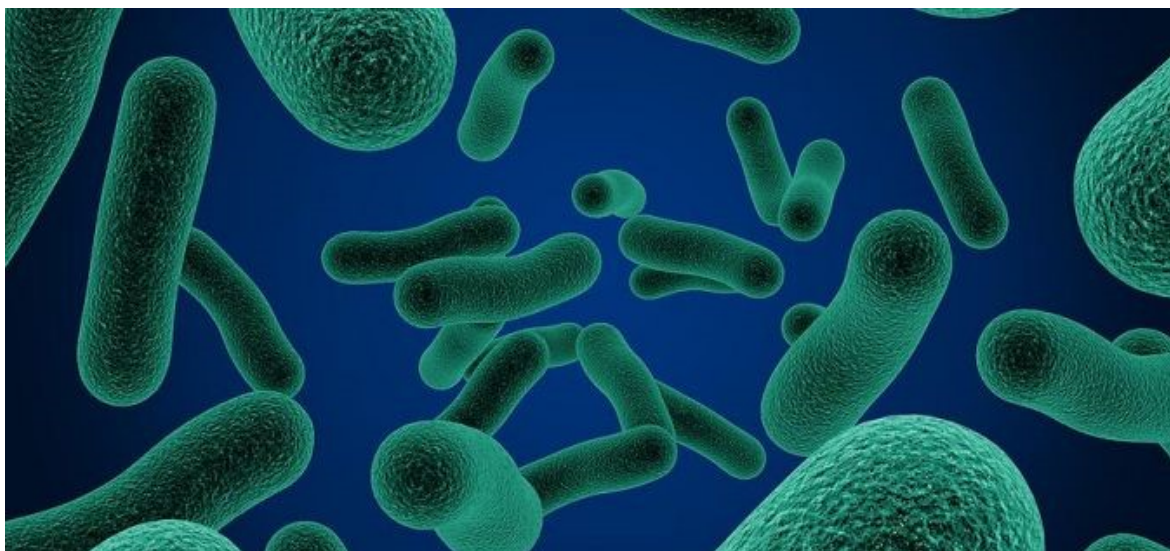
### 2.1.2.2 Rod *Clostridium*

Klostridia jsou pohyblivé anaerobní nebo aerotolerantní G<sup>+</sup> tyčinky, uspořádané ve dvojicích řetězcích nebo vláknech. Vytvářejí endospory, které mění tvar buňky. Vyskytují se běžně v půdě, odpadních vodách, na živočišných i rostlinných produktech, v zažívacím traktu živočichů. Mají silnou sacharolytickou nebo proteolytickou aktivitu. Řada druhů produkuje toxiny (Němec a Matoulková, 2015).

#### *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* jsou rovné nebo mírně zahnuté pohyblivé G<sup>+</sup> tyčinky o průměru 0,5 – 1,0 μm a délce 2–10 μm. Tvoří subterminálně umístěné oválné spory, které buňku v místě spory rozšiřují (Görner a Valík, 2004). Vegetativní formy bakterie jsou termolabilní, zatímco spory mohou odolávat i několika hodinovému varu. V přírodě se vyskytuje ve střevě různých zvířat a ryb, někdy i lidí, odkud se dostává do půdy, prachu a vody a následně pak do potravin. Produkuje enterotoxin zvaný botulotoxin, který se vyskytuje v 7 antigeních typech označovaných A, B, C (subtypy C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>), D, E, F a G. Botulotoxin je termolabilní protein, je denaturován několikaminutovým varem, částečně i světlem a silně alkalickým prostředím. Jedná se o nejúčinnější známý jed. Letální dávka typu A je pro člověka kolem 10<sup>-8</sup> g. Pro člověka jsou nebezpečné hlavně typy A, B a E. Toxin je složen ze dvou polypeptidových řetězců, přičemž těžký řetězec H se váže na nervové buňky a lehký řetězec L do nich proniká. Mechanismem jeho účinku je specifická blokáda malých synaptických vesikul zodpovědných za uvolňování acetylcholinu do neuromuskulárních spojení, čímž dojde k bloádě přenosu na nervosvalových ploténkách a obrna svalů. Tuto intoxikaci zvanou botulismus popsal poprvé van Ermengem v roce 1896 jako hromadnou otravu účastníků vesnické slavnosti v Belgii, vyvolanou požitím syrové šunky (Julák, 2006). Příznaky otravy se projevují po 6 až 27 hodinách po požití potraviny a projevují se bolestmi hlavy, nevolností, zvracením, suchem v ústech, dvojitým viděním a následným ochrnutím svalstva včetně dýchacího. Intoxikace končí ve 30–65 % smrtí (Šilhánková 2008).

Jedná se o velmi významnou bakterii, která tvoří snad vůbec nejúčinnější známý toxin, jehož produkční kmeny se dají snadno získat. Je možné ji poměrně snadno připravit ve velkém množství a snadno transportovat v malých, ale účinných dávkách, a proto by mohla být zneužita i jako bojová a bioteroristická zbraň (Julák, 2006).



Obrázek 3 *Clostridium botulinum* (<https://cs.medixa.org>)

### Metody detekce *Clostridium botulinum*

Laboratorní diagnostika botulismu se opírá o průkaz toxinu. Ten se zjistí neutralizačním pokusem na myších. Podle typu antitoxinu, který toxickou aktivitu neutralizoval, se určí typ toxinu. *Clostridium botulinum* se hledá kultivačně v podezřelé potravíně, ve výplachu střeva nebo ve stolici nemocného (Bednář, 1996). Kultivace se provádí za anaerobních podmínek v některém selektivním médiu pro anaeroby, nejčastěji se používá mDCRM (Diferential Reinforced Clostridial Medium modified) v tekuté nebo agarizované formě. Izoláty se identifikují pomocí identifikačních souprav pro anaeroby nebo klostridia. Rychle vykultivovat klostridia z různých materiálů za anaerobních podmínek je možné v bujonu s práškovým železem (Jičínská a Havlová, 1996).

### *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* je nepohyblivá aerotolerantní  $G^+$  tyčinka o průměru 0,9-1,3  $\mu\text{m}$  a délce 3-9  $\mu\text{m}$ . Tvoří oválné subterminální spory, které nezduřují buňku. Podle tvorby různých toxinů se rozeznávají typy A-E, přičemž typy A a C jsou pro lidi nejvíce patogenní.

Otravy potravinami způsobují jen ty kmeny *Clostridium perfringens* typu A, které tvoří polypeptidový enterotoxin s molekulovou hmotností 3,5 kDa. Jestliže se vegetativní buňky *Clostridium perfringens* nacházejí v potravinách s dostatečným množstvím proteinů, rostou v intervalu 15-50 °C, přičemž jejich optimum je mezi 43-46 °C. Přímou nebo nepřímou kontaminací půdy a vody fekáliemi se může tento mikroorganismus dostat do potravin, hlavně na hovězí a drůbeží maso. Ke znečištění fekáliemi může dojít při porážce, uzeniny mohou být znečištěny kontaminovanou vodou nebo nedostatečně ošetřenými střevy. Záhřev potravin při jejich kulinární úpravě většinou nestačí k devitalizaci spor. Teplotní šok může dokonce urychlit proces jejich klíčení. Častým přenašečem *Clostridium perfringens* jsou hotová jídla, která nebyla po přípravě dostatečně ochlazená nebo byla ochlazená pozdě až po vyklíčení a pomnožení do nebezpečné koncentrace. V takových potravinách (drůbeží a masové saláty, masové paštiky, masová kombinovaná jídla) může za několik hodin koncentrace *Clostridium perfringens* dosáhnout hodnoty až  $10^6$ , což postačuje na vyvolání toxoinfekce. Rychlé množení probíhá jen za anaerobních podmínek, například ve vnitřních vrstvách masa, v hloubce větších objemů polévek nebo ve vakuově balených potravinách (Görner a Valík, 2004).

### **Metody detekce *Clostridium perfringens***

*Clostridium perfringens* se snadno kultivuje, protože jeho buňky jsou metabolicky velmi aktivní a značně aerotolerantní, snášejí až 5 % kyslíku v prostředí. Na agarové půdě s beraní krví jsou kolonie obklopeny dvojitou zónou hemolýzy. Částečná  $\beta$ -hemolýza je způsobená účinkem  $\alpha$ -toxinu. Blíže kolem kolonií je vidět úplná  $\beta$ -hemolýza vyvolaná efektem toxinu  $\theta$  na krev v agarové půdě (Klaban, 2005).

Metody stanovení počtu *Clostridium perfringens* jsou součástí ČSN ISO 7937:2006 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu *Clostridium perfringens* – technika počítání kolonií.

Metoda pro stanovení vegetativních buněk a spor *Clostridium perfringens* ve vzorcích vody určené k lidské spotřebě je součástí ČSN EN ISO 14189:2017 Kvalita vod – stanovení *Clostridium perfringens* – Metoda membránových filtrů. Tato metoda může být používána pro všechny typy vzorků vod, pokud neobsahují nerozpuštěné nebo koloidní látky, které ruší filtraci.

### 2.1.2.3 Rod *Bacillus*

Bacily jsou aerobní nebo fakultativně anaerobní  $G^+$  sporulující tyčinky. Jsou poměrně velké o průměru 1  $\mu\text{m}$  a délce až 10  $\mu\text{m}$ , často mají na jednom konci buňky svazek peritrichálních bičíků, takže jsou pohyblivé. Charakteristická je pro ně tvorba endospor, která probíhá jen za přítomnosti kyslíku, potřebného k tvorbě obalů spory oxidací poly- $\beta$ -hydroxymásečné kyseliny. Spory jsou velmi odolné, mohou teoreticky přežít nekonečně dlouhou dobu. K rodu *Bacillus* pravděpodobně patří nejstarší bakterie, jejichž spory se podařilo nedávno oživit a jejichž stáří se odhaduje na 250 milionů let. Běžně se vyskytují v přírodě, půdě, prachu, vodě, některé ve zvířatech, rostlinách a hmyzu, kde dlouhodobě přežívají ve formě spor, proto je kontaminace z okolního prostředí v potravinářském průmyslu poměrně častá (Julák, 2006).

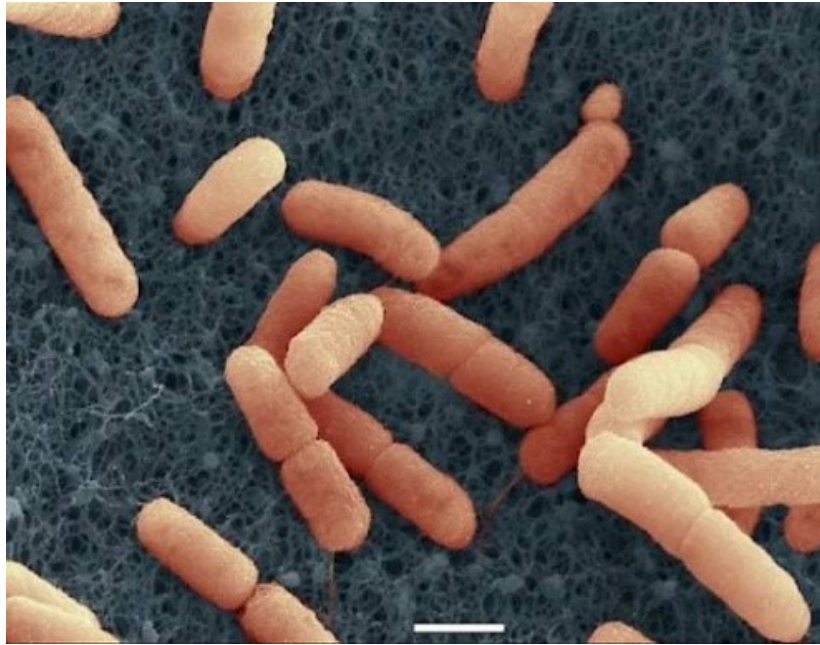
#### *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* je grampozitivní neopouzdrěná pohyblivá tyčinka s peritrichálním umístěním bičíků. Buňky jsou poměrně velké s centrálně umístěnými elipsoidními spory, které tyčinku nezduřují. Je znám hlavně jako původce enterotoxikóz a devastujících infekcí oka (Votava, 2003).

Roku 1906 popsal Lubenau průjmové onemocnění způsobené rodem *Bacillus*, v roce 1950 byl *Bacillus cereus* definitivně potvrzen jako příčina alimentárních enterotoxikóz a v roce 1971 byl prokázán jako původce emetického syndromu (syndrom zvracení) ve Velké Británii (Jay, Loessner a Golden, 2005).

Jedná se o kultivačně nenáročnou fakultativně anaerobní bakterii schopnou růstu v širokém teplotním rozpětí 8-55  $^{\circ}\text{C}$ , přičemž optimum je 28-35  $^{\circ}\text{C}$  a při pH v rozpětí 4,9-9,3 (Votava, 2003). *Bacillus cereus* disponuje řadou toxinů a faktorů virulence: produkuje fosfolipázu, hemolyziny a termostabilní emetický toxin a termolabilní toxin průjmového syndromu (Julák, 2006). K otravám dochází při pomnožení bakterie v potravine na koncentraci  $10^7 \text{ g}^{-1}$ . Nejčastější příčinou těchto otrav jsou potraviny obsahující obiloviny nebo škrob, například polévky, vařená rýže, pudinky, játrová paštika apod. Otrava se projevuje za 12-13 hodin od požití potraviny. Tvorba toxinů byly zjištěna i u některých kmenů *Bacillus subtilis* (Šilhánková 2008).





Obrázek 4 *Bacillus cereus* (<https://obrazky.seznam.cz>)

### Metody detekce *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* lze prokázat kultivací na krevním agaru nebo použitím vhodných selektivních půd (Votava, 2003). Na krevním agaru vyvolává  $\beta$ -hemolýzu a je rezistentní k antibiotiku polymyxinu B (Klaban, 2005). Jako selektivní půdu lze použít žloutkový agar s mannitolem a polymyxin-B sulfátem (agar MYP podle Mossela) (Jičínská a Havlová, 1996). Při mikroskopickém průkaze se využívá barvení intracelulárních lipidových granul. Průjmový toxin se prokazuje latexovou aglutinací. Toxin je možno prokázat např. pomocí ELISA, případně pokusem na myších (Votava, 2003).

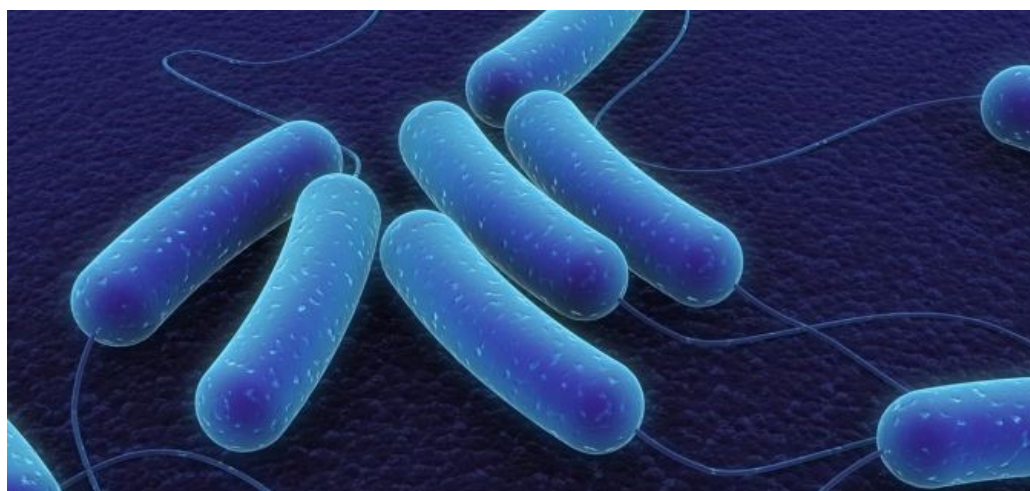
#### 2.1.2.4 Rod *Listeria*

Listerie jsou  $G^+$  krátké nesporelující tyčinky, jednotlivé nebo v řetězcích. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní, mají fermentační metabolismus a tvoří biofilm. Vyskytují se v půdě, vodě, fekáliích, na rostlinách i živočiších, často kontaminuje mléko a mléčné výrobky (Němec a Matoulková, 2015).

#### *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* bývá pro svůj tvar a růstovou nenáročnost na první pohled považována za enterokoka. Snadno se však odliší způsobem pohybu, který je pro ni charakteris-

tický. Rychlé přemísťování krátkých tyčinek je prokládáno přemety, které však lze pozorovat jen při teplotě 22-28 °C. Je pro ni charakteristické široké teplotní rozmezí množení v intervalu 4-45 °C. Přežívá proto v nedbale zahřátých potravinách a v kontaminovaných potravinách se pomnožuje i v chladničce (Schindler, 2010). První infekce člověka byla popsána v roce 1929. Jedná se o onemocnění, které může probíhat bezpříznakově, avšak u oslabených jedinců může mít závažné následky (Votava, 2003). Bývá příčinou potratů u lidí i zvířat, po průchodu placentou infikuje plod, dochází tak k porodu mrtvého plodu nebo jeho smrti krátce po porodu. Přežívající děti bývají různě poškozeny. Tato bakterie stojí pravděpodobně i za vymřením robu Stuartovců v Anglii 18. století (Julák, 2006).



Obrázek 5 *Listeria monocytogenes* (<https://cs.medixa.org>)

### Metody detekce *Listeria monocytogenes*

- a) Horizontální metoda průkazu a stanovení počtu *Listeria monocytogenes* a *Listeria* spp. (ČSN EN ISO 11290:2017)
  - Metoda průkazu – skládá se ze 4 po sobě následujících operací
    - Předmnožení – Fraserův bujón s poloviční koncentrací antibiotik
    - Selektivní pomnožení - Fraserův bujón
    - Vyočkování a kultivace na selektivně diagnostických agarech – oxfordský agar, PALCAM)
    - Potvrzení - TSYA (neselektivní agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničním extraktem), TSYB (trypton-sójový bujón s kvasničním extraktem), hemolýza a CAMP-test, bujón pro testování a využití cukrů, agarové médium pro testování pohyblivosti

Tabulka 4 Potvrzení příslušnosti k *Listeria monocytogenes*

Test <sup>*)</sup>	Výsledek testu		Výsledek typický pro <i>L. monocytogenes</i>
	Pozitivní (+)	Negativní (-)	
Morfologie	štlhlé, krátké tyčinky, nesporující	jiná morfologie	+
Barvení dle Grama	grampozitivní	gramnegativní	+
Pohyblivost kultivačně	pomalý pohyb s častými změnami směru, při kultivaci "deštníkový" růst	nepohyblivé nebo jiný typ pohybu, růst jen v místě vpichu	+
Tvorba katalázy	v suspenzi se tvoří bublinky plynu	plyn se netvoří	+
Fermentace L+ rhamnóza	zežloutnutí bujonu s rhamnózou	beze změny zabarvení média	+
D+ xylóza	zežloutnutí média s xylózou	beze změny zabarvení média	-
Průkaz β- hemolýzy	úzká zóna projasnění kolem vpichu, nejasně ohraničená	beze změny vzhledu média kolem vpichu	+
CAMP test	vyhodnocení CAMP testu viz schéma CAMP testu		+

- Metoda stanovení počtu

b) Komerční média a rychlé testy

ELISA testy - využívají imunologické metody a vlastnosti imunoglobulinů

PCR metoda - využívá polymerázové řetězové reakce

ACCUPROBE - je založen na hybridizaci s detekční sondou. Pozitivní výsledek je indikován chemiluminiscenční reakcí (Jičínská a Havlová, 1996).

### 2.1.2.5 Rod *Salmonella*

Salmonelóza je druhou nejčastější alimentární nákazou v ČR i EU. Ze zvířat na člověka se přenáší nejčastěji přes primárně nebo sekundárně kontaminované potraviny, v nichž se při nedodržení chladového řetězce může významně namnožit. U potravin rostlinného původu se jedná především o možnou sekundární kontaminaci při hnojení, zalévání kontaminovanou vodou a při transportu. V úvahu připadá i křížová kontaminace v procesu výroby (Julák, 2006).

Salmonely jsou fakultativně anaerobní, G<sup>-</sup> krátké tyčinky, pohyblivé pomocí bičíků. Vyskytují se jednotlivě, ve dvojicích nebo krátkých řetězcích. Často se nacházejí v půdě a vodě,

kde mohou přežívat i několik let, ze živočichů a prostředí přecházejí jako kontaminanty do potravin (Julák, 2006).

Od roku 1886, kdy byly popsána salmonela vyvolávající tyfus, byly ze stolic pacientů s gastrointestinálními infekcemi i za stolic zvířat izolovány bakterie metabolicky velmi podobné. Vnější membrána salmonel má nepřeborné množství antigenů a velké množství antigenních bičíků, které se u jednotlivých kmenů kombinují a hromadně vyskytují. To vedlo ke změně klasifikačního schématu. Ze stovek izolovaných salmonel nakonec zbyly 2 druhy, z nichž je důležitá *Salmonella enterica*, subspecies *enterica*, která má 1443 sérovarů. Praktický význam mají sérovary Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B, Enteritidis, Typhimurium (Schindler, 2010).

Salmonely sérovarů Typhi, Paratyphi A, Paratyphi B a Paratyphi C jsou tzv. tyfózní salmonely a vyvolávají onemocnění břišním tyfem a paratyfem. Po požití se bakterie zachytí na střevní sliznici, kterou pronikají a množí se v mezenterických mizních uzlinách. Tato fáze (inkubační doba trvá 14 dnů) a po ní bakterie pronikají do krevního oběhu a vzniká septický stav projevující se bolestmi hlavy, vysokou horečkou, červenými skvrnami na kůži a poruchami vědomí. Akutní fáze trvá asi 14 dnů, smrtnost neléčeného břišního tyfu je až 20 %. Často se vyskytuje v zemích s nízkou hygienickou úrovní a zdrojem bývá často kontaminovaná voda nebo led v nápojích, potraviny nebo styk s bacilonosičem (Julák, 2006).

Jako enteritické salmonelózy jsou označována onemocnění vyvolaná rozsáhlým souborem sérovarů, jejichž nositeli jsou různá zvířata (Julák, 2006). K přenosu infekce dochází nejčastěji po konzumaci masa, mléka a vajec od infikovaných zvířat. Ke kontaminaci živočišných produktů dochází primárně prostřednictvím krmiva nebo steliva. Ke kontaminaci vajec dochází buď po kontaktu se stolicí nebo transovariálně. K sekundární kontaminaci může dojít během výroby, distribuce, skladování a zpracování produktů. Jako vehikulum se nejčastěji uplatňují cukrářské výrobky, nebalená zmrzlina, lahůdkářské výrobky, drůbež, měkké uzeniny, výrobky z masa a vejce. Inkubační doba je 6-10 hodin. (Hamplová, 2015).

Salmonelózy se vyskytují celosvětově. Relativně větší význam mají ve vyspělých zemích, což souvisí pravděpodobně s hromadnou živočišnou výrobou, skladováním a distribucí potravin, dále s přechodem na rychlý způsob stravování, hromadnou přípravou polotovarů a teplých pokrmů a s používáním některých technologií při konečných úpravách potravin. K nárůstu onemocnění v USA a západní Evropě došlo po roce 1985 a v ČR po roce 1989 (Hamplová, 2015).



Obrázek 6 *Salmonella enterica* (<https://www.google.com>)

### ***Salmonella* Vari**

V březnu roku 2016 nahlásilo Řecko epidemii salmonelóz způsobenou dříve nepopsanou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérotyp 11:z41:e,n,z15 (*Salmonella* Vari). Tato epidemie se objevila v epidemiologické souvislosti s konzumací sezamu. Následně byly nahlášeny infekce způsobené tímto novým sérotypem také z Německa, ČR, Lucemburska a Velké Británie. Dotazníky na konzumaci rizikových potravin poukázaly na možné vehikulum nákazy – tahini pastu, která obsahuje sezam, a byla identifikována společnost v Řecku, která kontaminovaný sezam zpracovávala. Produkty, jež kontaminovaný sezam obsahovaly, byly okamžitě staženy z trhu (Meinen et al, 2019).

V návaznosti na tuto epidemii Evropská Unie zařadila sezam z Nigérie, Súdánu a Ugandy na seznam potravin, u jejichž importu jsou prováděny kontroly se zvýšenou frekvencí vzhledem k možné kontaminaci salmonelou (Nařízení EU 2017/1142, v platnosti od 1. 7. 2017) (Meinen et al, 2019).

### Metody detekce rodu *Salmonella*

Průkaz bakterií rodu *Salmonella* se provádí podle ČSN EN ISO 6579. Vyžaduje čtyři po sobě následující kroky:

- Předmnožení v neselektivní tekuté půdě (tlumivá peptonová voda)
- Pomnožení v selektivních tekutých půdách, a to v půdě Rappaporta a Vassiliadise se sójou (RVS) a v půdě podle Müllera a Kauffmanna s tetrathionanem a novobiocinem (MKTTa)
- Vyočkování na pevné půdy. Povinná půda je agar s xylózou, lyzinem a deoxycholanem (XLD)
- Konfirmace pomocí vhodných biochemických (enterotest) a sérologických testů (aglutinace aglutinačními séry) (Burdychová a Sládková, 2007)

Metodu průkazu přítomnosti bakterií rodu *Salmonella* ve vzorcích vody specifikuje mezinárodní norma ČSN ISO 19250:2011 Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu *Salmonella*.

#### 2.1.2.6 Rod *Shigella*

Shigely jsou G<sup>-</sup> nepohyblivé, fakultativně anaerobní, nesporulující tyčinky. Taxonomicky patří do čeledi *Enterobacteriaceae* a jsou blízce příbuzné rodu *Escherichia* (Julák, 2006).

Má se za to, že shigely vznikly před 35 000 – 250 000 lety převzetím plazmidu, který na *E. coli* přenesl geny faktorů virulence, a že od té doby genom shigel prošel asi 8 změnami, především ztrátou pohyblivosti a syntézy β-galaktosidázy (schopnost okyselovat laktózu) a jinými metabolickými znaky. Později se ještě přenosem genů napříč populacemi vyvíjely dále, zejména změnou antigenů vnější membrány (Schindler, 2010). Rod *Shigella* má čtyři druhy, které jsou totožné s antigenními skupinami: *Shigella dysenteriae*, skupina A s 12 sérovary, *S. flexneri*, skupina B s 6 sérovary, *S. boydii*, skupina C s 18 sérovary a *Shigella sonnei*, skupina D s 1 sérovarem (Julák, 2006). V Evropě převládají druhy *Shigella sonnei* (u nás 80-90 % onemocnění) a *Shigella flexneri*, méně často pak *Shigella boydii* (Görner a Valík, 2004). Shigely jsou na rozdíl od salmonel výhradně lidskými patogeny, jsou původci průjmového onemocnění, které se nazývá bacilární dyzenterie, úplavice nebo shigelóza. Jsou velmi dobře adaptovány na množení ve střevním epitelu a vybaveny několika faktory virulence (Julák, 2006). U některých kmenů *S. dysenteriae* se navíc uplatňuje tzv. shiga toxin, který má účinky enterotoxické, neurotoxické i cytotoxické (Votava, 2003).

Shigely dále produkují různé enterotoxiny, např. u *S. flexneri* byly prokázány enterotoxiny označované ShET1 a ShET2. Hlavně druhý z nich se vyskytuje i u ostatních druhů shigel, kde je jeho produkce kódována na plazmidech (Julák, 2006).

K přenosu dochází výhradně fekálně orální cestou, zpravidla v prostředí s nižším hygienickým standardem. Vektorem infekce mohou být pasivně mouchy nebo jiný hmyz. (Hamplová, 2015). Z potravin se při přenosu nákazy nejčastěji uvádí mléko a mléčné výrobky, ovoce a zelenina. Shigely mohou kontaminovat i zdroje pitných vod a vody na koupalištích. Některé sérotypy *S. dysenteriae* a *S. flexneri* přijaté organismem člověka s vodou bez jídla, vyvolávají onemocnění i při malé infekční dávce. Proti tomu i větší množství těchto sérotypů, jestliže se dostanou do organismu s potravou, nemusí vždy vyvolat onemocnění (Görner a Valík, 2004).



Obrázek 7 *Shigella sonnei* (<https://www.google.com>)

### Metody detekce rodu *Shigella*

Shigely jsou citlivé na vnější prostředí, proto přežívají ve většině poživatin velmi krátce, často jen několik hodin, a proto jejich průkaz bývá často neúspěšný (Hrubý a Turek, 1996).

Průkaz rodu *Shigella* se provádí podle ČSN EN ISO 21567:2005 Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu *Shigella*.

Vyžaduje čtyři po sobě následující stupně:

- Pomnožení zkušebního vzorku v bujónu pro pomnožení shigel obsahujícím novobiocin

- Vyočkování na tři selektivní diferenační půdy: MacConkeyův agar s nízkou selektivitou; XLD agar se střední selektivitou; a na agar označovaný jako Hektoen enteric agar s nejvyšší selektivitou
- subkultivace typických a suspektních kolonií bakterií rodu *Shigella* na živný agar
- sérologická a biochemická konfirmace

Shigely se identifikují biochemickými testy a aglutinační reakcí se specifickými antiséry (skličková aglutinace). *Shigella sonnei* zkvašuje laktózu a je touto vlastností mezi shigelami výjimkou (Schindler, 2010)

### 2.1.2.7 Rod *Escherichia*

Rod *Escherichia* jsou G<sup>-</sup>tyčinky, petrichálně obrvené, fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní s fermentatorním a respiratorním typem metabolismu (Němec a Matoulková, 2015). Obsahuje 7 druhů, z nichž nejvýznamnější je *Escherichia coli* (Julák, 2006).

#### *Escherichia coli*

Tato bakterie je jednou z nejlépe prostudovaných bakterií a je pravidelnou a nezbytnou součástí střevní mikrobioty. Její symbiotický účinek se projevuje produkcí vitamínu K, produkuje koliciny, které jsou schopné ničit buňky bakterií jiných druhů (Julák, 2006). Za určitých podmínek přijímá plazmidy, které nesou geny metabolické, geny rezistence nebo geny pro produkci toxinů. Kmeny *E. coli*, které získaly schopnost produkce přídatných faktorů virulence, jsou pak původci průjemových onemocnění. Podle projevů virulence se označují takto: ETEC – enterotoxická *E. coli* způsobuje cestovatelské průjmy. Produkuje 2 toxiny (termolabilní a termostabilní)

EPEC – enteropatogenní *E. coli* je původcem novorozeneckých průjmů, neprodukuje toxiny, ale je mírně invazivní

EIEC – enteroinvazivní *E. coli* přilne na sliznici, proniká do ní a pak se v ní pomnožuje, onemocnění se podobá úplavici

EAEC – enteroadherentní *E. coli* adhezuje ke sliznici, infekce je mírná, neinvazivní

EHEC – enterohemoragická *E. coli*, nejčastěji sérotyp O157:H7 (Schindler, 2010)

Pozornost mikrobiologů a epidemiologů je zaměřena především na enterohemoragické kmeny. Např. v roce 1971 v USA mělo příznaky otravy potravinou po konzumaci importo-



vaných sýrů camembert brie a columiers 387 osob. Onemocnění bylo způsobené enterohemoragickými *E. coli* O124:K72. Tyto sérovary *E. coli* se při výrobě sýrů dobře rozmnožují, to i při nízkých teplotách. Nyní je v centru pozornosti především velmi nebezpečná enterohemoragická *E. coli* O157:H7 (Marth a Steele, 2001). Vyznačuje se mimořádně nízkou MID, která se odhaduje na 10 buněk (Görner a Valík, 2004). Enterohemoragické kmeny produkují shiga-like toxin, který se podobá shigelovému, nazývá se také verotoxin (Klaban, 2005). Nejčastěji ho produkuje právě sérotyp O157, který poprvé popsal v roce 1983 L. W. Riley jako původce průjmových onemocnění (Julák, 2006).

Toxoinfekce způsobené *E. coli* O157:H7 se vyskytují ve spojitosti s konzumací kontaminovaného a nedostatečně technologicky upraveného masa, ovocných šťáv, zeleniny, mléka a mléčných výrobků. Za hlavní rezervoár této bakterie se považují dojnice. Buňky jsou termolabilní, nepřežívají pasterizaci (Görner a Valík, 2004).



Obrázek 8 *Escherichia coli* (<https://zoommagazin.iprima.cz>)

### ***Escherichia albertii***

Bakterie byla poprvé izolována při průjmech dětí v Bangladéši v roce 1991. Původně byla klasifikována jako *Hafnia alvei*. Popsána a taxonomicky zařazena byla až o několik let později, v roce 2005. Pojmenována byla podle svého objevitele (Smith a Fratamico, 2018). Systematické analýzy ukázaly, že *Escherichia albertii* představuje podstatnou část kmenů, které jsou v současné době identifikovány jako eae-pozitivní *Escherichia coli*, a zahrnuje kmeny produkující shiga toxin. Velké množství kmenů mohlo být chybně identifikováno jako EPEC nebo EHEC (Ooka, et al., 2012). Kmeny *Escherichia albertii* byly izolovány z kanadské přírodní vody, včetně studní, povrchové, rekultivační a odpadní vody. Byly také izolovány

z potravin, jako jsou kuřecí droby, syrová kuřecí játra, syrové maso (vepřové, skopové, kuřecí a kachní maso). Bylo prokázáno, že kmeny *Escherichia albertii* byly citlivější na teplo, kyselé prostředí a tlak ve srovnání s divokým typem *E. coli* O157: H7, což naznačuje, že podmínky zpracování potravin, které mohou zničit *E. coli* O157:H7 by měly také inaktivovat *Escherichia albertii* (Smith a Fratamico, 2018). Primární rezervoár pro *Escherichia albertii* představují ptáci. Některé kmeny *Escherichia albertii* vykazují rezistenci k antibiotikům (BHATT, et al., 2019)

### **Metody detekce rodu *Escherichia***

Diagnostika spočívá hlavně v kultivačním, sérologickém a biochemickém vyšetření (Görner a Valík, 2004).

Při technice počítání kolonií se používá zalévání inokula chromogenní selektivní kultivační půdou TBX (Tryptone Bile X-glucuronide). Půda obsahuje chromogenní substrát 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glukuronid, který *Escherichia coli* štěpí enzymem  $\beta$ -D-glukuronidázou a kolonie získávají modrozelenou barvu. Doprovodná mikroflóra je inhibována přísadkou žlučových solí (Burdychová a Sládková, 2007).

Přímý průkaz antigenu ve vzorku se provádí metodou ELISA (Votava, 2003).

#### **2.1.2.8 Rod *Yersinia***

Yersinie jsou G<sup>-</sup>, nesporulující rovné tyčinky s peritrichálně umístěnými bičíky. Jsou chemootrofní, fakultativně anaerobní s respiratorním i fermentatorním metabolismem, taxonomicky zařazené do čeledi *Enterobacteriaceae*. Pro člověka jsou nepatogenní až striktně patogenní. Vyskytují se v půdě, vodě a potravinách (Němec a Matoulková, 2015).

#### ***Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* je pohyblivá, kokoidní tyčinka, má přes 30 sérotypů O-antigenu a přes 20 H-antigenu (Schindler, 2010). Jedná se o psychrotropní mikroorganismus, proto roste i v chladničkových teplotách a způsobuje riziko množení i v chlazených potravinách. Její biochemické vlastnosti jsou variabilní, přesněji ji lze identifikovat jen na základě dalších sérologických vlastností. Ve spojitosti s potravinami se nejčastěji uvádí sérovar O3 (Görner a Valík, 2004). Významným faktorem patogenicity je tvorba enterotoxinu (Klaban, 2005). Jedná se o běžný patogen zvířat, hlavně hlodavců, ale i prasat, hovězího dobytka a ptáků,

která je mohou vylučovat i bez příznaků onemocnění. Zdrojem infekce může být kontaminované maso, často vepřové při domácích zabíjačkách, je možný i přenos kontaminovanou vodou. Onemocnění probíhá obvykle jako těžká gastroenteritida s průjmy, bolesti břicha často připomínají apendicitidu (Julák, 2006).



Obrázek 9 *Yersinia enterocolitica* (<https://www.google.com>)

*Yersinia pestis* je původcem moru a *Yersinia pseudotuberculosis* je původcem spontánně se hojící adenitidy mezenterních uzlin dětí a mladistvých a septického onemocnění, které končí i letálně. Nachází se ve vodě a v alimentárním traktu zvířat. Člověk se nakazí nejpravděpodobněji z vody (Schindler, 2010).

#### **Metody detekce rodu *Yersinia***

Průkaz patogenních *Yersinia enterocolitica* zahrnuje tři kroky:

- Pomnožení v selektivní tekuté půdě PSB (pomnožovací bujón se sorbitolem a žlučovými solemi) a ITC (irgasan-ticarcillinchlorátový bujón)
- Vyočkování kultur získaných pomnožením na povrch dvou pevných selektivních kultivačních půd CIN agar (agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem) a SSDC agar (*Salmonella – shigella* agar s desoxycholátem a vápníkem)

- Konfirmace pomocí biochemických testů a sérologie (Burdychová a Sládková, 2007)

Běžné je i sérologické (aglutinační) vyšetření protilátek proti O-antigenům (Votava, 2003).

### 2.1.2.9 Rod *Cronobacter*

Bakterie rodu *Cronobacter* jsou G<sup>-</sup> tyčinky a zahrnují deset druhů: *Cronobacter sakazakii*, *C. malonaticus*, *C. muytjensii*, *C. turicensis*, *C. dublinensis*, *C. universalis*, *C. condimenti*, *C. helveticus*, *C. pulveris* a *C. zurichensis*. Jsou považovány za oportunní patogeny (Brady et al., 2013)

#### *Cronobacter sakazakii*

Tento patogen byl na základě biochemického profilu původně klasifikován jako žlutě pigmentující kmen *Enterobacter cloacae*. Až v roce 1980 na základě rozboru DNA byl uznán jako samostatný druh *Enterobacter sakazakii* (Motarjemi a Adams, 2006). Později bylo taxonomickou analýzou zjištěno, že skupina vykazuje genotypové odlišnosti a byl zařazen do zcela nového rodu *Cronobacter*. *Cronobacter sakazakii* je oportunní patogen, který způsobuje vzácnou, ale často fatální infekci krevního řečiště a centrálního nervového systému především u kojenců s oslabenou imunitou a předčasně narozených dětí (Iversen, 2008). Většina případů pochází z práškové kojenecké výživy kontaminované bakterií. Předpokládá se, že kojenecká prášková výživa byla kontaminována až po výrobě, protože pasterizační proces je obvykle dostatečně účinný k usmrcení těchto bakterií. Přibližně 50% kojenců, kteří se nakazí *Cronobacter sakazakii* umírá a ti, kteří přežijí, mohou trpět neurologickým poškozením (Clark, 2014).



Obrázek 10 *Cronobacter sakazakii* (<https://www.google.com>)

### Metody detekce *Cronobacter sakazakii*

Jako metodu detekce lze využít rychlý rozlišovací test stanovení  $\alpha$ -glukozidázy. Pro specifickou detekci a identifikaci byly vyvinuty v několika laboratořích metody PCR (Motarjemi a Adams, 2006).

#### 2.1.2.10 Rod *Campylobacter*

Kampylobakterie jsou G<sup>-</sup> spirálovitě zakřivené tyčinky, pohyblivé jedním nebo dvěma polárně umístěnými bičíky. Jsou mikroaerofilní a chemoorganotrofní. Běžně se vyskytují v zažívacím traktu člověka i zvířat. Pro člověka mohou být závažným patogenem, k infekci postačuje minimální počet bakterií (asi 10<sup>2</sup>). Přežívají na potravinách skladovaných v chladničkách, částečně mohou přežít i mražení. (Němec a Matoulková, 2015).

Hlavním lidským patogenem rodu *Campylobacter* je *Campylobacter jejuni*, méně často se vyskytují *Campylobacter coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari* a další. Patogenní kmeny kampylobakterií produkují enterotoxin, podobný choleroému toxinu, některé kmeny i cytotoxiny podobné shiga toxinu. Kromě toho obsahují ve stěně, přesněji v lipidové membráně lipopolysacharid analogický endotoxinu ostatních G<sup>-</sup> bakterií, jakož i antigenní protein. Dalším antigenem je bičíkový protein. Podle somatických antigenů se rozlišuje více než 60 sérovarů, podle bičíkových antigenů více než 100 antigenů (Julák, 2006).

Typickými projevy onemocnění jsou průjem, často s příměsí krve, horečka, bolesti břicha a hlavy. Mohou se projevovat, jako lehké gastrointestinální obtíže trvající jen několik hodin, tak i těžké kolitidy připomínající ulcerativní kolitidu nebo Crohnovu chorobu. Někdy mohou kampylobakterie, zvláště *Campylobacter fetus*, proniknout až do krevního oběhu a vyvolat generalizované onemocnění a sepsi (Julák, 2006).

U lidí jsou prvořadým zdrojem infekce nedostatečně tepelně upravené potraviny, především maso a drůbež (Julák, 2006). Kontaminace masa a mléka může proběhnout už intravitálně a při porážce. V mléku, ve vodě, ale i ve výkalech přežívají bakterie při chladírenských teplotách i víc týdnů. V důsledku toho se mohou přenášet i fekálně kontaminovanou vodou, ovocem a zeleninou a taktéž mlékem. Řádně provedenou pasterizaci mléka však bakterie nepřežívají (Görner a Valík, 2004).



Obrázek 11 *Campylobacter jejuni* (<https://www.google.com>)

### Metody detekce rodu *Campylobacter*

Průkaz rodu *Campylobacter* vyžaduje tyto kroky:

- Pomnožení v tekuté půdě (bujón podle Boltona) v mikroaerofilním prostředí
- Vyočkování na pevné půdy, každá kultura se naočkuje na mCCD agar (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem) a na volitelný agar Preston nebo agar podle Karmaliho
- Charakteristické kolonie se přeočkují na krevní agar a inkubují. Provede se Gramovo barvení, test na pohyblivost, oxidázový test, test na TSI (Triple Sugar Iron Agar), test na katalázu a sérotypizační latexový test (podle Pennera a Liora) (Burdychová a Sládková, 2007)

#### 2.1.2.11 Rod *Arcobacter*

Rozvoj genotypizace s využitím sekvenčních, elektroforetických a PCR metod umožnil v roce 1991 rozlišení původního rodu *Campylobacter* na tři rody: *Campylobacter*, *Arcobacter* a *Sulfospirillum* (Drábek a Dubanský, 2006). Od kampylobakterů se odlišují schopností růstu za přítomnosti vzdušného kyslíku a při teplotě 15 °C (Jurajda, 2003).

Arkobaktery jsou G<sup>-</sup> štíhlé, zakřivené nesporulující tyčinky, někdy tvaru písmene „S“ nebo šroubovice, pohyblivé jedním polárním bičíkem charakteristickým vývrtkovitým pohybem

(Sedláček, 2007). Byly izolovány z trusu a trávicího traktu drůbeže, proto jsou častým kontaminantem jatečně upravených ptáků. Drůbež je považována za důležitý rezervoár *Arcobacter butzleri*, který je patogenní pro lidi (Jurajda, 2003). Tyto bakterie mohou způsobovat onemocnění gastrointestinálního traktu, v některých případech se závažným klinickým obrazem. V souvislosti s arkobakteriózou byly dosud v literatuře popsány druhy *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, *Arcobacter thereius* (Šilha, 2016). V posledních letech byly *Arcobacter butzleri* a *Arcobacter cryaerophilus* izolovány ze stolice pacientů s průjmem nebo opakující se bolestí břicha v USA, Kanadě, Austrálii, Jižní Africe, Thajsku, Itálii, Francii a Německu (Motarjemi a Adams, 2006).

### **Metody detekce rodu *Arcobacter***

Zatím neexistuje standardizovaná metoda pro zjišťování arkobakterů a jejich přítomnosti v různých vzorcích. Z tohoto důvodu je jejich výskyt podhodnocován. V rámci studie na Univerzitě Pardubice byla zavedena modifikace postupu, který je využitelný pro selektivní odhalení přítomnosti arkobakterů ve vzorcích potravin. Tato metodika využívá „pasivní filtraci“, která je velice dobrým nástrojem pro selektování doprovodné mikroflóry vzorku. Postup byl kombinován s využitím chromogenního agarů určeného pro kultivace kampylobakterů. V rámci studie byl zjištěn vysoký výskyt arkobakterů v mase a masných výrobcích obchodní sítě České republiky, ale také ve vodách, či plodech moře (Šilha, 2016).

### **2.1.2.12 Rod *Vibrio***

V současné době je uznáváno 48 druhů *Vibrio*, z nichž 10 je známo jako lidské patogeny. Z hlediska infekce způsobené potravinami jsou nejdůležitější *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* a *Vibrio vulnificus* (Motarjemi a Adams, 2006).

*Vibria* jsou G<sup>-</sup> mírně zakřivené pohyblivé tyčinky s polárními bičíky. Jsou fakultativně anaerobní s fermentatorním i respiratorním typem metabolismu. Jsou tolerantní k alkalickému prostředí, ale velmi citlivé ke kyselému (Němec a Matoulková, 2015).

### ***Vibrio cholerae***

*Vibrio cholerae* je nejvýznamnější patogen z tohoto rodu, je původcem obávaných celosvětových epidemií cholery. Díky objevu nového sérovaru O139 a nedostatku pitné vody ho lze zařadit mezi nově se objevující onemocnění. Poprvé ho izoloval Robert Koch v roce 1883 (Klaban, 2005). Vyskytuje se ve dvou biovarech (klasický a El Tor). Název El Tor je odvo-

zen od jména oázy na Sinajském poloostrově, kde byl poprvé izolován jako původce epidemie mezi poutníky do Mekky (Julák, 2006). Podle antigenní struktury se rozlišuje více než 200 O-sérotypů (Hamplová, 2015). Jako původce cholery jsou významné sérovar O1 a od roku 1993 sérovar O139. Toxigenní kmeny *Vibrio cholerae* mohou produkovat řadu toxinů jako faktorů virulence. Nejvýznamnějším toxinem je cholerový enterotoxin. Kromě enterotoxinu jsou známy také toxiny s cytotoxickým účinkem, které způsobují poruchy lipidových membrán a cytoskeletonu. *Vibrio cholerae* může dále produkovat tzv. aditivní toxiny, jako jsou hemolysin, shiga-like toxin, toxiny označované zot (Zonula occludens toxin), ace (accessory cholera enterotoxin) atd. (Julák, 2006).

Typický je fekálně-orální přenos hlavně v oblastech s nízkou hygienickou úrovní. Celosvětově převládá šíření zejména prostřednictvím kontaminované vody, používané k pití, oplachování ovoce a zeleniny a k přípravě ledu. Vehikulem nákazy mohou být i potraviny kontaminované pobřežní mořskou a říční vodou (ústřice, krabi apod.) (Hamplová, 2015).

Cholera je infekcí tenkého střeva, v jehož epitelu se původce usídí a produkuje enterotoxin. Nemoc začíná náhle bolestmi v břiše a průjmem. Zvracení nastupuje zpravidla až po průjmech. Velké ztráty vody a elektrolytů vedou k těžké a nebezpečné dehydrataci organismu (Klaban, 2005).

Zjistilo se, že v nepříznivých podmínkách vodního prostředí mohou patogenní kmeny přejít do tzv. nekultivovatelného stavu, ve kterém je nelze prokázat kultivačními metodami a pak se zase vrátí do předchozího stavu s patogenními schopnostmi (Klaban, 2005).



Obrázek 12 *Vibrio cholerae* (<https://www.google.com>)



### *Vibrio parahaemolyticus*

Tato bakterie je v současnosti celosvětově považována za hlavní příčinu gastroenteritid, a to hlavně na Blízkém východě, kde je vysoká konzumace mořských plodů. Poprvé byly identifikovány v Japonsku v roce 1950, kdy onemocnělo 272 osob po konzumaci sardinek a 20 z nich zemřelo (Motarjemi a Adams, 2006). Jedná se o halofilní vibria, produkující termostabilní toxin.

### *Vibrio vulnificus*

Tato halofilní podmíněně patogenní bakterie byla poprvé identifikována a popsána v roce 1976 jako jedna z hlavních příčin onemocnění po konzumaci mořských plodů v USA (Motarjemi a Adams, 2006). Infekce se objevují obvykle v teplých měsících a infekce postihuje převážně jedince s oslabenou imunitou. Mortalita je vysoká, více než 50 %. Patogenita je vázána na polysacharidové pouzdro, které chrání mikroorganismus před fagocytózou a baktericidním účinkem séra (Klaban, 2005).

### **Metody detekce rodu *Vibrio***

Pro izolaci a selektivní kultivaci vibrií, především *Vibrio cholerae* a *Vibrio parahaemolyticus* se doporučuje používat TCBS agar (thiosulfate citrate bile sucrose agar). Byl navržen Y. Nakanishim v roce 1962 a dále modifikován. Lze použít i krevní agar nebo agar se žlučovými solemi (Klaban, 2005).

K potvrzení identifikace *Vibrio parahaemolyticus* a *Vibrio vulnificus* se provádí test halofilismu. Užitečným diagnostickým testem je pozorování pohyblivosti vibrií, která je inhibována přidáním specifického antiséra. U izolovaných kmenů je nutné biochemické určení bi-ovaru a aglutinační určení sérovaru (Klaban, 2005).

### **2.1.2.13 Rod *Francisella***

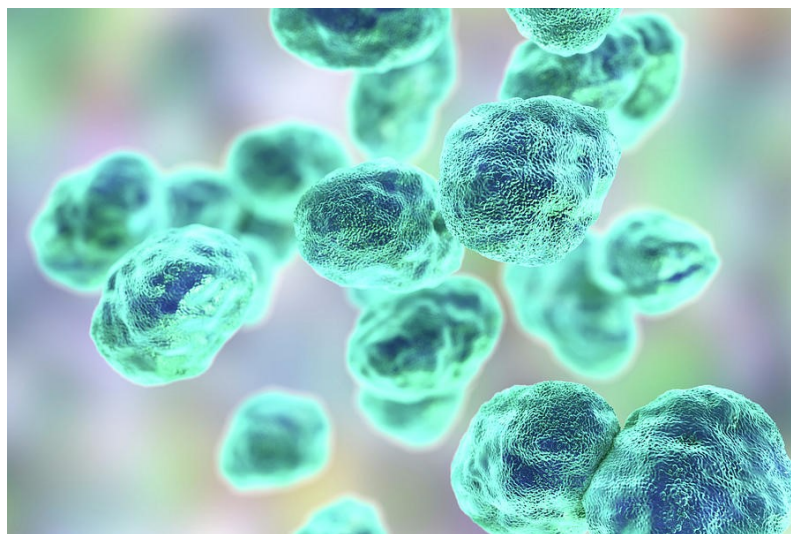
Jediným zástupcem tohoto rodu je *Francisella tularensis* (Klaban, 2005).

### *Francisella tularensis*

Bakterie tohoto druhu jsou nepohyblivé, nesporulující a neopuzdřené G<sup>-</sup> kokobacily, maximální délky 0,7 μm, které jsou celosvětově rozšířené. Poprvé byly bakterie izolovány v roce 1911 v oblasti Tulare (Kalifornie, USA). Rodové jméno dostaly na počest E. Francise, který je podrobněji prozkoumal. Rezervoárem jsou volně žijící drobní hlodavci, myš domácí, hraboš polní aj, z nichž se nákaza přenáší přes větší hlodavce na domácí a hospodářská zvířata

a z nich na člověka. Infekci mezi zvířaty mohou přenášet i členovci, hlavně klíšťata a komáři. Onemocnění se nazývá tularemie a je nákazou s přírodní ohniskovostí (Klaban, 2005). V České republice jsou ohniska na jižní Moravě (Znojmo, Břeclav, Třebíč, Hodonín), na Příbramsku a Plzeňsku. Ročně se u nás vyskytuje několik desítek případů onemocnění (Hamplová, 2015). Tularemie je velmi nebezpečná jak pro malou infekční dávku, která se uvádí jen 10 živých bakterií při podkožním podání, tak i poměrně vysokou smrtností, která je u neléčených pacientů okolo 30 % (Julák, 2006). Přenos nákazy je možný více způsoby a určuje klinickou manifestaci:

- Inokulace do kůže spojivky nebo sliznice při manipulaci s infikovaným zvířetem (stahování zajíců)
- Přisátím klíštěte nebo bodnutím hmyzu
- Požití masa infikovaného zvířete (nedostatečná tepelná úprava)
- Vdechnutí infekčního aerosolu (prach ze sena nebo slámy infikované močí hlodavců)
- Pitím kontaminované vody, požitím kontaminované potravy (epidemie – mošt z padaných jablek)(Hamplová, 2015)



Obrázek 13 *Francisella tularensis* (<https://www.google.com>)

### Metody detekce rodu *Francisella*

Vzhledem k růstové náročnosti francisel je jejich kultivační průkaz nejistý a pomalý. Diagnostika se proto provádí buď fluorescenčním průkazem pomocí fluoresciem značených protilátek, nebo nepřímými sérologickými metodami (aglutinace, vazba komplementu, ELISA)(Julák, 2006).

#### 2.1.2.14 Rod *Pseudomonas*

Název tohoto rodu bakterií je tvořen z řeckých slov pseudos = klam a monas = jednotka. Pseudomonády se nacházejí v půdě, na rostlinách, ve vodě, v exkrementech člověka i zvířat (Klaban, 2005). Jsou striktně aerobní, nefermentující, nesporulující rovné nebo mírně zahnuté G<sup>-</sup> tyčinky, pohyblivé pomocí polárních bičíků (Klaban, 2005).

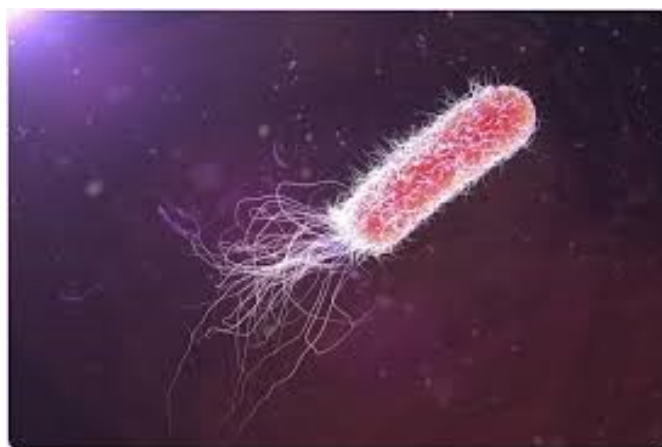
##### *Pseudomonas aeruginosa*

Původně se tato bakterie nazývala *Bacterium pyocyaneum*, podle modrozeleného pigmentu pyocyaninu. Je považována za extracelulární, striktně patogenní bakterii. Udává se, že asi 90 % kmenů vytváří toxin A považovaný za nejedovatější toxin tohoto organismu, protože potlačuje biosyntézu bílkovin. Na patogenitě kmenů se také podílí antifagocytární polysacharidová slizová vrstva a cytolytické exotoxiny (Klaban, 2005).

Vyskytuje se v půdě, povrchových vodách, na rostlinách a ovoci, především však na zelenině a z ní připravených jídlech. Jeho zdrojem může být kontaminovaná pitná voda, zvlhčovače vzduchu, voda v květinových vázách, stroje na umývání kuchyňského nádobí, nedostatečně čištěné a dekontaminované plochy, především v prvovýrobě mléka a mléko, které s těmito plochami přišlo do styku (Görner a Valík, 2004).

Může vyvolat akutní gastroenteritidu nebo enterokolitidu hlavně u kojenců a osob oslabených jiným onemocněním (Görner a Valík, 2004). Invaze do tkání a krevního oběhu může způsobit sepsi a meningitidu (Schindler, 2010).

Velmi významnou vlastností *Pseudomonas aeruginosa* je její schopnost snadno a rychle přejímat od ostatních bakterií informace o rezistenci na antibiotika, což je příčinou rychlého šíření multirezistence. (Julák, 2006).



Obrázek 14 *Pseudomonas aeruginosa* (<https://www.google.com>)

### Metody detekce rodu *Pseudomonas*

Kultivace je velmi snadná. Na krevním agaru se v okolí kolonií a pod nimi objevuje úplná hemolýza. Na Endově a MacConkeyově půdě vyrůstá *Pseudomonas aeruginosa* v růžově fialových koloniích s vůní jasmínu. Starší kolonie mohou páchnout amoniakem. Laboratorní identifikace je snadná u pigmentovaných kmenů. Nepigmentované kmeny se určují podle biochemických vlastností, pozitivita cytochromoxidázového testu. Netvoří indol ani sulfan. Vogesův- Proskauerův test a test s metylovou červení mají negativní (Klaban, 2005). Na základě tělových antigenů se rozlišuje zatím 17 sérotypů *Pseudomonas aeruginosa* (Votava, 2003).

#### 2.1.2.15 Rod *Mycobacterium*

Rod aerobních tyčinkovitých, obvykle slabě G<sup>+</sup> bakterií. Svůj název získal již v roce 1896 na základě toho, že bakterie vytvářely na povrchu tekutých půd blanky vzhledem připomínající plísně (Klaban, 2005). V současné době zahrnuje velký a rostoucí počet druhů. Zatímco v roce 1999 zahrnoval 80 druhů, do roku 2004 přibylo dalších 15 druhů a v roce 2005 již bylo uznáváno 115 druhů. Z nich jsou častými obligátními patogeny zejména *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* a *M. leprae*. Řada dalších druhů, např. *M. avium*, *M. intracellulare* nebo *M. kansasii*, jsou považovány za příležitostné patogeny (Julák, 2006). Nacházejí se v půdě, ve vodě, na rostlinách a také u člověka a zvířat (Klaban, 2005). Pro jejich patogenitu je významné zcela výjimečné složení jejich celulárních lipidů, kterých obsahují neobvykle velké množství a kterými se odlišují od ostatních bakterií. Jen u *Mycobacterium tuberculosis* bylo k roku 2004 identifikováno 99 různých lipoproteinů zakotvených do membrány, které patrně přispívají k jeho virulenci (Julák, 2006).

#### *Mycobacterium tuberculosis*

*Mycobacterium tuberculosis* je nejznámější, nejčastější a nejzávažnější patogen z rodu *Mycobacterium*, původce různých forem tuberkulózy (Julák, 2006). Bylo objeveno Robertem Kochem v roce 1882. Jsou to tyčinkovité bakterie velmi odolné proti vyschnutí, a proto mohou dlouho přežívat na předmětech znečištěných sputem nemocných. Jejich buněčná stěna obsahuje velké množství lipidů a kyseliny mykolovou (Klaban, 2005).

Tuberkulóza je rozšířena celosvětově, odhaduje se, že je infikována až třetina lidstva, tj. 2,1 miliardy lidí. Každoročně vzniká 9 milionů nových onemocnění, z nichž 95 % je

v rozvojových zemích. Ročně na toto onemocnění umírají 2 miliony lidí. K hlavním příčinám, které ovlivnily znovurozšíření tuberkulózy ve světě patří vysoká migrace, globální cestování, rozšíření HIV/AIDS, narůstající počet multirezistentních kmenů a omezení systémů kontroly nad tuberkulózou (Hamplová, 2015).

*Mycobacterium bovis* je patogenní pro různá zvířata, zejména skot, prasata, kozy, a na člověka se přenáší hlavně konzumací infikovaného mléka (Julák, 2006). U drůbeže vyvolává tuberkulózní onemocnění *Mycobacterium avium* (Klaban, 2005).



Obrázek 15 *Mycobacterium tuberculosis* (<https://www.google.com>)

### ***Mycobacterim leprae***

*Mycobacterim leprae* je lehce ohnutá tyčinka, typické je uspořádání do kuliček, kde jednotlivé buňky nelze diferencovat pro obsah mukózní substance (Klaban, 2005).

Onemocnění vyvolané těmito bakteriemi se nazývá lepra nebo malomocenství. V současné době se vyskytuje převážně v tropickém a subtropickém pásmu. Trpí jím více než 10 milionů lidí. Zdrojem je člověk nebo opice a v Norsku byl prokázán přenos vodou (Julák, 2006).

### **Metody detekce rodu *Mycobacterium***

Pro kultivaci se používají speciální média, zejména Löwensteinova-Jensenova půda (s asparaginem, glycerolem, vaječným žloutkem a malachitovou zelení), dále Sautonova půda, Šulova půda (s glycerolem a hovězím sérem). Je pro ně typická dlouhá generační doba, obvykle

se kultivují 3-6 týdnů. Pro mikroskopický vzhled je charakteristická jejich acidorezistence. Typické je barvení podle Ziehl-Neelsena. Mykobakteria se pak jeví jako červené tyčinky na zeleném pozadí, mohou být lehce zahnuté, nepravidelně probarvené s tzv. Muchovými granulemi, někdy ve shlucích. Zvláště pro virulentní kmeny jsou typické provazcovité útvary, zvané cords. Alternativou je fluorescenční barvení směsí auraminu O a rhodaminu (Julák, 2006).

*Mycobacterim leprae* se množí pouze v živých buňkách člověka nebo pásovice (Julák, 2006).

### **2.1.2.16 Rod *Helicobacter***

Bakterie tohoto rodu jsou  $G^-$  rovné nebo helikální pohyblivé mikroaerofilní tyčinky. Nachází se na žaludeční sliznici primátů (Němec a Matoulková, 2015). Hlavním lidským patogenem rodu *Helicobacter*, je *Helicobacter pylori* (dříve *Campylobacter pyloridis*)(Julák, 2006).

#### ***Helicobacter pylori***

*Helicobacter pylori* byl poprvé popsán australskými enterology B. J. Marshalllem a J. R. Warrenem v roce 1983, kdy kultivačně vyšetřovali části odebrané žaludeční sliznice pacienta trpícího chronickou gastritidou (Klaban, 2005).

Má obvykle podobu vlnovky až spirály a má několik polárních bičíků. Za nepříznivých okolních podmínek přechází na kokoidní formy, které jsou odolnější a významné pro přenos infekce. Vyskytuje se v žaludku ve vrstvě hlenu, která ho chrání před žaludeční kyselinou. Navíc je schopen hlen ve svém okolí neutralizovat amoniakem, produkovaným hydrolýzou močoviny. Vysoká pohyblivost pomocí bičíků mu umožňuje rychlou chemotaxi ve směru příznivého gradientu pH i ve viskózním hlenu. Jedním z jeho extracelulárních produktů je protein inhibující tvorbu žaludeční HCl. Z řady dalších produktů jsou patogenicky významné fosfolipázy, kataláza, proteázy, hemolyziny a antigenní protein zvaný cagA, které ovlivňují imunitní mechanismy hostitele. Způsobuje především chronickou gastritidu, žaludeční a duodenální vředy a žaludeční karcinomy (Julák, 2006).

Přenos infekce je zřejmě alimentární, i když jeho podrobnosti nejsou zcela jasné. Je možný kontaminovanou vodou, cestou fekálně orální, z úst do úst a také společným kuchyňským zařízením (Julák, 2006).

### Metody detekce *Helicobacter pylori*

Diagnostika je kultivační nebo sérologická (Schindler, 2010). Využívá se možnosti stanovení protilátek IgG a IgA proti helikobakterovým antigenům cagA a vacA, prováděné ze slin a krve nebo stanovení antigenů ve stolici metodou ELISA (Julák, 2006). Spolehlivý je standardní močovinový dechový test. Pacient vypije roztok močoviny a po 30 minutách lze z jeho dechu prokázat CO<sub>2</sub> (Schindler, 2010).

## 2.2 Mikromycety

### 2.2.1 Obecná charakteristika mikromycet

Mikromycety je pojmenování pro eukaryotické vláknité mikroskopické houby a plísně. Jedná se o saprofytické nebo parazitické všude se vyskytující organismy (Němec a Matoušková, 2015). Jsou aerobní a heterotrofní, to znamená, že pro výživu potřebují organické látky, které získávají enzymatickým štěpením bílkovin, keratinu a celulózy a transportují je buněčnou membránou dovnitř buňky (Schindler, 2010).

Systematický zájem o mykotoxiny vyvolal v roce 1960 úhyn asi 100 000 mladých krůt, jehož příčinou bylo zkrmování plesnivé moučky z podzemnice olejné. Mikrobiologické a chemické vyšetření vedlo k objevu aflatoxinu, tvořeného plísní *Aspergillus flavus* rostoucí na plesnivé moučce. Tato událost dala podnět k systematickému vyšetření více rodů a druhů plísní s ohledem na možnou tvorbu podobných toxinů (Görner a Valík, 2004).

Toxiny produkované plísněmi jsou po chemické stránce mnohem rozmanitější než toxiny bakteriální. Většina toxinů plísní je vylučována z buněk do prostředí a může potravinou difundovat (Šilhánková 2008).

Toxigenní kmeny mohou produkovat jeden i více mykotoxinů, a naopak určitý mykotoxin může být syntetizován zástupci několika rodů toxinogenních mikromycet (Klaban, 2005).

Mykotoxiny se tvoří především v potravinách rostlinného původu, z nichž nejdůležitější jsou obiloviny (především kukuřice), luštěniny (především podzemnice olejná) a různá olejnatá semena a ořechy. Mykotoxiny mohou procházet také potravním řetězcem do potravin živočišného původu jako je maso a mléko. Odhaduje se, že až 25 % světových potravinářských

plodin může být kontaminováno mykotoxiny. Důvodem k obavám z jejich přítomnosti v potravinách není akutní toxicita, ale především chronická toxicita, která může zahrnovat karcinogenitu, chronické poškození orgánů a imunosupresivní aktivitu, proto jsou stanoveny maximální tolerované limity pro jejich přítomnost v potravinách (Blackburn a McClure, 2009).

### Metody detekce mikromycet

K identifikaci mikromycet lze využít standardní kultivační metody, kdy jsou jednotlivé morfologické znaky porovnávány s atlasy. Tento postup je časově náročný, a proto jsou postupně zkoumány a využívány molekulárně biologické, chemické nebo fyzikální metody. K identifikaci je tak využívána PCR a sekvenování pro detekci specifických genů. Genetická informace rovněž udává informace o metabolismu vláknitých mikromycet. Ten zahrnuje široké spektrum chemických látek, jako jsou například terpeny, polyketidy, neribosomální peptidy, mastné kyseliny aj. K obecné detekci mohou sloužit typické produkty, jako jsou ergosterol či chitin. Pro selektivnější určení lze využít těkavé organické látky stanovené umělými nosy či chromatografickými metodami nebo specifické mastné kyseliny. Z fyzikálních metod narůstá zájem o metody analýzy obrazu pořízeného v různých oblastech spektra od ultrafialové až po infračervenou oblast (Dohnal a Jun, 2012).

## 2.2.2 Rody mikromycet významné z hlediska tvorby toxinů

### 2.2.2.1 Rod *Aspergillus*

Rod *Aspergillus* popsal jako první už v roce 1809 Johan Heinrich Friedrich Link. Česky se nazývá kropidlák a má charakteristické hlavičkovité zakončení konidioforů. Je celosvětově rozšířen, s častějším zastoupením v subtropických a tropických oblastech. Jednotlivé druhy tohoto rodu se vyskytují v půdě, ve vodě, v ovzduší a mohou tak snadno kontaminovat potravinářské výrobky (Klaban, 2005).

*Aspergillus flavus* a *A. parasiticus* byly po několik desetiletí považovány za jediné druhy schopné produkovat aflatoxiny. Až v roce 1987 zjistil Kurtzman, že *A. manitus*, druh úzce příbuzný *Aspergillus flavus* je také aflatoxigenní. Postupně byla popsána řada dalších druhů produkujících aflatoxiny: *A. bombicis*, *A. ochraceoroseus*, *A. pseudotamarii*, *A. tamarii*, *Emericella astellata*, *Emericella venezuelensis*. Ve srovnání s *A. flavus* a *A. parasiticus* se však vyskytují v přírodě méně a v zemědělství se s nimi setkáváme zřídka. Na kontaminaci



zemědělských produktů aflatoxiny má vliv vlhkost, teplota a také poškození hmyzem. Plodiny jsou často kontaminovány aflatoxiny už na poli před sklizní, hlavně v období sucha, kdy jsou rostliny oslabené a náchylné k poškození hmyzem. Mezi nejčastěji kontaminované plodiny patří kukuřice, arašídy, bavlna, ořechy, rýže, fíky, tabák a koření (Simjee, 2007).

Aflatoxiny jsou heterocyklické sloučeniny, dělí se na šest hlavních typů B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>, M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>. Písmena B a G pocházejí od jejich fluorescence v UV světle (blue = modrá, green = zelená) a písmeno M od mléka (milk) (Görner a Valík, 2004). Aflatoxin B<sub>1</sub> je nejsilnější dosud známý karcinogen. Aflatoxiny mohou vyvolat u člověka Reyeův syndrom, zánět jater, primární hepatom, kwashiorkor a stavy útlumu imunity (Šimůnek a Březina, 1996).

*A. ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. marinus* a *A. ostianus* vytváří především nebezpečný ochratoxin A. Ten má silně nefrotoxické účinky, je teratogenní, cytotoxický, karcinogenní a snižuje imunitu (Votava, 2003). Vyskytuje se hojně v půdě, na kazících se potravinách (Klaban, 2005).

Toxigenní kmeny *Aspergillus flavus*, *A. oryzae*, *A. versicolor* produkují za příznivých podmínek kromě aflatoxinů i kyselinu cyklopiazonovou (Klaban, 2005). Tento toxin může způsobovat patologické změny v játrech, slezině, pankreatu, ledvinách, myokardu atd. (Votava, 2003).

*A. bipolaris*, *A. flavus*, *A. nidulellus* a *A. versicolor* produkují sterigmatocystin, což je prekurzor aflatoxinu B (Votava, 2003).

### **Metody detekce rodu *Aspergillus***

Významná je přímá mikroskopie tkáňových řetězců stříbřených podle Grocotta nebo barvených hematoxylinem. Úspěšné může být také prohlížení preparátů barvených Parkerovým inkoustem nebo Ryluxem. Významnou roli hraje i průkaz nepřímý, využívající imunoelektroforézu, dvojistou imunodifuzi, techniku ELISA, případně analýzu specifických IgA pomocí imunoblottingu. Použit lze také reakci vazby komplementu (Votava, 2003).

Mykotoxiny mohou být detekovány chemickými nebo biologickými metodami. Využívá se tenkovrstvá chromatografie nebo vysoce účinná kapalinová chromatografie s detekcí UV zářením nebo absorpčním spektrem. Byly vyvinuty komerčně dostupné imunotesty (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

### 2.2.2.2 Rod *Penicillium*

Objev penicilinu v roce 1929 poskytl podnět k hledání dalších metabolitů rodu *Penicillium* s antibiotickými vlastnostmi, což vedlo k poznání patulinu, citrulinu, griseofulvinu jako mykotoxinů. Rod *Penicillium* produkuje 42 toxických metabolitů a nejméně 85 druhů je toxigenních (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

Český název je štetičkovec z latinského *penicillus* = štětec. V roce 1979 navrhl australský badatel John I. Pitt rozdělení rodu *Penicillium* do 4 podrodů: *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Penicillium*, *Biverticillium* (Klaban, 2005). Rozsah mykotoxinů, které produkuje rod *Penicillium* je širší než u jiných mikromycet. Většina toxinů však může být zařazena do dvou skupin, neurotoxiny a ty co ovlivňují činnost jater a ledvin (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

Nejdůležitější toxin produkovaný rodem *Penicillium* je ochratoxin A, produkován *Penicillium verrucosum*, který kontaminuje ječmen a pšenici zejména ve Skandinávii, střední Evropě a západní Kanadě. Ochratoxin A je původcem balkánské endemické nefropatie s vysokou úmrtností v oblastech Bulharska, bývalé Jugoslávie a Rumunska, která vznikla konzumací prasečího masa zvířat, která byla krmena plesnivým krmivem (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

Řada plísní z rodu *Penicillium* tvoří toxin patulin (*P. expansum*, *P. urticae*, *P. patulum*) (Görrner a Valík, 2004). Jedná se o mykotoxin s bakteriostatickými a baktericidními účinky, který se nachází v různých druzích ovoce, zejména jablech a výrobcích z nich. U patulinu byly prokázány karcinogenní, mutagenní a teratogenní účinky (Hrubý a Turek, 1996).

Metabolitem *P. citrinum*, *P. citreoviride*, *P. cyclopium*, *P. claviforme* a dalších 15 druhů penicilií je citrinin. Je nefrotoxický a vyskytuje se především v rýži. Je známý především v souvislosti s onemocněním lidí po tzv. žluté rýži. Tato otrava se objevila po 2. světové válce i v Itálii a ve Španělsku. Citrinin byl zjištěn také v různých krmných směsích nebo v produktech z kokosových ořechů (Hrubý a Turek, 1996).

#### **Metody detekce rodu *Penicillium***

Při určování druhů rodu *Penicillium* se sleduje makrohabitus na diagnostických půdách (CYA- Czapek agar s kvasničným extraktem a MEA agar se sladovým extraktem), kde vytváří dobře vyvinuté vegetativní mycelium a konidiální aparát i případné „plodničky“ (Malíř a Ostrý, 2003).

### 2.2.2.3 Rod *Fusarium*

Plísně tohoto rodu jsou v přírodě značně rozšířené, nachází se v půdě, ve vodě i v ovzduší. Mají bohaté plstnaté nebo vatovité mycelium a vyznačují se charakteristickou tvorbou dvou typů konidií: mikrokoniidie a makrokoniidie. Dříve byly zástupci rodu *Fusarium* považováni za nepatogenní pro člověka, v současné době jsou však popsány případy mykotických onemocnění u osob se sníženou imunitou. Infekce mívají často velmi závažný průběh (Klaban, 2005).

Mezi fusariové toxiny patří především fumonosiny, fusarenon X, fusarin C a X, moniliformin, trichothecin, HT-2 toxin, diacetoscirpenol (Hrubý a Turek, 1996). Závažným producentem fumonisinů a fusarinu X je *Fusarium moniliforme*, zejména typ MRC 826, ze kterého byl v roce 1988 v Jihoafrické republice první fumonisin izolován (Klaban, 2005).

Fumonisy jsou také metabolity *F. verticillioides*, *F. moniliforme*, *F. proliferatum* a *F. subglutinans*. Jsou to půdní rostlinné patogeny, které kontaminují kukuřici po celém světě (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

*Fusarium culmorum* produkuje mykotoxiny deoxynivalenol, zearalenon a acetyldeoxynivalenol. Vyskytuje se v půdě, způsobuje choroby obilí a plíseň u kukuřice, která pak může kontaminovat potraviny na bázi kukuřice (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

#### Metody detekce rodu *Fusarium*

K identifikaci toxinů rodu *Fusarium* se používají chromatografické separační techniky. Nejběžnější je tenkovrstvá chromatografie a vysoce účinná kapalinová chromatografie. Využívá se i plynová chromatografie, zejména ve spojení s hmotnostní spektrometrií. Byly vyvinuty také imunotesty. Kvalitativní soupravy pro screening, stejně jako soupravy pro kvantitativní analýzu, jsou k dispozici pro deoxynivalenol, zearalenon, T-2 toxin a fumonisy (Montville, Matthews a Kniel, 2012).

### 2.2.3 Nově se objevující toxické metabolity mikromycet

V různých potravinách se nalézá řada plísní, jejichž izoláty vykazují v různých testech toxicity a genotoxicity pozitivitu, aniž by byl dosud znám toxický metabolit. Jako příklad mohou sloužit některé kmeny *Cladosporium sphaerosporum*, izolované z pekařských výrobků a obilovin, *Aspergillus niger*, *Penicillium corylophytum* a *Fusarium oxysporum* z mrkve a chleba a *Fusarium solani* izolované ze zelí. U některých kmenů *Aspergillus niger* byla prokázána hepatotoxicita a nefrotoxicita (Hrubý a Turek, 1996).

Deoxynivalenol patří mezi trichotheceny, které se stávají stále důležitějšími mykotoxiny v plodinách jako je pšenice. Je produkován množstvím druhů *Fusarium*, z nichž nejdůležitější jsou *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum* a *Fusarium pseudograminearum*, které byly donedávna zařazeny k *Fusarium graminearum*. DON je sice méně toxický než jiné trichotheceny např. toxin T-2, ale je mnohem běžnější v obilovinách pěstovaných po celém světě. Maximální přípustné množství deoxynivalenolu v potravinách je stanoveno v Nařízení Komise (ES) č. 1881/2006, limity pro krmiva pak v Doporučení Komise ze dne 17. srpna 2006 (Blackburn a McClure, 2009).

## 2.3 Viry

### 2.3.1 Obecná charakteristika virů

Viry jsou nukleoproteinové částice, které nesou určitou genetickou informaci, ale nemají enzymové vybavení pro zajištění základních životních funkcí. Jsou schopny infikovat vhodnou hostitelskou buňku, to znamená, že do ní přenesou svou nukleovou kyselinu a využijí hostitelova enzymového systému pro svou replikaci. Většina virů poškozuje, někdy i ničí hostitelskou buňku nebo ovlivňuje její kontrolní mechanismy. Některé viry však zůstávají v latentním stavu a jejich genetický materiál se stává součástí genetického materiálu buňky (Šilhánková 2008).

Viry se vyskytují ve dvou fázích. Extracelulární fáze se nazývá virion (virová částice), intracelulární (replikační) fáze spočívá v replikaci virové nukleové kyseliny v buňce hostitele a v tvorbě nových virionů v hostitelské buňce. Viriony se skládají z molekuly DNA nebo RNA a z bílkovinného obalu nazvaného kapsida. Některé viry vyšších organismů jsou ještě obaleny zvláštní membránou bohatou na lipidy. U některých virů je složení bílkovin této membrány určeno virovými geny, u jiných je membrána úplně nebo částečně tvořena membránami, které vznikly ze složek hostitelské buňky. Byla zjištěna i existence tzv. viroidů, které nemají kapsidu a skládají se pouze z jednořetězcové RNA (Šilhánková 2008).

Podle způsobu množení viru můžeme tedy říci, že virus je parazit na molekulové úrovni. Viry existují jako specifictí paraziti všech druhů buněk. Živočišné viry se pomnožují na eukaryotních buňkách živočichů, nejsou úzce specifické pro živočišný druh, ale množí se

na určitém okruhu živočichů. Pomnožují se ve více orgánech a vyvolávají buď systémovou infekci, nebo mají orgánovou specifitu (Schindler, 2010).

Viry se rozmnožují jen v živých buňkách, proto je jejich rozmnožování v potravinách vyloučené. Potraviny a voda však mohou být významnými přenašeči takových virů, které jsou schopné uchovat si svoji životaschopnost delší dobu i mimo živou buňku. Velmi vhodným prostředím pro uchování životaschopnosti virů mimo živou buňku je mléko. Jestliže se potravina živočišného původu získá z živočichů infikovaných viry, může být kontaminovaná už primárně intravitální cestou. Mnohem častější jsou však sekundární kontaminace, především cestou fekálního znečištění (Görner a Valík, 2004).

Většina virů si zachovává svoji infekčnost i při chladírenských teplotách po dobu několika týdnů a při teplotách mrazírenských i několik měsíců. Viry jsou však citlivé vůči nižším hodnotám pH, vůči vysušení a také vůči vyšším teplotám (Görner a Valík, 2004).

### **2.3.2 Významné a nově se objevující viry přenosné potravinami**

Viry jako etiologická agens akutní gastroenteritidy byly rozpoznány později než bakterie a jejich průkaz závisel na rozvoji detekčních metod, založených nejprve na pozorování agens (elektronová mikroskopie), později na průkazu antigenu ve stolici. K objevu virů v souvislosti se střevními infekcemi došlo až v 70. letech 20. století (Ambrožová a Schramlová, 2006).

#### **Metody detekce virů v potravinách**

K průkazu virů v potravinách se používají tkáňové kultury. Změna vyvolaná virem může být v tkáňové kultuře viditelná pouhým okem, mikroskopicky nebo nepřímými metodami. Potvrzující testy se obvykle provádějí na zvířatech (Šilhánková, 1987).

#### **2.3.2.1 Virus hepatitidy A**

Virus hepatitidy A (HAV) je malý RNA virus z čeledi *Picornaviridae*, rodu *Hepatovirus*. Je velmi odolný vůči vlivům zevního prostředí, zmrazený přežívá roky. Je rezistentní ke kyselosti žaludeční šťávy (Hamplová, 2015). Přežívá i běžné chlorování pitné vody a devitalizuje se až varem delším než 5 minut (Görner a Valík, 2004).

Přenáší se fekálně-orální cestou a také prostřednictvím kontaminované vody a potravin. Inkubační doba je 14-50 dní. Probíhá vesměs s gastrointestinálními a chřipkovými příznaky (Hamplová, 2015).

Toto onemocnění se vyskytuje celosvětově, častěji v rozvojových zemích a v komunitách s nižším hygienickým standardem. Ročně dochází k více než 200 milionům případů akutní hepatitidy A a umírá více než 35 000 nemocných. Trend výskytu v ČR je dlouhodobě příznivý, poslední velká epidemie, při které bylo nakaženo prostřednictvím dovezených kontaminovaných jahod více než 30 000 lidí, proběhla v letech 1979-1980. Při epidemii v roce 2008 bylo podchyceno 1648 onemocnění (Hamplová, 2015).

### 2.3.2.2 *Virus hepatitidy E*

Virus hepatitidy E (HEV) je RNA virus zařazený do čeledi *Hepeviridae*. Klinický obraz je podobný jako u virové hepatitidy A, v počátečním stádiu jsou výraznější gastrointestinální, chřipkové a kloubní příznaky. Významně vyšší smrtnost může být u těhotných žen (20-30 %). Virus je značně stabilní, zejména ve vodě. Šíří se převážně v rozvojových zemích prostřednictvím kontaminované vody a ryb. Ve vyspělých zemích převládá přenos kontaminovaným, nedostatečně upraveným masem. Inkubační doba je 15-64 dní (Hamplová, 2015).

### **Metody detekce viru hepatitidy**

Viry hepatitidy se zjišťují použitím imunochemických metod, a to použitím antiséra označeného radioizotopem (metoda RIA tj. Radio Immuno Assay) (Šilhánková, 1987).

### 2.3.2.3 *Virus klíšťové encefalitidy*

Virus klíšťové encefalitidy tzv. západního typu je příslušníkem rodu *Flavivirus*. Udržuje se v přírodních ohniscích nákazy ve střední Evropě. Z rezervoáru hlodavců se přenáší klíšťaty na lesní zvěř a zvířata na pastvě (Schindler, 2010). V minulosti a vzácně i dnes dochází k alimentárnímu přenosu po konzumaci tepelně nezpracovaného mléka infikovaných hospodářských zvířat (koz, krav a ovcí) (Hamplová, 2015). Relativně veliká stabilita viru k vlivům vnějšího prostředí se projevuje jeho schopností přežít v mléce a másle až dva měsíce. Pasterací je virus spolehlivě inaktivován (Vařejka, Mráz a Smola, 1989).

Nákaza často probíhá velmi lehce, může být i inaparentní. Onemocnění však může mít i dvoufázový průběh, kdy po první chřipkovité fázi dochází k silným bolestem hlavy a zvracení. V rozvinutém stádiu je spektrum příznaků velmi pestré. Nejčastější formou postižení CNS je aseptická meningitida nebo meningoencefalitida (Hamplová, 2015). Po onemocnění zůstávají často neurologické následky. Smrtnost je 1-5 % (Votava, 2003). V České republice

je mnoho ohnisek, kde jsou dobré ekologické podmínky pro život klíšťat i rezervoárových zvířat, na kterých klíšťata parazitují (Hamplová, 2015).

### **Detekce viru klíšťové encefalitidy**

Laboratorní diagnostika je založena na sérologickém vyšetření s průkazem čtyřnásobného vzestupu protilátek a na izolaci viru v počátečním viremickém stádiu onemocnění. Velký význam mají metody molekulární biologie (Žemla, Čiampor a Labuda, 1998). Užívá se souběžně komplementfixační reakce a hemaglutinačně inhibiční test, případně průkaz protilátek metodou ELISA (Votava, 2003).

#### **2.3.2.4 Rotaviry**

Rotaviry byly u lidí popsány poprvé v r. 1973, kdy je Bishop se spolupracovníky objevili pomocí elektronové mikroskopie v bioptických vzorcích duodena u dětí s průjmem (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Patří do čeledi *Reoviridae*, nejsou vlastní jen člověku, ale vyskytují se také u mnoha druhů zvířat. Jsou to neobalené, 60-80 nm velké dvacetistěnné viry se zdvojenou kapsidou, tvarem připomínají kolo (latinsky rota), mají dvouvláknovou RNA. Podle antigenu a pohyblivosti v elektrostatickém poli existuje 6 skupin označených A až E (Schindler, 2010). Naprostá většina onemocnění ve světě je však vyvolána skupinou A, rotaviry ze skupiny B vyvolaly epidemie u dospělých v Číně, později v Indii a Bangladéši, skupina C vyvolává sporadická onemocnění dětí i dospělých (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Rotaviry jsou nejčastějšími vyvolavateli nebakteriálních gastroenteritid s nejzávažnějším průběhem a jsou celosvětově rozšířeny. Jejich výskyt není příliš ovlivněn socioekonomickými podmínkami a počet onemocnění v rozvojových i rozvinutých zemích je stejný. Téměř každé dítě na zeměkouli se jimi infikuje do 5 let věku (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Infekce se přenáší orálně-fekální cestou nebo potravinami. Rotaviry jsou odolné vůči mytí rukou, onemocnění se projevuje zvracením a průjmem. Průjem je pro dehydrataci nebezpečný zvláště u kojenců. Na světě, především v rozvojových zemích způsobují rotavirové průjmy až 850 000 dětských úmrtí ročně (Schindler, 2010).

### Detekce rotavirů

V diagnostice je rozhodující průkaz antigenu ve stolici, který je možno provést několika metodami. Nejrychlejší je latexová aglutinace, která má senzitivitu asi 90 %. Citlivější metodou se senzitivitou kolem 98 % je ELISA. Velmi vhodnou metodou je elektronová mikroskopie (EM), jejíž nevýhodou však je závislost na počtu virů ve stolici. Nejcitlivější metodou k průkazu RNA jsou molekulárně-genetické metody (PCR) (Ambrožová a Schramlová, 2006).

#### 2.3.2.5 Caliciviry

Caliciviry jsou jednovláknité neobalené RNA viry o pozitivní polaritě vlákna, jejichž dvacetistěnná kapsida o průměru 30-45 nm je formována do 32 kalíškovitých důlků (latinsky calyx – kalich) (Schindler, 2010).

Lidské caliciviry se řadí do dvou rodů *Norovirus* a *Sapovirus* (Votava, 2003).

### Noroviry

Název rodu *Norovirus* pochází od prototypového kmene Norwalk a ten se nazývá podle místa, kde byl poprvé prokázán (škola v Norwalk v Ohiu v roce 1968). Prohlubně na povrchu jsou u příslušníků tohoto rodu poměrně špatně patrné. Viry jsou velmi odolné, snášejí např. chlór v koncentraci, která se používá při přípravě pitné vody (Votava, 2003). V současné době rozlišujeme 6 genoskupin calicivirů z rodu norovirů (Hamplová, 2015).

Onemocnění začíná náhlým nebo postupným vývojem křečí břicha, objevuje se nauzea, zvracení, průjem, chřipkové příznaky a u poloviny postižených teplota. Nejčastější komplikací je dehydratace, zejména u mladších a starších osob. V souvislosti s norovirovou infekcí dochází v rozvojových zemích k více než 200 000 úmrtí dětí do 5 let (Hamplová, 2015).

Přenáší se fekálně orální cestou nebo prostřednictvím kontaminované vody a také potravinami (ústřice, maliny, saláty) (Hamplová, 2015). Noroviry byly nalezeny i v balené pitné vodě. V počtu onemocnění bývají na druhém místě hned za rotaviry (Ambrožová a Schramlová, 2006).

### Sapoviry

Sapoviry byly objeveny poprvé u dětí s gastroenteritidou v 70. letech 20. století. Onemocnění je typické zejména pro malé děti, může se však vyskytnout i u starších dětí a dospělých.



Sapoviry vyvolávají epidemie v dětských centrech, školách, nemocnicích a dětských domovech. Mohou se přenášet i potravinami, např. ústřicemi. Klinický obraz a prevence se výrazněji neliší od onemocnění vyvolaných noroviry (Ambrožová a Schramlová, 2006).

### **Detekce calicivirů**

Virus je zatím nekultivovatelný. Při laboratorní diagnostice ze stolice se využívají různé metody: imunochromatografie, ELISA, RT-PCR, IEM, EM (Hamplová, 2015).

Noroviry genových skupin I. a II. v pitné vodě lze detekovat jednoduchou metodou pomocí jedноступňové reverzní transkripční polymerázové řetězové reakce (RT-PCR) v reálném čase (Adley, 2006).

### **2.3.2.6 Astroviry**

Astroviry jsou čtvrtým nejčastějším původcem virových gastroentritid. Virus je poměrně malý, neobalený, o průměru asi 30 nm a má vzhled pěti nebo šestihroté hvězdy (Schindler, 2010). Genom je tvořen jednovláknovou RNA. Lidská onemocnění vyvolávají astroviry z rodu *Mamastrovirus*, je známo 8 sérotypů lidských astrovirů, nejčastěji se vyskytuje sérotyp č. 1 (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Infekce jsou nejčastější u kojenců a malých dětí do 3-5 let, dále pak u hospitalizovaných starých lidí a u imunodeficitních pacientů. U zdravých lidí vyvolávají astroviry epidemie i sporadická onemocnění po požití kontaminovaných potravin a vody. Největší epidemie byly zaznamenány v 90. letech 20. století v Japonsku, kde onemocnělo několik tisíc studentů po požití oběda ve školní jídelně. Astroviry byly opakovaně nalezeny i v mušlicích, ústřicích, v říčních a odpadních vodách (Ambrožová a Schramlová, 2006).

U astrovirů je typický sezónní výskyt, který se ale geograficky liší. V zemích mírného pásma je nejvyšší výskyt v zimě, v tropech v období dešťů (Ambrožová a Schramlová, 2006).

### **Detekce astrovirů**

Pro záchyt astrovirů je důležitá použitá diagnostická metoda. Při použití elektronové mikroskopie mohou být výsledky zkreslené, protože asi jen 10 % částic má typický hvězdicovitý vzhled. Přesnější jsou enzymatické metody, např. komerčně vyráběná ELISA (Ideia Astrovirus), která detekuje antigen ve stolici a slouží k záchytu všech 8 sérotypů. Nejmodernější a nejcitlivější metodou k detekci astrovirů je RT-PCR (Ambrožová a Schramlová, 2006).

### 2.3.2.7 Adenoviry

Adenoviry byly poprvé izolovány v roce 1953 z adenoidní tkáně (nosní mandle). Lidské adenoviry se řadí do rodu *Mastadenovirus* (Votava, 2003). Adenoviry jsou středně velké, mají sférický tvar a kubickou symetrii kapsidy. V průměru měří 70-90 nm. Kapsidu tvoří 252 sférických kapsomer velikosti 8-9 nm (Vařejka, Mráz a Smola, 1989). Genom obsahuje dvouvláknovou DNA (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Adenoviry jsou rozšířeny po celém světě, některé sérotypy vyvolávají gastroenteritidy především u malých dětí. Jedná se o sérotypy 40 a 41. Řada případů probíhá asymptomaticky. Incidence střevních adenovirů u malých dětí byla podle amerických a argentinských studií 4-7/100. I když jsou průběhy obvykle lehké, byly popsány i smrtelné případy u imunodeficitních pacientů. Střevní adenoviry nevykazují sezónnost. Podle studií prováděných u dětí s průměrem v různých zemích světa se adenoviry vyskytují méně často než rotaviry a astroviry (Ambrožová a Schramlová, 2006).

#### Metody detekce adenovirů

Střevní adenoviry se diagnostikují ze vzorků stolice. Lze je pozorovat elektronovým mikroskopem, ale při přímé elektronové mikroskopii je nelze odlišit od kultivovatelných sérotypů. Detekce je možná imunoelektronovou mikroskopií (Ambrožová a Schramlová, 2006).

Největší záchyt adenovirů ve stolici je během prvního týdne onemocnění, pak dochází k poklesu vylučování viru. Asi nejvíce používanou, i když méně citlivou metodou je latexová aglutinace, komerčně se vyrábí i specifická ELISA. Nejvyšší senzitivitu má PCR (Ambrožová a Schramlová, 2006).

### 2.3.2.8 Polioviry

Kromě člověka jsou k poliovirům vnímaví jen primáti. Existují 3 typy, které se liší antigenně a homologii nukleotidů (Schindler, 2010). Onemocnění se nazývá poliomyelitida (přenosná dětská obrna), probíhá zpravidla inaparentně (95 %), u několika procent lidí vyvolá chřipkové onemocnění a pouze výjimečně dochází k virémii a průniku viru do nervové soustavy. Projeví se jako aseptická meningitida nebo paralytická forma s chabými asymetrickými parézami svalů, vedoucími k trvalému ochrnutí. Od konce 80. let 20. století jsou ve světě uplatňovány eradikační programy. Epidemicky se dosud vyskytuje v Nigérii, Pákistánu, Afganistánu a v roce 2014 se objevila také na Arabském poloostrově. V České republice se

díky povinnému očkování dětí nevyskytuje již od roku 1961. Přenáší se fekálně-orální cestou, při koupání ve vodách kontaminovaných odpadními vodami nebo může dojít i k alimentární epidemii z kontaminovaných potravin (Hamplová, 2015).

## 2.4 Priony

V roce 1982 identifikoval tým, který vedl Stanley B. Prusiner, ředitel ústavu neurogenerativních nemocí na Kalifornské univerzitě v San Franciscu, infekční autoreplikační proteiny, které Prusiner nazval priony (Washington, 2017). Stanley B. Prusiner prokázal priony jako původce scrapie a dalších neurogenerativních nemocí a formuloval prionovou teorii, za což obdržel v roce 1997 Nobelovu cenu (Julák, 2006).

### 2.4.1 Obecná charakteristika prionů

Priony jsou specifické proteiny lokalizované v nervových buňkách. Neobsahují nukleovou kyselinu, jejich proteinová molekula je kódována strukturním genem hostitelského organismu. Infekce prionem vede k syntéze tohoto proteinu, který se hromadí v nervových buňkách a způsobuje poruchy CNS. Dochází k úbytku nervových buněk a v mozku zůstávají prázdná místa. Příznaky tohoto onemocnění se projeví až po velmi dlouhé době. Pomalý, nevyčísitelný průběh nemoci s prohlubujícími se smyslovými poruchami a demencí končí smrtí. (Mišurcová, 2012).

### 2.4.2 Priony přenosné potravinami

#### 2.4.2.1 Creutzfeldt -Jakobova nemoc (nová varianta)

Jedná se o neurodegenerativní onemocnění u člověka rozpoznané v roce 1996. Postihuje mladší osoby, progreduje rychleji, dochází k pravidelnému postižení malého mozku a předpokládá se alimentární přenos v souvislosti s BSE. Předpokládá se, že zdrojem je hovězí dobytek infikovaný původci BSE. Přenáší se pravděpodobně požitím hovězího masa a potravin z něj připravených. Rizikové by mohly být i potravinářské výrobky z kostí a kůže nakažených zvířat (např. želatina). Je uvažováno i o přenosu krví a krevními deriváty. Hypotézu o souvislosti obou nemocí potvrzuje především místní a časová spojitost výskytu obou nemocí. V letech 1996-2012 bylo celosvětově hlášeno 230 případů onemocnění vncjn, z toho nejvíce ve Velké Británii (160), ve Francii (15), dále v Irsku, USA, Kanadě,

Itálii, Japonsku, Holandsku, Portugalsku, Španělsku a Saudské Arábii. V České republice dosud nebyl potvrzen žádný případ. Onemocnění končí přibližně do roku demencí, imobilitou a smrtí. Diagnostika není snadná, neexistují zatím žádné intravitální testy. Definitivní potvrzení nemoci je možné až z pitevního nálezu (Hamplová, 2015).

#### **2.4.2.2 Kuru**

Tato nemoc byla poprvé diagnostikována u příslušníků kmene Fore na Nové Guineji. Protože si muži nechávali prasata, která ulovili pro sebe, ženy a děti si obohacovaly stravu tím, že jedly těla, a hlavně mozky svých nedávno zemřelých příbuzných. Priony, které způsobují kuru, jsou soustředěny v mozku a nervové tkáni, takže 90 % žen a dětí obojího pohlaví touto nemocí onemocnělo. V 60. letech minulého století kmen sice kanibalismu zanechal, ale nemoc má dlouhou inkubační dobu, a tak kuru byla diagnostikována ještě 50 let po infekci patogenem. Tato nemoc se projevuje bolestmi rukou i nohou, potížemi s koordinací, rovnováhou a chůzí, bezděčnými křečemi ve svalech, třesem a záškuby. Nakonec se dostaví demence. Kuru je lidskou obdobou scrapie (klusavky) u ovcí a BSE u dobytka (Washington, 2017).

## **2.5 Parazitičtí prvoci**

### **2.5.1 Obecná charakteristika prvoků**

Prvoci (protozoa) jsou jednobuněčné organismy. Jejich tělo tvoří eukaryotická buňka různých rozměrů v rozmezí nejčastěji 1-150  $\mu\text{m}$ . Struktura buněk se podobá struktuře buněk mnohobuněčných organismů. Mají charakteristickou cytoplazmatickou membránu, jádro ohraničené jadernou membránou, endoplazmatické retikulum, mitochondrii, Golgiho aparát a ribozomy. Někteří prvoci mají chloroplasty a někteří mohou mít různé specializované buněčné struktury. Většině prvoků nebo alespoň některým stádiím jejich životního cyklu je dána schopnost aktivního pohybu. Parazitičtí prvoci se pohybují u svých hostitelů v krvi, v lymfě, v mezibuněčných prostorech a tkáních a ve střevním lumen (Ryšavý, 1989).

Vyvolávají infekce, které mohou být asymptomatické, ale také smrtelné v závislosti na druhu prvoka a hostitele. Formy s plně rozvinutým metabolismem se nazývají trofozoity,

odolnější formy, které přežívají nepříznivé podmínky zejména v prostředí mimo tkáň hostitele, jsou cysty. Klasifikují se podle morfologie, vzhledu, velikosti a vybavení. Jejich životní cyklus je složitější než u bakterií (Schindler, 2010).

### 2.5.1.1 *Rod Giardia*

Tento rod zahrnuje druhy, které kromě zdvojeného jaderného a bičíkatého aparátu mají tzv. adhezivní disk a útvary zvané mediální tělíska. Adhezivní disk slouží jako přichycovací organela na epitelové buňky a je na přední straně těla prvoka. Význam mediálních tělísek není jasný, jejich tvar a postavení však pomáhá při druhovém rozlišení gardií. Vytvářejí oválné čtyřjaderné cysty (Ryšavý, 1989).

#### *Giardia intestinalis*

Giardióza je střevní infekce vyvolaná jednobuněčným bičíkovcem *Giardia intestinalis*, pro kterého je používáno i synonymum *Giardia lamblia* nebo *Giardióza duodenalis* (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). Gardie poprvé pozoroval objevitel jednobuněčných organismů, holandský obchodník Antony van Leeuwenhoek vlastnoručně vyrobeným mikroskopem už v roce 1681. Poprvé však byly popsány až v roce 1859 českým lékařem profesorem Vilémem Dušanem Lamblem (Votava, 2003).

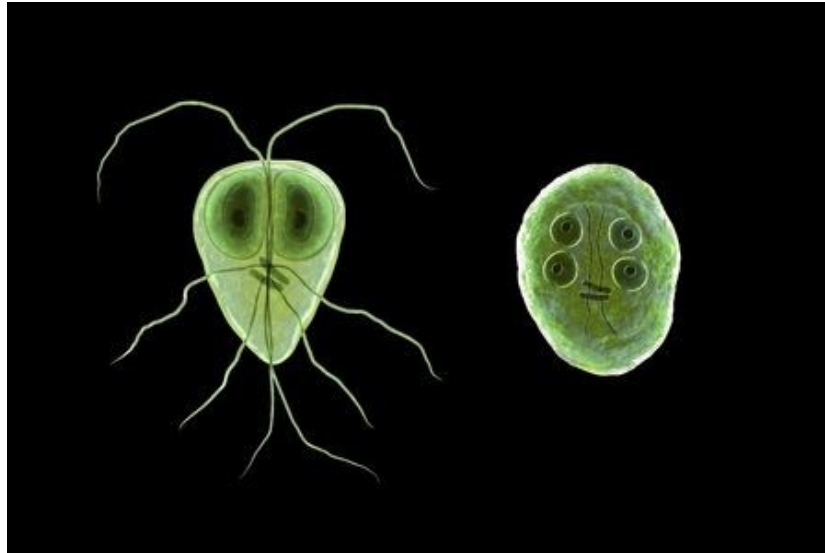
Pohybliví trofozoiti gardinií mají tvar podélně rozkrojené hrušky a měří 10-15 x 6-10  $\mu\text{m}$ . Jako příslušníci diplomonád mají dvě stejná jádra a dvakrát čtyři bičíky. Cysty gardií jsou oválné o velikosti 8-12 x 7-10  $\mu\text{m}$ , obsahují čtyři jádra a rozložený přísavný disk (Votava, 2003).

K nákaze stačí méně než deset cyst. Cysty projdou žaludkem a v duodenu dojde k excystaci, při které se uvolní dva trofozoiti. Ti adherují k povrchu enterocytů duodena a množí se binárním dělením. Do buněk nepronikají. Cysty po pasáži tlustým střevem odcházejí se stolicí. Člověk se nakazí většinou pozřením cyst kontaminovanou vodou nebo potravinami. Cysty jsou velmi odolné k podmínkám vnějšího prostředí, obvyklá chlorace pitné i bazénové vody je neúčinná. Cysty se spolehlivě zahubí desetiminutovým varem (Votava, 2003).

Giardióza patří mezi nejrozšířenější střevní parazitární infekce (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). Symptomaticky se vyskytují spíše u dětí, bývají spojeny s malabsorpcí a neprospíváním. Často se vyskytují u jedinců s deficitem IgA (Votava, 2003).

Výskyt giardiózy je celosvětový, ale mnohem častěji se s ní můžeme setkat v tropech a v oblastech s nižším hygienickým standardem, kde může být nakaženo až 30 % obyvatelstva.

V ČR je v současné době hlášeno několik desítek případů klinické giardiózy ročně. Asi polovina je diagnostikována u cestovatelů a cizinců nebo migrantů, zbytek je pravděpodobně domácího původu (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).



Obrázek 16 *Giardia intestinalis* (<https://www.123rf.com>)

### Metody detekce *Giardia intestinalis*

Používá se mikroskopický průkaz cyst nebo trofozoitů ve stolici. Lze vyšetřit i duodenální šťávu, která obsahuje pouze trofozoity. Vhodné jsou také koncentrační metody (Faustova metoda za použití  $ZnSO_4$ ) a barvicí metody (barvení trichromem) (Votava, 2003). Rovněž lze použít přímý průkaz antigenu ve stolici pomocí komerčně vyráběných diagnostických setů (Bednář, 1996). Ty jsou však nákladné a méně spolehlivé. Stále častěji se používají molekulární metody založené na metodě tzv. multiplex CRP. Která dokáže současně detekovat hned několik střevních patogenů jako *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*, *Cryptosporidium* spp., *Blastocystis hominis* (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

#### 2.5.1.2 Rod *Entamoeba*

Améby jsou jednobuněčné organismy přítomné v prostředí (Schindler, 2010). Ve střevech člověka se vyskytuje asi 9 druhů améb, ale pouze *Entamoeba histolytica* je patogenní a způsobuje závažná onemocnění (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

#### *Entamoeba histolytica*

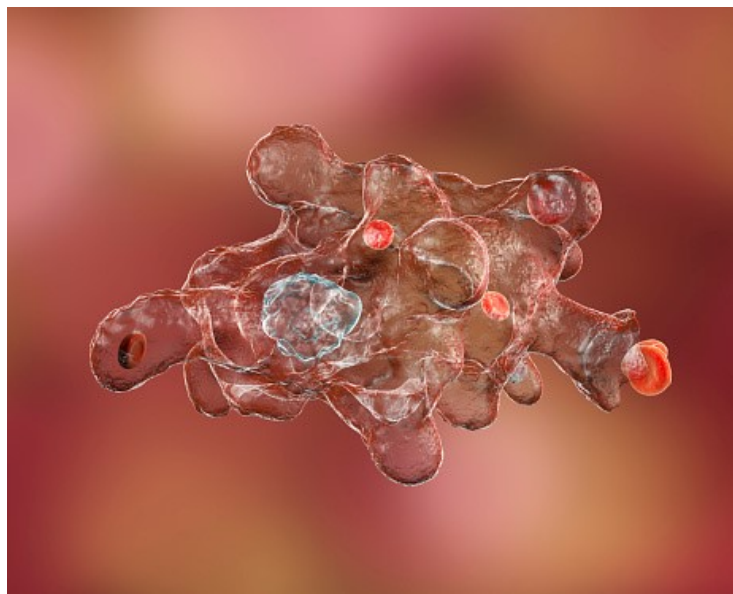
Je rozšířena v tropech, subtropích a v oblastech s nízkým hygienickým standardem. Je původcem střevních a mimostřevních, často závažných, onemocnění, která neléčena mohou

skončit smrtí (Votava, 2003). Podle současných odhadů umírá ročně na amébu 40-110 tisíc lidí, častěji bývají postiženi muži než ženy (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

Vyskytuje se ve dvou formách:

- menší, neinvazivní forma zvaná „forma minuta“ (10-20  $\mu\text{m}$ ) tvoří cysty s 1-4 jádry
- větší, invazivní forma zvaná „forma magna“ (20-40  $\mu\text{m}$ ), v její plazmě lze najít fagocytované erytrocyty, tato forma netvoří cysty

Menší neinvazivní „forma minuta“ žije v lumen tlustého střeva. Člověk se nakazí cystami obsaženými v potravinách nebo nápojích (Votava, 2003). Vlivem dosud ne zcela známých faktorů (např. výživa hostitele, množství a složení střevních bakterií, teplotní stres, pohlavní hormony) se „forma minuta“ mění na invazivní „formu magna“, která proniká do střevní stěny a způsobuje amébovou dyzenterii, projevující se úpornými průjmy. Ještě nebezpečnější formou infekce je stav, kdy jsou améby zaneseny portálními žilami do jater, kde vytváří amébové jaterní abscesy. Naprostou vzácností jsou amébové abscesy lokalizované v jiných orgánech (mozek, ledviny, slezina, kůže), o to jsou však nebezpečnější (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).



Obrázek 17 *Entamoeba histolytica* (<https://www.google.com>)

### **Metody detekce *Entamoeba histolytica***

Trofozoity a cysty v průjmové stolici se prokazují mikroskopicky v nativním a barveném preparátu nebo kultivačně na speciálních médiích (Bednář, 1996). Při záchytu morfologicky

nerozlišitelných cyst se se využívají nejčastěji molekulárně genetické metody na bázi PCR (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). U mimostřevních infekcí se detekují protilátky (ELISA) (Votava, 2003).

### 2.5.1.3 Rod *Toxoplasma*

#### *Toxoplasma gondii*

*Toxoplasma gondii* je intracelulárně parazitující prvok. Má komplikovaný vývoj, vyskytuje se ve vegetativních formách a cystách (Hamplová, 2015). Rodové jméno *Toxoplasma* je odvozeno z řeckého slova taxon znamenajícího oblouk (luk) a slova plasma označujícího formu. Jméno tak velmi dobře vystihuje banánovitý tvar jejích zoitů (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). Tachyzoiti (4-8 x 2-3  $\mu\text{m}$ ) kolují během akutního stadia v tělních tekutinách, napadají buňky a tam se množí. Bradyzoiti jsou klidová, intracelulární stadia toxoplazem. (Votava, 2003).

Tento jednobuněčný cizopasník byl sice popsán už v roce 1908 dvěma Francouzi, Carlesem Nicollem a Louisem Manceauxem u polopouštního hlodavce gundi saharského v Tunisu, ale ještě v roce 1960 musel zakladatel moderní české parazitologie a průkopník toxoplazmologické tradice u nás, prof. Otto Jírovec napsat: „Způsob, jakým se člověk toxoplazmózou infikuje, není přesně znám.“ Na objasnění celého životního cyklu si museli odborníci počkat až do roku 1970, kdy Skot William McPhee Hutchison, Indoameričan Jitender Prakash Dubey a Američan Jacob Karl Frenkel zjistili, že klíčovou roli definitivního hostitele hraje v šíření toxoplazmy kočka (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

Definitivním hostitelem, v jehož těle probíhá pohlavní rozmnožování parazita, je sice pouze kočka nebo jiná kočkovitá šelma, ale mezihostitelem může být kterýkoliv pták nebo savec, tedy i člověk. Ve tkáních hostitele se vytvoří tzv. tkáňové cysty a v každé z nich odpočívají stovky až desítky tisíc bradyzoitů, kteří přežívají v hostiteli až do jeho smrti. Pokud hostitele pozře jiný teplokrevný živočich, uvolní žaludeční šťávy z cyst toxoplazmy, které pronikají přes střevní stěnu do nového mezihostitele a časem se v něm opět usadí v podobě tkáňových cyst. Jestliže však nakaženého mezihostitele sežere kočka, proběhne v jejím střevě pohlavní cyklus parazita, jehož výsledkem jsou odolné oocysty, nesoucí dvě sporocysty, každou se čtyřmi sporozoity vylučované do prostředí v kočičím trusu. Oocysty na vzduchu dozrávají a infekční se stávají až za jeden až pět dnů. Kočka vylučuje oocysty obvykle jen jednou za život po dobu dvou až třech dní (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).



Člověk se může nakazit parazitem *Toxoplasma gondii* principiálně čtyřmi odlišnými cestami. První cestou je nákaza oocystami z trusu koček, který často zahrabávají do záhonů nebo písku pískovišť. Cysty tak mohou ulpět např. na vypěstované zelenině. Pokud se kočičí trus s oocystami dostane do pitné vody nebo do skladů potravin, může způsobit epidemie, jak již bylo opakovaně zaznamenáno po celém světě. Druhou cestou je nákaza při konzumaci masných výrobků obsahujících tkáňové cysty. Pro člověka je nejrizikovější maso králíčí, skopové, méně vepřové a drůbeží a téměř bez rizika je maso hovězí. Rizikové jsou zejména malochovy s přístupem koček a hlodavců (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). Člověk se může nakazit také mlékem infikovaných zvířat (Hamplová, 2015). Toxoplazmu v tkáňových cystách spolehlivě zabíjí vnitřní teplota alespoň 66 °C nebo hluboké mrazení pod 15 °C. Třetí cestou je možnost přenosu tkáňové cysty při transplantaci orgánů od infikovaných dárců. Poslední, čtvrtou cestou nákazy je vrozený přenos, kdy se toxoplazma dostane přes placentu z matky na její plod, který může být vážně poškozen. K přenosu však dochází jen tehdy, když se matka nakazí v průběhu těhotenství (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

Toxoplazmóza je běžná kosmopolitní nákaza. V České republice bývá hlášeno několik set případů ročně a řada případů zřejmě hlášení uniká (Hamplová, 2015). V ČR je odhadem nakaženo 15 – 20 % populace, z toho asi u 1 % se mohou objevit závažné následky. Největší riziko představuje toxoplazmóza pro osoby s oslabenou imunitou, těhotné ženy, jejich plod a novorozence. U imunologicky oslabených jedinců opustí toxoplazmy tkáňové cysty, bradyzoiti se opět změni na rychle se množící tachyzoity a nastane reaktivace toxoplazmózy. Ta se projeví nejčastěji jako mozková nebo plicní forma. Má velmi těžký průběh, který může bez léčby skončit smrtí pacienta (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018). Cysty *Toxoplasma gondii* dlouhodobě perzistují v sítnici oka, mozku či myokardu a mohou vyvolat příznaky až po řadě let (Hamplová, 2015).



Obrázek 18 *Toxoplasma gondii* (<https://www.istockphoto.com>)

### Metody detekce *Toxoplasma gondii*

V diagnostice se využívá PCR, sérologických vyšetření, histologických vyšetření uzlin a placenty případně možnosti radiologických metod u některých forem, výjimečně izolace *Toxoplasma gondii* (Hamplová, 2015). Využívá se ELISA, kterou se stanovují jednotlivé třídy imunoglobulinů (IgG, IgA, IgM), jejichž vzájemným posouzením se určuje stádium nákazy (Votava, 2003).

#### 2.5.1.4 Rod *Cyclospora*

Rod *Cyclospora* byl popsán už v roce 1881 Schneiderem. V současnosti je známo sedmnáct druhů tohoto rodu převážně u hmyzožravců, hlodavců, plazů i primátů.

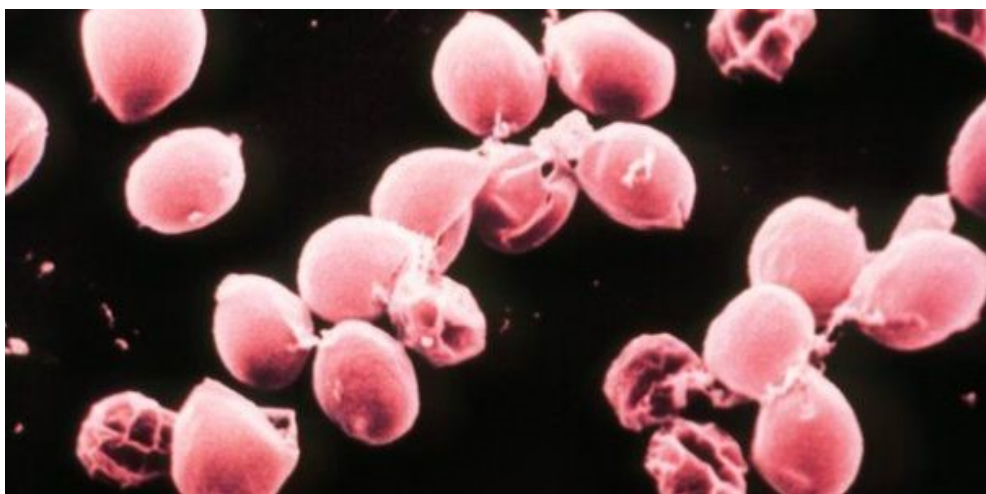
#### *Cyclospora cayentanensis*

V 80. a 90. letech minulého století se začaly v odborném tisku objevovat články popisující zvláštní kulovité útvary ve stolici osob trpících vleklými průjmy. Nálezy byly zaznamenány u pacientů z oblasti Papua Nová Guinea, Nepálu, Mexika, Peru či Haiti. Detailní morfologický popis, taxonomické zařazení a název druhu *Cyclospora cayentanensis* však přinesly až práce Ortegy z let 1992–1994, které byly prováděny na univerzitě v Limě, nesoucí jméno peruánského profesora Cayetano Heredia, po němž *Cyclospora* dostala své druhové jméno (Tolarová, 2005).

Člověk se nakazí potravou, nejčastěji zeleninou, nebo ovocem, méně často přímo vodou, kontaminovanou oocystami cyklospor. Oocysty jsou kulovité, 8–10 µm velké útvary, kryté na povrchu 63 nm silným vnějším fibrilárním obalem, pod nímž je buněčná stěna o tloušťce 50 nm. Oocysty jsou klidová stádia, určená k přečkání nepříznivých vnějších podmínek. Z těla vycházejí jako nevysporulované, tedy neinfekční útvary. K tomu, aby se staly pro člověka infekčními, musejí oocysty prodělat určitou část vývoje (sporulace) ve volném prostředí. Podmínky, za kterých oocysty v přírodě dozrávají a sporulují, nejsou dosud dobře známy. Usuzuje se však, že životaschopnost a odolnost oocyst vůči vnějším podmínkám i vůči působení dezinfekčních roztoků a herbicidů je vysoká (Tolarová, 2005).

V endemických oblastech výskytu cyklosporózy, kterými jsou hlavně střední a jižní Amerika jihovýchodní Asie, Papua-Nová Guinea, ale i některé africké státy se prevalence výskytu pohybuje od několika procent do několika desítek procent. Např. u dětí v Peru je udáváno 6–18 %, velmi často asymptomatických nálezů. Onemocnění má výrazně sezónní charakter a je těsně spjato s obdobím dešťů. Importované případy, které jsou popisovány nejen v USA,

Kanadě a Austrálii, ale i v řadě evropských zemí kopírují často sezónní charakter onemocnění podle země původu nákazy. V České republice bylo v letech 1997–2004 diagnostikováno celkem šestnáct importovaných případů onemocnění cyklosporózou. Velká pozornost je věnována epidemiím, které se každoročně opakují v USA a Kanadě, a které jsou způsobeny potravinami, zejména zeleninou a ovocem, kontaminovanými oocystami cyklospor. Jen v letech 1996 a 1997 bylo zaznamenáno celkem 2944 případů, ale odhaduje se, že ve skutečnosti nákazu prodělalo mnohem více osob. Nejčastěji uváděným vehikulem jsou maliny, importované do USA a Kanady v jarních měsících, především z Guatemaly, kde v tomto období sezónní výskyt cyklosporózy vrcholí. Teprve přijetím velmi přísných opatření ohledně importu, ale i hygienických a provozních podmínek na plantážích, kde se maliny pěstují, včetně filtrace závlahové vody, se počet případů, za které byly zodpovědné guatemalské maliny, snížil. Stále se však objevují další druhy ovoce (borůvky) a zeleniny (mnoho druhů hlávkového salátu, listy bazalky), které působí hromadné nákazy, i když s menším počtem nakažených osob. V roce 2004 bylo např. v Pensylvánii zachyceno minimálně 40 laboratorně diagnostikovaných a spolu souvisejících případů cyklosporózy. Epidemiologickým šetřením se prokázalo, že oocysty cyklospor byly importovány opět z Guatemaly, tentokrát na mladých luscích hrášku, které byly v syrovém stavu přidávány do těstovinového salátu. Případy hromadných onemocnění však nezůstávají omezeny jen na USA a Kanadu. V prosinci roku 2000 se nakazilo 34 osob v jedné restauraci v jihovýchodním Německu s největší pravděpodobností salátem, připraveným z různých druhů zeleného a červeného hlávkového salátu a ochuceného petrželovou a cibulovou natí. Čerstvá zelenina byla dovezena z jižní Francie a jižní Itálie (Tolarová, 2005).



Obrázek 19 *Cyclospora cayentanensis* (www.google.com)

### Metody detekce *Cyclospora cayentanensis*

Izolace oocyst z prostředí je velmi složitý proces. Množství oocyst, zejména ve vodě, je velmi nízké, a proto se musí filtrovat množství vody přesahující objem sto litrů. Izolace patogenního agens se provádí postupně řadou kroků, které spočívají spočívajících v koncentraci, čištění, detekci a příp. provedení testu sporulace k ověření životaschopnosti oocyst. Oocysty se vychytávají pomocí speciálních filtrů, nebo se koncentrují flokulací za použití koagulantů. Mikroskopická detekce je vzhledem k přítomnosti značného množství detritu i jiných organismů ztížena. Výťažnost těchto metod je velmi nízká, a tak se v řadě případů hromadných nákaz cyklosporózou, oocysty cyklospor nepodaří z podezřelých potravin izolovat vůbec a rozhoduje se pouze na základě epidemiologických metod sledování možných cest a zdrojů nákazy. Jako perspektivní se však začínají ukazovat selektivní metody molekulárně biologické (PCR), které se mohou dobře uplatňovat v prostředí, kde se vyskytuje velmi mnoho balastních látek i řada jiných patogenních i nepatogenních organismů. Jejich nevýhodou je nemožnost rozlišení vysporulovaných, tudíž infekčních oocyst od oocyst nevysporulovaných (Tolarová, 2005). Při mikroskopickém průkazu oocyst ve stolici se používá modifikace Ziehl-Nielsenova barvení, Miláčkovovo barvení a autofluorescence (Votýpka, Kolářová a Horák, 2018).

#### 2.5.1.5 Rod *Cryptosporidium*

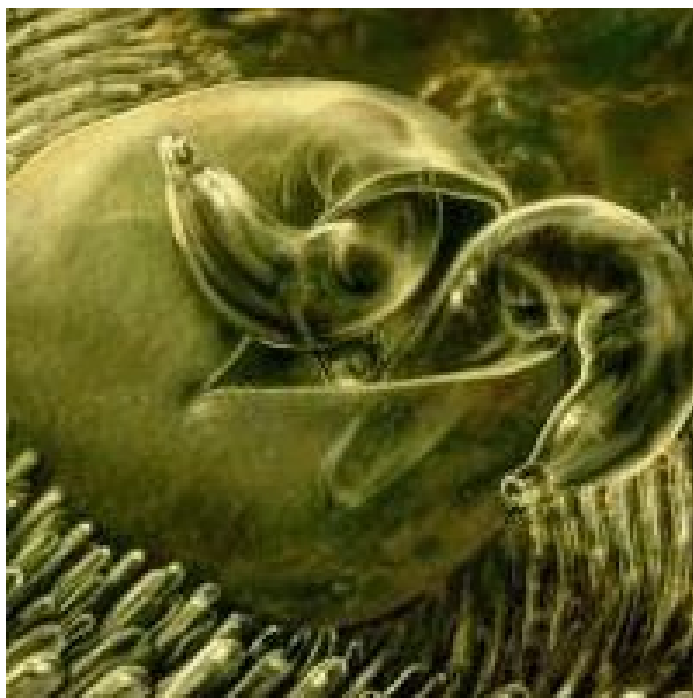
Rod *Cryptosporidium* působí patrně vážná onemocnění střevní i orgánová a zdá se, že mohou napadat relativně široké spektrum hostitelů. V posledních letech je intenzivně studován. Nejvíce popsán je druh *Cryptosporidium parvum* (Ryšavý, 1989).

#### *Cryptosporidium parvum*

Je intracelulární parazit přítomný ve střevech savců, plazů a ptáků. Jeho patogenita pro člověka byla zjištěna poměrně nedávno. Vyvolává mírné průjemové onemocnění především u dětí, které spontánně vymizí, ale může být chronické až smrtelné pro osoby se sníženou imunitou, zejména u nemocných AIDS. Patogenický mechanismus není znám (Schindler, 2010). Diagnosticky jsou nejdůležitější kulovité oocysty (2-5  $\mu\text{m}$ ) se čtyřmi sporozoity. Kokcidie se množí nejprve nepohlavně a potom pohlavně. Po splynutí samčích a samičích gamet vznikají dva druhy oocyst:

- silnostěnné, opouští hostitele a mohou nakazit nového
- tenkostěnné, které se podílejí na autoinfekci

Člověk se nakazí nejčastěji kontaminovanou vodou (Votava, 2003). V mnohem menší míře byly jako zdroje lidských infekcí zjištěny nepasterizované mléko, jogurty, tepelně neupravené masné výrobky, zelenina nebo mošty. Kontaminované potraviny a voda uchovávané v chladniče představují velké riziko infekce (Ditrich, Kváč a Květoňová, 2005).



Obrázek 20 *Cryptosporidium parvum* (<https://hoards.com>)

### Metody detekce *Cryptosporidium parvum*

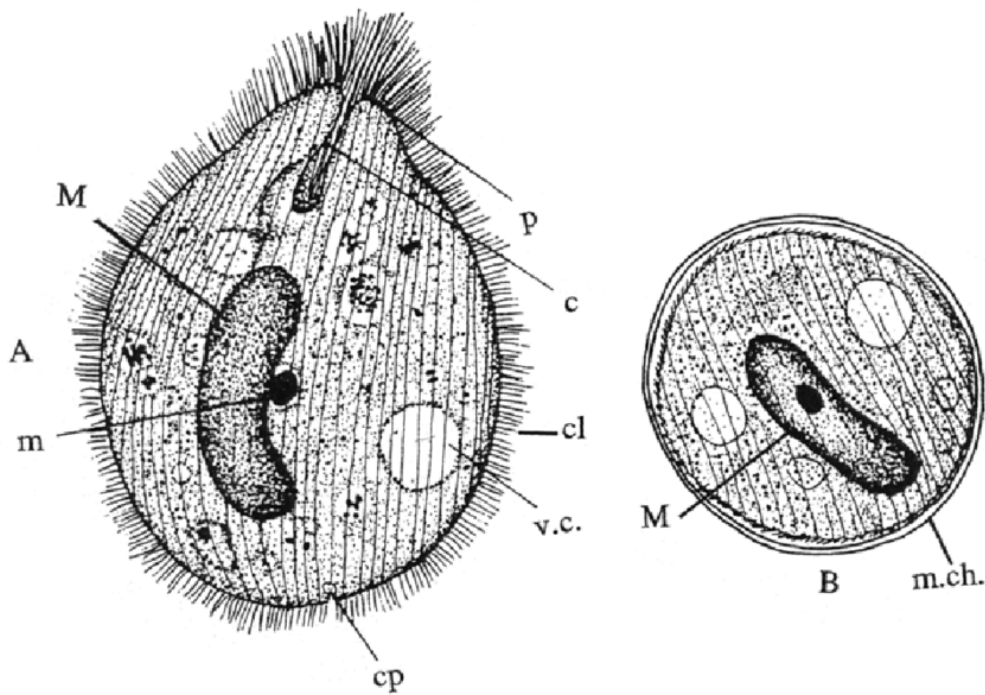
S výjimkou velmi zkušených odborníků diagnostikujících kryptosporidie často, není doporučováno vyšetření nativních preparátů (ani supernatantů z flotace, glycerinových preparátů apod.). To vedlo v minulosti k mnoha omylům a falešně pozitivním výsledkům. Doporučuje se buď jednoduché barvení nátěru stolice (podle Miláčka nebo modifikované Ziehl-Nielsonovo barvení) nebo použití komerčně dostupných imunodiagnostických testů (IFAT nebo ELISA). Existují i diagnostické molekulární testy, při kterých se rovnou determinuje původce, je však nutné je kombinovat, protože univerzální test rozlišující všechny druhy zatím neexistuje. Jako nevhodný indikátor pro stanovení výskytu kryptosporidií ve vodě se ukázal dříve doporučovaný výskyt *Clostridium perfringens*. Není vhodné, aby se na přítomnost kryptosporidií vyšetřovaly pouze vzorky vody pozitivní na *Clostridium*. Naopak velmi slibnou metodou usnadňující stanovení oocyst kryptosporidií na lokalitě je vyšetření výplachu žaber přítomných mlžů (Ditrich, Kváč a Květoňová, 2005).

### 2.5.1.6 Rod *Balantidium*

Jediný rod nálevníků, který je schopen parazitovat u člověka (Ryšavý, 1989).

#### *Balantidium coli*

*Balantidium coli* je vejčitá hustě obrvená buňka o velikosti až 300  $\mu\text{m}$  se dvěma jádry, tvoří cysty o velikosti asi 70  $\mu\text{m}$  s kosmopolitním rozšířením (Bednář, 1996). Jedná se o původně neškodného příživníka tlustého střeva prasat, u člověka může vyvolat onemocnění nazvané balantidióza. Člověk se nakazí cystami balantidií. Nákaza může být bezpříznaková, někdy však balantidia začnou pronikat do stěny tlustého střeva, rozrušují ji a způsobují vředy. Krevní nebo lymfatickou stěnou může *Balantidium coli* proniknout i mimo střevo do jater nebo do plic. Těžké nákazy končí i smrtelně (Ryšavý, 1989).



Obrázek 21 *Balantidium coli*: A- trofozoid, B- cysta (<https://www.google.com>)

#### Metody detekce *Balantidium coli*

Spočívá v mikroskopickém nálezu cyst nebo trofozoita ve stolici. Používá se nativní nebo barvený preparát (Votava, 2003).

### **3 RIZIKA VÝSKYTU NOVĚ SE OBJEVUJÍCÍCH PATOGENNÍCH MIKROORGANISMŮ V POTRAVINÁCH**

#### **3.1 Změna klimatu**

Existují důkazy, že prostředí a počasí hrají významnou roli při přenosu některých bakterií (např. salmonel nebo kampylobakterů). Globální oteplování může mít tedy vliv na zvýšený přenos také jiných patogenů nebo se může stát klíčovým faktorem pro vznik nových patogenů. Potraviny se také budou vyrábět za změněných klimatických podmínek v modifikovaných okolních ekosystémech a interakce mezi těmito změnami a systémy produkce potravin jsou složité a nepředvídatelné. Například zvýšený chov zvířat ve vnitřním prostředí zabrání sice tepelnému stresu, ale může zvýšit potenciál přenosu zootických patogenů na zvířata. Prodloužené vegetační období může vést k většímu využívání venkovních pastvin a zvýšit pravděpodobnost přenosu patogenů z prostředí. Zápaly nebo sucho mohou mít dopad na kvalitu vody a přenos patogenů. Důležitý aspekt se týká rostoucího nedostatku vody a celosvětové poptávce po sladké vodě. V důsledku toho lze očekávat nárůst používání odpadních vod pro zavlažování a využívání splaškových kalů doprovázené rostoucími riziky kontaminace zemědělské půdy a rostlin patogeny (Franz, Besten a Böhnlein, 2018).

#### **3.2 Hromadná výroba a globalizace potravin a přenos patogenů do nových oblastí**

Zpracovatelů potravin existuje v současné době méně, zato jsou to velké, často nadnárodní, společnosti. To vede ke zlevnění potravin a jejich celoroční dostupnosti. Pokud však dojde během zpracování k mikrobiálnímu problému, může se rozšířit do více států nebo dokonce celosvětově (Smith a Fratamico, 2018). K rozšíření zoonotických patogenů přispěla intenzifikovaná živočišná výroba, velkochovy a také změny životního prostředí (Motarjemi a Adams, 2006).

Centralizace hotových jídel ve velkokuchyních a jejich rozvoz do spotřebitelských center (velké studentské domovy, nemocnice aj.) má za následek, že alimentární nákaze nebo otravě může podlehnout naráz více lidí. Mimořádné riziko spočívá v potřebě udržovat hotová jídla delší čas v teplém stavu (doba výdeje), proto by jejich teplota neměla klesnout pod 70 °C (Görner a Valík, 2004).

### 3.3 Zvýšená migrace obyvatelstva a měnící se charakter populace

Poměrně novým faktorem majícím vliv na výskyt nálezů potravinami je zahraniční turistický ruch, především do rozvojových zemí (Görner a Valík, 2004). Dále je to pak časové zkrácení vzdáleností díky novým a rychlejším způsobům dopravy (letecká doprava) (Schindler, 2010).

V současné době přibývá podíl seniorů, v roce 2017 činil 25 % populace. V roce 2017 se počet seniorů odhadoval celosvětově na 962 milionů, pro rok 2030 už činí odhad 1,4 miliardy a v roce 2050 2,1 miliardy. Jejich oslabený imunitní systém zvyšuje jejich zranitelnost a riziko onemocnění. Přibývá také osob se špatnými stravovacími návyky, zdravotními problémy a osob drogově závislých. Pro tyto osoby jsou nebezpečné nejen primárně patogenní, ale především podmíněně patogenní mikroorganismy (Franz, Besten a Böhnlein, 2018).



## 4 MOŽNOSTI PREVENCE VÝSKYTU NOVÝCH PATOGENŮ V POTRAVINÁCH

### 4.1 Nové metody výroby potravin

Metody konzervace lze rozdělit na tepelné a netepelné postupy. Ve výzkumu a vývoji se zvláštní pozornost věnuje netepelným technologiím, a to hlavně z důvodu požadavků zákazníků na čerstvé a přírodní produkty.

- Ohmický ohřev – využívá se pro pasterizaci a sterilizaci zejména hotových jídel, ovoce, zeleniny, masa, drůbeže a ryb.
- Mikrovlny – výhodou využití mikrovln je úspora času.
- Přehřátá pára - získá se poklesem tlaku nasycené páry, neobsahuje vodu a je účinná při inaktivaci bakteriálních spor.
- Pulzní elektrické pole (PUF) – pracuje na aplikaci impulzů na potravinu mezi dvěma elektrodami.
- Oscilační magnetické pole – výhodou je minimální tepelná denaturace, snížené energetické nároky a možnost ošetření potravin v plastových obalech.
- Ultrafialové záření – poškozuje DNA mikroorganismů.
- Pulzní světlo - metoda rychlé, ale nákladné sterilizace.
- Ultrazvuk.
- Vysoký tlak.
- Ozařování potravin (Riemann a Cliver, 2006)

Způsob zpracování potravin má vliv na charakter a množství mikrobiální kontaminace. Procesy zpracování mohou mikroorganismy fyzicky odstranit, inaktivovat nebo poskytnout podmínky k omezení jejich růstu. Například ořezání, filtrace a čištění fyzicky odstraní některé mikroorganismy; pasterizace, komerční sterilizace a dezinfekce sníží jejich počet; sušení, chlazení, mrazení a moření vytvoří podmínky, které omezí růst významných frakcí mikrobiální populace potravin. Způsoby zpracování potravin zvyšují jejich stabilitu a zároveň snižují pravděpodobnost výskytu patogenních mikroorganismů a jejich toxinů, tak, aby jídlo mohlo být považováno za bezpečné pro lidskou spotřebu. Využívají se nové technologie jako např. mikrovlnný ohřev nebo vysokotlaká pasterizace a sterilizace společně se strategií HACCP, které pomáhají kontrolovat potenciální rizika spojená s potravinami (Rodriguez, 2013).

## 4.2 Aktivní a inteligentní systémy balení potravin

Jedná se o perspektivní část obalové techniky, jejímuž vývoji je v současné době věnována zvýšená pozornost. Předpokládá se, že bude docházet k významnému rozšiřování těchto obalů v potravinářské praxi (Dobiáš a Hanušová, 2010).

Jako aktivní obaly se označují takové, které jsou schopny samovolně reagovat na změny podmínek uvnitř nebo vně obalu úpravou svých vlastností a tím zmírnit nebo eliminovat nepříznivý dopad těchto změn na kvalitu baleného produktu (Dobiáš a Hanušová, 2010).

Pojmem inteligentní balení se označují systémy monitorující podmínky v okolí baleného výrobku, které pak poskytují informaci o historii produktu, tj. o podmínkách a dosavadní manipulaci s výrobkem, o stavu a kvalitě baleného výrobku během transportu a skladování (Dobiáš a Hanušová, 2010).

Mezi aktivní obaly se řadí např. absorbéry kyslíku, absorbéry oxidu uhličitého (balení pražené kávy), absorbéry etylénu (zpomalují dozrávání) apod. Významnou skupinou aktivních obalů jsou obaly inhibující růst mikroorganismů v baleném produktu. Patří mezi ně již zmíněné absorbéry kyslíku, které jsou velmi účinným prostředkem proti aerobním mikroorganismům. Pro prodloužení trvanlivosti baleného pečiva se využívají emitory etanolu. Rozšiřuje se také využití polymerních fólií nebo nátěrů s přísadami keramických materiálů obsahujících stříbro (Dobiáš a Hanušová, 2010)

Mezi inteligentní systémy balení patří především indikátory teploty, indikátory složení atmosféry uvnitř obalu nebo indikátory čerstvosti baleného výrobku. Indikátory teploty ukazují, zda byl výrobek během skladování nebo manipulace vystaven jiným než předepsaným hodnotám a mohlo v něm tak dojít ke kritickým změnám z hlediska bezpečnosti nebo kvality. Indikátory celkového tepelného účinku pak poskytují kontinuální odezvu v závislosti na teplotě. Indikátory kyslíku se označují také jako indikátory neporušenosti obalu. Je navržen tak, že při koncentraci kyslíku vyšší než je zvolená hodnota, nevratně změní barvu a varuje tak spotřebitele, že výrobek není v pořádku. Indikátory oxidu uhličitého pak odhalí mikrobiální nestabilitu výrobku (Dobiáš a Hanušová, 2010)

## 4.3 Nové metody detekce mikroorganismů

Trendem v detekci patogenů je pokračující posun směrem k rychlým metodám detekce a charakterizace patogenů za účelem zvýšení bezpečnosti potravin. Jedná se o imunologické

testy, testy v reálném čase, PCR, MLST (srovnání sekvencí vybraných konzervativních genů), MLVA. PCR a DNA testy se neustále vyvíjejí, což umožňuje velmi rychlé identifikace a diferenciací patogenů. Použití rychlých, spolehlivých a citlivých metod umožňuje rozvoj intervenčních strategií, které by mohly omezit šíření potravinových patogenů (Simjee, 2007).

S rozvojem výroby a distribuce potravin vzrostl požadavek na získání výsledků v krátkém časovém období. Toto vedlo k vývoji rychlých automatizovaných metod, které lze použít k testování surovin před použitím, sledování hygieny výrobní linky v reálném čase a také kontrole konečných produktů v krátkém časovém období. Ještě větší rychlost detekce lze získat propojením různých rychlých metod. Vývoj metod založených na detekci a identifikaci DNA dává významné možnosti k rychlé identifikaci patogenních mikroorganismů v potravinách (Blackburn a McClure, 2002).

#### **4.4 RASFF - Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva**

**RASFF** (Rapid Alert System for Food and Feed) slouží k oznamování přímého nebo nepřímého rizika pro lidské zdraví pocházejícího z potravin nebo krmiva. Umožňuje rychlé a účinné sdílení informací o nebezpečných potravinách nebo krmivech mezi členy systému: Evropskou komisí, členskými státy EU a EFTA (Island, Lichtenštejnsko a Norsko) a Evropským úřadem pro bezpečnost potravin (EFSA). Systém byl zřízen na základě článku 50 Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 178/2002, kterým se stanoví obecné zásady a požadavky potravinového práva, zřizuje se Evropský úřad pro bezpečnost potravin a stanoví postupy týkající se bezpečnosti potravin. Ve všech členských státech a v Evropské komisi byla vytvořena kontaktní místa, mezi nimiž probíhá výměna informací o nebezpečných potravinách nebo krmivech. Pokud má některý člen RASFF informace o závažném zdravotním riziku u potravin nebo krmiv, musí prostřednictvím systému okamžitě informovat Evropskou komisi. Komise vyhodnocuje všechna příchozí hlášení a předává je dále všem členům RASFF prostřednictvím jednoho ze čtyř typů oznámení:

**Varování** - jsou zasílána, pokud jsou potraviny či krmiva představující vážné rizika nabízeny spotřebitelům ke koupi a je tedy nutné rychle jednat.

**Informace** - používají se v případech, kdy rizikové potraviny či krmiva již nejsou na trhu nebo se riziko nepovažuje za závažné, tudíž není od ostatních členů rychlý postup vyžadován.

Odmítnutí na hranicích - týká se zásilek potravin a krmiv, které byly testovány a odmítnuty na vnějších hranicích EU (a EHP), bylo-li u nich zjištěno zdravotní riziko.

Novinky – veškeré informace týkající se bezpečnosti potravin a krmiv, které nejsou sdělovány prostřednictvím varování či informací, avšak jsou považovány za významné pro kontrolní orgány (RASFF, 2002).

## 4.5 Systém HACCP

Nový přístup ke kontrole hygieny potravin představuje systém HACCP. Je zkratkou anglického Hazard Analysis and Critical Control Points a do češtiny je překládán jako „Analýza nebezpečí a kritické kontrolní body“ (Hrabě, 2001). Předchází, identifikuje a vyhodnocuje nebezpečí ohrožení zdraví ještě před tím, než může vzniknout. Udává postupy a prostředky nutné k tomu, aby se nebezpečí předcházelo ještě před tím, než se může projevit. Zavádí způsoby sledování nebezpečí a nápravná opatření, která jsou zárukou toho, že je preventivní systém účinný. Na rozdíl od tradičních přístupů k zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a pokrmů založených na vyšetřování produktů, je vytvořen systém kontroly nad procesem výroby, surovinami, manipulací, prostředím a pracovníky tak, aby se předcházelo vzniku nebezpečí, které by mohlo ohrozit zdraví osob (Voldřich, Jechová a Kaudelová, 2004).

Systém HACCP vznikl na základě požadavků Amerického úřadu pro kosmonautiku NASA ve společnosti Pillsbury Co. na počátku roku 1959. Koncem 50. let vrcholil program letů člověka do vesmíru, bylo proto nezbytné zajistit potraviny pro kosmonauty (Voldřich, Jechová a Kaudelová, 2004).

Požadavky byly dva:

- Potraviny nesmí být drobné – při požívání ve stavu beztíže by docházelo ke znečištění prostoru kosmické lodi
- Potraviny nesmí obsahovat choroboplodné mikroorganismy a toxické látky.

První požadavek byl vyřešen použitím jedlých obalů a byly baleny po porcích konzumovatelných naráz. Řešením pro výrobu bezpečných potravin bylo místo posuzování nezávadnosti výrobku hledat zdroje nebezpečí na cestě od surovin po konzumenty. Byl formulován postup, který zahrnuje sedm základních principů:

- Analýza nebezpečí
- Stanovení kritických bodů

- Stanovení znaků a kritických mezí v kritických bodech
- Vymezení systému sledování v kritických bodech
- Určení nápravných opatření
- Zavedení ověřovacích postupů
- Vedení dokumentace (Voldřich, Jechová a Kaudelová, 2004).

Kritické body se stanoví na základě provedené analýzy nebezpečí v těch operacích a postupech, kde je možné nebezpečí předcházet a kde zároveň není možné jiné jednodušší řešení. Jsou to vlastně činnosti, ve kterých se provádí sledování určených znaků, na jejichž základě je možné poznat, zda příprava probíhá „bezpečným“ způsobem. Pro parametry jsou stanoveny kritické meze, které nesmí hodnota sledovaného parametru překročit. V případě, že dojde k překročení stanovených kritických mezí, musí být určeny přesné postupy, které se použijí pro nápravu nebezpečného stavu. Z toho je zřejmé, že požadavky jsou uvedeny poměrně volně a provozovatelé nemají nařízenou přísnou formu, kterou musí dodržovat. Dá se říci, že Nařízení (ES) č. 852/2004 o hygieně potravin a jeho přílohy definují soubor cílů v oblasti bezpečnosti potravin, které musí splňovat firmy působící v potravinářství a dává tak provozovatelům větší volnost při zajišťování hygienických zásad v provozovně a při vedení souvisejících dokumentů. Rozsah dokumentace není striktně definován, ale platí obecné principy nařízení a doporučení Codex Alimentarius. Z druhé strany je však na provozovatele kladena mnohem větší odpovědnost. Pro úplnost je třeba dodat, že v současné době je možné certifikovat systém HACCP v souladu s požadavky normy ISO 22 000, která zároveň obsahuje požadavky systému managementu kvality podle normy ČSN ISO 9001 (Valošek, 2012).

Systém HACCP se postupně rozšířil ve výrobě potravin v USA i Evropě. Od 1. 1. 2000 je tento systém povinný pro výrobce potravin, od 1. 5. 2005 pro distributory potravin. Od 1. 5. 2004 platí povinnost zavést systém HACCP také pro všechny provozovatele stravovacích služeb (Voldřich, Jechová a Kaudelová, 2004).

Zavedení postupů založených na principech stanovení kritických kontrolních bodů je tedy zákonem stanovená povinnost platná pro celý proces výroby potravin od prvovýroby až ke konečnému spotřebiteli. Jedná se o systém preventivních opatření, která slouží k zajištění zdravotní nezávadnosti potravin a pokrmů během všech činností souvisejících s výrobou, zpracováním, skladováním, manipulací, přepravou a prodejem konečnému spotřebiteli (Váchal a Vochozka, 2013).

## ZÁVĚR

Výčet patogenních mikroorganismů, které způsobují infekční onemocnění, není úplný a ani úplný být nemůže. Důvodem je neustálý vývoj nejen infekčních agens, ale i člověka jako jejich hostitele. To se projevuje frekvencí výskytu, závažností jednotlivých onemocnění a také výskytem nových, dříve neznámých onemocnění. Ze strany mikroorganismů je tento vývoj poměrně rychlý, díky jejich rychlému množení. Projevuje se například vznikem různě virulentních mutant, vznikem rezistentních kmenů, změnou zastoupení mikroorganismu v prostředí. Biologický vývoj člověka je v porovnání s mikroorganismy velmi pomalý a změny ve výskytu infekčních chorob jsou spíše důsledkem změn jeho chování. Výskyt infekčních onemocnění je tak nepříznivě ovlivňován technickým pokrokem a industrializací, změnami životního stylu a v neposlední řadě zrychlujícím a zvyšujícím se pohybem osob při migraci a cestování. Odvrácenou tvář objevu antibiotik pak bylo jejich zneužívání a důvěra v jejich schopnost vyřešit jednoduše problém infekčních nemocí. Také pokroky v mikrobiologii a diagnostických metodách umožnily objev dříve neznámých mikroorganismů. Některé nemoci byly naopak potlačeny, a to díky prevenci a očkování.

**SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY**

AMBROŽOVÁ, Helena a Jana SCHRAMLOVÁ, 2006. Virové gastroenteritidy. In: *ZAM-zdravotnictví a medicína* [online]. [cit. 2020-03-26]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/virove-gastroenteritidy-173276>

BEDNÁŘ, Marek, 1996. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil. ISBN 80-902-8967-3.

BHATT, Shantanu et al., 2019. The Evasive Enemy: Insights into the Virulence and Epidemiology of the Emerging Attaching and Effacing Pathogen *Escherichia albertii*. *Infection and Immunity* [online]. **87**(1), [cit. 2020-03-28]. DOI: 10.1128/IAI.00254-18. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <http://iai.asm.org/lookup/doi/10.1128/IAI.00254-18>

BLACKBURN, Clive de W. a Peter J. MCCLURE, 2002. *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis, and control*. Cambridge, England: Woodhead. ISBN 18-557-3454-0.

BLACKBURN, Clive de W. a Peter J. MCCLURE, 2009. *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis, and control*. 2ed. Cambridge, England: Woodhead. ISBN 978-1-84569-362-6.

BRADY ET AL., 2013. Taxonomic evaluation of the genus *Enterobacter* based on multilocus sequence analysis (MLSA). *Systematic and Applied Microbiology* [online]. Elsevier, **36**(5) [cit. 2020-05-18]. DOI: 10.1016/j.syapm.2013.03.005. ISSN 0723-2020. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2013.03.005>

BUCHTA, Vladimír, 1998. *Základy mikrobiologie a parazitologie pro farmaceuty*. Praha: Karolinum. ISBN 80-718-4565-5.

BURDYCHOVÁ, Radka a Pavla SLÁDKOVÁ, 2007. *Mikrobiologická analýza potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita.

CLARK, Marler, 2014. *Cronobacter sakazakii* in Infant Formula. *Foodborne illness* [online]. [cit. 2020-04-01]. Dostupné z: ([https://foodborneillness.com/enterobacter\\_sakazakii\\_food\\_poisoning](https://foodborneillness.com/enterobacter_sakazakii_food_poisoning)).

ČSN EN ISO 14189:2017. *Kvalita vod - Stanovení Clostridium perfringens - Metoda membránových filtrů*, Praha: Věstník ÚNMZ.

ČSN EN ISO 21567:2005. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu bakterií rodu Shigella*, Praha: věstník ÚNMZ.

ČSN EN ISO 6888:1999. *Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda stanovení počtu koagulázapozitivních stafylokoků (Staphylococcus aureus a další druhy)*, Praha: věstník ÚNMZ.

ČSN EN ISO 9001:2016. *Systémy managementu kvality - Požadavky*. Praha: ÚNMZ.

ČSN ISO 19250:2011, *Jakost vod – Průkaz přítomnosti bakterií rodu Salmonella*, Praha: Věstník ÚNMZ.

ČSN ISO 7937: 2006. *Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu Clostridium perfringens - Technika počítání kolonií.*, Věstník ÚNMZ. Praha.

DITRICH, Oleg, Martin KVÁČ a Dana KVĚTOŇOVÁ, 2005. *Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy: Kryptosporidíóza: rizika pro imunokompetentní a imunodeficitní jedince* [online]. Praha: Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP, sekce lékařské parazitologie ve spolupráci se Společností infekčního lékařství ČLS JEP a Českou parazitologickou společností [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <http://www.parazitologie.cz/protozoologie/SbornikLD05.pdf>

DOBIÁŠ, Jaroslav a Kristýna HANUŠOVÁ, 2010. *Svět potravin a kouzlo biotechnologií: Aktivní a inteligentní systémy balení masa.* KEY publishing. ISBN 978-80-7418-069-9.

DOHNAL, Vlastimil a Daniel JUN, 2012. *Metody detekce a identifikace plísní.* *Journal of Nursing and Social Sciences related to Health and Illness* [online]. 497-504 [cit. 2020-03-20]. ISSN 1804-7122. Dostupné z: <https://kont.zsf.jcu.cz/pdfs/knt/2012/04/10.pdf>

Doporučení Komise (ES) č. 576/2006 Sb., o přítomnosti deoxynivalenolu, zearalenonu, ochratoxinu A, T-2 a HT-2 a fumonisinů v produktech určených ke krmení zvířat. In: *Sbírka zákonů.* 2006. Ve znění pozdějších předpisů. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu>

DRÁBEK, Josef a Vladimír DUBANSKÝ, 2006. *Zoonózy: bakteriální zdroj infekce, příznaky, léčba a prevence závažných chorob z povolání.* Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-730-5572-4.

FRANZ, Charles, Heidy BESTEN a Christina BÖHNLEIN, 2018. *Microbial food safety in the 21st century: Emerging challenges and foodborne pathogenic bacteria.* *Trends in Food Science & Technology* 81. 155-158. ISSN 0924-2244.

GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho povodu, ktorých zárodoky sú prenášané požívatinami.* Bratislava: Malé centrum. ISBN 80-967-0649-7.

HAMPLOVÁ, Lidmila, 2015. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie, hygiena pro bakalářské studium a všechny typy zdravotnických škol.* V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7387-934-1.

HRABĚ, Jan, 2001. *Technologie, zbožiznalství a hygiena potravin: Potravinářská legislativa, systémy jakosti a certifikace.* Vyškov: VVŠ PV. ISBN 80-7231-069-0.

HRUBÝ, Stanislav a Bohumil TUREK, 1996. *Mikrobiologická problematika ve výživě.* Brno: Institut pro další vzdělávání pracovníků ve zdravotnictví. ISBN 80-7184-565-5.

IVERSEN, Carol, 2008. *Cronobacter gen. nov., a new genus to accommodate the biogroups of Enterobacter sakazakii, and proposal of Cronobacter sakazakii gen. nov., comb. nov., Cronobacter malonaticus sp. nov., Cronobacter turicensis sp. nov., Cronobacter muytjensii sp. nov., Cronobacter dublinensis sp. nov., Cronobacter genomospecies 1, and of three subspecies, Cronobacter dublinensis subsp. dublinensis subsp. nov., Cronobacter dublinensis*



subsp. lausannensis subsp. nov. and Cronobacter dublinensis subsp. lactaridi subsp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 58(6) [cit. 2020-03-09]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65577-0>

JAY, James M., Martin J. LOESSNER a David Allen GOLDEN, c2005. *Modern food microbiology*. 7th ed. New York: Springer. ISBN 03-872-3180-3.

JIČÍNSKÁ, Eva a Jana HAVLOVÁ, 1996. *Metody detekce patogenních mikroorganismů v potravinách*. Praha: Ústav zemědělských a potravinářských informací. ISBN 80-851-2049-6.

JULÁK, Jaroslav, 2006. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-1270-4.

JURAJDA, Vladimír, 2003. *Nemoci drůbeže a ptactva: bakteriální a mykotické infekce*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita. ISBN 80-730-5464-7.

KLABAN, Vladimír, 2005. *Ilustrovaný mikrobiologický slovník*. Praha: Galén. ISBN 80-726-2341-9.

KOMPRDA, Tomáš, 2004. *Obecná hygiena potravin*. V Brně: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita. ISBN 80-715-7757-X.

MALÍŘ, František a Vladimír OSTRÝ, 2003. *Vláknité mikromycety (plísně), mykotoxiny a zdraví člověka*. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů. ISBN 80-701-3395-3.

MARTH, Elmer H. a James L. STEELE, c2001. *Applied dairy microbiology*. 2nd ed., rev. and expanded. New York: M. Dekker. Food science and technology (Marcel Dekker, Inc.), 110. ISBN 08-247-0536-X.

MEINEN, Anika, et al., 2019. Salmonellosis outbreak with novel *Salmonella enterica* subspecies enterica serotype (11: z41: e, n, z15) attributable to sesame products in five European countries, 2016 to 2017 [online]. *Eurosurveillance* 24.36 (2019). [cit. 2020-01-21]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/kratka-zprava-o-vyskytu-zcela-noveho-serotypu-salmonella>

MIŠURCOVÁ, Ladislava, 2012. *Základy biologie*. Vyd. 2., rozš. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 978-80-7454-156-8.

MONTVILLE, Thomas J., Karl R. MATTHEWS a Kalmia E. KNIEL, 2012. *Food Microbiology an introduction*. 3. Washington, USA: ASM Press. ISBN 978-1-55581-720-6.

MOTARJEMI, Yasmine a Martin ADAMS, 2006. *Emerging foodborne pathogens*. Cambridge, Anglie: Woodhead Publishing. ISBN 978-1-85573-963-5.

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 852/2004 ze dne 29. dubna 2004 o hygieně potravin (Úř. věst. L 139, 30.4.2004, s. 1–54). Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu>

Nariadení Komise (ES) č. 1881/2006 Sb., kterým se stanoví maximální limity některých kontaminujících látek v potravinách. In: *Sbírka zákonů*. 2006. Ve znění pozdějších předpisů. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu>

Nariadení Komise (EU) č. 2073/2005 ze dne 15. listopadu 2005 o mikrobiologických kritériích pro potraviny (Úř. věst. L 338 ze dne 22.12.2005, s. 1–26). Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu>

NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ, 2015. *Základy obecné mikrobiologie*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 978-80-210-7923-6.

OOKA, Tadasuke, et al., 2012. Clinical Significance of *Escherichia albertii*. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **18**(3) [cit. 2020-03-28]. ISSN 1080-6059. Dostupné z: <https://dx.doi.org/10.3201/eid1803.111401>

OTTOVÁ, Vlasta, Jiří HÄUSLER a František KUNC, 1991. *Mikrobiologie pro posluchače studijního oboru technologie vody*. 2., přeprac. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická. ISBN 80-7080-136-0.

PANTŮČEK, 2007. Bakterie staphylococcus jako častý zdroj nebezpečí pro člověka. *Universitas*. Masarykova univerzita, 2007(2). ISSN 1212-8139.

PODSTATOVÁ, Hana, 2001. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena*. Olomouc: EPAVA. ISBN 80-862-9707-1.

RIEMANN, Hans P. a Dean O. CLIVER, 2006. *Foodborne Infections and Intoxications*. 3. University of California, Davis. ISBN 978-0-12-588365-8.

RODRIGUEZ, Alfredo C., 2013. *Foodborne Infections and Intoxications (Fourth Edition): Effects of Food Processing on Disease Agents*. Spojené státy americké: Academic Press. Agricultural, Biological, and Food Sciences 2013. ISBN 978-0-12-416041-5.

RASFF, 2002. *Informační centrum bezpečnosti potravin* [online]. Odbor bezpečnosti potravin Ministerstva zemědělství [cit. 2020-04-01]. Dostupné z: [https://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potravinu-a-krmiva-\(rasff\).aspx](https://www.bezpecnostpotravin.cz/stranka/system-rychleho-varovani-pro-potravinu-a-krmiva-(rasff).aspx)

RYŠAVÝ, Bohumil, 1989. *Základy parazitologie: vysokoškolská učebnice pro studenty přírodovědecké fakulty*. Praha: Státní pedagogické nakladatelství. ISBN 80-042-0864-9.

SEDLÁČEK, Ivo, 2007. *Taxonomie prokaryot*. Brno: Masarykova univerzita. ISBN 80-210-4207-9.

SCHINDLER, Jiří, 2010. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. Sestra (Grada). ISBN 978-80247-3170-4.

SIMJEE, Shabbir, 2007. *Foodborne Diseases*. Totowa, New Jersey: Humana Press. ISBN 978-1-59745-501-5.

SMITH, James L. a Pina M. FRATAMICO, 2018. Emerging and Re-Emerging Foodborne Pathogens. *Foodborne Pathogens and Disease*. **15**(12), 737-757. DOI:

10.1089/fpd.2018.2493. ISSN 1535-3141. Dostupné také z: <https://www.liebert-pub.com/doi/10.1089/fpd.2018.2493>

ŠILHA, David, 2016. *Arcobacter spp. – patogen, který uniká naší pozornosti* [online]. In: . 27. Kongres Československé společnosti mikrobiologické [cit. 2020-03-23]. ISBN 978-80-270-0136-1. Dostupné z: <http://hdl.handle.net/10195/67433>

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 1987. *Mikrobiologické zkoumání potravin*. Praha: Vydala VŠCHT v Čs. redakci VN MON.

ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila, 2008. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3. [i.e. 4.], opr. a dopl., v nakl. Academia 1. vyd. [i.e. 2. vyd.]. Praha: Academia. ISBN 978-80-200-1703-1.

ŠIMŮNEK, Jan a Pavel BŘEZINA, 1996. *Mykotoxiny*. Vyškov: Vysoká vojenská škola pozemního vojska.

ŠULCOVÁ, Margaréta, 2018. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učební texty pro zdravotnické obory*. Vydání třetí přepracované. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta zdravotnických studií. ISBN 978-80-7561-116-1.

TOLAROVÁ, Věra, 2005. *Oportunní a opomíjené protozoární střevní nákazy: Co víme o cyklosporóze* [online]. Praha: Společnost pro epidemiologii a mikrobiologii ČLS JEP, sekce lékařské parazitologie ve spolupráci se Společností infekčního lékařství ČLS JEP a Českou parazitologickou společností [cit. 2020-03-02]. Dostupné z: <http://www.parazitologie.cz/protozoologie/SbornikLD05.pdf>

UNE-EN ISO 22000:2018, 2018. *Food safety management systems — Requirements for any organization in the food chain*. Technical Committee : ISO/TC 34/SC 17 Management systems for food safety.

VÁCHAL, Jan a Marek VOCHOZKA, 2013. *Podnikové řízení*. Praha: Grada. Finanční řízení. ISBN ISBN978-80-247-4642-5.

VALOŠEK, Petr, 2012. HACCP: Systém kritických bodů. *Potraviny info* [online]. [cit. 2020-04-18]. Dostupné z: [https://www.potravinyinfo.cz/33/haccp-system-kriticky-ch-bodu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLi3LvUI\\_aLdi4S-ECD-vMUnwPlw/](https://www.potravinyinfo.cz/33/haccp-system-kriticky-ch-bodu-uniqueidmRRWSbk196FNf8-jVUh4EtI668NLi3LvUI_aLdi4S-ECD-vMUnwPlw/)

VAŘEJKA, František, Oldřich MRÁZ a Jirí SMOLA, 1989. *Speciální veterinární mikrobiologie: celostátní vysokoškolská učebnice pro vysoké školy veterinární*. Praha: Státní zemědělské nakladatelství. ISBN 80-209-0042-X.

VÍTOVÁ, Eva, 2004. *Hygiena potravin*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. ISBN 80-214-2680-2.

VOLDŘICH, Michal, Marie JECHOVÁ a Marcela KAUDELOVÁ, 2004. *Systém kritických bodů (HACCP) v obchodě: příručka pro pracovníky potravinářských prodejen*. Praha: České a slovenské odborné nakladatelství. Moderní obchod. ISBN 80-903-4012-1.

VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5.

VOTÝPKA, Jan, Iva KOLÁŘOVÁ a Petr HORÁK, 2018. *O parazitech a lidech*. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553-350-0.

WASHINGTON, Harriet A., 2017. *Doba jedová*. V Praze: Stanislav Juhaňák - Triton. ISBN 978-80-7553343-2.

ŽEMLA, Jaroslav, Fedor ČIAMPOR a Milan LABUDA, 1998. *Špeciálna virológia*. Bratislava: Slovak academic press. ISBN 80-88908-04-3.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

AEEC	Enteroadherentní <i>Escherichia coli</i>
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome (syndrom získaného selhání imunity)
BSE	Bovinní spongiformní encefalopatie
CIN	Agar s cefsulodinem, irgasanem a novobiocinem
CNC	Centrální nervová soustava
ČR	Česká republika
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DON	Deoxinivalenol
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin (European Food Safety Authority)
EFTA	Evropské sdružení volného obchodu (European Free Trade Association)
EHEC	Enterohemoragická <i>Escherichia coli</i>
EHP	Evropský hospodářský prostor
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i>
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzymová imunoanalýza)
EM	Elektronová mikroskopie
EPEC	Enteropatogenní <i>Escherichia coli</i>
ETEC	Enterotoxigenní <i>Escherichia coli</i>
EU	Evropská unie
G <sup>+</sup>	Gram-pozitivní bakterie
G <sup>-</sup>	Gram-negativní bakterie
HIV	Human Immunodeficiency Virus (virus lidské imunitní nedostatečnosti)
IEM	Imunoelektronová mikroskopie
IFAT	Indirect Immunofluorescence Antibody Test
ITC	irgasan-ticarcillinchlorátový bujón

kDa	Kilodakton
mDRCM	Diferential Reinforced Clostridial Medium modified
MID	Minimální infekční dávka
MLST	Multi-Locus Sequence Typing – srovnání sekvencí vybraných genů
MLVA	Multiple-Locus Variable number tandem repeat Analysis
MPN	Nejvíce pravděpodobný počet
MRSA	Methicilin-Rezistentní <i>Staphylococcus Aureus</i>
NASA	Národní úřad pro letectví a kosmonautiku (National Aeronautics and Space Administration)
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PSB	Pomnožovací bujón se sorbitolem a žlučovými solemi
PUF	Pulzní elektrické pole (pulsed electric field)
RNA	Ribonukleová kyselina
SE	Stafylokokový enterotoxin
SSDS	<i>Salmonella – shigella</i> agar s desoxycholátem a vápníkem
TCBS	Thiosulfate citrate bile sucrose agar
TSI	Triple Sugar Iron Agar (trojitý cukrový železný agar)
TSYA	Neselektivní agar s tryptonem, sójovým peptonem a kvasničním extraktem
TSYB	Trypton-sójový bujón s kvasničním extraktem
ÚNMZ	Úřad pro technickou normalizaci, metrologii a státní zkušebnictví
VRSA	Vankomycin-Rezistentní <i>Staphylococcus Aureus</i>
XLD	Agar s xylózou, lyzinem a deoxycholanem

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Základní dělení mikroorganismů (Němec a Matoulková, 2015) .....	10
Obrázek 2 <i>Staphylococcus aureus</i> ( <a href="https://biologywise.com/anaerobic-bacteria">https://biologywise.com/anaerobic-bacteria</a> ) .....	17
Obrázek 3 <i>Clostridium botulinum</i> ( <a href="https://cs.medixa.org">https://cs.medixa.org</a> ) .....	21
Obrázek 4 <i>Bacillus cereus</i> ( <a href="https://obrazky.seznam.cz">https://obrazky.seznam.cz</a> ) .....	24
Obrázek 5 <i>Listeria monocytogenes</i> ( <a href="https://cs.medixa.org">https://cs.medixa.org</a> ).....	25
Obrázek 6 <i>Salmonella enterica</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ).....	28
Obrázek 7 <i>Shigella sonnei</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	30
Obrázek 8 <i>Escherichia coli</i> ( <a href="https://zoommagazin.iprima.cz">https://zoommagazin.iprima.cz</a> ).....	32
Obrázek 9 <i>Yersinia enterocolitica</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	34
Obrázek 10 <i>Cronobacter sakazakii</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	35
Obrázek 11 <i>Campylobacter jejuni</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ).....	37
Obrázek 12 <i>Vibrio cholerae</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	39
Obrázek 13 <i>Francisella tularensis</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	41
Obrázek 14 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	42
Obrázek 15 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ) .....	44
Obrázek 17 <i>Giardia intestinalis</i> ( <a href="https://www.123rf.com">https://www.123rf.com</a> ).....	61
Obrázek 18 <i>Entamoeba histolytica</i> ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ).....	62
Obrázek 19 <i>Toxoplasma gondii</i> ( <a href="https://www.istockphoto.com">https://www.istockphoto.com</a> ) .....	64
Obrázek 20 <i>Cyclospora cayentanensis</i> ( <a href="http://www.google.com">www.google.com</a> ).....	66
Obrázek 21 <i>Cryptosporidium parvum</i> ( <a href="https://hoards.com">https://hoards.com</a> ).....	68
Obrázek 22 <i>Balantidium coli</i> : A- trofozoid, B- cysta ( <a href="https://www.google.com">https://www.google.com</a> ).....	69

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Přehled potravin a patogenních mikroorganismů, které se v nich nejčastěji vyskytují (Matyáš 1993).....	13
Tabulka 2 Nejvýznamnější patogenní mikroorganismy na jejichž přenosu se voda významně podílí (Ottová 1991):.....	14