



**Agronomická
fakulta**

**Mendelova
univerzita
v Brně**



Stanovení termotolerantních druhů
***Campylobacter* spp. v potravinách**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
MVDr. Olga Cwиковá, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Jana Zsoldosová

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Stanovení termotolerantních druhů *Campylobacter* spp. v potravinách vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

Jsem si vědoma, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne: 27. 4. 2017

.....

podpis

Poděkování

Děkuji všem, kteří mi při tvorbě a zpracování této diplomové práce byli nápomocni, zejména paní MVDr. Olze Cwиковé, Ph.D. za odborné rady, užitečné připomínky, trpělivost a ochotu.

Dále patří mé díky nejbližší rodině a mému příteli, kteří mě při celém studiu pomáhali a podporovali mě.

ABSTRAKT

Kampylobakteri3za je podle Evropského úřadu pro bezpe4nost potravin jedním z nej4ast4jších celosv4etov4e rozšířených alimentárních onemocnění způsobující gastroenteritidy. 4eská republika patří na první pří4ky s nejvyšším výskytem kampylobakteri3zy. Tato práce se zabývá stanovením termotolerantních druhů *Campylobacter* spp. ve vzorcích drůbežíř a vepřových jater, drůbežíř 4tvrtek a syrového ml4eka. Z celkového po4tu 50 vzorků, bylo 31 vzorků pozitivních na přítomnost *Campylobacter* spp. U drůbežíř jater i u drůbežíř zadních 4tvrtek bylo 92 % pozitivních vzorků. U vepřových jater byl výskyt nižší, pouze 46 %. U 4erstvého syrového ml4eka byl výskyt nejnižší, pouhých 17 %. Vyšší výskyt v 4eské republice sv4edčí o dobrém způsobu vyhledávání infekcí a jejich následného hlášení.

Klí4ová slova: *Campylobacter*, gastroenteritida, mikroaerofilní atmosféra, drůbež, játra, ml4eko

ABSTRACT

Campylobacteriosis is according to European Food Safety Authority one of the most advanced worldwide foodborne disease causing gastroenteritis. The Czech republic ranks at number one in the highest incidence of campylobacteriosis. This thesis deals with the determination of thermotolerant *Campylobacter* spp. in samples of poultry and pork liver, in chicken and raw milk. From total number of 50 samples were 31 samples positive for *Campylobacter* spp. For poultry liver and chicken at the back of thighs were 92 % of positive samples. For pig liver was lower incidence, only 46 %. For fresh raw milk was the lowest incidence of just 17 %. Higher incidence in the Czech republic reflects good way of searching their subsequent reporting infections.

Keywords: *Campylobacter*, gastroenteritis, microaerophilic atmosphere, poultry, liver, milk

OBSAH

1	Úvod	10
2	Cíl práce.....	11
3	Literární přehled	12
3.1	Rod <i>Campylobacter</i>	12
3.1.1	Historie.....	12
3.1.2	Morfologie	13
3.1.3	Faktory ovlivňující růst a přežívání	13
3.1.4	Výskyt a patogenita.....	14
3.1.5	Kampylobakterióza	16
3.1.6	Epidemiologie	18
3.1.7	Diagnostika	19
3.1.8	Druhová identifikace.....	20
3.1.9	Subtypizace	20
3.1.10	Rizikové potraviny.....	21
3.2	<i>Campylobacter jejuni</i>	23
3.2.1	Biochemie	24
3.2.2	Prostředí	24
3.2.3	Terapie	24
3.2.4	Epidemiologie	25
3.2.5	Prevence	25
3.2.6	Diagnostika	25
3.2.7	Genetika	26
3.3	<i>Campylobacter coli</i>	26
3.3.1	Biochemie	26
3.3.2	Rizikové faktory.....	26

3.3.3	Genetika	27
3.3.4	Epidemiologie	27
3.3.5	Terapie	28
3.3.6	Diagnostika	28
3.4	Ostatní kampylobaktery	28
3.4.1	<i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	28
3.4.2	<i>Campylobacter upsaliensis</i>	29
3.4.3	<i>Campylobacter lari</i>	30
3.5	Metody detekce bakterií rodu <i>Campylobacter spp.</i>	30
3.5.1	Postup metody dle ČSN EN ISO 10 272 (2006).....	30
3.5.2	Nové způsoby stanovení	32
3.5.3	Molekulárně biologické metody	32
3.5.4	Fenotypové testy	32
3.5.5	Průkaz oxidázy.....	33
3.5.6	Mikroskopie a barvení dle Grama.....	33
4	Materiál a metodika	35
4.1	Seznam použitých přístrojů a pomůcek.....	35
4.2	Vyšetřovaný materiál	35
4.3	Metodika.....	36
4.3.1	Předmnožení.....	36
4.3.2	Pomnožení.....	36
4.4	Kultivační média a selektivní suplementy.....	36
4.4.1	<i>Campylobacter</i> pomnožovací bujón	36
4.4.2	Suplement X132.....	37
4.4.3	<i>Campylobacter</i> selektivní agar.....	39
4.4.4	Suplement X112.....	39
4.5	Konfirmace bakterií rodu <i>Campylobacter spp.</i>	41

4.5.1	Průkaz oxidázy	41
4.5.2	Průkaz katalázy	41
4.5.3	Barvení dle Grama	42
4.6	Statistické vyhodnocení.....	42
5	Výsledky	43
5.1	Konfirmace	47
6	Diskuze	49
7	Závěr	51
8	Literatura.....	53
9	Seznam obrázků.....	64
10	Seznam tabulek	65
11	Seznam zkratk	66

1 ÚVOD

Kampylobakteriíza je jedním z nejčastějších celosvětově rozšířených alimentárních onemocnění způsobující gastroenteritidy. K infikování člověka dochází především po požití kontaminované potravy. V prostředí dokážou kampylobaktery přežít několik týdnů při teplotě kolem 4 °C. Schopnost přežít při nepříznivých podmínkách bývá ovlivněna i přítomností jiných mikroorganismů a schopností tvořit biofilmy.

Nejvíce rizikovými potravinami jsou drůbeží maso, voda, syrové mléko, ryby či produkty rybolovu a mušle. Častým zdrojem infekce, hlavně pro děti, mohou být i domácí mazlíčci – psi a kočky. V brojlerových chovech v Evropě se výskyt kampylobakterů pohybuje mezi 1,8 – 88 %. Česká republika spolu se Slovinskem a Španělskem patří mezi země s nejvyšším výskytem kampylobaktrů. Naše prvenství je zásluhou spíše dobrého způsobu vyhledávání a hlášení infekcí. Vyšší nárůst onemocnění je především v letních měsících.

Výskyt kampylobakterií u nás se pohybuje okolo 20 629 případů ročně, což je asi 210 onemocnění na 100 000 obyvatel. V Evropské unii je nejčastější hlášenou zoonózou od roku 2005.

2 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo zhodnotit výskyt termotolerantních kampylobakterů v potravinách, stanovení termotolerantních druhů *Campylobacter* spp. v potravinách a porovnání výsledků s publikovanou vědeckou literaturou.

Dalším cílem bylo zhodnocení rizika pro zdraví konzumenta a vyjádření možných preventivních opatření.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rod *Campylobacter*

Bakterie patřící do rodu *Campylobacter* řadíme mezi ϵ -*Proteobacteria* a do čeledi *Campylobacteriaceae*. Společně s čeledí *Helicobacteraceae* patří čeleď *Campylobacteraceae* do společného řádu *Campylobacterales*. Rod *Helicobacter* obsahuje 23 druhů a rod *Campylobacter* 25 druhů (Demnerová, 2016; Julák, 2015).

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení (Kameník, 2014)

kmen	<i>Proteobacteria</i>
třída	<i>Epsilonproteobacteria</i>
řád	<i>Campylobacterales</i>
čeleď	<i>Campylobacteraceae</i>
rod	<i>Campylobacter</i>

Rod *Campylobacter* obsahuje 18 druhů, dále 6 poddruhů a 2 biovary (Humphrey et al., 2007). Do rodu *Campylobacter* v dnešní době zahrnujeme tyto druhy: *Campylobacter canadensis*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter consicus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter hyointestinalis*, *Campylobacter insulaenigrae*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter mucosalis*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter sputorum* a *Campylobacter upsaliensis* (Kameník, 2014).

3.1.1 Historie

V roce 1913 byl identifikován patogen označovaný jako *Vibrio fetusoid* (později přejmenován na *Vibrio fetus*), který způsoboval potraty u ovcí a skotu. O pár let později se začala dávat do souvislosti průjemová onemocnění a tento patogen. Patogen *Vibrio jejuni* byl popsán jako původce zánětů střev a dysenterie u skotu a u telat (Ngulukun, 2016). Až v roce 1946 byla publikována spojitost mezi patogenním mikroaerofilním vibriem a člověkem, kde se izoloval mikroorganismus podobný *V. jejuni* u pacienta

trpícího akutním průjmovým onemocněním. Zdrojem infekce byla konzumace kontaminovaného kravského mléka v USA. V roce 1963 se podle nefermentativního metabolismu, striktně mikroaerofilní kultivace a profilem DNA ustanovil rod *Campylobacter*. Slovo *Campylobacter* je řeckého původu („kampulos“) a znamená zkroucený, zahnutý. Část slova „baktron“ znamená zase tyč či prut (Blaser, 2015).

3.1.2 Morfologie

Jedná se o komenzální bakterie ve tvaru tyčinek o velikosti obvykle v délce 0,5 – 0,8 μm a v šířce 0,2 – 0,5 μm . V tomto rodě jsou zástupci patřící do skupiny gramnegativních bakterií. Tito zástupci jsou mikroaerofilní. Mají polárně umístěné bičíky a jejich tvar bývá proměnlivý. Pohyb je charakteristický (vývrtkový). Z klinického materiálu se izolují tyčinky zahnuté ve tvaru písmene S. U starších kultur, hlavně po vystavení kyslíku nebo nízké teplotě, přecházejí do podoby koků. Nacházejí se samostatně nebo jako dlouhé spirálovité formy. *Campylobacter showae* nese více bičíků, naopak tomu je u *Campylobacter gracilis*, který je nepohyblivý (Votava, 2010; Goering et al., 2016; Demnerová, 2016; Julák, 2015; Keener et al., 2004; Allos, 2009; Bolton, 2015).

Kolonie dělíme podle morfologie do 2 typů. Prvním typem jsou kolonie rovné, ploché, mukoidní s mokřým vzhledem. Obvykle vytváří shluky nebo jsou ostře ohraničené a vypouklé. Po 18 – 24 hodinové inkubaci jsou kolonie spíše naředěné až průsvitné. Při prodloužení inkubace na 24 – 48 hodin jsou kolonie typicky šedé nebo mohou mít až nažloutlou barvu nebo kovovou opalescenci (Moore et al., 2005; Snelling et al., 2005).

3.1.3 Faktory ovlivňující růst a přežívání

Rod *Campylobacter* spp. je citlivým patogenem, který má velmi specifické růstové nároky. Tyto druhy jsou mikroaerofilní a kapnofilní, tudíž vyžadují atmosféru s 3 – 15% kyslíku a 2 – 10 % CO_2 . Teplotním optimem je 42 °C, neroste při teplotách pod 30 °C a nad 45 °C. V potravinách mohou přežít, ale nejsou schopny se pomnožovat. Jsou velmi citlivé k nízkému pH. Limitní hodnotou pH je 4,7. Optimální hodnoty pro růst je pH mezi 6,5 – 7,5, tudíž jsou v trávicí soustavě zničeny žaludečními šťávami, pokud nejsou zkonsumovány společně s potravinami, které

je chrání. Hynou v suchém prostředí s aktivitou vody pod hodnotu 0,97. Jejich schopnost růstu je limitována koncentrací 2% roztoku chloridu sodného (Kameník, 2014; Fernandez, 2009b; Görner a Valík, 2004; Forsythe a Hayes, 1998).

Kampylobaktery dokážou přežít při teplotách okolo 4 °C i několik týdnů. Přežívají především ve vodě nebo ve vhodné potravinové matrici. Jejich schopnost přežít při takových podmínkách bývá ovlivněna zejména přítomností jiných mikroorganismů a tvorbou biofilmu. Teploty používané v chladírenském či mrazírenském zařízení jejich počty značně redukuje, ale neeliminují. Mohou přežít i účinky dezinfekce, pokud jsou přítomni v biofilmech nebo v tukové či proteinové matrici. Pro efektivní zničení kampylobakterů se využívají chlorové přípravky (chlornan), které je zničí i ve vodě nebo v biofilmech. Inhibici růstu způsobuje i kyselina mléčná, a to dokonce více než kyselina chlorovodíková. V některých státech (mimo EU) se organické kyseliny používají na těla ječně opracované drůbeže před chlazením právě k eliminaci *Campylobacter* spp. (Blackburn a McClure, 2002; Humphrey et al., 2007; Fernandez, 2009b).

Kampylobaktery nepřežívají teploty pastérace, sušení, ani tepelné opracování potravin (Blackburn a McClure, 2002; Humphrey et al., 2007).

Efektivními způsoby zničení *Campylobacter* spp. je ozáření u vakuově baleného vepřového masa (Blackburn a McClure, 2002). Nabízí se další možnosti využití ošetření vysokým tlakem, kde došlo ke snížení počtu o dva až tři logaritmické řády při použití 325 MPa. K úplné eliminaci došlo při použití 400 MPa (Solomon a Hoover, 2004).

3.1.4 Výskyt a patogenita

Kampylobaktery se vyskytují především v trávicím traktu zvířat a ptáků. U lidí vyvolávají střevní obtíže, u domácích zvířat mohou vyvolat potraty a u osob se sníženou imunitou mohou vyvolat i systémové infekce. Nejvýznamnějším druhem tohoto rodu je *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*. Ze vzorků však bývají izolovány i další termotolerantní druhy (*Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* a *Campylobacter upsaliensis*). Dalšími patogenními druhy pro člověka jsou *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. hyointestinalis*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae* a *C. sputorum*. Kampylobaktery nejsou bakterie fermentující ani oxidující cukry (Votava, 2010; Goering et al., 2016; Demnerová, 2016; Julák, 2015; Kameník, 2014).

Patogenní druhy (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari* a další) produkují enterotoxin, některé kmeny i cytotoxiny. Bakteriální toxiny jsou zodpovědné za klinické projevy. Ve své lipidové membráně tyto bakterie mají lipopolysacharid, antigenní protein a bičíkový protein. Podle somatických (tělních) antigenů rozlišujeme více než 60 sérovarů. Podle flagelárních (bičíkových) antigenů rozlišujeme následně více než 100 sérovarů. Proteinové antigeny se nejspíš podílejí na adhezivních vlastnostech bakterií (Julák, 2015).

Tyto mikroorganismy produkují nejméně 3 toxiny. Jsou jimi tepelně labilní enterotoxin, který zvyšuje hladinu cyklinického adenosinmonofosfátu (cAMP) ve střevních buňkách (vznik průjmu), anebo může dojít k reakci s protilátkami anticholerového toxinu. Dalším je cytoskelet měnící toxin (může způsobit průjem jako předchozí toxin) a termolabilní proteinový cytotoxin, který není neutralizován anticholerovým toxinem (Forsythe a Hayes, 1998).

Kampylobaktery disponují virulenčními faktory. Jsou jimi chemotaxe, motilita, schopnost adheze na stěnu střeva, vnikání až do lamina propria, schopnost vázat železo, syntetizovat ferritin jako ochranu před oxidativním stresem, produkce toxinů, schopnost tvořit biofilm, schopnost signalizace mezi buňkami na základě koncentrace, rezistence k antibiotickým látkám a schopnost tvořit životaschopné buňky, ale neschopné vytvořit kulturu (tzv. viable but non-culturable; VNBC) (Kameník, 2014).

Campylobacter jejuni a *Campylobacter coli* způsobují zánětlivé onemocnění střev se symptomy, jako jsou bolesti břicha, průjem, krev ve stolici nebo horečka. Symptomy spojené s kampylobakteriózou jsou částečně způsobeny sekrecí tzv. cytholethal distending toxinů (CDTs), které vykazují DNázovou aktivitu (Vondráková et al., 2014).

V Evropě se pohybuje výskyt bakterií rodu *Campylobacter* od 1,8 – 88 % v brojlerových chovech. Česká republika patří, společně se Slovinskem a Španělskem, k zemím s nejvyšším výskytem. Naopak severské země (Finsko, Dánsko, Švédsko) patří dlouhodobě k zemím s nejnižším výskytem (European Food Safety Authority a European Centre for Disease Prevention and Control, 2012). Naše první místo svědčí spíše o dobrém způsobu vyhledávání a hlášení infekcí, kde se podchytí mnohem vyšší procento skutečných onemocnění (Bardoň, 2016; Engberg, 2006).

3.1.5 Kampylobakteri3za

Kampylobakteri3za je jedn3m z nej3ast3jších celosv3tov3 rozšířených alimentárních onemocnění, které způsobuje gastroenteritidy. Toto onemocnění je způsobeno právě termotolerantními bakteriemi rodu *Campylobacter* spp. (Kameník, 2014).

Faktorem patogenity je živá pohyblivost kampylobakterů. Patogeneze tohoto onemocnění však není zcela jasná (Votava, 2010).

Patogen se dostává do těla buď po kontaktu se zvířaty, po kontaktu s nemocnými nebo s potravou (zejména se jedná o drůbeží maso). Po pomnožení v tenkém střevě dochází k narušení sliznice a k vyvolání zánětlivé reakce. Pouze vzácně proniká do krve, čímž se vyvine akutní zánět žaludku a střeva (Schindler, 2014).

Příznaky infekce jsou většinou bolesti břicha, výrazný průjem (někdy i krvavý) a zvýšená teplota (Votava, 2010). Ale příznaky mohou být rozmanité – od asymptomatických projevů až po závažnou sepsi (Engberg, 2006). Klinická manifestace většinou začíná bolestmi břicha (u některých jedinců příznaky typické pro chřipku – horečka, bolesti hlavy, bolesti svalů, malátnost a závratě). Nejčastějším příznakem je průjem (od vodnatých až po těžké krvavé průjmy, bolesti břicha, křeče, bolesti svalů a hlavy, teplota a malátnost) (Humphrey et al., 2007; Hu a Kopecko, 2003; European Food Safety Authority a European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou citlivé k nízkému pH, s čímž souvisí poměrně vysoká infekční dávka (10^4 buněk). Inkubační doba se pohybuje mezi dvěma až pěti dny (Votava, 2010; Demnerová, 2016; Blackburn a McClure, 2002; Forsythe a Hayes, 1998). U některých osob může dojít k onemocnění již po pozření pětiset buněk, u některých je ale potřeba k propuknutí příznaků dávka až 10^6 buněk (Gharst et al., 2013; Görner a Valík, 2004).

Organismus zvládne vypořádat se s infekcí během týdne. V poslední době se již kampylobakteri3za vyskytuje čteněji než salmonel3za. Vyšší nárůst onemocnění je především v letních měsících u lidí středního věku (Schindler, 2014).

Patologický a histologický obraz infekce ukazuje tvorbu vředů a krvácivé stavy sliznice lačnicku, kyčelníku a tlustého střeva (Goering et al., 2016). Někdy může infekce

proběhnout inaparentně. Výsledek nemoci závisí na imunitním stavu hostitele a virulenci patogenu (Bolton, 2015). Klinicky se infekce kampylobakterem velmi podobá salmonelovým či shigelovým infekcím. Kampylobakteriózy však mívají delší inkubační dobu a mají i delší průběh (Goering et al., 2016).

K infikování jedince dochází po požití kontaminované potravy (především drůbež a voda). Častým zdrojem infekce (především pro děti) mohou být i domácí mazlíčci (psi a kočky) (Demnerová, 2016). K přenosu infekce může dojít i z volně žijících ptáků. *Campylobacter* je častým kontaminantem potravin, zejména masa, syrového mléka, ryb či produktů rybolovu, mušlí a pitné vody (Kameník, 2014). Mezilidský přenos je vzácný, převažuje přenos fekálně-orální cestou (Goering et al., 2016). Uvádí se i možný sexuální přenos (Julák, 2015). Riziko infekce spočívá především v nízké úrovni hygieny při manipulování se syrovým masem drůbeže v domácnostech či provozech veřejného stravování, kde často dochází k uchovávání v ledničce společně s potravinami určenými k přímé spotřebě. Dále hrozí i riziko křížové kontaminace ploch určených ke zpracování, kuchyňského náčiní při porcování a zpracování masa před tepelnou úpravou (Demnerová, 2016; Kameník, 2014; Fernandez, 2009b). *Campylobacter* spp. se také často nachází ve vodních zdrojích, zejména v povrchových či odpadních (Steinhauser a Beneš, 1995). Bylo provedeno několik studií zvíře v Kanadě (koně, lamy, alpaky, husy, kachny, krávy, kuřata, prasata, ovce a kozy) a prevalence se u těchto druhů zvířat pohybovala mezi 9 – 80 %. Při typizaci izolátů genu flaG pomocí polymorfismu délky restričních fragmentů (restriction fragment length polymorphism; RFLP) bylo zjištěno, že neupravená voda, kanalizační systém a některá domácí i divoká zvířata mají stejný profil genu. Tato skutečnost naznačuje, že se kampylobaktery rozšířily do mnoha hostitelů sdílením stejného zdroje vody a prostředí. I mušle z kontaminované vody byly uznány jako zdroj kampylobakterií (Huang et al., 2015).

Ze všech druhů byl výskyt druhů *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* 95 %. Bylo zjištěno, že kampylobaktery obsahuje i prasečí kejda a to v množství 0,3 %. Prokázalo se, že jatečně opracovaná těla prasat obsahovala 66 % kampylobakterů před zmrazením. Po zmrazení došlo k poklesu a jatečně opracovaná těla obsahovala pouze 14 % (Forsythe, 2010).

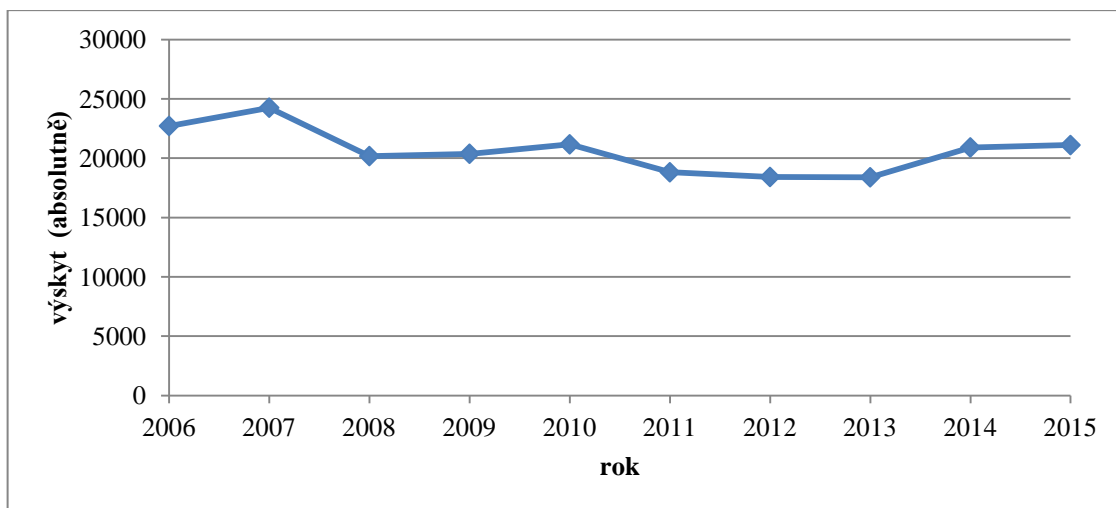
Pokud dojde k vážnějšímu průběhu, onemocnění se léčí antibiotickými přípravky. Velkou komplikací může být rozvoj Guillain-Barré postinfekční syndrom (GBS). Jedná

se o akutní neurologické onemocnění, kde dochází k paralýze způsobené demyelinizací periferních nervů. Tento stav se projevuje 2 – 3 týdny po začátku kampylobakteriózy. Příznaky jsou horečka, palčivý pocit bolesti, slabost, znecitlivění, poruchy dýchacích funkcí a neurologické poruchy. Pacient trpící GBS vyžaduje hospitalizaci a léčbu, která trvá až několik týdnů. Naštěstí se tato komplikace vyskytuje asi u jednoho promile pacientů, kteří prodělali enteritidu způsobenou *C. jejuni* (Demnerová, 2016; Drenthen et al., 2011; European Food Safety Authority a European Centre for Disease Prevention and Control, 2013; Whiley et al., 2013). Další komplikací může být i Miller Fisher syndrom (MFS) nebo reaktivní artritida (tzv. Reiterův syndrom) (Whiley et al., 2013).

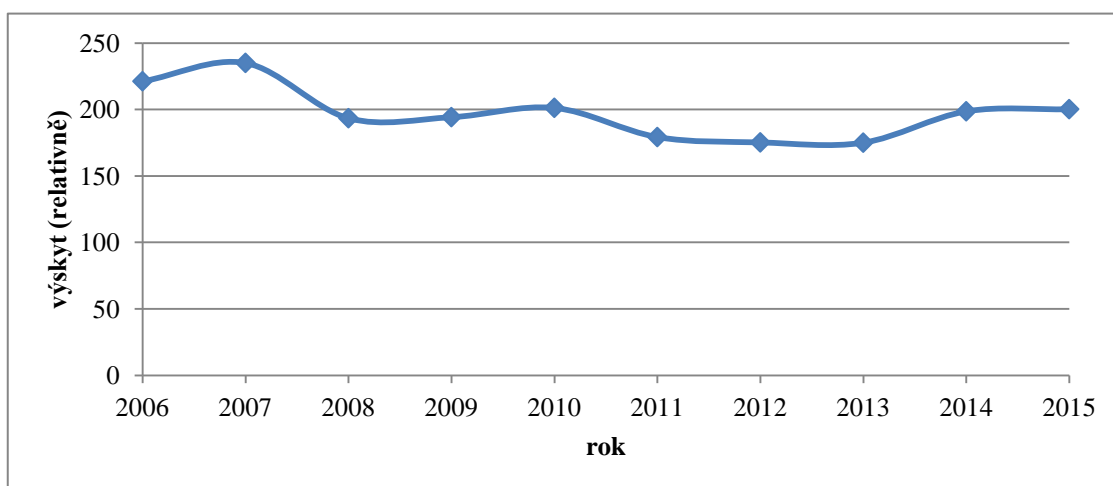
3.1.6 Epidemiologie

Výskyt kampylobakterióz se u nás pohybuje ročně kolem 210 případů na 100 000 obyvatel. Dříve byl do tohoto rodu řazen i druh *Campylobacter pylori*, který je dnes znám jako *Helicobacter pylori*, původce gastritid a žaludečních vředů, tudíž dřívější data zahrnují i tento druh (Goering et al., 2016). V současnosti bakterie rodu *Campylobacter* spp. představují nejčastější příčinu alimentárních onemocnění v mnoha částech světa (Sears et al., 2011). V EU je nejčastěji hlášenou zoonózou již od roku 2005. Tuto situaci v EU sledují Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) a Evropské centrum pro prevenci a kontrolu onemocnění (Kameník, 2014).

Druhem *Campylobacter jejuni* je způsobeno 85 – 95 % všech infekcí. Zbylých 5 – 15 % je většinou způsobena druhem *Campylobacter coli* (Prescott et al., 2005).



Obr. č. 1: Výskyt kampylobakteriózy v letech 2006 - 2015, data převzata ze Státní zdravotní ústav, 2017a



Obr. č. 2: Výskyt kampylobakteriózy na 100 000 obyvatel v letech 2006 – 2015 (relativně), data převzata ze Státní zdravotní ústav, 2017b

3.1.7 Diagnostika

Bakterie *Campylobacter* spp. vyžadují mikroaerofilní atmosféru, tudíž vyžadují složení atmosféry s 3 – 15 % kyslíku a se 2 – 10 % CO₂ (Snelling et al., 2005). Některé druhy rostou za anaerobních i za aerobních podmínek. *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter upsaliensis* jsou termotolerantními druhy, což znamená, že rostou při teplotním optimu 42 °C. Tato teplota je vyšší než u ostatních zástupců tohoto rodu (Moore et al., 2005; Snelling et al., 2005). Termofilní druhy

jsou oxidáza a kataláza pozitivní. Kmeny *Campylobacter jejuni* like jsou uváděny jako méně aktivní než kmeny *Campylobacter coli* like. Dalšími biochemickými vlastnostmi jsou redukce fumarátu na sukcinát, nitrátů na nitrity, nehydrolyzují močovinu, želatinu, kasein ani škrob. Dále netvoří lecitinázu, lipázu a nerostou v prostředí chloridu sodného (limitní je množství 3,5 %). Nevyužívají cukry, energii k růstu získávají z aminokyselin nebo z meziproductů citrátového cyklu. Jsou indol negativní (Debruyne et al., 2008). Pouze *Campylobacter jejuni* hydrolyzuje hippurát, čímž ho můžeme od ostatních druhů odlišit. Schopnost růst v glycinu (1%) je pro jednotlivé druhy variabilní vlastností. Velkým problémem při biochemické typizaci některých izolátů je právě výskyt hippurát – negativních kmenů *Campylobacter jejuni* (Fitzgerald a Nachamkin, 2011).

3.1.8 Druhov \acute{a} identifikace

Některé kmeny *Campylobacter* spp. reagují velmi atypicky, proto může být používání standardních biochemických testů (průkaz katalázy, stanovení citlivosti ke kyselině nalidixové a cephalotinu, průkaz hippurátu sodného a indoxyl acetátu nebo použití API Campy) velmi problematické (Blackburn a McClure, 2002). Přesnějšími, efektivnějšími i rychlejšími jsou metody molekulárně biologické. Jedná se zejména o polymerázovou řetězovou reakci (PCR), polymerázovou řetězovou reakci v reálném čase (real-time PCR), dále multisekvenční lokusová typizace (MLST), metoda polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), microarray a MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie (On, 2013; Gharst et al., 2013; Humphrey et al., 2007). Výše zmíněné metody mohou být použity pro identifikaci, detekci nebo pro potvrzení rodu. S využitím metody polymerázové řetězové reakce lze kvantifikovat množství. Molekulárně biologické metody jsou využívány k detekci genů, které kódují faktory virulence nebo mohou kódovat i rezistenci k antimikrobiálním látkám. Právě pro stanovení rodu *Campylobacter* spp. jsou využívány oblasti v genech 16S rRNA (hsp60, groEI, cpn60, ceuE a rpoB) (On, 2013).

3.1.9 Subtypizace

Subtypizace slouží k charakterizaci izolovaných kmenů *Campylobacter* spp. Díky subtypizaci můžeme charakterizovat vztahy mezi jednotlivými druhy, původ, příbuznost

a můžeme analyzovat riziko. Subtypizace je významná zejména pro epidemiologické studie, kde lze identifikovat patogen a prokázat jeho rezervoár. Takto můžeme potvrdit i cirkulaci v potravinovém řetězci či jiných environmentálních zdrojích (On, 2013; Taboada et al., 2013). Existují různé subtypizační metody – Lior sérotypizace (rozlišení více než 100 sérotypů *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*), dále biotypování, fágová typizace a antimikrobiální rezistotypizace. Zlatým standardem je však pulzní gelová elektroforéza. Stále více se používají metody využívající celogenomové sekvenování (Taboada et al., 2013; O'Reilly et al., 2006).

3.1.10 Rizikové potraviny

Rizikovými potravinami z hlediska možného onemocnění kampylobakteriózou jsou nejvíce syrová drůbež, dále porcované drůbeží maso i polotovary z nich vyráběné. Rizikové jsou v menší míře i vepřové a hovězí maso nebo korýši a mořské plody. Zdrojem nákazy může být i syrové nepasterované mléko, voda nebo zelenina (pokud se aplikují statková hnojiva na vzešlé plodiny). I příprava jídla je riziková, zejména při grilování či opékání. V domácnosti může dojít ke křížové kontaminaci, pokud nezacházíme s jídlem příliš hygienicky. Ze suroviny se může dostat *Campylobacter* na nástroje, na nádobí, a přes plochu se dostane na další potravinu. U tepelně opracovaných nebo fermentovaných masných výrobků se *Campylobacter* spp. nenachází (Blackburn a McClure, 2002; Moore et al., 2005).

Řada celosvětově prováděných studií potvrzuje, že se na površích chlazené a mražené drůbeže často vyskytuje *Campylobacter* spp. V ČR je vysoká promořenost chovů s velmi vysokou prevalencí tohoto patogenu v trávicí soustavě drůbeže. Dochází k sekundární kontaminaci v průběhu jatečného opracování, což se negativně promítá do pozitivivity nálezů u chlazených a mražených brojlerů v obchodní síti. U chlazených výrobků je zaznamenáno až 75 % pozitivních nálezů, u mražených výrobků 37 %. (Bardoň et al., 2011). Ve všech zemích s nejvyšším výskytem kampylobakteriózy byl jako dominantní druh potvrzen *Campylobacter jejuni* (European Food Safety Authority a European Centre for Disease Prevention and Control, 2013).

U vepřového masa se pohybuje výskyt *Campylobacter* spp. mezi 1 – 10 % (Juntunen et al., 2010).

Infekční agens se může přenášet i ovocem a zeleninou (Görner a Valík, 2004).

Kampylobaktery byly izolovány i ze zobáku kavky a straky (Fernandez, 2009a).

Drůbeží maso a játra

Po analýze epidemiologických údajů byla drůbež identifikována jako hlavní zdroj kampylobakterů (Omurtag et al., 2013).

Kampylobaktery mohou kontaminovat povrch jater post mortem, ale může nastat i systémová infekce u živých ptáků. Použití bakteriofágů ke snížení počtu kampylobakterů je slibným přístupem k problematice. Většina fágů však byla izolována z výkalů. Bakterie kampylobakterů převládají v drobch, zejména v játrech (Cornelius et al., 2005).

Pokrm, jako třeba játrová paštika, byly prohlášeny jako potenciální zdroj pro vypuknutí alimentárních onemocnění (CDC, 2013). Důkladným vařením dochází k eliminaci rizika onemocnění enteritidou z drůbežích pokrmů. Některé pokrmy se pouze minimálně vaří, aby si zachovaly sensorické vlastnosti i narůžovělý vzhled. Pokud je chceme vařit bezpečně, kritická teplota v jádru výrobku musí být 68 – 70 °C po dobu 45 minut (Hutchinson et al., 2015).

V některých případech může být kontaminace jater kampylobakterem výsledkem kontaminace v průběhu zpracování (Barot et al., 1983).

Brojleři jsou obecně uznávaným zdrojem kontaminace při manipulaci, přípravě a konzumaci masa. Tato kontaminace může být zodpovědná až za 20 – 30 % případů onemocnění kampylobakteriózou u lidí (European Food Safety Authority, 2010).

Vepřové maso a droby

U prasat bylo prokázáno, že jsou rezervoárem *Campylobacter* spp., tudíž vepřové produkty mohou být zdrojem infekce u lidí. Syrová nebo nedostatečně tepelně upravená játra nebo i jiné produkty obsahující játra, mohou představovat potenciální nebezpečí pro zdraví lidí (Moore a Madden, 1998).

Ve studii Sticht-Groh (1982) je uvedeno, že kampylobakter byl izolován ze vzorků stolice zdravých poražených prasat v 59 %. Celých 24 % bylo identifikováno jako *Campylobacter jejuni*. Tento druh byl izolován i ze vzorků střev, která byla skladována v solném láku, což naznačuje, že sůl ze střev nezničila všechny přítomné

mikroorganismy.

Mléko

Rizikovým faktorem pro infekci kampylobakterem je pití nepasterovaného mléka (Kapperud et al., 2003).

Campylobacter spp. nejsou schopny přežít pasteraci mléka, nemohou růst v syrovém či pasterovaném mléce, i když jsou schopny přežít v mléce při nízkých teplotách. K vypuknutí kampylobakteriózy z pasterovaného mléka ale přece jen došlo. Bylo tomu ve Velké Británii v roce 1979, kdy bylo nakaženo až 2500 školáků (Fernandez, 2009a).

3.2 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni je nejčastějším původcem bakteriálních průjmů v rozvinutých zemích. Zdrojem tohoto patogenu jsou především kuřata (Votava, 2010; Kameník, 2014).

Tento druh má dva poddruhy – *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* a *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*. *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* byl prozatím potvrzen pouze u člověka trpícího akutním zánětem žaludku a střeva. *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* se nachází v trávicím traktu volně žijících ptáků, drůbeže, u skotu, u prasat a u malých přežvýkavců. Následně se vyskytuje i v produktech těchto zvířat (v mase, v syrovém mléce). Tento poddruh byl identifikován i v mořských plodech (Kameník 2014). *Campylobacter jejuni* byl izolován i na skořápkách konzumních vajec, jak zevně, tak uvnitř (Fernandez, 2009b).

V roce 1995 došlo k vypuknutí enteritidy v USA způsobené druhem *Campylobacter jejuni*. Postihla 30 lidí, kteří se najedli v místní restauraci. Zdrojem nákazy bylo česnekové máslo. Přežití kampylobaktera v másle (s nebo bez přítomnosti česneku) bylo později studováno a bylo zjištěno, že *C. jejuni* může přežít na másle bez česneku po dobu 13 dní při teplotě 5 °C (Fernandez, 2009a).

Jedná se o tenkou gramnegativní pohyblivou tyčinku. Svým typickým vzhledem se podobá písmenu S, je zahnutá nebo zprohýbaná. V tekutém médiu rostou seřazené do řetízku. *Campylobacter jejuni* má spoustu sérotypů, které se liší především

rozmanitostí v antigenech O- a H-. Tento patogen kolonizuje sliznici tenkého, ale i tlustého střeva a působí zánětlivé průjemové onemocnění s horečkou (Schindler, 2014; Votava, 2010; Steinhäuser a Beneš, 1995).

3.2.1 Biochemie

Campylobacter jejuni je mikroorganismem produkujícím oxidázu a katalázu. *C. jejuni* hydrolyzuje hippurát, což bakterie *C. coli* ne (Votava, 2010).

3.2.2 Prostředí

Campylobacter jejuni neroste v aerobním prostředí. Tento druh není schopen se množit v potravinách, ale může v nich různou dobu přežívat. Při chladírenských teplotách a při dostatečné vlhkosti přežívá i několik dní. Při teplotě kolem 20 °C je devitalizován již za několik málo hodin. Mrazírenské teploty jsou tímto druhem tolerovány velmi dobře. Dokáže se pomnožit v rozmezí pH 6,0 – 9,5. Zvládá i přítomnost chloridu sodného do koncentrace 2 – 3 %. Tento druh je však velice citlivý na vlhkost (snížení aktivity vody pod 0,95 ho devitalizuje) a na přítomnost organických kyselin. Citlivý je zejména na kyselinu mléčnou a kyselinu octovou. Vykazuje citlivost i k běžně používaným dezinfekčním prostředkům či k působení UV záření (Steinhäuser a Beneš, 1995).

Tento druh je citlivý na zmrazení, sušení, ale i kyselé podmínky. Tyto podmínky mohou být použity jako bariéry k omezení růstu (Fernandez, 2009b).

3.2.3 Terapie

Campylobacter jejuni je citlivý k makrolidům (např. erytromycin), aminoglykosidům a tetracyklinovým antibiotikům. Léčba antibiotiky se však zahajuje pouze při závažném průběhu infekce (Schindler, 2014; Votava, 2010; Goering et al., 2016).

Pokud dojde k rozvoji invazivní infekce, jsou nutná i další antibiotika jako chinoliny nebo aminoglykosidy (Goering et al., 2016).

3.2.4 Epidemiologie

C. jejuni se vyskytuje v trávicím traktu ptáků (jedná se tedy o zoonózu). Přenos probíhá především kontaktem s drůbeží (až 2/3 kuřat je nakažených) a při zpracování masa (v drůbežářských provozech, v obchodech i v domácnostech) (Votava, 2010). U drůbeže se pohybuje výskyt až okolo 60 – 80 %, u prasat se vyskytuje v rozmezí 30 – 50 %. U skotu či ovcí bývá výskyt kolem 10 – 30 % (Steinhauser a Beneš, 1995). Přenos mezi lidmi je vzácný. Infekční onemocnění je často spojeno s konzumací nedostatečně tepelně opracovaného kuřecího masa. Při manipulaci se syrovým masem může dojít ke křížové kontaminaci (Votava, 2010). *Campylobacter jejuni* je často izolován ze syrového mléka, kde dochází ke kontaminaci při špatné hygieně dojení. Mléko je kontaminováno prostřednictvím výkalů (Steinhauser a Beneš, 1995).

3.2.5 Prevence

Hlavními preventivními opatřeními jsou především dodržování hygieny stravování a dostatečná tepelná úprava pokrmů (především drůbežího masa) (Votava, 2010; Julák, 2015).

Není nutný screening pracovníků pracujících s potravinami, protože přenos od nich se vyskytuje velmi vzácně (na rozdíl od salmonelóz) (Goering et al., 2016).

3.2.6 Diagnostika

Základem pro laboratorní diagnostiku je přímý průkaz kultivací. Průkaz protilátek metodou ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) je využíván pouze výzkumně (Votava, 2010).

Při diagnostice se využívá stolice. Je však nutný speciální způsob kultivace, který vyžaduje, aby byl obsah kyslíku v atmosféře 5 %. Dále je nutný obsah CO₂ v množství alespoň 10 % a kultivační teplota musí být 42 °C. K potlačení růstu doprovodné flóry se využívají směsi antibiotik (Schindler, 2014; Julák, 2015).

Většina postupů používaných v potravinářství byla navržena pro bakterii *Campylobacter jejuni*, jsou však použitelné i na řadu dalších kampylobakterů (*C. coli*, *C. upsaliensis* a *C. lari*). Pro izolaci *Campylobacter* spp. z potravin (dle ČSN ISO/TS 10272-1 a 10272-2) se používají různá obohacovací média, kde je nutné dodržet

mikroaerofilní podmínky a zvýšenou teplotu kultivace. Po 24 hodinách a po 48 hodinách se vzorky inokulují na selektivní agary, které se kultivují při teplotě 42 – 43 °C. Metabolismus těchto bakterií využívá pouze aminokyseliny a peptidy, tudíž stačí médium obsahující pepton. Suspektní kolonie se poté odlišují podle testu hydrolýzy hippurátu u *C. jejuni* a *C. coli* (*C. jejuni* pozitivní hippurát) (Demnerová, 2016).

3.2.7 Genetika

Campylobacter jejuni má velikost genomu 1,6 Mb, je velmi bohatý na sekvence adeninu a thyminu a odlišuje se tím, že nemá žádné inzerční sekvence či sekvence, které jsou odvozené od bakteriofágů. Mají také velmi málo repetitivních sekvencí (Parkhill et al., 2000).

3.3 *Campylobacter coli*

Tento druh je fenotypově velmi blízký druhu *Campylobacter jejuni*. Používá se velká škála genotypových metod k odlišení *C. jejuni* od *C. coli* (Ngulukun, 2016).

Campylobacter coli může u člověka vyvolat taktéž průjemové onemocnění, ale tyto infekce jsou méně časté. Zdrojem nákazy může být nejen drůbež, ale i prasata (Votava, 2010).

3.3.1 Biochemie

Campylobacter coli se od *C. jejuni* liší negativní hydrolýzou hippurátu (Votava, 2010).

3.3.2 Rizikové faktory

Podle Tam (2003) jsou rizikové faktory pro přenos *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni* různé. Z toho vyplývá, že budou potřeba odlišné strategie pro kontrolu těchto dvou druhů a bude potřeba provádět druhově specifické analytické studie. Převaha *C. jejuni* znamená, že byl *C. coli* zanedbaným lidským patogenem. Ale jeho relativní význam se zvýší vzhledem k současnému poklesu výskytu infekčních

onemocnění způsobených *Salmonella enteritidis*. Kampylobaktery jsou však vysoce variabilní organismy schopné se přizpůsobit širokému rozsahu podmínek, které se liší podle druhu.

3.3.3 Genetika

Při srovnání genů ve stejné oblasti genomu *C. coli* a *C. jejuni* bylo odhaleno 137 změn. Lokus IpxA může být užitečným při rozlišování nejen těchto dvou druhů, ale mohl by být použit i k odlišení ostatních termotolerantních *Campylobacter* spp. (Klena et al., 2004).

3.3.4 Epidemiologie

Campylobacter coli kolonizuje gastrointestinální trakt hospodářských zvířat. Nachází se zejména u prasat a drůbeže. Tento druh se u nich však vyskytuje v mnohem menší míře než *Campylobacter jejuni*. *Campylobacter coli* je potvrzeným druhým nejčastějším druhem (5 – 10 %) asociovaným s humánní kampylobakteriózou (Kameník, 2014; Tam, 2003).

Kampylobakterióza byla pozorována i u psů, kde převažoval výskyt *Campylobacter jejuni*. U psů s vážnými průjmy byly identifikovány smíšené infekce *C. coli* a *C. jejuni*, což může naznačovat možnost synergismu mezi těmito dvěma druhy. Velkým problémem by mohlo být nakažení dětí, starších lidí nebo lidí se sníženou imunitou. Navíc spousta psů může takto přenášet multirezistentní kampylobaktery, což je taktéž velkým problémem pro veřejné zdraví (Karshima a Bobbo, 2016).

Častou příčinou gastrointestinálního onemocnění u koček je neutrofilní zánět střevní sliznice. Jedná se o zánětlivé onemocnění střev, které způsobují nežádoucí účinky potravin, antibiotik a infekce (virové, bakteriální, protozoální, parazitární i fugální). Bylo potvrzeno spojení mezi tímto onemocněním a přítomností *Campylobacter coli* u koček. Kočky s touto diagnózou měly významně vyšší počet *C. coli* ve sliznici střeva. *Campylobacter coli* je nejspíš schopen k produkci sloučenin, které stimulují neutrofilny nebo indukují kočičí střevní buňky k produkci neutrofilů pomocí chemoatraktantů (Maunder et al., 2016).

3.3.5 Terapie

Za nejlepší antimikrobiální léčbu je považována léčba erytromycinem, fluorochinolony a tetracykliny, které se využívají zejména u pacientů s těžkou infekcí (Lucey et al., 2000).

3.3.6 Diagnostika

K rozlišení *Campylobacter* spp. se používá polymerázová řetězová reakce s následným restričním štěpením (PCR – RFLP). Při PCR se používají primery THERM₁ a THERM₄, které amplifikují část genu pro 23S ribozomální RNA. Následně dochází ke štěpení endonukleázami. Specifické štěpení umožňuje druhové určení *C. coli*, *C. jejuni*, *C. upsaliensis* a *C. lari* (Steinhauserová et al., 2001).

3.4 Ostatní kampylobaktery

Existují různé druhy kampylobakterů. Spousta z nich jsou četnými saprofyty či patogeny. Podobnými druhy jsou *C. jejuni* a *C. coli* (tento druh je obtížněji diferencovatelný). Vzácně může u člověka vyvolat infekci i druh *Campylobacter fetus* (Schindler, 2014).

3.4.1 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

Tento patogen je především znám jako původce onemocnění u hovězího dobytka a u ovcí. U lidí, kteří mají narušenou imunitu, může vyvolávat nejen hnisavé infekce, ale může dojít i k celkové infekci. Jeho neschopnost růstu při teplotě 42 °C a podle citlivosti k cefalotinu můžeme snadno odlišit od *C. jejuni* (Votava, 2010).

Tento patogen se nachází v zažívacím traktu skotu, ovcí, koz, prasat, psů, koček a slepic. Představuje hlavní příčinu septického potratu u těchto zvířat a má afinitu k placentární tkáni. Infekce způsobené *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* probíhá u oslabených jedinců ve formě systémového onemocnění spolu s bakteriémií, meningitidou, cévními infekcemi, abscesy a celulitidou. Nicméně, tento mikroorganismus je zřídka lidským patogenem (Fujihara et al., 2006).

U lidí bylo popsáno 13 případů, kdy u 5 z nich došlo k potratům. Hlavními

příznaky u matek byla horečka společně se studenou zimnicí. Pouze u 3 případů došlo k průjmům. Ve všech případech novorozenci měli těžkou sepsi a meningitidu. Čtyři děti zemřely již v novorozeneckém období na následky nezralosti centrálního nervového systému. Histologické vyšetření placenty odhalilo léze se zánětlivým infiltrátem polymorfonukleárních neutrofilních leukocytů. Rozšíření infekce probíhalo krví (Fujihara et al., 2006).

3.4.2 *Campylobacter upsaliensis*

Tento mikroorganismus byl pojmenován po městě, ve kterém byl poprvé izolován. Od té doby se po celém světě začal brát jako lidský bakteriální enteropatogen. *Campylobacter upsaliensis* je spojen s akutními průjmy, které odezní samy. Byl izolován i u chronických průjmových onemocnění (Bourke et al., 1998).

Campylobacter upsaliensis je termofilní, kataláza negativní mikroorganismus, který byl poprvé identifikován jako psí patogen v roce 1983. Nyní je tento mikroorganismus vedený jako lidský enteropatogen (Bourke et al., 1996).

C. upsaliensis je dalším druhem nejčastěji izolovaným u lidí po druhu *C. jejuni*. Bývá však jen zřídka izolován v klinických laboratořích, a proto je málo známý mezi lékaři. *Campylobacter upsaliensis* je citlivý na antibiotika běžně používaná v selektivní půdě pro kampylobaktery (Bourke et al., 1998).

Při průjmových onemocněních člověka bývá velmi vzácně izolován jako původce. Pro izolaci tohoto druhu patogena nejsou vhodná běžně používaná selektivní média, nejspíš je to i jeden z důvodů, proč je izolován velmi vzácně (Votava, 2010).

Tento druh nejčastěji kolonizuje trávicí trakt psů, koček nebo ptáků chovaných jako domácí mazlíčci. Význam kolonizace trávicího traktu těchto zvířat však není jasný, protože chybí jasné důkazy, zda se jedná o skutečnou příčinu průjmů psů a koček (Weese, 2011; Forsythe, 2010). Druhy *Campylobacter lari* a *Campylobacter upsaliensis* jsou zodpovědné asi za 1 % případů onemocnění kampylobakteriózou (Blackburn a McClure, 2002). Tento druh bývá velmi vzácně izolován z potravin, ale nebyl zatím nalezen průkaz, že je asociován s infekcí vyvolanou u člověka. Nejpravděpodobnější cestou přenosu je tudíž přímý kontakt se zvířetem nebo člověka s člověkem, nikoliv potravinovým řetězcem (Mandrell a Miller, 2006).

3.4.3 *Campylobacter lari*

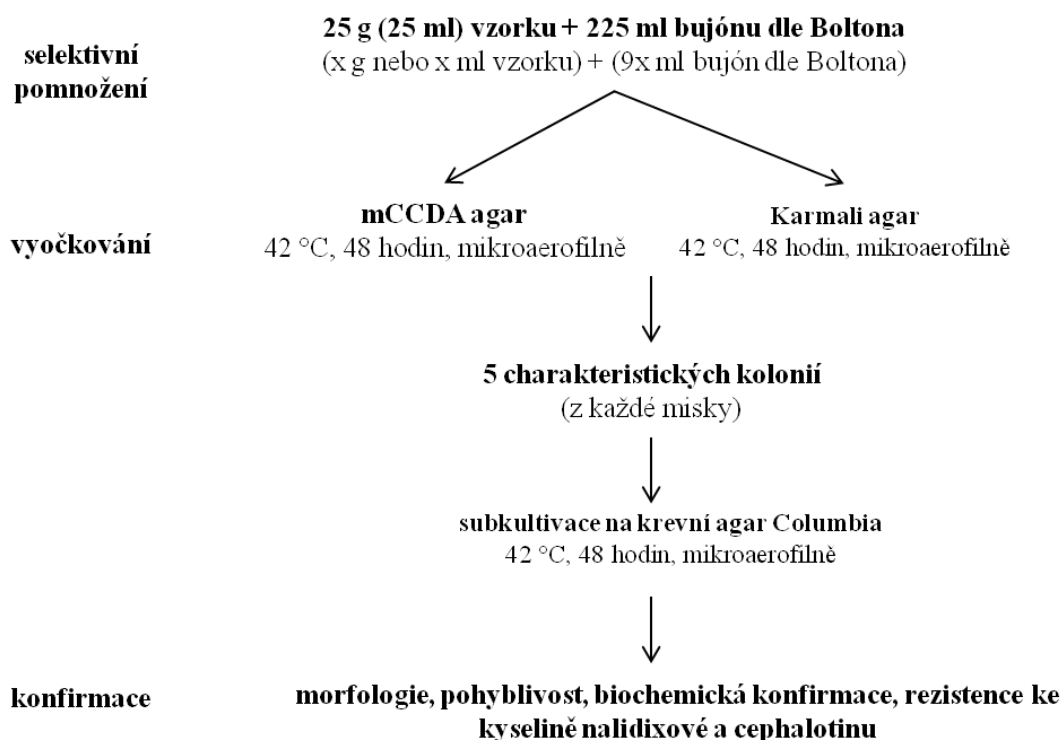
Z humánních vzorků bývá také velmi zřídka izolován. Ve většině případů je také původcem infekcí žaludku a střeva (Votava, 2010).

Tento druh bývá často izolován z vod, ze střevního obsahu volně žijících ptáků, zvláště ptáků migrujících (zejména racků). V menší míře se vyskytuje i u prasat, psů, koček nebo dalších domácích mazlíčků. Může se vyskytovat i u mořských živočichů jako jsou mušle nebo ústřice. Jeho přítomnost v mořské vodě je nejspíše výsledkem kolonizace gastrointestinálního traktu racků a jiných pobřežních ptáků, kteří tak prostředí vody kontaminují. *Campylobacter lari* dokáže přežít v prostředí s koncentrací soli až 3,5 % (Mandrell a Miller, 2006).

3.5 Metody detekce bakterií rodu *Campylobacter* spp.

3.5.1 Postup metody dle ČSN EN ISO 10 272 (2006)

K průkazu bakterií rodu *Campylobacter* spp. se využívá normy ČSN EN ISO 10 272-1, ve které jsou uvedena speciální bohatá živná média obsahující selektivní složky. Selektivními složkami jsou látky inhibující růst doprovodných mikroorganismů (antibiotika – cefoperazon, vankomycin, cykloheximid a trimetoprim), dále složky zvyšující aerotoleranci (defibrinovaná koňská krev, hemin, aktivní uhlí, pyruvát sodný a disiřičitan sodný). Kultivace probíhá v mikroaerofilní atmosféře, která obsahuje 5 % O₂, 10 % CO₂ a dostatečnou vlhkost (Brožková et al., 2016; Gharst et al., 2013; On, 2013; Blackburn a McClure, 2002). K průkazu suspektních patogenních kmenů tohoto rodu dochází ve třech krocích. Prvním krokem je pomnožení v tekuté selektivní půdě (pomnožovací bujón dle Boltóna). Druhým krokem je vyočkování na povrch dvou selektivních kultivačních půd – modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (mCCDA) a druhá půda dle výběru (Karmaliho agar, Butzlerův agar, čokoládový agar). Třetím krokem je konfirmace, kde se zkoumají typické kolonie (pohyb, biochemické testy) (Brožková et al., 2016).



Obr. č. 3: Schématický postup průkazu kampylobakterů (Brožková et al., 2016)

Tab. č. 2: Konfirmace a hodnocení výsledků (Brožková et al., 2016)

vzhled kolonií	pohyb v zástinu	preparát dle Grama	biochemické testy	
šedé nebo světle hnědé	živě se pohybující	G ⁻	oxidáza	+
vodnaté	vlnící se	tenké spirální tyčinky	kataláza	+
nepřavidelný tvar		pleomorfní	růst při 25 °C	mikroaerofilně (-)
nehemolytické			růst při 42 °C	aerofilně (-)

Podle výsledků konfirmace potvrdíme či vyloučíme přítomnost termotolerantních druhů rodu *Campylobacter* spp. v navážce vzorku, který zkoumáme (Brožková et al., 2016).

3.5.2 Nové způsoby stanovení

Nová vysoce selektivní jsou média pro stanovení *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* z potravin. Patří sem například CampyFood ID agar nebo *C. jejuni/C. coli* Chromogenic Planting medium.

K rychlé detekci kampylobakterů v potravinách se používají i latexové aglutinační testy. Patří sem například Microgen M46 *Campylobacter* nebo SCIMEDXCAMPY, které jsou využívány především ke stanovení druhů *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter lari*. Ke stanovení z potravin se dnes využívají automatizované systémy (př. VIDAS), které využívají principů enzymové imunoeseje (enzyme-linked immunosorbent assay). Pro klinické vzorky jsou využívány systémy jako např. ImmunoCardSTAT! CAMPY, Ridascreen *Campylobacter* nebo the ProSpecT *Campylobacter* assay. Citlivost těchto metod se pohybuje kolem 10^5 kolonie tvořící jednotky na 1 ml. Tyto metody však musí být vždy potvrzovány dalšími metodami (Gharst et al., 2013).

3.5.3 Molekulárně biologické metody

K detekci a kvantifikaci rodu *Campylobacter* spp. se využívá metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR). Průkaz bakterií *C. jejuni* a *C. coli* je založen na detekci specifických sekvencí, které se vyskytují v genomu nezávisle na sobě. Aby se při reakci přišlo na falešně negativní výsledek reakce, do každé reakce je přidána interní amplifikační kontrola. K falešně negativnímu výsledku může dojít vlivem přítomnosti inhibitorů, které ovlivňují průběh reakce. Následná kvantifikace probíhá dle kalibračních křivek (Mikel et al., 2015).

Podle specifity, kterou vyžadujeme, jsou použity různé oblasti genomu. Pokud chceme identifikovat pouze na úrovni rodu, využívají se úseky 16S rRNA. Při identifikaci jednotlivých druhů jsou využívány specifické geny (Hochel, 2009).

3.5.4 Fenotypové testy

Většina fenotypových testů je založena na hodnocení morfologických znaků, nutričních požadavků, rezistenci k různým agens (včetně antibiotik), toleranci na teplotu a na biochemických vlastnostech. I když biochemické testy poskytují informace

pro předběžné určení druhu, je nutno dávat pozor, protože výsledky musíme vyhodnotit vzhledem k variabilitě a reprodukovatelnosti jednotlivých testů. Rozdíly mohou být způsobeny velikostí inokula, rozdílnými kultivačními médii, ale i provedením biochemických testů (např. záleží na stáří kultury).

Pomocí fenotypových testů můžeme například určit *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*, protože jsou oxidáza i kataláza pozitivní, redukují dusičnany na dusitany, rostou při 42 °C za mikroaerofilních podmínek a nerostou při teplotě 25 °C (Hochel, 2009).

3.5.5 Průkaz oxidázy

K detekci enzymu cytochromoxidázy nebo indofenolové oxidázy se využívají komerčně vyráběné disky. Pomocí disků se detekují mikroorganismy, jako jsou například *Neisseria*, *Alcaligenes*, *Aeromona*, *Vibrio*, *Campylobacter* a *Pseudomonas*, které dávají pozitivní reakci. Enzymy cytochromoxidáza nebo indofenolová oxidáza katalyzují transport elektronů. Disky jsou sterilní filtrační papíry napuštěné N, N-dimethyl-p-fenylendiaminem oxalátem, kyselinou askorbovou a a-naftolem. Bezbarvý N,N-dimethyl-p-fenylendiamin slouží jako umělý akceptor elektronů. Při reakci je oxidován na barevnou sloučeninu, kterou je indofenolová modř (Himedia, 2017).

3.5.6 Mikroskopie a barvení dle Grama

Mikroskopie je důležitá metoda, která se využívá pro svoji rychlost a jednoduchost. Mikroskopování je důležitou součástí téměř všech vzorků, i když tato metoda není příliš citlivou. Při mikroskopii převažuje pozorování fixovaného a barveného preparátu (Votava, 2005; Greenwood, 2012).

Význam barvení dle Grama je především rozdělení bakterií na 2 základní taxonomické skupiny – grampozitivní a gramnegativní. Toto taxonomické rozdělení je podle celé řady anatomických i fyziologických vlastností, kterými se tyto bakterie odlišují. Nejpodstatnější je při tomto barvení rozdílná stavba bakteriální stěny. Při barvení dochází v buňce ke vzniku komplexu krystalové violeti spolu s jódem, který je u skupiny gramnegativních bakterií vyplaven alkoholem či acetonem. Odbarvení odolávají grampozitivní bakterie (nesmí však dojít k dlouhodobému působení) (Votava, 2010).

Buněčná stěna bakterií je složena především z peptidoglykenu mureinu. Murein se skládá z N-acetylglukosaminu a kyseliny N-acetylmuramové. Tyto složky jsou střídavě za sebou uspořádány ve vlákna a jsou propojena glykosidickými vazbami. Navíc jsou mezi sebou vlákna propojena peptidickými vazbami, čímž tvoří síť. Odlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií je i v tloušťce mucinové vrstvy.

U grampozitivních bakterií je silná vrstva peptidoglykenu mureinu, která je prostoupena řetězci kyseliny teichoové.

U gramnegativních bakterií je buněčná stěna o mnoho složitější. Murein tvoří jen tenkou vrstvu a kyselina teichoová není přítomna. Vnější membrána obsahuje především fosfolipidy, strukturní a enzymové proteiny, lipoproteiny a lipopolysacharidy. Tzv. periplazmový prostor (mezi vnější membránou a peptidoglykenem mucinem) je místem, v němž se nacházejí různé enzymy, živiny a metabolity důležité pro chod buňky. Vnější membránou prostupují póry, které umožňují prostup malých molekul a mohou zasahovat až k peptidoglykenu, na který se vážou (Kalhotka a Tesařová, 2014).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Seznam použitých přístrojů a pomůcek

- laboratorní váhy s přesností $\pm 0,01$ (firma Schoeller Instruments, s.r.o., Praha, Česká republika)
- homogenizátor Bag Mixer (firma Interscience, Paříž, Francie)
- digestoř
- tlakový hrnec
- komorový termostat Sanyo incubator (firma Schoeller instruments, s.r.o., Praha, Česká republika)
- komorový termostat Julabo TW 20 - vodní lázeň (firma Schoeller instruments, s.r.o., Praha, Česká republika)
- anaerostat
- jednorázové plastové Petriho misky (rozměr 90 x 100 mm)
- laboratorní sklo – pipety, odměrné válce, zkumavky, 500 ml skleněné láhve
- myčka nádobí
- mikrotenové sáčky, alobal, pinzety, skalpely

4.2 Vyšetřovaný materiál

Mikrobiologická analýza byla provedena u 50 vzorků, z toho 13 jater drůbežích, 13 jater vepřových, 12 vzorků čtvrtek a 12 vzorků syrového mléka. Vzorky byly čerstvé a pocházely z 19 řeznictví, 4 hypermarketů nebo v případě mléka, z 10 mlékomatů z oblasti Brna a okolí.

Vyšetřovaný materiál byl zakoupen vždy jeden den před mikrobiologickou analýzou. Skladování vzorků bylo při teplotě nepřesahující 4 °C. Přeprava vzorků do mikrobiologické laboratoře probíhala vždy v co nejkratším možném čase a bez porušení chladicího řetězce.

Mikrobiologická analýza vyšetřovaných vzorků byla prováděna v mikrobiologické laboratoři na Ústavu technologie potravin na Mendelově univerzitě v Brně v období od září do prosince roku 2016.

4.3 Metodika

U veškerého vyšetřovaného materiálu bylo prováděno potvrzení či nepotvrzení přítomnosti bakterií druhu *Campylobacter*. Veškeré výsledky se dále konfirmovaly mikroskopii, oxidázovým testem a testem k průkazu katalázy.

Pomocí sterilního skalpelu a pinzety bylo odebráno (z různých částí) 25 gramů vzorku.

4.3.1 Předmnožení

K takto připravenému vzorku byl následně přidán ochlazený *Campylobacter* pomnožovací bujón (Lab M, Velká Británie) v množství 225 ml. Vzorek byl spolu s bujónem homogenizován po dobu 90 sekund a kultivace proběhla v mikroaerofilním prostředí CampyGen od firmy Oxoid. Nádobka pro kultivaci (s mikroaerofilním prostředím) byla umístěna do termostatu a vzorky byly inkubovány při teplotě 42 °C.

4.3.2 Pomnožení

Do připravené Petriho misky se selektivním agarem (Lab M, Velká Británie) pro kampylobaktery bylo nanášeno 0,1 ml inokula (metodou roztěru) z pomnožovacího bujónu. Takto připravené misky byly opět inkubovány za mikroaerofilních podmínek při 42 °C v termostatu po dobu 48 hodin.

Po inkubaci byly vytvořeny preparáty pro mikroskopování (obarveny dle Grama) a dále konfirmovány pomocí oxidázového a katalázového testu.

4.4 Kultivační média a selektivní suplementy

4.4.1 *Campylobacter* pomnožovací bujón

Při přípravě bylo naváženo 27,5 g prášku a následně rozpuštěno v 1 litru neionizované vody. Po 10 minutách následovalo důkladné promíchání a sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Směs byla ochlazená na teplotu 47 °C a byl přidán suplement X132 a 50 ml lyzované koňské krve. Vše bylo důkladně promícháno. Vzorek s pomnožovacím bujónem byl vložen do mikroaerofilní

atmosféry a následně do termostatu, kde byla udržována teplota 42 °C. Po inkubaci byla část vzorku odebrána a inokulována na Petriho misku se selektivním agarem pro kampylobaktery.

Bujón má vzhled průsvitně červený s jemným černým nádechem.

Tab. č. 3: Složení Campylobacter pomnožovacího bujónu

složka	koncentrace (g/l)
masový pepton	10
laktalbuminové hydrolyzáty	5
kvasničný extrakt	5
chlorid sodný	5
hemin	0,01
pyruvát sodný	0,5
a-ketoglutarová kyselina	1,0
disiřičitan sodný	0,5
uhličitan sodný	0,6

4.4.2 Suplement X132

Balení obsahovalo 10 lahviček k jednorázovému použití, přičemž pro dosažení správné pracovní koncentrace (do 500 ml pomnožovacího bujónu) byla zapotřebí jedna lahvička.

Tento výrobek má trvanlivost 2 roky při dodržování skladovací teploty mezi 2 – 8 °C.

Pracovník by měl mít na sobě latexové rukavice, pokud rekonstruuje suplementy v 5 ml sterilní neionizované vody a měl by používat sterilní pipetu.

Suplement má být přidán asepticky do média, které je ochlazeno na 47 °C, a směs musí být okamžitě důkladně promíchána.

Tab. č. 4: Složení suplementu

látká	koncentrace ve vialce (mg)	koncentrace v médiu (mg/l)
cefoperazon	10	20
vankomycin	10	20
trimethoprim	10	20
natamycin	12,5	25

Cefoperazon

Jedná se o antibiotikum, které patří do skupiny cefalosporinů III. generace (součástí beta-laktamů). Tato antibiotika jsou vysoce účinná na gramnegativní bakterie. Jedná se o poměrně silné selektory širokospektrých beta-laktamas, je tedy nutné je indikovat s rozvahou (Votava, 2010).

Vankomycin

Vankomycin je antibiotikum patřící do skupiny glykopeptidových antibiotik. Tato antibiotika jsou peptidy s navázanou cukernou složkou a jejich účinek je zaměřen především na zásah do syntézy bakteriální stěny. Vankomycin je poměrně toxickým, zatím však působí i na rezistentní kmeny *Staphylococcus aureus* a *Staphylococcus epidermidis*, na většinu enterokoků či na *Clostridium difficile* (Votava, 2010).

Trimethoprim

Trimethoprim řadíme do skupiny chemoterapeutik, která působí jako antibiotika. Jedná se o poměrně toxické látky, které se využívají v léčbě kožních onemocnění, gastroenterologii, očním lékařství či ORL (Votava, 2010).

Natamycin

Natamycin je antimykotikem používaným k lokálnímu použití. Působí především na kvasinky a plísňe (Votava, 2010).



Obr. č. 4: *Campylobacter pomnožovací bujón* (LabM, 2017b)

4.4.3 *Campylobacter* selektivní agar

Při přípravě bylo rozmícháno 45,5 g prášku v 1 litru neionizované vody. Směs se nechala odstát po dobu 10 minut, byla promíchána a následně sterilizována v autoklávu po dobu 15 minut při 121 °C. Poté se ochladila na teplotu 47 °C a byl přidán suplement X112. Směs byla důkladně promíchána a nalita na Petriho misky. Před použitím bylo nutné, aby povrch agaru oschnul. Poté došlo k inokulaci pomnoženým kampylobakterem a následně k inkubaci při teplotě 42 °C po dobu 48 hodin.

4.4.4 Supplement X112

Balení obsahovalo 10 lahviček k jednorázovému použití, přičemž pro dosažení správné pracovní koncentrace (do 500 ml selektivního agaru) byla zapotřebí jedna lahvička.

Tento výrobek má trvanlivost 2 roky při dodržování skladovací teploty mezi 2 – 8 °C.

Pracovník by měl mít na sobě latexové rukavice, pokud rekonstruuje suplementy v 5 ml sterilní neionizované vody a měl by používat sterilní pipetu.

Suplement má být přidán asepticky do média, které je ochlazeno na 47 °C, a směs musí být okamžitě důkladně promíchána.

Tab. č. 5: Složení suplementu

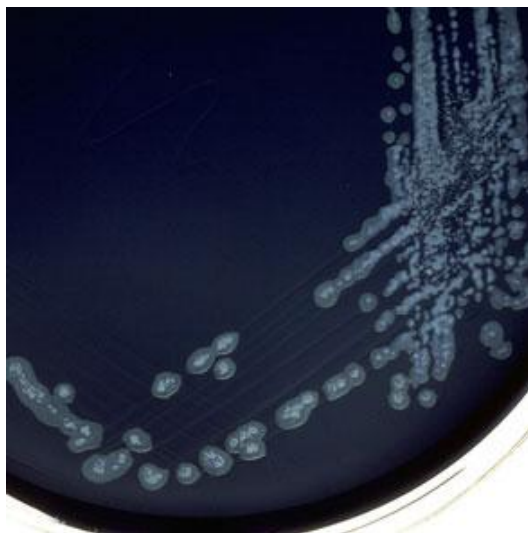
látko	koncentrace ve vialce (mg)	koncentrace v médiu (mg/l)
cefoperazone	16	32
amfotericin	5	10

Cefoperazon

Jedná se o antibiotikum, které patří do skupiny cefalosporinů III. generace (součástí beta-laktamů). Tato antibiotika jsou vysoce účinná na gramnegativní bakterie. Jedná se o poměrně silné selektory širokospektrých beta-laktamas, je tedy nutné je indikovat s rozvahou (Votava, 2010).

Amfotericin

Amfotericin je antimykotikum, které řadíme do skupiny polyenů. Polyeny jsou poměrně toxické látky vážící se na ergosterol. Má inhibiční účinek na kandidy, aspergily, příslušníky rodu *Mucor* i na některé prvoky (Votava, 2010).



Obr. č. 5: *Campylobacter* selektivní agar (LabM, 2017a)

4.5 Konfirmace bakterií rodu *Campylobacter* spp.

4.5.1 Průkaz oxidázy

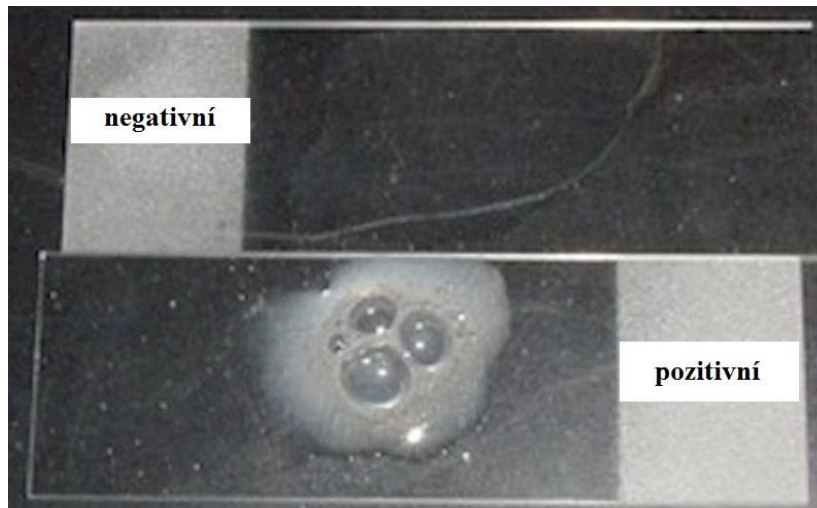
Testují se bakteriální kolonie 18 – 24 hodin staré. Oxidázový disk se navlhčí destilovanou vodou a umístí se do sterilní Petriho misky. Sterilní kličkou je na povrch vlhkého disku přenesena testovaná kolonie a rozetřena po povrchu. Pozitivní reakce se objeví do 5 – 10 sekund při 25 – 30 °C, kdy je možno sledovat tmavě modrofialové zbarvení disku. Může však dojít i k opožděné pozitivní reakci, která se objevuje do 60 sekund. Pokud nedojde ke změně barvy po uplynutí 1 minuty, výsledek reakce je negativní (Himedia, 2017).



Obr. č. 6: Pozitivní a negativní výsledek reakce oxidázového testu (Mittal, 2017)

4.5.2 Průkaz katalázy

Kataláza je enzym, který má schopnost rozštěpit peroxid vodíku na vodu a kyslík. K tomuto průkazu se používá 3% roztok peroxidu vodíku. Tento roztok kápneme na podložní sklíčko a sterilní kličkou nabereme kolonii, kterou rozmícháme v kapce H_2O_2 . Pozitivní reakcí je šumění, které je viditelné po smíchání (Votava, 2010).



Obr. č. 7: Pozitivní a negativní reakce při průkazu katalázy (Telmeds.org, 2017)

4.5.3 Barvení dle Grama

Očkovací kličkou byl nanesen nátěr bakteriální kultury na podložní sklíčko. Tento nátěr byl dokonale vysušen a fixován nad plamenem. Poté byl nátěr převrstven krystalovou violetí, která působila po dobu jedné minuty. Následně se sklíčko opláchlo vodou. Nátěr byl dále převrstven jodovým roztokem, který opět působil po dobu jedné minuty. Následoval opět oplach vodou. Poté byl nátěr převrstven dekolorizačním roztokem a působil po dobu jedné minuty. Následoval opětovný oplach vodou. Sklíčko bylo převrstveno safraninem, který zase působil po dobu jedné minuty. Nakonec sklíčko bylo opláchnuto vodou, osušeno a prohlíženo pod imerzním objektivem.

4.6 Statistické vyhodnocení

Výsledky byly vyhodnoceny pomocí programu Statistica 12 analýzou rozptylu (ANOVA).

5 VÝSLEDKY

Cílem této diplomové práce byla detekce kampylobakterů v různých potravinách. Vzorky byly zakoupeny v tržní síti. Výběr vyšetřovaných vzorků byl zaměřen na potraviny, u kterých byl zaznamenán (u nás nebo v zahraničí) podíl na vzniku tohoto alimentárního onemocnění. Sledování přítomnosti *Campylobacter* spp. bylo prováděno u 50 vzorků, z toho 13 jater drůbežích, 13 jater vepřových, 12 vzorků drůbežích čtvrtek a 12 vzorků mléka z mlékomatů. Z celkového počtu 50 vzorků byl prokázán pozitivní nález kampylobakterů v 31 případech.

Mikrobiologická analýza byla prováděna den po nákupu čerstvých vzorků, kde vzorky byly uchovány při teplotě 4 °C.

Odběry vzorků byly prováděny vždy z různých částí vzorku, a to z nejméně z povrchu včetně části kůže, ale i zevnitř.

U všech vzorků byla sledována přítomnost (nepřítomnost) patogenních mikroorganismů *Campylobacter* spp.

Výsledky tohoto stanovení jsou uvedeny v tab. č. 6.

Tab. č. 6: Přehled vyšetřovaných vzorků

vzorek	celkový počet	pozitivní vzorky	negativní vzorky
játra drůbeží	13	12	1
játra vepřová	13	6	7
drůbeží zadní čtvrtky	12	11	1
mléko	12	2	10
celkově	50	31	19

Z tab. č. 6 je patrné, že výskyt kampylobakterů je opravdu značný. Z uvedených výsledků je zřejmé, že nejvyšší výskyt *Campylobacter* spp. je u drůbežního masa.

Toto zjištění koresponduje s údaji uváděnými v literatuře, ale i s výskytem kamylobakterií uváděné Státním zdravotním ústavem.

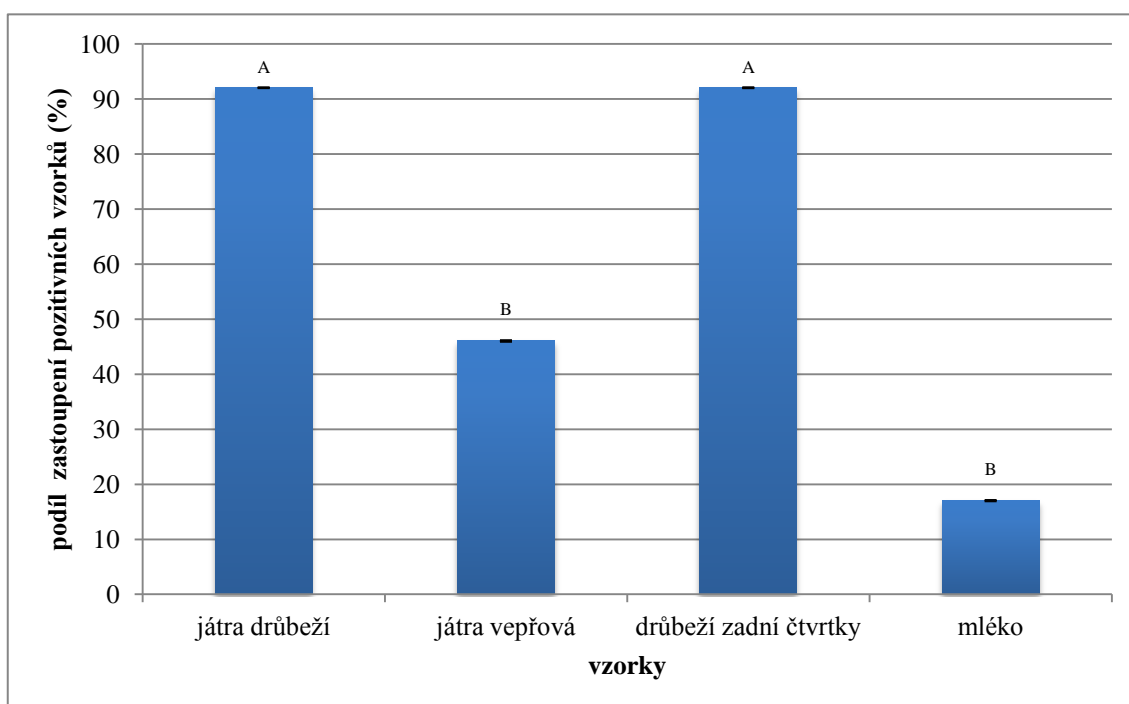
Co se týká drůbežích jater, pozitivních vzorků bylo celkem 12 ze 13 různých vzorků nakoupených v tržní síti.

U drůbežích zadních čtvrtky byl také jen jediný vzorek negativní.

U jater vepřových bylo prokázáno 6 pozitivních vzorků z celkového počtu 13.

A u čerstvého mléka z mlékomatů byl pozitivní výskyt pouze u 2 vzorků z celkového počtu 12.

Z 50 analyzovaných vzorků bylo 31 pozitivních.

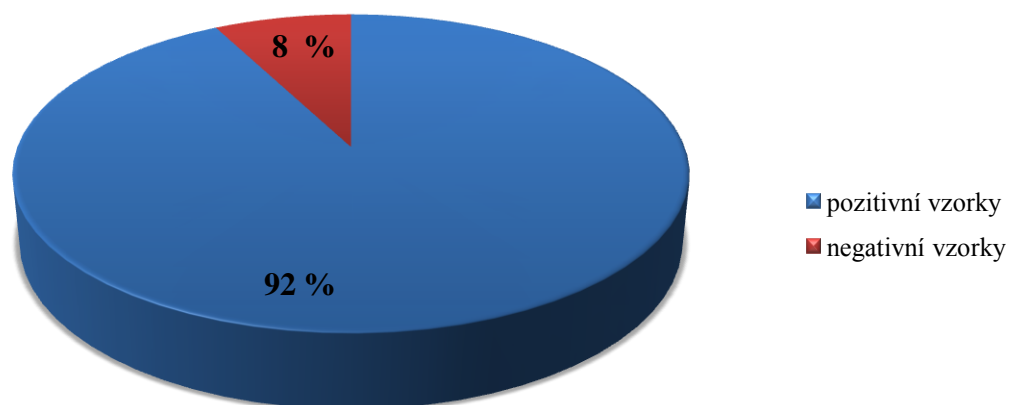


Obr. č. 8: Pozitivní výskyt *Campylobacter spp.* u jednotlivých vzorků v % (játra drůbeží $n = 13$; játra vepřová $n = 13$; drůbeží zadní čtvrtky $n = 12$; mléko $n = 12$)
Průměry označené různými písmeny se statisticky liší ($p < 0,05$)

Z výše uvedeného obr. č. 8 vyplývá, že ve vzorcích drůbežích jater a čtvrtí nebyl rozdíl v procentuálním výskytu. U drůbežního masa bylo pozitivních vzorků 92 %. U jater vepřových byl výskyt mnohem nižší, pohyboval se kolem 46 %. U čerstvého mléka z mlékomatů byl výskyt nejnižší, a to jen 17 %.

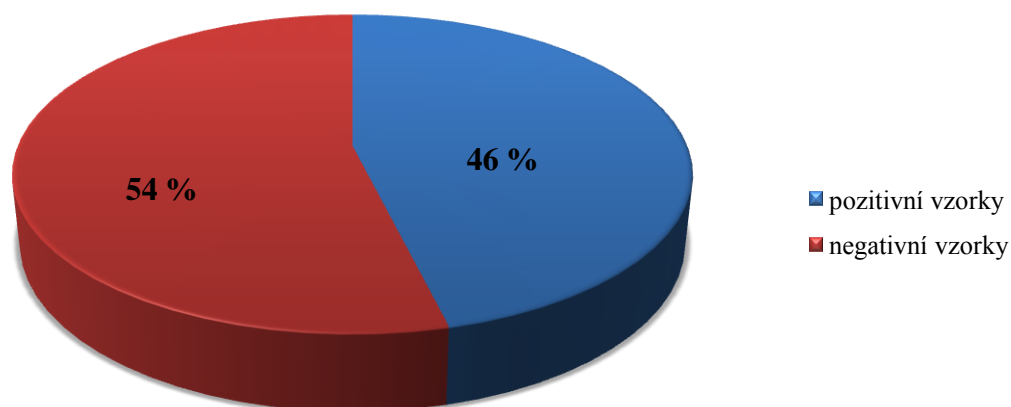
Vzorky mléka a vepřových jater se statisticky průkazně lišily od drůbežích zadních čtvrtků a drůbežích jater. Popis označený různými písmeny se statisticky liší ($p < 0,05$).

Nejvyšší zastoupení bylo zaznamenáno u drůbežích jater a drůbežích zadních čtvrtků, naopak nejnižší zastoupení u vepřových jater a mléka.



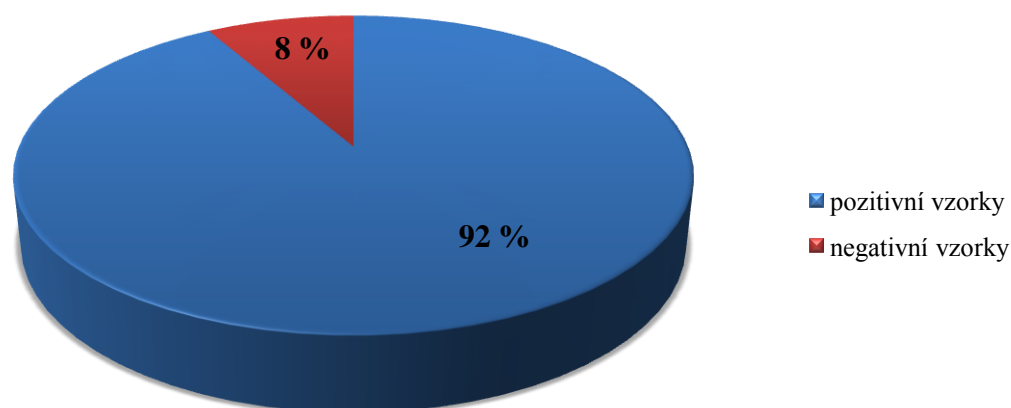
Obr. č. 9: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků drůbežích jater (uvedený v %)

Z celkového počtu 13 vzorků drůbežích jater byl zaznamenán pozitivní výskyt kampylobakterů u 12 vzorků. Negativní vzorek byl pouze 1. Z těchto výsledků vyplývá i výše uvedený obr. č. 9. Z koláčového grafu je pozorovatelné, že pozitivních vzorků bylo analyzováno 92 % a negativních vzorků 8 %.



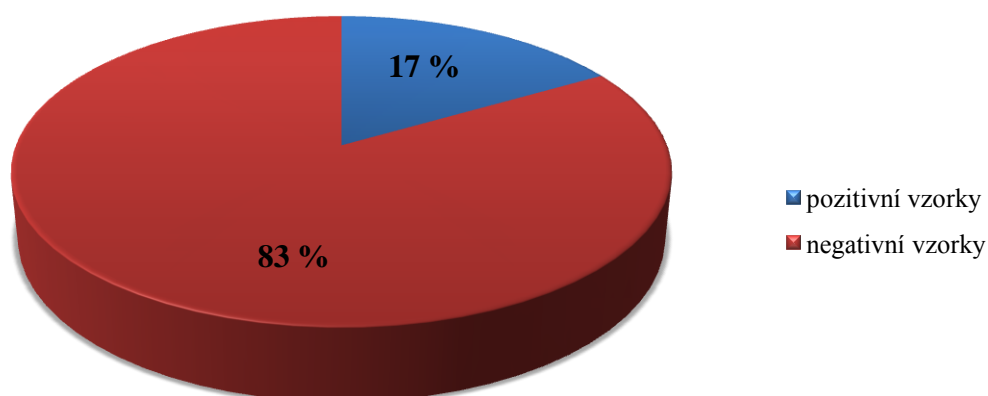
Obr. č. 10: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků vepřových jater (uvedený v %)

Z celkového počtu 13 vzorků vepřových jater bylo zjištěno 6 vzorků pozitivních a 7 vzorků negativních na přítomnost kampylobakterů. Z těchto výsledků je odvozen i výše uvedený obr. č. 10. Negativních vzorků bylo zjištěno 54 % a pozitivních 46 %.



Obr. č. 11: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků drůbežích zadních čtvrtek (uvedený v %)

Z celkového počtu 12 vzorků drůbežích zadních čtvrtků byl výskyt pozitivních vzorků 11, pouze 1 vzorek byl negativní (obr. č. 11). Při srovnání drůbežích zadních čtvrtků s drůbežími játry byl procentuální výskyt kampylobakterů stejný – 92 % pozitivních a 8 % negativních na *Campylobacter* spp.



Obr. č. 12: Pozitivní a negativní výskyt *Campylobacter* spp. u vzorků mlék
(uvedený v %)

Z celkového počtu 12 čerstvých mlék byly pouze 2 vzorky pozitivní, 10 vzorků bylo negativních při stanovení *Campylobacter* spp. Při procentuálním znázornění na obr. č. 12 bylo pozitivních vzorků 17 %, negativních vzorků 83 %. Čerstvé mléko mělo z vyšetřovaných vzorků nejmenší výskyt kampylobakterů.

5.1 Konfirmace

Charakteristické kolonie, narostlé na selektivním agaru, byly dále konfirmovány pomocí mikroskopie a testů k průkazu katalázy a oxidázy.

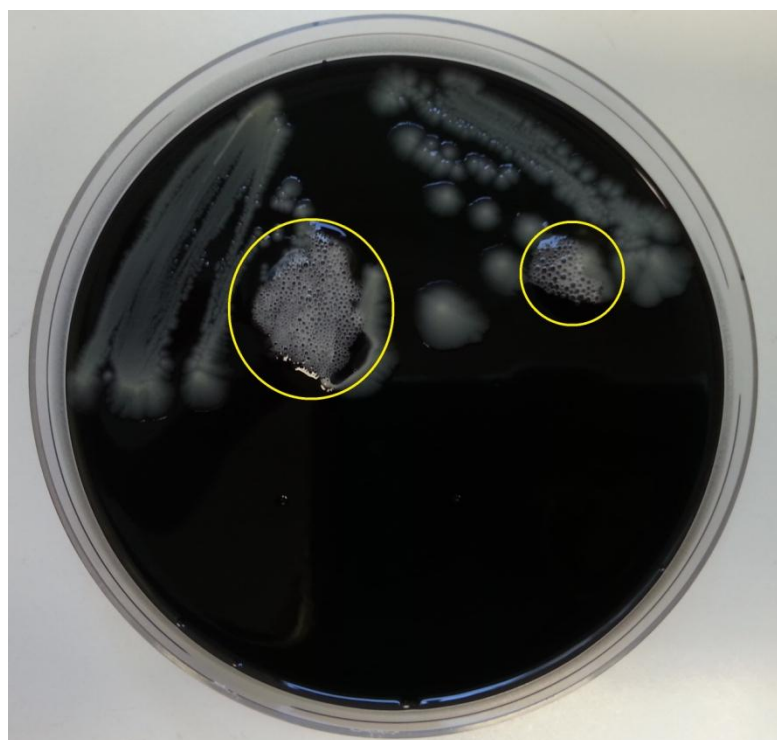
Při mikroskopování byly vidět malé gramnegativní tyčinky spirálovitého tvaru, což naznačuje přítomnost kampylobakterů v pozorovaném preparátu.

Všechny charakteristické kolonie byly testovány oxidázovým testem, kde při naočkování kolonií na předem mírně navlhčený terčík, došlo k barevné reakci, která je pozorovatelná na obr. č. 13. Okamžitá reakce s modrým zbarvením byla dalším potvrzením přítomnosti kampylobakterů.

Při průkazu enzymu katalázy se pozorovala pozitivní reakce šumění. Reakce proběhla po menší časové odezvě, ale šumění byl průkazný výsledek přítomnosti kampylobaktera viditelný na obr. č. 14.



Obr. č. 13: Pozitivní reakce k průkazu přítomnosti oxidázy



Obr. č. 14: Pozitivní reakce k průkazu přítomnosti katalázy

6 DISKUZE

Podle studie Firlieyanti et al. (2016) bylo 87 % drůbežích jater kontaminováno kampylobakterem na povrchu a 83 % bylo kontaminováno uvnitř tkáně.

Srovnáme-li výzkum Firlieyanti et al. (2016) s našim výzkumem, pak v našem pokusu byl zaznamenán vyšší výskyt pozitivních vzorků u drůbežích jater, a to 92 %.

Ve studii Moore a Madden (1998) bylo zjištěno ze vzorků tkáně jater, že asi 6 % vepřových jater bylo infikováno *Campylobacter* spp. Z toho bylo 67 % *Campylobacter coli*, 30 % *Campylobacter jejuni* a 3 % *Campylobacter lari*.

Další studie Altrock et al. (2013) se zabývala zjištěním prevalence *Campylobacter* spp. na povrchu jater u poražených prasat ze vzorků odebraných v Dolním Sasku. Bylo zjištěno, že 10 % povrchů vepřových jater bylo pozitivní na kampylobaktery. Převládajícím druhem byl *Campylobacter coli* (76 %) a následně *Campylobacter jejuni* (21 %). Antimikrobiální rezistence poukazuje, že *Campylobacter* spp. byl ze samotného prasete, nikoliv z jatek. Při srovnání izolátů z prasat a u člověka se ukázalo, že izoláty *C. coli* z prasat by měly být považovány za potenciální zdroj lidské infekce.

Při srovnání výzkumů týkajících se vepřových jater s našimi výsledky, nekorespondují. Pozitivní výskyt kampylobakterů byl u našich vzorků mnohem vyšší, a to 54 %.

Ve výzkumu Sampers et al. (2008) byla téměř polovina (48 %) vzorků kuřecího masa pozitivní na přítomnost *Campylobacter* spp. V této studii, která probíhala po celé Belgii, se prevalence pohybovala v rozmezí od 9 do 85 % u jednoho producenta. Přítomnost nebo přídavek kůže do masných polotovarů měl za následek více než dvojnásobné zvýšení pravděpodobnosti, že vzorky budou pozitivní pro kampylobaktery.

Při výzkumu Scherer et al. (2006) byly zkoumány vzorky ze stehen – vzorky z oplachu stehna a vzorky kůže. Vzorky kůže byly pozitivní na kampylobaktery v 70 % a vzorky z oplachu byly ze 77 % pozitivní na kampylobaktery.

Na úrovni Společenství byla prevalence kampylobakterů u těl brojlerů 75,8 %. Tato prevalence se značně lišila mezi jednotlivými členskými státy (European Food Safety Authority, 2010)

Ve studii Guyard-Nicodème et al. (2015) byl kampylobakter detekován

v 76 % kuřecích masných výrobků při monitoringu provedeném v průběhu roku 2009 ve Francii. *Campylobacter jejuni* byl nejčastějším druhem, způsobil kontaminaci až 64,7 % výrobků. Produkty s kůží byly více kontaminovány než produkty bez kůže.

V našem výzkumu jsme neodlišovaly vzorky drůbežího masa s kůží nebo bez kůže, tudíž výsledky se studií Guyard-Nicodème et al. (2015) nelze jednoznačně určit za nekorespondující. Avšak při porovnání s předchozími studiemi je pozitivní výskyt kampylobakterů u drůbežího masa velice obdobný.

Výsledky studie El-Zamkan a Hameed (2016) ukazují, že 24,6 % zkoumaných vzorků obsahovalo *Campylobacter* spp. *Campylobacter jejuni* byl izolován ze syrového mléka (20 %), z kareish sýru (14 %) a ze vzorků jogurtu (8 %).

Výsledky jiné studie poukazují, že 26 vzorků z celkového počtu 1629 bylo pozitivních na přítomnost kampylobaktera. Všechny izobáty byly identifikovány jako *Campylobacter jejuni*. Statisticky významný rozdíl byl zjištěn u vzorků s termofilními kampylobaktery, kde byl zjištěn významný nárůst v teplejších měsících roku (Bertasi et al., 2016).

Při srovnání výsledků studií týkajících se mléka můžeme vidět obdobné výsledky u studie El-Zamkan a Hameed (2016), kde byl kampylobakter izolován u 20 % vzorků syrového mléka, v našem případě byl pozitivní nález u 17 % vzorků syrového mléka.

Důvodem vyššího výskytu pozitivních vzorků v České republice může být spíše dobrý způsob vyhledávání a hlášení infekcí, což potvrzují i výzkumy dalších odborníků.

7 ZÁVĚR

V této diplomové práci jsem se zabývala problematikou termotolerantních druhů *Campylobacter* a jejich průkazem v různých potravinách. Při průkazu kampylobakterů ve vzorcích drůbežích a vepřových jater, drůbežích čtvrtek a mléka bylo zjištěno, že nejvyšší výskyt přítomnosti kampylobaktera je ve vzorcích drůbeže (játra a čtvrtky). Nižší výskyt byl zjištěn u vepřových jater a u syrového mléka.

Do všech zkoumaných mlékomatů bylo dodáváno mléko stejnou firmou, ale opakovaný pozitivní výskyt byl zjištěn pouze u jednoho z nich. Možným zdrojem kontaminace mohlo být právě ono dovážené mléko. Kampylobakter může přežívat při teplotách okolo 4 °C i několik týdnů, pokud je přítomna vhodná matrice (což mléko bezpochyby je) a pokud jsou přítomny mikroorganismy tvořící biofilm. Kampylobakter v takovém prostředí může přežít i účinky dezinfekčních prostředků, což by bylo možným vysvětlením, proč se vyskytuje pouze v jednom mlékomatu. Doporučením by bylo vyměnit některé součástky mlékomatu anebo provést sanitaci silněji dezinfekčními přípravky. Dalším možným řešením je provést opatření u dodavatele (častější mikrobiologická kontrola, častější a účinnější sanitace speciálními prostředky, anebo zjištění, zda nedošlo k porušení chladicího řetězce).

Možným řešením ke snížení křížové kontaminace by mohlo být sous-vide vaření. Jedná se o techniku vaření (původem z Francie), kde je potravina vakuově uzavřena v sáčku a vařena ve vodní lázni za určité teploty. Při nákupu zabaleného a připraveného vakuově zabaleného syrového masa by mohla odpadnout manipulace se syrovými produkty a eliminovalo by se riziko kontaminace. Kampylobakter není schopen růstu při teplotě nad 45 °C a nepřežívá tepelné opracování, čehož při vaření jistě dosáhneme.

Aktuálnost a závažnost tohoto problému byla projednávána i na Evropské komisi, kde bylo schváleno, že v nejbližším období bude zařazen průkaz *Campylobacter* spp. do mikrobiologických kritérií dle Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005.

Rizika pro zdraví konzumenta jsou velmi závažná. Příznaky infekce mohou být bolesti břicha, průjem nebo zvýšená teplota, ale může nastat i velmi závažná sepe. Velkou komplikací může být rozvoj Guillain-Barré poinfekčního syndromu, kde dochází k demyelinizaci periferních nervů. Následkem toho může být paralýza, která vyžaduje hospitalizaci a dlouhodobou léčbu.

Preventivními opatřeními jsou především dodržování základních hygienických návyků a dostatečná tepelná úprava zejména drůbežího masa (hlavně v domácnostech spotřebitelů, podnicích veřejného stravování a rychlých občerstveních, kdy může docházet k nedostatečnému tepelnému opracování).

8 LITERATURA

ALLOS, B. M., 2009. Campylobacter Infections. In: P. S. BRACHMAN a E. ABRUTYN, ed. *Bacterial Infections of Humans* [online]. Boston, MA: Springer US, s. 189–211 [vid. 2017-01-18]. ISBN 978-0-387-09842-5. Dostupné z: http://link.springer.com/10.1007/978-0-387-09843-2_9

ALTROCK, A. von, A. HAMEDY, R. MERLE a K. - H. WALDMANN, 2013. Campylobacter spp. – Prevalence on pig livers and antimicrobial susceptibility. *Preventive Veterinary Medicine* [online]. 109(1–2), 152–157. Dostupné z: [doi:10.1016/j.prevetmed.2012.09.010](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.010)

BARDOŇ, J., M. KOLÁŘ, R. KARPÍŠKOVÁ a K. HRICOVÁ, 2011. Prevalence of thermotolerant Campylobacter spp. in broilers at retail in the Czech Republic and their antibiotic resistance. *Food Control* [online]. 2., 22(2), 328–332. ISSN 09567135. Dostupné z: [doi:10.1016/j.foodcont.2010.08.001](https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2010.08.001)

BAROT, M. S., A. C. MOSENTHAL a V. D. BOKKENHEUSER, 1983. Location of Campylobacter jejuni in Infected Chicken Livers. *Journal of Clinical Microbiology*. 17(5), 921–922.

BERTASI, B., M. N. LOSIO, P. DAMINELLI, G. FINAZZI, A. SERRAINO, S. PIVA, F. GIACOMETTI, E. MASELLA a F. OSTANELLO, 2016. Seasonal variability of thermophilic Campylobacter spp. in raw milk sold by automatic vending machines in Lombardy Region. *Italian Journal of Food Safety* [online]. 5(3), 131–133. Dostupné z: [doi:10.4081/ijfs.2016.5848](https://doi.org/10.4081/ijfs.2016.5848)

BLACKBURN, C. de W. a P. J. MCCLURE, ed., 2002. *Foodborne pathogens: hazards, risk analysis, and control*. Boca Raton, FL : Cambridge, England: CRC Press ; Woodhead. Woodhead Publishing in food science and technology. ISBN 978-0-8493-1213-7.

BLASER, M. J., 2015. Campylobacter jejuni and Related Species. In: J. E. BENNETT, R. DOLIN a M. J. BLASER, ed. *Mandell, Douglas, and Bennett's principles and practice of infectious diseases*. Eighth edition. Philadelphia, PA: Elsevier/Saunders, s. 2485–2493. ISBN 978-1-4557-4801-3.

- BOLTON, D. J., 2015. Campylobacter virulence and survival factors. *Food Microbiology* [online]. 6., 48, 99–108. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2014.11.017
- BOURKE, B., S. T. AL RASHID, H. L. BINGHAM a V. L. CHAN, 1996. Characterization of Campylobacter upsaliensis fur and its localization in a highly conserved region of the Campylobacter genome. *Gene* [online]. 1., 183(1–2), 219–224. ISSN 03781119. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1119(96)00562-8
- BOURKE, B., V. L. CHAN a P. SHERMAN, 1998. Campylobacter upsaliensis: Waiting in the Wings. *Clinical Microbiology Reviews*. 11(3), 440–449.
- BROŽKOVÁ, I., P. MOŤKOVÁ, M. PEJCHALOVÁ a D. ŠILHA, 2016. *Laboratoře z potravinářské mikrobiologie*. Pardubice: Univerzita Pardubice: Chemicko-technologická fakulta. ISBN 978-80-7395-997-5.
- CDC, 2013. Multistate Outbreak of Campylobacter jejuni Infections Associated with Undercooked Chicken Livers - Northeastern United States, 2012. *Centers for Disease Control and Prevention*. 62(44), 874–876.
- CORNELIUS, A. J., C. NICOL a J. A. HUDSON, 2005. Campylobacter spp. in New Zealand raw sheep liver and human campylobacteriosis cases. *International Journal of Food Microbiology* [online]. (99), 99–105. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.07.016
- DEBRUYNE, L., D. GEVERS a P. VANDAMME, 2008. Taxonomy of the Family Campylobacteraceae. In: I. NACHAMKIN, Ch. M. SZYMANSKI a M. J. BLASER, ed. *Campylobacter*. 3rd ed. Washington, DC: ASM Press, s. 3–25. ISBN 978-1-55581-437-3.
- DEMNEROVÁ, K., 2016. *Laboratoř mikrobiologického zkoumání potravin*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze. ISBN 978-80-7080-957-0.

DRENTHEM, J., N. YUKI, J. MEULSTEE, E. M. MAATHUIS, P. A. VAN DOORN, G. H. VISSER, J. H. BLOK a B. C. JACOBS, 2011. Guillain-Barre syndrome subtypes related to Campylobacter infection. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* [online]. 1. 3., 82(3), 300–305. ISSN 0022-3050. Dostupné z: doi:10.1136/jnnp.2010.226639

EL-ZAMKAN, M. A. a K. G. A. HAMEED, 2016. Prevalence of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in raw milk and some dairy products. *Veterinary World* [online]. 9(10), 1147–1151. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2016.1147-1151

ENGBERG, J., 2006. Contributions to the epidemiology of Campylobacter infections. A review of clinical and microbiological studies. *Danish Medical Bulletin*. 11., 53(4), 361–389. ISSN 1603-9629.

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2010. Analysis of the baseline survey on the prevalence of Campylobacter in broiler batches and of Campylobacter and Salmonella on broiler carcasses in the EU, 2008 - Part A: Campylobacter and Salmonella prevalence estimates. *EFSA Journal* [online]. 8(3). Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2010.1503

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY a EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2010. *EFSA Journal* [online]. 3., 10(3), 2597. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2012.2597

EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY a EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011: EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2011. *EFSA Journal* [online]. 4., 11(4), 3129. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2013.3129

FERNANDEZ, R., ed., 2009a. *Microbiology Handbook: Dairy Products*. B.m.: Leatherhead Publishing. ISBN 978-1-905224-62-3.

FERNANDEZ, R., ed., 2009b. *Microbiology Handbook Meat Products*. B.m.: Leatherhead Publishing. ISBN 978-1-905224-66-1.

FIRLIEYANTI, A., P. L. CONNERTON a I. F. CONNERTON, 2016. Campylobacter and their bacteriophages from chicken liver: The prospect for phage biocontrol. *International Journal of Food Microbiology* [online]. (237), 121–127. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.026

FITZGERALD, C. a I. NACHAMKIN, 2011. Campylobacter and Arcobacter. In: J. VERSALOVIC a AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY, ed. *Manual of clinical microbiology*. 10th ed. Washington, DC: ASM Press, s. 885–899. ISBN 978-1-55581-463-2.

FORSYTHE, S. J., 2010. *The Microbiology of Safe Food*. B.m.: Blackwell Science. ISBN 978-1-4051-4005-8.

FORSYTHE, S. J. a P. R. HAYES, ed., 1998. *Food Hygiene, Microbiology and HACCP*. B.m.: Springer Science +Business Media New York. ISBN 978-1-4419-5196-0.

FUJIHARA, N., S. TAKAKURA, T. SAITO, Y. IINUMA a S. ICHIYAMA, 2006. A case of perinatal sepsis by Campylobacter fetus subsp. fetus infection successfully treated with carbapenem – case report and literature review. *Journal of Infection* [online]. 11., 53(5), e199–e202. ISSN 01634453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinf.2006.01.009

GHARST, G., O. A. OYARZABAL a S. K. HUSSAIN, 2013. Review of current methodologies to isolate and identify Campylobacter spp. from foods. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 10., 95(1), 84–92. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2013.07.014

GOERING, R. V., H. M. DOCKRELL, M. A. ZUCKERMAN, I. M. ROITT, P. L. CHIODINI, J. JULÁK, J. BOBEK, R. ČERMÁKOVÁ, K. HOLADA, Z. MĚLKOVÁ, T. MOŠKO, J. NOVÁK, L. PROKEŠOVÁ a J. SUCHANOVÁ, 2016. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. ISBN 978-80-7387-928-0.

GÖRNER, F. a L. VALÍK, 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin: princípy mikrobiológie požívatin, potravinársky významné mikroorganizmy a ich skupiny, mikrobiológia potravinárskych výrob, ochorenia mikrobiálneho pôvodu, ktorých zárodky sú prenášané požívatinami*. Bratislava: Malé Centrum. ISBN 80-967064-9-7.

GREENWOOD, D., ed., 2012. *Medical microbiology: a guide to microbial infections: pathogenesis, immunity, laboratory diagnosis and control*. 18th ed. Edinburgh ; New York: Churchill Livingstone. ISBN 978-0-7020-4089-4.

GUYARD-NICODÈME, M., K. RIVOAL, E. HOUARD, V. ROSE, S. QUESNE, G. MOURAND, S. ROUXEL, I. KEMPF, L. GUILLIER, F. GAUCHARD a M. CHEMALY, 2015. Prevalence and characterization of *Campylobacter jejuni* from chicken meat sold in French retail outlets. *International Journal of Food Microbiology* [online]. (203), 8–14. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.02.013

HIMEDIA, 2017. Oxidase discs. *Himedia Technical Data* [online]. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/DD018.pdf>

HOCHÉL, I., 2009. Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. *Chemické listy*. (103), 814–822.

HU, L. a D. J. KOPECKO, 2003. *Campylobacter* species. In: M. D. MILIOTIS a J. W. BIER, ed. *International handbook of foodborne pathogens* [online]. New York: M. Dekker, Food science and technology, 125. ISBN 978-0-8247-0685-2. Dostupné z: <https://eddymercado.files.wordpress.com/2012/11/manual-internacional-de-contaminacion-patogenica-de-alimentos.pdf>

HUANG, H., B. W. BROOKS, R. LOWMAN a C. D. CARRILLO, 2015. *Campylobacter* species in animal, food, and environmental sources, and relevant testing programs in Canada. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 61(10), 701–721. Dostupné z: doi:10.1139/cjm-2014-0770

HUMPHREY, T., S. O'BRIEN a M. MADSEN, 2007. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: A food production perspective. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 7., 117(3), 237–257. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2007.01.006

HUTCHINSON, M., D. HARRISON, I. RICHARDSON a M. TCHÓRZEWSKA, 2015. A Method for the Preparation of Chicken Liver Pâté that Reliably Destroys Campylobacters. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. (12), 4652–4669. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph120504652

JULÁK, J., 2015. *Úvod do lékařské bakteriologie*. ISBN 978-80-246-3210-0.

JUNTUNEN, P., H. HEISKA, S. OLKKOLA, A.-L. MYLLYNIEMI a M.-L. HÄNNINEN, 2010. Antimicrobial resistance in *Campylobacter coli* selected by tylosin treatment at a pig farm. *Veterinary Microbiology* [online]. 11., 146(1–2), 90–97. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2010.04.027

KALHOTKA, L. a M. TESAŘOVÁ, 2014. *Potravinářská mikrobiologie pro Zahradnickou fakultu*. Brno: Mendelova univerzita v Brně. ISBN 978-80-7509-017-1.

KAMENÍK, J., 2014. *Maso jako potravina: produkce, složení a vlastnosti masa*. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita : Časopis Maso. ISBN 978-80-7305-673-5.

KAPPERUD, G., G. ESPELAND, E. WAHL, A. WALDE, H. HERIKSTAD, S. GUSTAVSEN, I. TVEIT, O. NATÅS, L. BEVANGER a A. DIGRANES, 2003. Factors Associated with Increased and Decreased Risk of *Campylobacter* Infection: A Prospective Case-Control Study in Norway. *American Journal of Epidemiology* [online]. 158(3), 234–242. Dostupné z: doi:10.1093/aje/kwg139

KARSHIMA, S. N. a A. A. BOBBO, 2016. Isolation and PCR Characterisation of Thermophilic *Campylobacter* Species in Dogs Presented to Selected Veterinary Clinics in Jos, Nigeria. *Alexandria Journal of Veterinary Sciences* [online]. 50(1), 70–77. Dostupné z: doi:10.5455/ajvs.221754

KEENER, K.M., M.P. BASHOR, P.A. CURTIS, B.W. SHELDON a S. KATHARIOU, 2004. Comprehensive Review of *Campylobacter* and Poultry Processing. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* [online]. 4., 3(2), 105–116. ISSN 1541-4337, 1541-4337. Dostupné z: doi:10.1111/j.1541-4337.2004.tb00060.x

KLENA, J. D., C. T. PARKER, K. KNIBB, J. C. IBBITT, P. M. L. DEVANE, S. T. HORN, W. G. MILLER a M. E. KONKEL, 2004. Differentiation of *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, and *Campylobacter upsaliensis* by a Multiplex PCR Developed from the Nucleotide Sequence of the Lipid A Gene *lpxA*. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 42(12), 5549–5557. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.42.12.5549–5557.2004

LABM, 2017a. *Campylobacter Blood Free Selective Medium (Modified CCDA)*. *LabM a Neogen Company* [online]. Dostupné z: <http://www.labm.com/products/campylobacter-blood-free-selective-medium-modified-ccda.asp>

LABM, 2017b. *Campylobacter Enrichment Broth*. *LabM a Neogen Company* [online]. Dostupné z: <http://www.labm.com/products/campylobacter-enrichment-broth.asp>

LUCEY, B., D. CROWLEY, P. MOLONEY, B. CRYAN, M. DALY, F. O'HALLORAN, E. J. THRELFALL a S. FANNING, 2000. Integronlike Structures in *Campylobacter* spp. of Human and Animal Origin. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 6(1), 51–55. Dostupné z: doi:10.3201/eid0601.000109

MANDRELL, R. E. a W. G. MILLER, 2006. *Campylobacter*. In: Y. MOTARJEMI a M. ADAMS, ed. 1. *Emerging Foodborne Pathogens*: Woodhead Publishing, s. 476–521. ISBN 978-1-84569-139-4.

MAUNDER, C. L., Z. F. REYNOLDS, L. PEACOCK, E. J. HALL, M.J. DAY a T. A. COGAN, 2016. *Campylobacter* Species and Neutrophilic Inflammatory Bowel Disease in Cats. *Journal of Veterinary Internal Medicine* [online]. (30), 996–1001. Dostupné z: doi:10.1111/jvim.14374

MIKEL, P., I. BARTEJSOVÁ a P. KRÁLÍK, 2015. *Detekce a kvantifikace Campylobacter jejuni a Campylobacter coli pomocí metody qPCR*. ISBN 978-80-86895-60-4.

MITTAL, S., 2017. Dr. Shweta Mital. *Oxidase test* [online]. Dostupné z: <https://drshwetamittal.wordpress.com/2015/07/10/oxidase-test/>

MOORE, J. E., D. CORCORAN, J. S. G. DOOLEY, S. FANNING, B. LUCEY, M. MATSUDA, D. A. MCDOWELL, F. MÉGRAUD, B. CHERIE MILLAR, R. O'MAHONY, L. O'RIORDAN, M. O'ROURKE, J. R. RAO, P. J. ROONEY, A. SAILS a P. WHYTE, 2005. *Campylobacter*. *Veterinary Research* [online]. 5., 36(3), 351–382. ISSN 0928-4249, 1297-9716. Dostupné z: doi:10.1051/vetres:2005012

MOORE, J. E. a R. H. MADDEN, 1998. Occurrence of Thermophilic *Campylobacter* spp. in Porcine Liver in Northern Ireland. *Journal of Food Protection* [online]. 61(4), 409–413. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-61.4.409

NGULUKUN, S. S., 2016. Taxonomy and physiological characteristics of *Campylobacter* spp. In: G. KLEIN, ed. *Campylobacter: Features, Detection, and Prevention of Foodborne Disease*. B.m.: Academic Press, s. 41–60. ISBN 978-0-12-803623-5.

OMURTAG, I., P. PAULSEN, F. HILBERT a F.J. M. SMULDERS, 2013. The risk of transfer of foodborne bacterial hazards in Turkey through the consumption of meat; risk ranking of muscle foods with the potential to transfer *Campylobacter* spp. *Food Security* [online]. 5(1), 117–127. Dostupné z: doi:10.1007/s12571-012-0230-z

ON, S. L.W., 2013. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *Journal of Microbiological Methods* [online]. 10., 95(1), 3–7. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2013.06.011

O'REILLY, L. C., T. J. J. INGLIS, L. UNICOMB a THE AUSTRALIAN CAMPYLOBACTER SUBTYPING STUDY GROUP, 2006. Australian multicentre comparison of subtyping methods for the investigation of *Campylobacter* infection. *Epidemiology and Infection* [online]. 8., 134(04), 768. ISSN 0950-2688, 1469-4409. Dostupné z: doi:10.1017/S0950268805005777

PARKHILL, J., B. W. WREN, K. MUNGALL, J. M. KETLEY, C. CHURCHER, D. BASHAM, T. CHILLINGWORTH, R. M. DAVIES, T. FELTWELL, S. HOLROYD, K. JAGELS, A. V. KARLYSHEV, S. MOULE, M. J. PALLAN, C. W. PENN, M. A. QUAIL, M. A. RAJANDREAM, K. M. RUTHERFORD, A. H. VAN VLIET, S. WHITEHEAD a B. G. BARRELL, 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* [online]. 10. 2., 403(6770), 665–668. ISSN 0028-0836. Dostupné z: doi:10.1038/35001088

PRESCOTT, L. M., J. P. HARLEY a D. A. KLEIN, 2005. *Microbiology*. 6th ed. Dubuque, IA: McGraw-Hill Higher Education. ISBN 978-0-07-255678-0.

SAMPERS, I., I. HABIB, D. BERKVEN, A. DUMOULIN, L. de ZUTTER a M. UYETTENDAELE, 2008. Processing practices contributing to *Campylobacter* contamination in Belgian chicken meat preparations. *International Journal of Food Microbiology* [online]. (128), 297–303. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.08.024

SEARS, A., M. G. BAKER, N. WILSON, J. MARSHALL, P. MUELLNER, D. M. CAMPBELL, R. J. LAKE a N. P. FRENCH, 2011. Marked *Campylobacteriosis* Decline after Interventions Aimed at Poultry, New Zealand. *Emerging Infectious Diseases* [online]. 6., 17(6), 1007–1015. ISSN 1080-6040, 1080-6059. Dostupné z: doi:10.3201/eid1706.101272

SCHERER, K., E. BARTELT, C. SOMMERFELD a G. HILDEBRANDT, 2006. Comparison of different sampling techniques and enumeration methods for the isolation and quantification of *Campylobacter* spp. in raw retail chicken legs. *International Journal of Food Microbiology* [online]. (108), 115–119. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.08.031

SCHINDLER, Jiří, 2014. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada. ISBN 978-80-247-4771-2.

SNELLING, W.J., J.E. MOORE a J.S.G. DOOLEY, 2005. The colonization of broilers with *Campylobacter*. *World's Poultry Science Journal* [online]. 12., 61(04), 655–662. ISSN 0043-9339, 1743-4777. Dostupné z: doi:10.1079/WPS200577

SOLOMON, E.B. a D.G. HOOVER, 2004. Inactivation of *Campylobacter jejuni* by high hydrostatic pressure. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 6., 38(6), 505–509. ISSN 0266-8254, 1365-2673. Dostupné z: doi:10.1111/j.1472-765X.2004.01527.x

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2017a. Infekce v ČR - EPIDAT. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2006-2015 - absolutně* [online]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2006-2015-absolutne>

STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2017b. Infekce v ČR - EPIDAT. *Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2006-2015 - relativně* [online]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2006-2015-relativne>

STEINHAUSER, L. a J. BENEŠ, 1995. *Hygiena a technologie masa*. Brno: LAST. ISBN 978-80-900260-4-9.

STEINHAUSEROVÁ, I., K. FOJTÍKOVÁ a J. ČEŠKOVÁ, 2001. Problémy s izolací a identifikací termofilních *Campylobacter* sp. *Veterinářství*. (51), 51–54.

STICHT-GROH, V., 1982. *Campylobacter* in healthy slaughter pigs: a possible source of infection for man. *The Veterinary Record*. 30. 1., 110(5), 104–106. ISSN 0042-4900.

TABOADA, E. N., C. G. CLARK, E. L. SPROSTON a C. D. CARRILLO, 2013. Current methods for molecular typing of *Campylobacter* species. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 10., 95(1), 24–31. ISSN 01677012. Dostupné z: doi:10.1016/j.mimet.2013.07.007

TAM, C, 2003. *Campylobacter coli*—an important foodborne pathogen. *Journal of Infection* [online]. 7., 47(1), 28–32. ISSN 01634453. Dostupné z: doi:10.1016/S0163-4453(03)00042-2

TELMEDS.ORG, 2017. Katalázový test. *Telmeds.org* [online]. Dostupné z: <http://www.telmeds.org/atlas/bacteriologia/cocos-gram-positivos-piogenos-de-importancia-medica/prueba-de-catalasa-distinguir-staphylococcus-de-streptococcus/>

VONDRÁKOVÁ, L., J. PAZLAROVÁ a K. DEMNEROVÁ, 2014. Detection, identification and quantification of *Campylobacter jejuni*, *coli* and *lari* in food matrices all at once using multiplex qPCR. *Gut Pathogens* [online]. 6(1), 12. ISSN 1757-4749. Dostupné z: doi:10.1186/1757-4749-6-12

VOTAVA, M., 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-00-9.

VOTAVA, M., 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. Brno: Neptun. ISBN 978-80-86850-04-7.

WEESE, J. S., 2011. Bacterial Enteritis in Dogs and Cats: Diagnosis, Therapy, and Zoonotic Potential. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice* [online]. 3., 41(2), 287–309. ISSN 01955616. Dostupné z: doi:10.1016/j.cvsm.2010.12.005

WHILEY, H., B. VAN DEN AKKER, S. GIGLIO a R. BENTHAM, 2013. The Role of Environmental Reservoirs in Human Campylobacteriosis. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 8. 11., 10(11), 5886–5907. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph10115886

9 SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. č. 1: Výskyt kampylobakterií v letech 2006 - 2015, data převzata ze Státní zdravotní ústav 2017a).....	19
Obr. č. 2: Výskyt kampylobakterií na 100 000 obyvatel v letech 2006 – 2015 (relativně), data převzata ze Státní zdravotní ústav 2017b	19
Obr. č. 3: Schématický postup průkazu kampylobakterů (Brožková et al. 2016)	31
Obr. č. 4: Campylobacter pomnožovací bujón (LabM 2017b).....	39
Obr. č. 5: Campylobacter selektivní agar (LabM 2017a)	40
Obr. č. 6: Pozitivní a negativní výsledek reakce oxidázového testu (Mittal 2017)	41
Obr. č. 7: Pozitivní a negativní reakce při průkazu katalázy (Telmeds.org 2017)	42
Obr. č. 8: Pozitivní výskyt Campylobacter spp. u jednotlivých vzorků v %	44
Obr. č. 9: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků drůbežích jater (uvedený v %).....	45
Obr. č. 10: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků vepřových jater (uvedený v %).....	46
Obr. č. 11: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků drůbežích zadních čtvrtků (uvedený v %).....	46
Obr. č. 12: Pozitivní a negativní výskyt Campylobacter spp. u vzorků mlék	47
Obr. č. 13: Pozitivní reakce k průkazu přítomnosti oxidázy	48
Obr. č. 14: Pozitivní reakce k průkazu přítomnosti katalázy.....	48

10 SEZNAM TABULEK

Tab. č. 1: Taxonomické zařazení (Kameník 2014).....	12
Tab. č. 2: Konfirmace a hodnocení výsledků (Brožková et al. 2016)	31
Tab. č. 3: Složení <i>Campylobacter</i> pomnožovacího bujónu	37
Tab. č. 4: Složení suplementu	38
Tab. č. 5: Složení suplementu	40
Tab. č. 6: Přehled vyšetřovaných vzorků.....	43

11 SEZNAM ZKRATEK

AFLP	metoda polymorfizmu délky amplifikovaných fragmentů
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CDTs	cytholethal distending toxins; cytoletální distendní toxiny
EU	Evropská unie
EFSA	Evropský úřad pro bezpečnost potravin
GBS	Guillain-Barré syndrom
MALDI-TOF MS	matrix-assisted laser desorption ionisation-time of flight mass spectrometry
MFS	Miller Fisher syndrom
mCCDA	modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem
MLST	multisekvenční lokusová typizace
ORL	otorinolaryngologie (ušní, nosní, krční)
CO ₂	oxid uhličitý
real-time PCR	polymerázová řetězová reakce v reálném čase
PCR	polymerázová řetězová reakce
VNBC	viable but non-culturable; životaschopné buňky, ale neschopné vytvořit kulturu