



Zdravotně  
sociální fakulta  
Faculty of Health  
and Social Studies

Jihočeská univerzita  
v Českých Budějovicích  
University of South Bohemia  
in České Budějovice

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Zdravotně sociální fakulta

Katedra laboratorních metod a informačních systémů

Bakalářská práce

Výskyt, diagnostika a antibiotická rezistence  
*Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*

Vypracoval: Lukáš Holer

Vedoucí práce: MUDr. Magdalena Horníková

České Budějovice 2015

## Abstrakt

*Campylobacter spp.* je jednou z nejrozšířenějších bakterií, které jsou původcem alimentárních otrav. První zmínka o těchto bakteriích byla publikována v roce 1886 Theodorem Escherichiem. Zástupci rodu byli dříve řazeni do rodu *Vibrio*. Až v roce 1973 byla vypracována komplexní taxonomie rodu *Campylobacter* a byly definovány čtyři nejdůležitější druhy: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* a *C. sputorum*.

Zástupci rodu *Campylobacter* jsou charakterizováni jako gramnegativní, mikroaerofilní, malé zakřivené až spirálkovitě zahnuté tyčinky s typickým vývrtkovitým pohybem pomocí polárně umístěných bičíků. *Campylobacter* vyžaduje v atmosféře přítomnost 3 – 5 % O<sub>2</sub> a 3 – 10 % CO<sub>2</sub>. Je citlivý zejména k vyšší koncentraci kyslíku a v aerobní atmosféře rychle hyne.

Hlavním rezervoárem *Campylobacter spp.* je zažívací trakt hospodářských zvířat (*C. jejuni* a *C. coli*), domácích mazlíčků (*C. upsaliensis*), ptáků (u racků *C. lari*) i člověka. Je součástí střevní mikroflóry, odkud se dostává do prostředí porážek. Metabolismus rodu *Campylobacter* je respiratorního typu. Všechny druhy mají pozitivní oxidázovou a katalázovou reakci. To se velmi dobře využívá k samotné diagnostice. Rozlišuje se celkem 175 serotypů.

Bakterie kolonizuje střevo pomocí chemotaxe. Pokud přežije, produkuje toxiny. Hlavním toxinem *Campylobacter spp.* je CDT (cytolethal distending toxin). Další toxiny produkované *Campylobacter spp.* jsou: enterotoxin podobný choleroému toxinu (Shiga-like toxin) a hepatotoxin.

Mezi nejčastější onemocnění patří kampylobakteriózy. Nejčastějším projevem je lehký nebo střední vodnatý průjem. Léčba spočívá převážně v rehydrataci a podávání solných roztoků s glukózou. Komplikací tohoto onemocnění je Guillain-Barré syndrom. Jen v nejzávažnějších případech jsou nasazována antibiotika na bázi makrolidů, tetracyklinů nebo chinolonů.

Základem diagnostiky zůstává přímý průkaz kultivací, ke které se používá nejčastěji CSM agar. Provádí se široká škála metod jako biochemické, genetické, imunochemické, chemotaxonomické profilování mastných kyselin, metody gelové elektroforézy a měření molekulové hmotnosti druhově specifických proteinových biomarkerů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF.

Tématem této práce bylo zjištění výskytu a porovnání způsobů diagnostiky na Bakteriologickém oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. Dále pak stanovení citlivosti mikrobů k vybraným antibiotikům.

Na pracovišti Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. se diagnóza určuje ze vzorku stolice. K diagnostice se zde používá přímého průkazu kultivací a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

V roce 2014 bylo zachyceno 296 pozitivních nálezů kmene *Campylobacter jejuni*. Z celkového počtu bylo 55 % mužů a 45 % žen. Nejčastější záchyt byl v měsíci červenci. Ve stejném roce bylo zachyceno 18 pozitivních nálezů kmene *Campylobacter coli*. Z celkového počtu bylo 39 % mužů a 61 % žen. Nejčastější záchyt byl v měsíci srpnu.

U všech kmenů *Campylobacter jejuni* byla stanovena citlivost k vybraným antibiotikům. 72% kmenů bylo rezistentních k cirpofloxacinu, 34% kmenů k doxycylinu. 100% citlivost vykazuje clarithromycin. Také u všech kmenů *Campylobacter coli* byla stanovena citlivost k vybraným antibiotikům. 72% kmenů bylo rezistentních k cirpofloxacinu, 50% kmenů k doxycylinu. Ke clarithromycinu je opět 100% citlivost.

**Klíčová slova:** mikroaerofilní bakterie, CSM agar, hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF, *Campylobacter*

## Abstract

*Campylobacter spp.* are one of the most spreaded bacteria that causes food poisoning. The very first mention of these bacterium was published in 1886 by Theodore Escherichia. Members of the genus were formerly classified in the genus *Vibrio*. Taxonomy of the genus *Campylobacter* was developed in 1973 and four most important species were defined: *C. fetus* , *C. coli* , *C. jejuni* and *C. sputorum*.

Members of the genus *Campylobacter* are characterized as Gram-negative, microaerophilic, curved or spiral small curved rods with a typical motion that is caused by polar located flagella. *Campylobacter* requires the presence of 3-5 % O<sub>2</sub> and 3-10 % CO<sub>2</sub>. It is particularly sensitive to high presence of oxygen in an aerobic atmosphere and quickly dies.

The main reservoir of *Campylobacter spp.* is the digestive tract of animals (*C. jejuni* and *C. coli*), pets (*C. upsaliensis*), birds ( seagulls at *C. lari*) and humans. It is part of the intestinal microflora, from where it enters the environment defeats. Metabolism of the genus *Campylobacter* is a bacterial respiratory type. All species have positive oxidase and catalase reaction. It can be very well used for actual diagnosis. Around 175 serotypes are distinguished.

Bacteria colonize the gut using chemotaxis. If it survives, it produces toxins. The main toxine of *Campylobacter spp.* is CDT (cytolethal distending toxin). Other toxins produced by *Campylobacter spp.* are: cholera-like enterotoxin (Shiga-like toxin) and hepatotoxin.

The most common diseases include Campylobacteriosis. The most common manifestation is light or moderate diarrhea. Treatment consists mainly of dehydration and administration of saline solutions with glucose. A serious complication of the disease is Guillain-Barré syndrome. Only in the worst cases, antibiotics are deployed based on macrolides, tetracyclines or quinolones.

Basic of diagnostic method is direct proof by cultivation, for which is preferably used CSM agar. New methods are carried out such as biochemical, genetic, immunochemical, chemotaxonomic profiling fatty acids, methods of gel electrophoresis and measuring the molecular weight of the species-specific protein biomarkers by mass spectrometry MALDI-TOF .

The topic of this work was to determine the incidence and comparison of diagnostic methods for the Bacteriological department of Nemocnice České Budějovice, a.s., and furthermore susceptibility to antibiotics.

The diagnosis in the workplace of Bacteriological department of Nemocnice České Budějovice, a.s. is determined from a stool sample, The diagnosis uses direct proof by cultivation and mass spectrometry MALDI- TOF.

It was detected 296 positive findings of *Campylobacter jejuni* strain in 2014 of the total, 55 % of men and 45 % women. The most common seizure was in the month of July. It was detected 18 positive findings of *Campylobacter coli* strain in the same year of the total, 39 % of men and 61 % of women. The most common seizure was in the month of August.

Sensitivity to selected antibiotics was determined for 296 strains of *Campylobacter jejuni*. 72% of the strains were resistant to ciprofloxacin , 34% of the strains to doxycylin. Clarithromycin evince 100% susceptibility. Sensitivity to selected antibiotics was determined for 296 strains of *Campylobacter coli*. 72% of the strains were resistant to ciprofloxacin , 50% of the strains to doxycylin. Clarithromycin evince 100% susceptibility.

**Key words:** microaerofilic bacterium, CSM agar, mass spectrometry MALDI-TOF, *Campylobacter*

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním svého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 10. 8. 2015 .....

(jméno a příjmení)

## **Poděkování**

Rád bych poděkoval vedoucí mé bakalářské práce MUDr. Magdaleně Horníkové za odborné vedení, cenné rady, trpělivost a pomoc při zpracování této práce. Děkuji také Mgr. Josefu Jandovi za pomoc při pravopisné a gramatické kontrole práce.

# Obsah

1.	Úvod.....	1
2.	Teoretická část .....	3
2.1	Charakteristika rodu <i>Campylobacter</i> .....	3
2.1.1	Taxonomie.....	3
2.1.2	Morfologie.....	4
2.1.3	Stavba buněčné stěny .....	4
2.2	Specifika <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>Campylobacter coli</i> .....	5
2.2.1	Výskyt .....	6
2.2.2	Metabolismus .....	7
2.2.3	Genetika.....	7
2.2.4	Faktory virulence.....	8
2.2.5	Epidemiologie .....	10
2.2.6	Patogeneze a patofyziologie.....	11
2.2.7	Kampylobakterióza .....	12
2.2.8	Diagnostika infekce <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>Campylobacter coli</i> ..	14
2.2.9	Terapie infekce <i>Campylobacter jejuni</i> a <i>Campylobacter coli</i> .....	20
2.2.10	Antibiotická rezistence a její mechanismy .....	23
3.	Metodika .....	25
3.1	Hypotézy .....	25
3.2	Vymezení spádové oblasti.....	25
3.3	Charakteristika souboru .....	26



3.4	Prelaboratorní část diagnostiky .....	26
3.5	Laboratorní část diagnostiky .....	28
3.6	Postlaboratorní část diagnostiky .....	33
4.	Výsledky .....	34
5.	Diskuze .....	44
6.	Závěr .....	47
7.	Seznam použité literatury .....	48

## Seznam použitých zkratek

ATB – antibiotikum

CDT – cytolethal distending toxin

CLA - clarithromycin

CNS – centrální nervová soustava

CIP – ciprofloxacin

CSM – Charcoal-Based Selective Medium

DNA – deoxyribonucleic acid

DOX – doxycyklin

GBS – Guillain-Barré syndrom

MALDI-TOF – Matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight

PCR – polymerase chain reaction

rRNA – ribosomal ribonucleic acid

tRNA – transfer ribonucleic acid

# 1. Úvod

*Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsou jedny z nejrozšířenějších bakterií, které jsou původcem alimentárních otrav. Již před několika lety britští vědci stanovili její úplný genetický kód, což umožnilo zjistit mechanismus virulence této bakterie a strategii její kontroly.

Oba tyto druhy jsou od sedmdesátých let považovány za nebezpečné potravinářské patogeny a patrně jsou původci většího množství případů střevních onemocnění ve srovnání se známější *Salmonellou*. Původně byl *Campylobacter* považován za neškodný mikroorganismus žijící v zažívacím traktu některých živočichů a dosud není objasněna skutečnost, že je často přítomen v zažívacím traktu ptáků, aniž by působil jakékoliv potíže, zatímco u lidí je závažným patogenem. K infekci stačí minimální množství bakterií a v posledních dvaceti letech se alimentární otravy způsobené *Campylobacter spp.* vyskytovaly velmi často. Zdravé osoby nejsou nositeli tohoto patogena a nedochází k přenosu z infikovaných osob na osoby zdravé. Prudký nárůst kampylobakterióz byl zaznamenán od konce 90. let minulého století až do roku 2005 také v České republice.

Kampylobakterie byly původně popsány jako zvířecí patogeny a byly zařazeny do rodu *Vibrio*. Vůbec první zmínka o rodu *Campylobacter* byla publikována v roce 1886 Theodorem Escherichem, který pozoroval a popsal spirálovitě tvarovanou bakterii u dětí s cholerou. V roce 1906 dva britští veterináři popsali velké množství „zvláštních organismů“ u vzorku stolice z ovce. V roce 1947 Vinzent a spol. prokázali patogenitu těchto nových vibrií tím, že úspěšně izolovali *V. fetus* z krve gravidních žen, postižených dlouhodobým horečnatým onemocněním s následným spontánním potratem. O deset let později Kingová našla v krvi pacienta mikroorganismus, který morfoloicky odpovídal druhu *V. fetus*, avšak který se odlišoval svými biochemickými a antigenními vlastnostmi. Toto nové species označila termínem „related vibrio“.

Počet infekcí prokazatelně způsobených touto bakterií byl vzhledem k nedostatečně účinným izolačním technikám až do začátku 70. let nízký. V roce 1963, na základě stanovení obsahu guaninu a cytosinu v molekule DNA a podle biochemických charakteristik *V. fetus* a *V. tubulus*, se začlenily do nového rodu *Campylobacter*. O deset let později byla vypracována komplexní taxonomie tohoto rodu a byly definovány čtyři nejčastější druhy: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* a *C. sputorum*.

Téma této bakalářské práce jsem si zvolil z důvodu narůstající četnosti střevních onemocnění vůbec. Širší veřejností není tento problém brán na větší zřetel. Přitom jsou *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jako původci kampylobakterióz nejčastější příčinou bakteriálních střevních infekcí v České republice a nabývají stále většího významu. Nejrizikovější skupinou infekce jsou děti a mladiství do 18 let věku. Hlavními cíli této práce jsou diagnostika *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Dále je to porovnání metod identifikace těchto mikrobů, zmapování jejich výskytu u člověka během roku a stanovení citlivosti na antibiotika. Veškerá zpracování jsem prováděl na Bakteriologickém oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s.

## 2. Teoretická část

### 2.1 Charakteristika rodu *Campylobacter*

Do rodu *Campylobacter* spadá široká skupina mikroaerofilních a kapnofilních bakterií majících velmi široké hostitelské spektrum. Nalézají se v zažívacím traktu zvířat, ptáků i člověka. Patří do tzv. termofilních, podmíněně patogenních bakterií. Termofilní kampylobakteři jsou známí jako významní původci alimentárních onemocnění teprve posledních 20 let. Roční incidence onemocnění způsobených tímto rodem se v humánní populaci pohybuje kolem 210 případů na 100 000 obyvatel. K termofilním kampylobakterům, kteří mají schopnost růstu při 42 °C, patří *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter upsaliensis* a *Campylobacter lari* (Bednář a kol., 1996).

#### 2.1.1 Taxonomie

Doména:	<i>Bacteria</i>
Kmen:	<i>Proteobacteria</i>
Třída:	<i>Epsilon Proteobacteria</i>
Řád:	<i>Campylobacterales</i>
Čeleď:	<i>Campylobacteraceae</i>
Rod:	<i>Campylobacter</i>

### 2.1.2 Morfologie

Zástupci rodu *Campylobacter* jsou charakterizováni jako mikroaerofilní, malé zakřivené až spirálkovitě zahnuté tyčinky s typickým vývrtkovitým pohybem, pomocí polárně umístěných bičíků. Za nevhodných podmínek přecházejí v kokovité útvary. Jsou široké 0,2 – 0,8  $\mu\text{m}$  a dlouhé přibližně 0,5 – 0,6  $\mu\text{m}$ . Takový tvar bakterie je příčinou snadného proniknutí vrstvou primárních bariér hostitele. Patří do skupiny gramnegativních bakterií (Versalovic, 2011).

### 2.1.3 Stavba buněčné stěny

Jak bylo zmíněné výše, *Campylobacter* patří do skupiny gramnegativních bakterií. Buněčná stěna této skupiny bakterií je mnohem složitější nežli bakterií grampozitivních. Je složena ze zevní membrány a pod ní umístěného peptidoglykanu. Jeho vrstva je tenká, a tím tedy i celá buněčná stěna – kolem 15 nm. Obsahuje kyselinu diaminopimelovou a je součástí periplasmatického prostoru nad cytoplasmatickou membránou.

Zevní membrána je složena z fosfolipidů, lipopolysacharidů a proteinů. Z fosfolipidů je tvořena dvojitá permeabilní membrána obsahující kanálky – poriny, složené z bílkovin. Poriny usnadňují transport živin do periplasmatického prostoru. Pevné spojení peptidoglykanu a zevní membrány zajišťují lipoproteiny. V zevní vrstvě je tedy obsažen lipopolysacharid endotoxin, zakotvený svou lipidovou částí. Polysacharidová část je vně zevní vrstvy a svým složením určuje druh či serotyp bakterie. Zevní membrána je nepropustná pro molekuly některých barviv nebo antibiotik.

V periplasmatickém prostoru se nachází řada enzymů mající odlišné specifické funkce. Bud' štěpí a inaktivují živiny, nebo mohou inaktivovat některé typy antibiotik, jako např. beta-laktamy.

Bakterie žijí v prostředí pro ně hypotonickém. Tím pádem v jejich nepřírodném hypertonicném prostředí dochází k plazmolýze. Působením lysozymu vznikají okrouhlé útvary ohraničené cytoplasmatickou membránou sféroplasty. Sféroplasty mají na svém povrchu zbytky buněčné stěny (Votava, 2006).

## **2.2 Specifika *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli***

Tito velmi úspěšní původci onemocnění z potravin mají přísné nároky na své růstové podmínky, proto se běžně v potravinách nemnoží, pouze přežívají. *Campylobacter* je mikroaerofilní a vyžaduje v atmosféře přítomnost 3 – 5 % O<sub>2</sub> a 3 – 10 % CO<sub>2</sub>. Je citlivý zejména k vyšší přítomnosti kyslíku a v aerobní atmosféře rychle hyne (Votava, 2006).

Teplotní optimum pro skupinu termofilních kampylobakterů je 42 °C, nerostou pod 30 °C a nad 45 °C. *Campylobacter* je citlivý k tepelnému opracování (D<sub>55</sub> = 1 min) a nepřežívá pasteraci. Chladírenské teploty 4 °C mohou redukovat počty bakterií (např. v másle přežívá při 5 °C po dobu 13 dnů). Mražením jsou počty redukovány, nikoliv eliminovány.

Růst může být dále limitován koncentrací NaCl (2 %), pH nižším než 4,9 (optimum 6,5 - 7,5) a snížením aktivity vody pod 0,98 (v suchém prostředí nepřežívá). Růst *Campylobacter spp.* inhibují anorganické i organické kyseliny jakou jsou například kyselina chlorovodíková respektive kyselina mléčná. Použití organických kyselin se

v některých státech používá k eliminaci kampylobakterů na tělech jatečně opracované drůbeže před jejich chlazením.

Dále jsou bakterie rodu *Campylobacter* citlivé vůči gamma záření. Účinek gamma záření na bakterie závisí na typu výrobku. Nejúčinnější je toto záření na výrobky s pokojovou teplotou, méně na chlazené výrobky a nejméně na mražené výrobky. Rod *Campylobacter* je na účinky záření citlivější než *Salmonella spp.* a *Listeria monocytogenes*, které snesou mnohem větší dávky záření (Stephen, 2013).

### 2.2.1 Výskyt

Hlavním rezervoárem *Campylobacter spp.* je zažívací trakt hospodářských zvířat (*C. jejuni* a *C. coli*), domácích mazlíčků (*C. upsaliensis*), ptáků (u racků *C. lari*) i člověka. Bakterie lze izolovat ze syrových potravin, a to především z potravin živočišného původu, dále ze zeleniny (rizikem je hnojení statkovými hnojivy), mořských plodů a vody. Příčinou epidemií jsou zpravidla drůbeží produkty (nedostatečně tepelně opracované drůbeží maso), nepasterované mléko, sekundární kontaminace při zpracování potravin (nízká infekční dávka umožňuje přímý přenos kontaminovanými rukama), kontaminovaná povrchová voda a především také křížová kontaminace v domácnostech nebo v provozech veřejného stravování.

*Campylobacter* je součástí střevní mikroflóry, odkud se dostává do prostředí porážek. Ve střevním obsahu brojlerů se nachází v průměru  $10^6 - 10^7$  KTJ.g<sup>-1</sup> kampylobakterů a převládá výskyt druhů *C. jejuni* a *C. coli*. U prasat je nejčastějším druhem *C. coli* (Bardon et al., 2009).



### 2.2.2 Metabolismus

Metabolismus rodu *Campylobacter* je respiratorního typu. Všechny druhy mají pozitivní oxidázovou a katalasovou reakci (Epps et al., 2013). Z tryptofanu nevytvářejí charakteristický produkt metabolismu aminokyselin. Redukují dusičnan, ale dusitany již nikoliv. Z toho důvodu jsou indol negativní. Nefermentují ani neoxidují sacharidy. energii získávají degradací aminokyselin (Haddad et al., 2013). Diferenciace druhů je založena na několika aspektech. *Campylobacter spp.* jsou citlivé k nalidixové kyselině, mají schopnost hydrolýzy hippurátu a jsou rezistentní k cefalotinu.

### 2.2.3 Genetika

V cytoplasmatické membráně bakterií je lokalizován lipopolysacharidový (Ellström et al., 2013) a proteinový antigen (Hoppe et al., 2013). Podle lipopolysacharidového antigenu se rozlišuje 65 sérotypů podle Pennerova schématu. Nepatrně více sérotypů – 110, lze typizovat podle proteinu obsaženého v bičíku bakterie. To je základem Liorova schématu. Pro jemnější rozlišení kmenů lze použít k určení sérotypu obě schémata nebo jedno z nich kombinovat s biotypizací či fagotypizací (Pike et al., 2013).

Sangerova metoda, kterou se genom této bakterie sekvenoval, objevila opakované sekvence guaninu a cytozinu v každém z 25 genů mikroba. Tyto úseky jsou mimořádně náchylné k mutacím (Hu et al., 2014). Zmíněné mutace primárně ovlivňují geny účastníci se produkce lipopolysacharidů, které obalují povrch *C. jejuni*. Bakterie se tak může vyhnout rozpoznání protilátkami vyprodukovanými při předchozí infekci organismu. Není to však jediná obranná strategie *C. jejuni*.

Gen NeuB může způsobit, že povrchové molekuly na *C. jejuni* vypadají jako gangliosid – to je lipid hojně se vyskytující v nervovém systému (Amar et al., 2014). Tato podobnost může poplést imunitní systém a ten může zaútočit na nervové buňky a způsobit Guillainův-Barrého syndrom (González-Hein et al., 2013).

#### 2.2.4 Faktory virulence

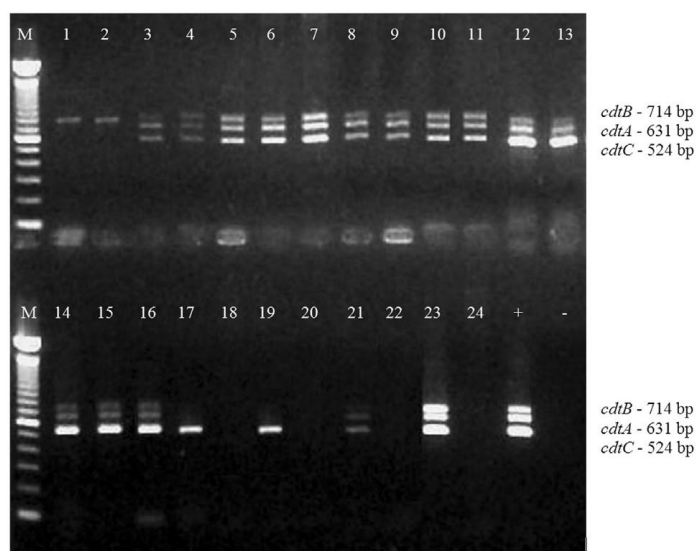
Bakterie *Campylobacter spp.* produkují řadu faktorů virulence. Kolonizace střeva je umožněna pohyblivostí bakterií za chemickým podnětem – chemotaxí a produkcí adhezivních proteinů. Přežití uvnitř vakuol epitelálních buněk je bakteriím usnadněno produkcí katalázy a superoxiddismutázy, která inaktivuje volné kyslíkové radikály. Významné pro přežití a patogenitu *Campylobacter spp.* je schopnost získávat železo z transferinu a laktoferinu obsažených v séru a sliznicích hostitele (Cullen et al., 2012).

##### 2.2.4.1 CDT toxin

Hlavním toxinem produkovaným *Campylobacter spp.* je CDT (cytolethal distending toxin). Aktivita toxinu je zakódována do klastru genu cdt, který se skládá ze tří sousedních genů s podobnou molekulární hmotností: CdtA, CdtB, CdtC. Pro úplnou toxickou aktivitu je potřeba přítomnost všech tří genů. CDT narušuje epitelální klky,

čímž je dočasně narušena absorpční funkce střeva a vzniká průjem. CDT je termolabilní (70 °C) a trypsin senzitivní (Silva et al., 2014).

CDT blokuje G2/M fázi v eukaryotních buňkách a způsobuje po několika krocích narušení celistvosti buňky její smrt. Jako jediný z toxinů produkovaný *Campylobacter jejuni* je dopodrobna prostudovaný a s jistotou lze říci, že je opravdu v bakterii přítomen (Barletta et al., 2013).



Obr. 1: Multiplex PCR pro CDT (Carvalho et al., 2013)

Další toxiny produkované *Campylobacter spp.* jsou: enterotoxin podobný cholerovému toxinu, Shiga toxiny a hepatotoxin (Castillo et al., 2011).

#### 2.2.4.2 Enterotoxin

Enterotoxin je vysoce termostabilní. Zvyšuje permeabilitu kapilár a způsobuje hromadění vody a NaCl ve střevních kličkách.

Toxin účinkuje na střevo a vyvolává poruchu některých jeho funkcí jako jsou například vstřebávání živin a imunita, čímž snižuje celkovou obranyschopnost organismu. Enterotoxin produkují některé bakterie, kromě *Campylobacter jejuni* např. *Vibrio cholerae*, původce cholery, některé kmeny *E. coli* tzv. enterotoxické kmeny, stafylokoky, *Bacillus cereus* či *Clostridium perfringens* (Stef et al., 2013).

### 2.2.4.3 Shiga toxin

Shiga toxin patří do rodiny příbuzných toxinů s dvěma hlavními skupinami Stx1 a Stx2. Stx2 je asi o 400x více toxická než Stx1. Toxin vyžaduje vysoce specifický receptor na povrchu buňky podmiňující jeho vstup. Je složen ze dvou podjednotek. A podjednotky o molekulové hmotnosti 32000 D a B podjednotky o molekulové hmotnosti 7700 D. A podjednotka se rozděluje na dvě části. První se váže na ribozom a narušuje syntézu proteinů. Tím tak buňku činí neschopnou života. Druhá část se váže na epitel střevní sliznice a ničí ho. Proniká i do oběhu, kde nachází odpovídající receptory v ledvinách a v endotelu kapilár. B podjednotka se váže na glykolipidový receptor v buněčné membráně (Díaz-Sánchez et al., 2013).

### 2.2.5 Epidemiologie

Počet hlášených onemocnění způsobených bakterií rodu *Campylobacter* se dle databáze Epidat SZÚ v České republice pohyboval mezi lety 2001 - 2010 v rozmezí 20 063 – 30 268 nemocných osob za rok. V současné době je kampylobakterií

nejčastějším onemocněním z potravin v ČR. V EU je situace podobná. Četnost kamylobakterií je 44,4 případů na 100 000 obyvatel s odhadem 9 milionů ročně. V období 2000 – 2005 byla četnost vyšší. Lze tedy usoudit, že hygienická opatření EU jsou efektivní a dochází ke snižování výskytu kamylobakterií. Pro srovnání lze uvést data z USA, kde se míra výskytu *Campylobacter spp.* mezi lety 1996 – 2005 pohybovala v rozmezí 23,5 – 12,6 onemocnění na 100 000 obyvatel a měla klesající tendenci. 95 % humánních infekcí je způsobeno druhy *C. jejuni* a *C. coli* (Deckert et al., 2014).

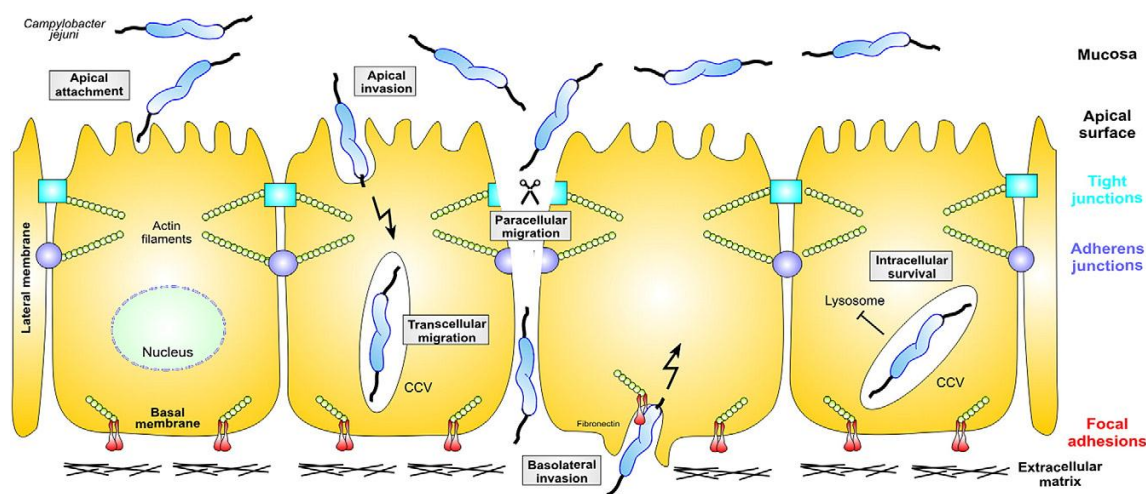
Prevenčí výskytu *Campylobacter spp.* je důkladné tepelné opracování potravin, zamezení křížové kontaminace v průběhu zpracování a skladování potravin, dodržování nejen sanitace a desinfekce v průběhu produkce a zpracování potravin, ale i osobní hygieny osob zpracovávajících potraviny.

### 2.2.6 Patogeneze a patofyziologie

Infekční dávka kamylobakterů je asi 500 mikroorganismů a inkubační doba se pohybuje mezi 2 – 5 dny. Ve vzniku nemoci se uplatňuje hlavně pohyblivost kamylobakterů, adherence k buňkám, rezistence k antibiotikům, konkurenční boj s ostatními mikroorganismy a vyvolání buněčné smrti. Kamylobaktery využívají ke kolonizaci zažívacího traktu muciny ve vilózních kryptách tenkého a tlustého střeva. Zdroj uhlíku představuje pro mikroby acetát i laktát, podle kolísavosti příjmu uhlovodíků ve stravě.

Velmi důležité pro invazi a přežití v organismu je schopnost kamylobakterů využívat konečné metabolity žlučových kyselin jako signální molekulu pro expresi flagelárního antigenu. Je to především kyselina deoxycholová. Obdobně důležitý je lipopolysacharid umístěný ve vnější membráně mikrobů (Polák, 2014).

Do buněk se kampilobakter může dostat dvěma způsoby. První způsob, který je velmi výjimečný, je za pomoci aktinu nebo mikrotubulů. Druhý způsob je mnohem účinnější. Mikrob vstupuje do zažívacího traktu tzv. subvazí. Tak se dostane pod buňky epiteliální vrstvy, do kterých poté proniká přes membránu. K této membráně se mikroby dostanou lýzou infikovaných enterocytů, přestupem přes těsná spojení nebo transcytózou. Všechny tři způsoby se mohou vzájemně kombinovat a doplňovat. Po průniku do intracelulárního prostředí dochází k tvorbě vakuol, ve kterých jsou bakterie chráněny před rozpoznáním imunitním systémem (viz Obr. 2) (Backert et al., 2013)



Obr. 2: Hypotetický model mechanismu infekce *Campylobacter jejuni* (Backert et al., 2013)

### 2.2.7 Kampilobakteriíza

Toto onemocnění patří mezi zoonózy. Může být tedy přenosné ze zvířat na člověka. Je shledáváno jako jedno z nejčastějších v rozvinutých zemích. Většina potravinových onemocnění se vyskytuje sporadicky nebo v rodině. Jen malá část

onemocnění přechází do epidemie. Způsob přenosu je stejný jako u gastroenteritid fekálně-orální cestou.

Termofilní druhy rodu *Campylobacter spp.*, zejména *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, jsou nejčastěji považovány za původce akutních bakteriálních gastroenteritid u lidí.

Gastroenteritida je jedno z nejčastějších onemocnění u člověka. Velmi časté jsou i epidemie. Největší příčinou nákazy je kontaminovaná potrava, voda a zanedbání hygienických návyků. Přenos se děje fekálně orální cestou. Nejvíce zasažené infekcí jsou žaludek a tenké střevo. Inkubační doba je obvykle několik hodin až 3 dny. K příznakům patří zvracení, průjem, nevolnost, zvýšená teplota, někdy až 38 °C. Komplikace mohou nastat při silném zvracení a průjmu, kdy dochází k dehydrataci. Většinou je ale průběh nemoci bez těchto projevů (Ghosh et al., 2013). Infekční dávka je přibližně 500 buněk mikroorganismů (Ivanovic, 2012).

Dalšími druhy, které byly prokázány za lidské patogeny způsobující kamylobakteriízy, jsou *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. fetus* a *C. sputorum*. Převážná většina kamylobakteriíoz je vyvolána *C. jejuni*, méně často *C. coli*. Další serotypy způsobují spíše systémové infekce (*C. fetus*) (Príkazská a kol., 2004).

Rizikovými faktory jsou drůbež, nepasterizované mléko a neupravená voda. Dochází i k přenosům z kojenců a dětí na rodiče. Při manipulaci s potravinami může dojít k sekundární kontaminaci hlavně potravin hotových, tepelně ošetřených. V létě, kdy začíná sezóna grilování, je zvýšený výskyt kamylobakteriíoz.

Příznaky onemocnění se liší podle jednotlivců díky variabilitě hostitele a infikujících organismů. Inkubační doba tohoto onemocnění je mezi 24 až 72 hodinami. Můžou nastat horečka, zimnice, bolesti hlavy nebo svalové křeče doprovázené průjmem (Donatin et al., 2013), který je vodnatý, častý a může obsahovat stopy krve.

Jako druhotné komplikace se nejčastěji objevuje reaktivní artritida. Postihuje klouby a je diagnostikována převážně u mladých lidí. Příznaky jsou záněty kloubů, reprodukčních a močových orgánů.

Další komplikací je Guillain-Barré syndrom (GBS). GBS je akutní paralytické onemocnění s autoimunní etiologií. Mezi příznaky patří slabost, smyslové poruchy. Pacienti potřebují z jedné třetiny podporu plicní ventilace, bez které je tato komplikace pro 3 – 10 % pacientů fatální (Sarkar et al., 2014).

Nejčastěji GBS způsobuje serotyp 19 *Campylobacter jejuni*. Podobným syndromem jako je GBS je Miller-Fisher syndrom, který je charakterizován descendentní paralýzou.

#### **2.2.8 Diagnostika infekce *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli***

Pro úspěšný záchyt kampylobakterů zajištěných z transportu materiálu se používá Amiesova (s aktivním uhlím, anorganickými solemi, thioglykolátem sodným a 1 % agarem) nebo Stuartova (s methylenovou modří) půda. Dalším způsobem kultivace je využití speciálních kultivačních půd. Nejvíce to jsou Butzlerovo selektivní medium, Skirrowův krevní agar anebo nejvyužívanější vůbec pro laboratorní praxi selektivní medium s aktivním uhlím bez krve – CSM agar s pH 7,4 (Votava, 2000).



Tab. I: Složení CSM agaru

Složka	Množství [g/l]
Pepton, speciální	23
Škrob	1
NaCl	5
Aktivní uhlí	4
Agar	10
Hemin	0,032
Pyruvát sodný	0,1
Cefoperazon	0,032
Vankomycin	0,02
Cyklohexamid	0,1

Naočkované půdy se nechají inkubovat v prostředí s 5 % kyslíku, 10 % CO<sub>2</sub> a 85 % dusíku. Je důležité, aby se před započítím inkubace k mediu přidala antibiotika potlačující doprovodnou střevní mikroflóru.

Inkubace probíhá 24-72 hodin při teplotě 42 °C. Vzhled narostlých kolonií se odvíjí od druhu mikroba.

Mimo charakteristického vzhledu kolonií na určených selektivně-diagnostických půdách představuje základní potvrzení hodnocení morfologie buněk po obarvení dle Grama, mikroaerofilní růst při 25 °C, aerobní růst při 42 °C a průkaz oxidázy (Wang et al., 2004).

K druhové identifikaci lze využít: průkaz katalázy, stanovení citlivosti ke kyselině nalidixové a cephalotinu, průkaz hydrolýzy hippurátu sodného a indoxyl acetátu.

Provádí se celá řada testů pro potvrzení *Campylobacter* podle rodu a druhu. Patří mezi ně biochemické, genetické, imunochemické, chemotaxonomické profilování

mastných kyselin, metody gelové elektroforézy a měření molekulové hmotnosti druhově specifických proteinových biomarkerů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF (Rokos et al., 2014).

### 2.2.8.1 Imunologické metody

Imunologické metody představují alternativní techniky detekce rodu *Campylobacter* v různých typech vzorků. Jsou založeny na interakci antigenu se specifickou protilátkou. Aglutinační reakce se stala základem několika komerčně dostupných testů. Všechny využívají latexových částic s imobilizovanými imunoglobuliny, které byly připraveny proti:

- 1) antigenům různých druhů rodu *Campylobacter*, tj. *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. fetus* (Campyslide, BBL Crystal Microbiology System)
- 2) různým sérotypům *C. jejuni* (Microscreen, Mercia Diagnostics)
- 3) flagelárnímu antigenu *C. jejuni* (Meritec-Campy, Meridian Diagnostics)

Pro konfirmaci suspektních izolátů termotolerantních kampylobakterů lze také využít latexaglutinační soupravy (např. Dryspot *Campylobacter* test). Na principu enzymového imunochemického stanovení jsou založeny komerčně dostupné kity VIDAS *Campylobacter* kit a EIA-Foss *Campylobacter* enzyme-immunosorbent assay kit. Specifické protilátky mohou být využity nejen pro přímou detekci, ale také pro separaci patogenního organismu ze vzorku (Votava, 2010).

### 2.2.8.2 Molekulárně genetické metody

Molekulárně biologické metody založené na řetězové polymerázové reakci (PCR) lze využít ke konfirmaci a druhové identifikaci kampylobakterů, detekci genů kódujících tvorbu faktorů virulence či genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám. Principem PCR metod je multiplikace krátkého fragmentu bakteriálního genomu.

PCR probíhá v přístroji, který dokáže vzorek velmi rychle zahřát a ochladit. Reakce probíhá v tenkostěnné kyvetě, která se umístí do termocykleru. Reakční směs obsahuje izolovanou DNA, primery, DNA-polymerázu, nukleotidy,  $MnCl_2$  a  $MgCl_2$ .

Následují tři opakující se kroky:

1. Denaturace: při teplotě 95 °C se do sebe oddělí vlákna DNA
2. Hybridizace: při ochlazení reakční směsi na teplotu okolo 50 – 60 °C se na specifická místa ssDNA navážou komplementární primery, které na obou vláknech vymezí „amplikon“
3. Elongace: při teplotě 72 °C dojde k polymeraci, tedy k syntéze nového řetězce DNA podle primery, na který nasedne DNA-polymeráza a připojuje nové nukleotidy

Celý proces se opakuje přibližně 30x. Množství amplikonů roste geometrickou řadou. Po dvou hodinách vzniká  $10^5$  –  $10^6$  kopií DNA.

Vzniklý produkt je pak dále zpracován elektroforézou, kde dochází k jeho separaci a následně vizualizaci na agarosovém gelu. Pro detekci rodu nachází využití vysoce konzervativní úseky 16S rRNA (Backert et al., 2013). V případě druhů se využívají druhově specifické geny. Pro *Campylobacter jejuni* byl použit gen pro

hippurikasu *HipO* nebo gen pro membránový protein. Své využití nalezne i gen kódující flagelin *flaA*. Metody PCR jsou citlivé, ale mohou nastat problémy v závislosti na druhu vzorku. Jistou nevýhodou je i úprava postupů, která nadále zamezí reprodukovatelnost výsledků mezi laboratořemi (Steinhauserova et al., 2002).

### 2.2.8.3 Molekulárně biologické metody

Většina těchto metod je také založena na PCR. Jsou ovšem jen doplňkové k předešlým pro další charakterizaci rodu *Campylobacter*. Lze jimi detekovat přímo mikrob s různou úrovní rozlišení. Příkladem je multiplexová PCR s primerem genu kódující flagelin *flaA*. Účinnost metody byla ověřena na 142 kmenech *Campylobacter* různého původu.

Pro Real-time PCR je používán primer komplementární s genem *mapA*. Metoda je založena na klasické PCR s tím rozdílem, že speciální přístroj umožňuje kontinuální kvantifikaci DNA během každého cyklu. Amplifikovanou DNA se detekuje pomocí fluorescenčních sond 31 či barviv např. SYBR Green. Sada oligonukleotidových primerů a sond zesiluje reakci cílového genu. Výsledkem reakce je intenzivní fluorescence, která se detekuje pomocí fotometru, jež je zabudován v termocykléru. Hlavní výhodou metody oproti klasické PCR je možnost kvantifikace syntetizovaného produktu, a to buď relativní, tj. porovnáním s jinou skupinou vzorků (např. kontrolní), nebo absolutní, tj. z kalibrační křivky rekombinantní DNA o známém množství. Další výhodou je vysoká specifita a citlivost metody Real-time PCR (Platts-Mills, 2014).

Zkombinováním analýzy délkového polymorfismu restrikčního fragmentu a PCR se detekují bodové mutace odpovědné za rezistenci *Campylobacter* k makrolidům (Perez-Boto et al., 2014). Pro subtypizaci jsou používány v menší míře i jiné metody

jako pulsní elektroforza, ribotypizace, náhodná amplifikace polymorfní DNA nebo *flaA* typizace.

Osekvenování celého genomu *Campylobacter jejuni* umožnilo zavádění mikročipů. Spočívá v umístění specifických DNA sond na velmi malé ploše. To umožňuje testování velkého počtu vzorků s minimální spotřebou materiálu a reagensů.

#### **2.2.8.4 Fenotypové testy**

Zástupci rodu *Campylobacter* jsou nároční na růstové podmínky a nefermentují sacharidy. Tím se ztěžuje jejich identifikace a diferenciací pomocí těchto testů. Většina z nich je založena na vyhodnocení morfologických znaků, nutričních požadavcích, rezistenci k agens, teplotní toleranci a biochemických testech.

Jak bylo výše uvedeno, *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsou oxidasa a katalasa pozitivní, redukují dusičnany na dusitany. Rostou za mikroaerofilních podmínek při teplotě 42 °C. Bylo navrženo dvanáct fenotypových testů usnadňujících identifikaci šesti druhů rodu *Campylobacter*. Růstové podmínky a definovaný soubor identifikačních testů umožňují rozlišit čtyři nejvýznamnější druhy.

Biochemické testy poskytují rychlé údaje pro identifikaci a subtypizaci. Je však potřeba vyhodnocovat výsledky opatrně z důvodu variability v interpretaci a reprodukovatelnosti jednotlivých testů.

### 2.2.8.5 Serologické testy

Pro identifikaci *Campylobacter jejuni* existuje několik serotypizačních schémat. Jedná se o jednu z běžných metod detailní fenotypové charakterizace.

Pennerova serotypizace je založena na pasivní hemaglutinaci s rozpustnými, tepelně stabilními antigeny, navázanými na erytrocyty se specifickými antiséry. Hlavní antigení složkou jsou lipopolysacharidy. Reakce se účastní též kapsulární polysacharidy. Nevýhodou Pennerovy metody je ovlivnitelnost výsledků variabilitou erytrocytů a jejich srážlivosti a aglutinace izolátů s více séry najednou.

Jinou metodou je Liorova serotypizační. Jejím principem je přímá skličková aglutinace s protilátkami proti tepelně labilnímu antigenu. Pro tuto metodu byla připravena speciální antiséra vakcinací králíků živými kulturami *Campylobacter jejuni*. Tato metoda rozděluje *Campylobacter spp.* do osmi skupin. Biotypizace se spíše využívá jako doplňkový test spolu s dalšími metodami.

### 2.2.9 Terapie infekce *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*

Hlavním onemocněním způsobeným těmito bakteriemi jsou průjmy. Základním postupem léčby zůstává stále rehydratace. Je nutné doplnit základní potřebu tekutin i ztráty způsobené průjmem, zvracením a horečkou. Po rehydrataci následuje brzká realimentace. Důležité v léčbě průjmů se stalo podávání solných roztoků s glukózou. Ta umožňuje aktivní transport iontů a vody ze střeva do organismu. Dalším základním léčebným prostředkem je dieta. Bez ní není možná úspěšná medikamentózní terapie.

Nespecifická léčba zahrnuje podávání probiotik, adsorbencí (aktivní uhlí). Antibiotická léčba je nutná jen asi u 5 % případů. Lehké a střední bakteriální průjmy antibiotickou léčbu nevyžadují. ATB jsou indikována u těžkých septických forem. ATB se obvykle podávají v běžných dávkách po dobu 3 – 5 dnů, u septických forem je léčba dlouhodobá a intravenózní po dobu 14 dnů podle stavu pacienta. U kampylobakterióz se podávají makrolidy. Alternativou jsou chinolony, které lze použít až od 17 let věku a tetracykliny, jež lze použít od 8 let věku (Ambrožová, 2006).

### **2.2.9.1 Makrolidy**

Makrolidy jsou antibiotika obsahující makrocyclický laktonový kruh. Principem účinku makrolidů je vazba na rRNA a inhibice proteosyntézy. Vznikající peptidická vazba brání uvolnění tRNA. Tento účinek je pouze bakteriostatický. Makrolidy se vyznačují velmi dobrým průnikem do různých tkání (mimo CNS), do buněk i na povrch sliznic.

U gastrointestinálních onemocnění se makrolidy mohou uplatnit u infekcí způsobených *Helicobacter pylori* a právě u infekcí způsobených *Campylobacter*. U tohoto rodu je možným antibiotikem k použití clarithromycin. Velká výhoda spočívá v jeho stabilitě v kyselém prostředí zažívacího traktu. Má však největší potenciál k rozvoji nebezpečných lékových interakcí (Votava, 2005).

### **2.2.9.2 Chinolony**

Chinolony působí na gramnegativní mikroby tím, že se váží na podjednotku enzymu DNA-gyrasy, která odpovídá za štěpení a opětovné složení řetězce DNA. To má za následek prostorové rozvíjení mateřských řetězců DNA a druhotné stáčení molekuly. Takto rychle zaplněný prostor zastaví další rozplétání řetězce, a tím i celou replikaci. Účinek většiny chinolonů je baktericidní.

Původní chinolony – kyselina oxolinová a nalidixová – sloužily jen k léčbě močových infekcí. Až fluorované chinolony jsou širokospektrými antibiotiky pro těžké systémové infekce. Jejich spektrum je zaměřené spíše na gramnegativní bakterie. Jsou velmi účinné díky obsahu fluoru v jejich molekule a jsou to systémově velmi využívané antimikrobiální látky. U infekcí kampylobakterem je to především fluorochinolon druhé generace – ciprofloxacin (Votava, 2005).

### **2.2.9.3 Tetracykliny**

Tetracyklinová antibiotika jsou skupinou širokospektrálních antibiotik. Primárně působí bakteriostaticky především proti gramnegativním bakteriím ale i proti mnoha druhům grampozitivních bakterií. Současným problémem je podávání těchto antibiotik hospodářským zvířatům a tím zvyšování rezistence bakterií, které se mohou geneticky přizpůsobit a ve velmi krátké době vyvinout obranný mechanismus proti danému antibiotiku.

Tetracykliny se váží na malou podjednotku ribozomu a tím zabraňují vazbě aminoacyl-tRNA. Dochází k inhibici proteosyntézy a ukončuje se růst bakterie.



Používanými antibiotiky k léčbě jsou například tetracyklin a doxycyklin. Tato antibiotika jsou až krajním případem volby z důvodu vysoké bakteriální rezistence. Závažné jsou vedlejší účinky. Především u mladistvých, kdy se tato antibiotika ukládají do nově tvořených zubů a kostí. Tetracyklinová antibiotika procházejí placentou do plodu a objevují se v mateřském mléce.

### 2.2.10 Antibiotická rezistence a její mechanismy

Antibiotická rezistence je odolnost infikujících organismů vůči antibiotikům. Je jedním z vedlejších efektů chybného užívání antibiotik. Přirozená rezistence se vztahuje na bakteriální druhy, které jsou mimo spektrum působení antibiotika, tj. nenesou zásahové struktury příslušné antimikrobiální látky. Získaná (sekundární) rezistence je následkem evoluce bakteriálního genomu a selekčního tlaku prostředí. Rychlost rozvoje sekundární rezistence závisí na frekvenci mutací a na množství bakterií s určitým stupněm rezistence. Sekundární rezistence má dva typy: penicilinový typ (multiple step mutation) – vzniká po dlouhodobém podávání některých antibiotik jako penicilin či chloramfenikol a streptomycinový typ (one step mutation) – s rychlým vznikem vysoce rezistentních kmenů.

Mechanismy rezistence jsou v podstatě způsoby, pomocí kterých se mikroorganismy brání letálním účinkům antibiotik. Mikroorganismy mění podobu cílových struktur nebo tvoří proteiny, které chrání cílové struktury před účinkem antibiotik. Mikroorganismy zabraňují antibiotiku ve vstupu do buňky, anebo jej z buňky aktivně odčerpávají. V neposlední řadě enzymaticky modifikují některé molekuly antibiotik. Fenotypová podoba rezistence k antibiotikům má svou genotypovou podstatu.

Mikroby využívají 5 známých mechanismů rezistence, které mezi sebou mohou kombinovat (Kolář, 2002). Nejméně častým mechanismem vzniku rezistence jsou metabolické změny v buňce.

Více objevujícím se mechanismem je omezená penetrace antibiotika do bakteriální buňky. Tento mechanismus je jeden z nejčastějších u rezistence k makrolidům. Gramnegativní bakterie mohou omezit přísun látek a živin, tím i množství vstupujícího antibiotika do buňky díky porinům, které jsou umístěny ve vnější membráně buněčné stěny. Nevýhodou je, že dochází i k omezení přísunu živin, čímž dochází k znevýhodnění rezistentní buňky vůči původní populaci (Lochmann, 1994).

Dalším mechanismem je změna cílové struktury (receptoru), kdy vlivem působení antibiotika dochází k mutacím. U rezistence k makrolidům je to mutace v podjednotce ribozomu. U rezistence k chinolonům je to pro změnu mutace v podjednotce DNA-gyrázy

Nejjednodušším mechanismem mikrobů je produkce enzymů inaktivujících antibiotikum. Vyskytuje se u rezistence k makrolidům. Stačí pouze jediný gen kódující tento typ rezistence. Dochází k snadnému přenosu mezi jednotlivými bakteriemi v rámci druhu, ale i mezi různými druhy bakterií a tím dochází k jejich rychlému šíření. Tuto rezistenci lze většinou snadno inaktivovat podáním falešného substrátu, který zablokuje aktivní místo enzymu (Kolář, 2002)

Posledním mechanismem je aktivní vypuzování antibiotika z bakteriální buňky. Bakterie efluxní pumpy využívají i k odstraňování metabolitů a toxinů. Hyperprodukcí efluxních pump dochází i k ovlivnění vypuzování jiných látek vnitřního prostředí buňky a k oslabení buňky. Tímto způsobem se mikroby brání proti makrolidům i chinolonům (Lochmann, 1994).

## **3. Metodika**

### **3.1 Hypotézy**

Pro hlavní cíl práce výskyt *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsem stanovil dvě hypotézy:

H1: Během roku je výskyt *Campylobacter jejuni* větší než *Campylobacter coli*.

H2: Během roku je výskyt *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* stejný v každém měsíci.

### **3.2 Vymezení spádové oblasti**

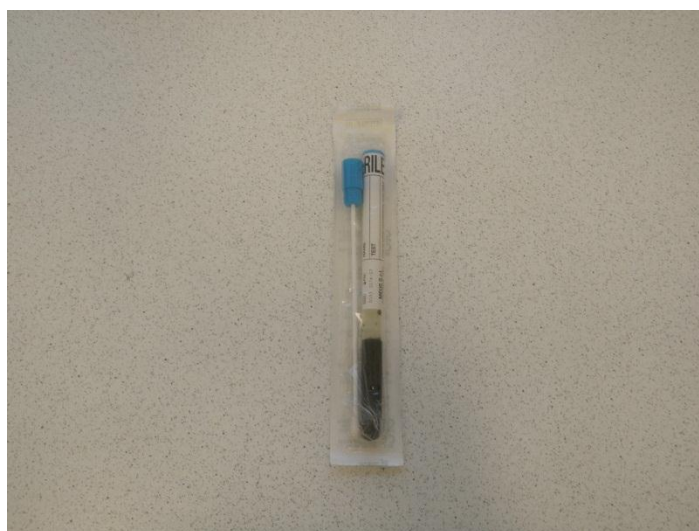
Spádovou oblastí pro sběr vzorků Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. jsou jednotlivá oddělení Nemocnice České Budějovice a.s., Nemocnice Český Krumlov, a.s., a část obvodních praktických lékařů z Českobudějovicka a Českokrumlovska.

### **3.3 Charakteristika souboru**

Praktickou část této práce jsem prováděl na pracovišti Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. (dále Nemocnice ČB). Po dobu praktické části jsem se podílel pod dohledem příslušného pracovníka na rutinní práci v laboratoři, která zahrnuje příjem a zpracování vzorku, provedení diagnostických metod a jejich vyhodnocení. Pro naplnění cílů práce jsem využil údaje za rok 2014 o výskytu *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* během roku a antibiotické rezistence s údaji z let 2002 – 2014 vztahující se k celkové statistice zachycených střevních patogenů. K získání dat jsem použil databázi bakteriologického oddělení.

### **3.4 Prelaboratorní část diagnostiky**

Pro mikrobiologické vyšetření je důležitý správný odběr biologického materiálu. Pro diagnostiku *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* se materiál získá výtěrem z recta standardním dakronovým tamponem na plastové tyčince (viz Obr. 3). Obecně se nesmí používat vatové tampony a dřevěné špejle. Oba uvedené materiály obsahují baktericidní látky. Po provedení výtěru se tampon umístí do transportního media. Nejčastější volbou jsou transportní media Amies nebo Stuart. Stolice by neměla být kontaminována příměsí krve či moči.



Obr. 3: Dakronový tampon s přiloženým transportním médiem (zdroj: vlastní)

Transport vzorků do mikrobiologické laboratoře musí být dostatečně rychlý. Nejlépe do dvou hodin (při dodržení veškerých zásad do 24 hodin) a ke vzorkům šetrný, nejlépe při teplotě 8 – 12 °C. Vzorky stolice se do transportu uchovávají v lednici. Doporučuje se, aby byly transportní nádobky umístěny nejlépe ve svislé poloze a v pevné a nepropustné nádobě. V případě extrémních vnějších teplot je nutno nádobky přepravovat v boxech, které zamezí znehodnocení vzorku (např. boxy s chladícími vložkami, temperování boxu na pokojovou teplotu). Nejrychleji hynou nejvíce náročné bakterie a ve vzorku se úspěšně pomnoží bakterie běžné flóry. Všechny nádobky musí být řádně označeny – tzn. nutnost označení jménem pacienta, jeho rodným číslem, kódem zdravotní pojišťovny a druhem biologického materiálu. Vzorek je doprovázen řádně vyplněnou žádankou k mikrobiologickému vyšetření. Kromě výše uvedených informací musí obsahovat čas odběru, jméno zdravotnického pracovníka, který odběr provedl, a jméno lékaře, který odběr indikoval. Na žádance se označí příslušný materiál a požadované vyšetření.

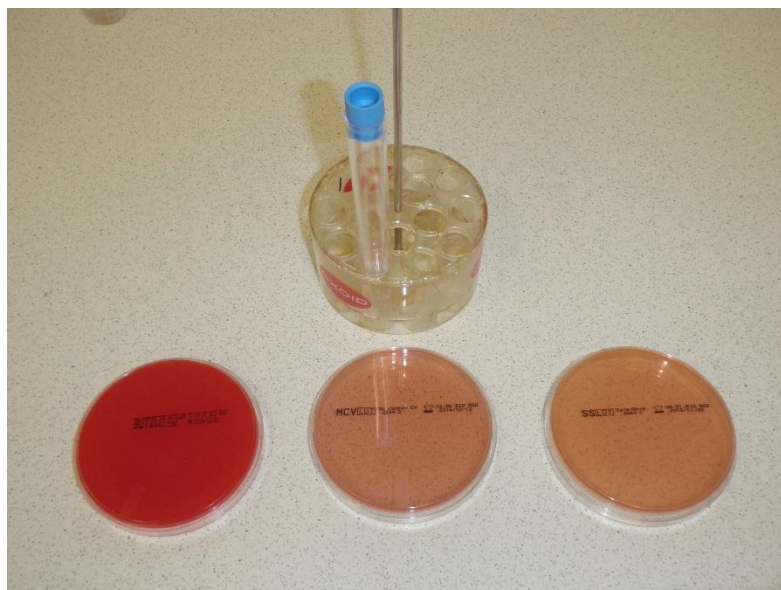
Při příjmu laborant zkontroluje správnost údajů na žádance a zaslané nádobce s biologickým materiálem. Laborant poté zapíše své jméno, datum a čas převzetí vzorku. Materiál dále pokračuje na pracoviště, kde se vyšetření provádí.

### 3.5 Laboratorní část diagnostiky

Pro úspěšný záchyt *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* zajištěných z transportovaného materiálu se využívá na pracovišti bakteriologického oddělení Nemocnice ČB přímého průkazu metodou kultivace. Tato metoda předchází vždy další diagnostiky. U kampylobakterů se při očkování půd postupuje podle přesně daného schématu. Jako první se očkuje málo selektivní a diferenční dezoxycholátová půda, po ní následuje McConkey agar a CSM agar s aktivní uhlím dle Karmaliho. V případě mikrobiologického pracoviště Nemocnice ČB se místo CSM agaru používá Butzlerovo selektivní medium. Nakonec se dakronový tampon vloží do pomnožovací selenitové půdy (viz Obr. 4). V tomto kroku nesmí dojít k omylu, protože pokud nastane a naočkuje se selenit dříve než selektivní půda, kampylobakter se tímto usmrtí.

Tab. II: Složení Butzlerova selektivního media

Složka	Množství [g/l]
Columbia agar	14
Směs speciálních peptidů	16
Kvasnicový extrakt	2,5
Masový extrakt	2,5
Chlorid sodný	5
Cefoperazon	0,032
Rimfapicin	0,01
Amphotericin	0,1
+ 5 % sterilní ovčí krve	



Obr. 4: Používané půdy ke kultivaci kampylobakterů na mikrobiologickém pracovišti Nemocnice ČB (zdroj: vlastní)

Naočkované půdy se nechají inkubovat v prostředí s 5 % kyslíku, 10 % CO<sub>2</sub> a 85 % dusíku. Je důležité, aby se před započítím inkubace k mediu přidala antibiotika potlačující doprovodnou střevní mikroflóru.

Inkubace probíhá 48 hodin při teplotě 42 °C. Následný vzhled vzniklých kolonií se odvíjí od druhu mikroba. Jsou ploché a nepravidelné či jsou šedé barvy s hladkými a vypouklými koloniemi, popř. se může na misce pozorovat plazivý růst.

Z každého kultivačního nálezu se zhotoví mikroskopický preparát. Preparát se připravuje vždy a pouze z jedné suspektní kolonie natřené na podložní sklíčko. Sklíčko je předtím řádně označeno číslem vzorku, které je vedeno v systému pracoviště z opačné strany, než bude natřeno materiálem a následně ofixováno plamenem kahanu. Poté se přistupuje k barvení podle Grama.

Tab. III: Postup barvení podle Grama

Roztok	Čas [s]
Krystalová violet'	90
Lugolův roztok	90
Odbarvovací roztok	30
Safranin	30

Mezi každým použitým roztokem se preparát opláchne vodou po dobu 30 s. Nakonec se nechá oschnout cca dvě minuty.

Mikroskopický preparát se prohlíží pomocí optického mikroskopu při celkovém zvětšení 1000x za použití imerzního oleje.

K rozpoznání kmene bakterie se v mikrobiologické laboratoři Nemocnici ČB používá hmotnostní spektrometrie MALDI TOF (MALDI – ionizace laserem za přítomnosti matrice, TOF – analýza doby letu) (viz Obr. 5). Pomocí této techniky se identifikují bakterie a mikromycety. Zároveň to je jediný zaručený postup, jak s jistotou na zmíněném pracovišti rozeznat *Campylobacter jejuni* od *Campylobacter coli*.





Obr. 5: Hmotnostní spektrofotometr s pracovní stanicí (zdroj: vlastní)

Do přístroje se vkládají destičky umístěné na rovném povrchu. Jsou rozděleny do 48 pozic ve třech měřících skupinách a jsou označeny čárovým kódem zajišťujícím informace o pozici vzorku na nosiči. Pomocí bakteriální kličky se na destičku nanese čistá kolonie a rozetře se do tenké vrstvy. Na takto připravenou destičku se nanese 1  $\mu$ l matričního roztoku HCCA a nechá se zaschnout. Jako kontrolní vzorek se používá referenční kmen *Escherichia coli*, který je umístěn stejně jako kmen zkoumaný.

Nosič je poté vystaven laserovému paprsku. Ten se vstřebává a dochází ke vzniku elektrického náboje. Po jeho vzniku dojde k ionizaci matrice. Uvolněné ionty se rozdělí ve vakuové trubici podle jejich hmotnosti. Výsledkem hmotnostní spektrometrie je grafické znázornění čárových spekter. Křivky (píky) odpovídající různým fragmentům původních molekul ve vzorku se porovnávají s databází spekter známých kmenů. Pravděpodobnost shody s typickým spektrem daného mikroba se vyjádří procentuálně. Dokonalá shoda znamená 99 %.

Stanovení citlivosti k antibiotikům se na mikrobiologickém pracovišti Nemocnice ČB provádí diskovým difúzním testem. Po kultivaci se neselektivní půdy bez přidaných antibiotik naočkují suspenzí kmene. Jednotlivé disky jsou napuštěné určitým antibiotikem a dispensorem se vloží na připravenou půdu. Na jedné půdě se prověřuje vždy sada tří antibiotik. Inkubace se provádí v mikroaerofilním prostředí při 37 °C po dobu 48 hodin. Poté se změří průměr inhibiční zóny okolo disků v milimetrech a porovná se s hraniční hodnotou pro konkrétní antibiotikum.

Bakterie citlivá k antibiotiku neroste v okolí disku a zóna růstu je větší nebo rovná hraniční hodnotě. Pokud je bakterie k antibiotiku rezistentní, její inhibiční zóna je menší než hraniční hodnota nebo není rozpoznatelná a bakterie roste bezprostředně v okolí disku. U *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* se testuje citlivost na ciprofloxacin, doxycyklin a clarithromycin

Tab. IV: Hraniční hodnoty inhibičních zón pro *Campylobacter jejuni* u vybraných antibiotik (zdroj: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Zkratka ATB	ATB	Citlivost [mm]	Rezistence [mm]
CIP	ciprofloxacin	≥ 26	< 26
DOX	doxycyklin	≥ 30	< 30
CLA	clarithromycin	≥ 20	< 20

Tab. V. Hraniční hodnoty inhibičních zón pro *Campylobacter coli* u vybraných antibiotik (zdroj: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)

Zkratka ATB	ATB	Citlivost [mm]	Rezistence [mm]
CIP	ciprofloxacin	≥ 26	< 26
DOX	doxycyklin	≥ 30	< 30
CLA	clarithromycin	≥ 24	< 24

### **3.6 Postlaboratorní část diagnostiky**

Při zjištění výskytu kampylobakterů ve vzorku je nutné tuto skutečnost nahlásit na příslušné oddělení odkud vzorek přišel na laboratoř. Při hlášení se oznamuje jméno pacienta, jeho rodné číslo a jméno ošetřujícího lékaře.

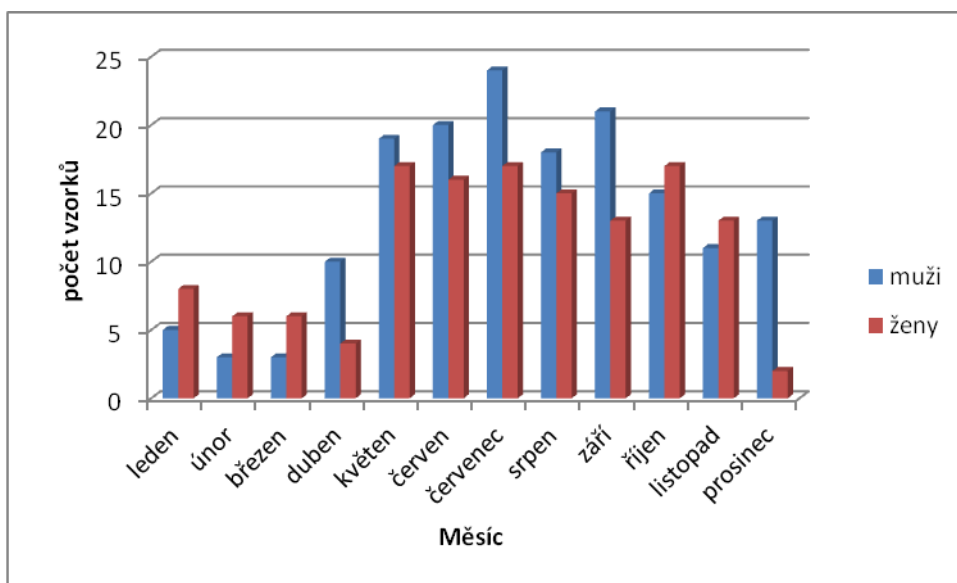
## 4. Výsledky

V průběhu roku 2014 bylo na mikrobiologickém pracovišti Nemocnice ČB zachyceno celkem 296 pozitivních nálezů kmene *Campylobacter jejuni* (viz Tab. VI). U mužů a žen se výskyt v jednotlivých měsících výrazně neliší. Tendence výskytu se zvyšuje od konce jara s maximem přes léto až k podzimním měsícům, kdy výskyt opět klesá (viz Obr. 7). Detailnější výskyt zobrazuje Obr. 6.

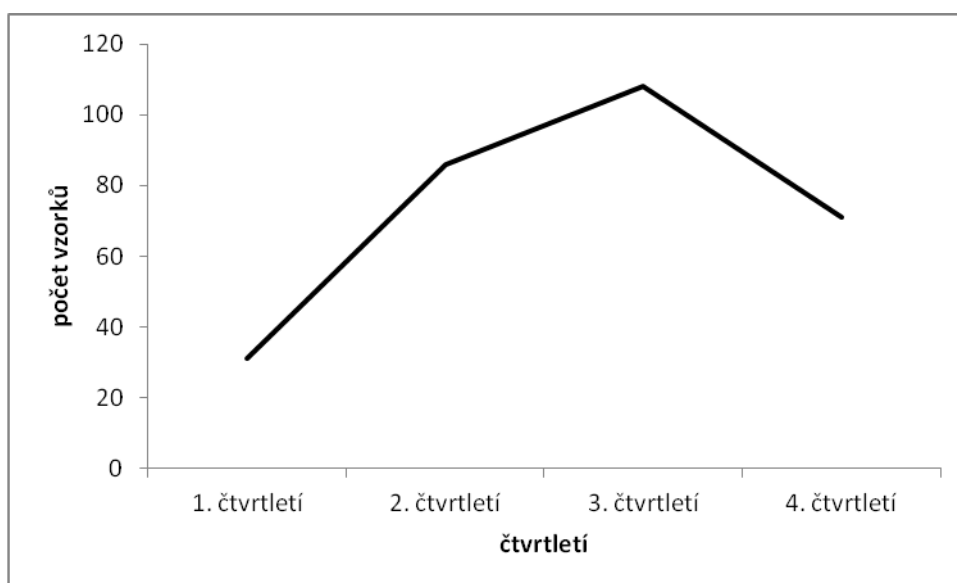
Z celkových pozitivních 296 vzorků bylo 162 od mužů (55 %) a 134 od žen (45 %). Zvýšený záchyt *Campylobacter jejuni* byl od května do října, přičemž největší počet byl v měsíci červenci (41).

Tab. VI: Počet pozitivních nálezů *Campylobacter jejuni* za rok 2014

	Počet pozitivních nálezů		Celkem
	muži	ženy	
Leden	5	8	13
Únor	3	6	9
Březen	3	6	9
Duben	10	4	14
Květen	19	17	36
Červen	20	16	36
Červenec	24	17	41
Srpen	18	15	33
Září	21	13	34
Říjen	15	17	32
Listopad	11	13	24
Prosinec	13	2	15
Celkem	162	134	296



Obr. 6: Počet pozitivních nálezů *Campylobacter jejuni* u mužů a žen v jednotlivých měsících za rok 2014



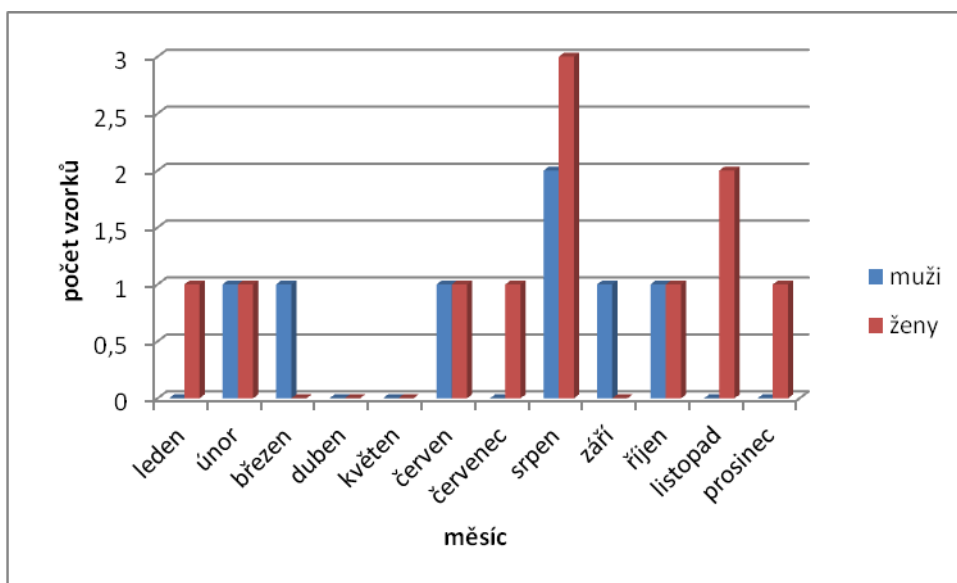
Obr. 7: Vývoj četnosti záchytu *Campylobacter jejuni* podle čtvrtletí za rok 2014

Následující část ukazuje výskyt *Campylobacter coli*. Ve stejném roce jako v předchozím případě bylo zachyceno celkem 18 pozitivních nálezů tohoto mikroba (viz Tab. VII). Výskyt není tak častý jako u *Campylobacter jejuni*, je ale druhým nejčastějším z rodu *Campylobacter*. Vrcholu dosahuje opět v letních měsících (viz obr. 8). Na Obr. 9 je vidět, že vývoj četnosti není stoupající od počátku roku a je kolísavý. To je však zřejmě způsobeno malým počtem zachycených pozitivních nálezů a chybou malých čísel.

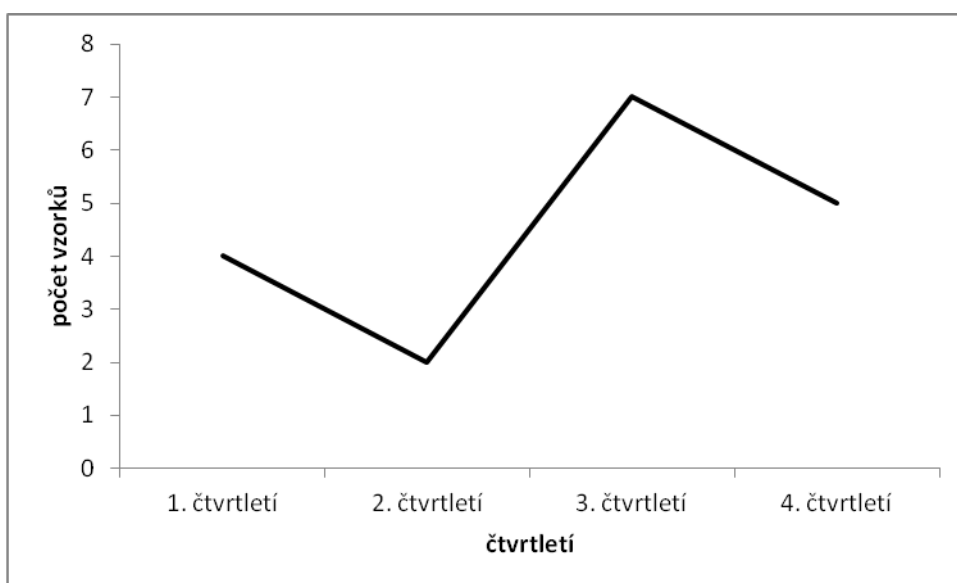
Z celkových 18 pozitivních vzorků bylo 7 od mužů (39 %) a 11 od žen (61 %). Zvýšený záchyt *Campylobacter coli* byl od června do listopadu, přičemž největší počet byl v měsíci srpnu (5).

Tab. VII: Počet pozitivních nálezů *Campylobacter coli* za rok 2014

	Počet pozitivních nálezů		Celkem
	muži	ženy	
Leden	0	1	1
Únor	1	1	2
Březen	1	0	1
Duben	0	0	0
Květen	0	0	0
Červen	1	1	2
Červenec	0	1	1
Srpen	2	3	5
Září	1	0	1
Říjen	1	1	2
Listopad	0	2	2
Prosinec	0	1	1
Celkem	7	11	18



Obr. 8: Počet pozitivních nálezů *Campylobacter coli* u mužů a žen v jednotlivých měsících za rok 2014



Obr. 9: Vývoj četnosti záchytu *Campylobacter coli* podle čtvrtletí za rok 2014

Tab. VIII ukazuje tendenci výskytu nejčastějších střevních patogenů v období 2002 – 2014. Porovnává se zde tendence výskytu *Campylobacter jejuni* a za rok 2013 a 2014 i minoritní zástupci rodu *Campylobacter* - *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. ureolyticus*, *C. hyointestinalis* s tendencí výskytu druhého nejčastějšího střevního patogena *Salmonella enteritidis*. Grafické znázornění tohoto sledování je zobrazeno na Obr. 10.

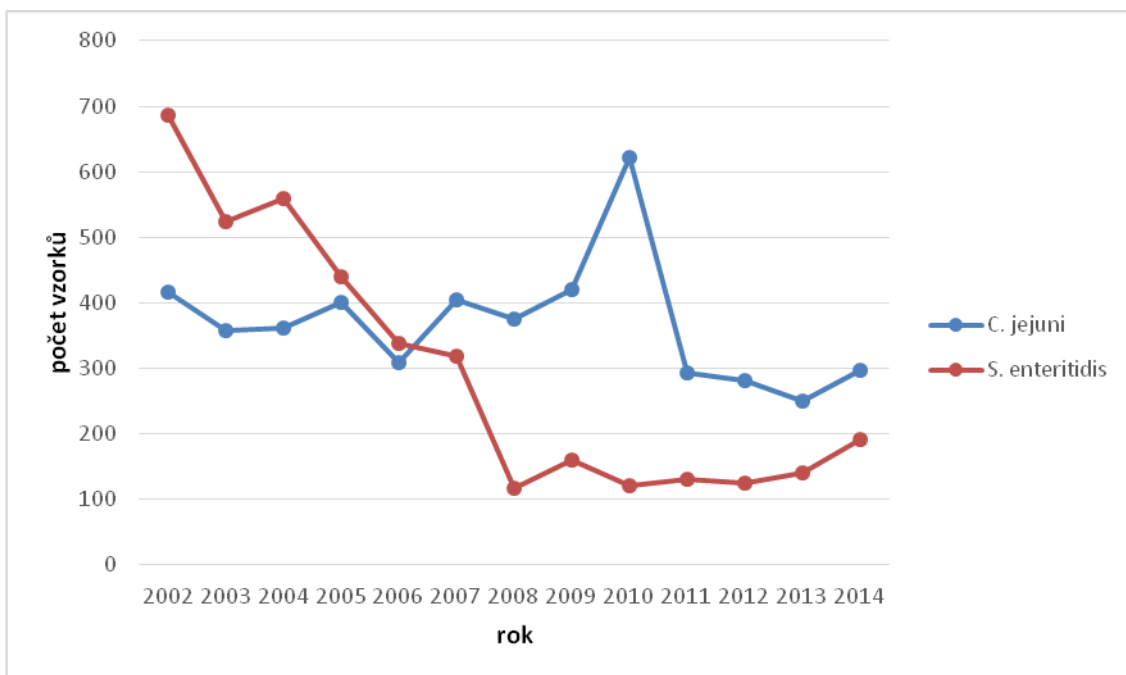
Od počátku sledového období byla častějším patogenem *Salmonella enteritidis*. Tato skutečnost se začala měnit od roku 2006, kdy tento patogen vystřídal *Campylobacter jejuni*. Jeho největší záchyt byl v roce 2010 – 621 případů. Od roku 2013 se na mikrobiologickém pracovišti Nemocnice ČB izolují i ostatní druhy rodu *Campylobacter*.

Tab. VIII: Statistika četnosti záchytu nejčastějších střevních patogenů v období 2002-2014

Rok	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>C. jejuni</i>	417	357	362	401	308	404	375
<i>Salmonella enteritidis</i>	686	524	560	440	338	318	117
Celkem	1103	881	922	841	646	722	492



Rok	2009	2010	2011	2012	2013	2014
<i>C. jejuni</i>	421	621	293	281	250	296
<i>C. coli</i>					13	18
<i>C. upsaliensis</i>					2	
<i>C. ureolyticus</i>					1	
<i>C. hyointestinalis</i>					1	1
<i>Salmonella enteritidis</i>	159	121	130	125	140	192
Celkem	580	742	423	406	407	507

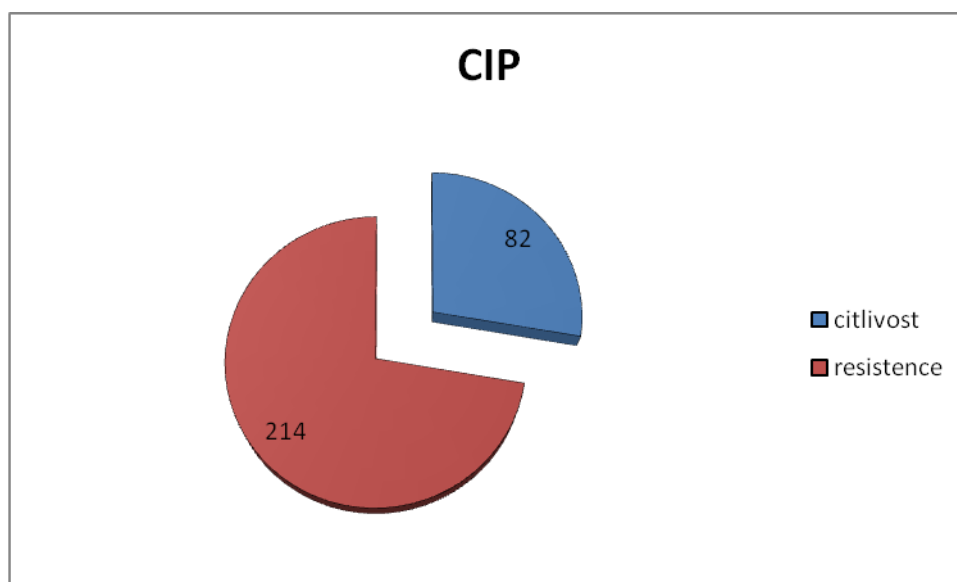


Obr. 10: Vývoj četnosti záchytu nejčastějších střevních patogenů v období 2002-2014

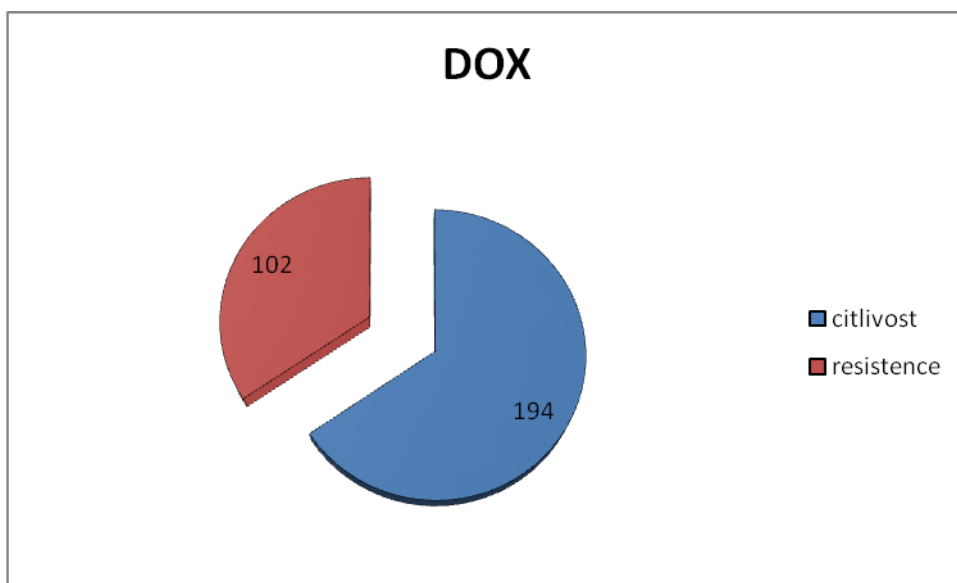
Na pracovišti mikrobiologické laboratoře Nemocnice ČB se ke každému kultivačnímu nálezu provádí i citlivost na antibiotika difúzním testem. V roce 2014 byla citlivost na antibiotika u *Campylobacter jejuni* zřetelně stanovena u všech případů – 296. Z Tab. IX je zřejmé, že *Campylobacter jejuni* je 100% citlivý na antibiotika ze skupiny makrolidů – clarithromycin. Z tohoto důvodu byly zhotoveny grafy předkládající počet citlivých a rezistentních kmenů *Campylobacter jejuni* na ciprofloxacin a doxycyklin (Obr. 11 a Obr. 12).

Tab. IX: Přehled citlivosti a rezistence u *Campylobacter jejuni* k jednotlivým antibiotikům. Legenda: ATB – antibiotikum, CIP – ciprofloxacin, DOX – doxycyklin, CLA – clarithromycin

ATB	Počet kmenů	Citlivost (počet)	Citlivost (%)	Rezistence (počet)	Rezistence (%)
CIP	296	82	28	214	72
DOX	296	194	66	102	34
CLA	296	296	100	0	0



Obr. 11: Citlivost *Campylobacter jejuni* k ciprofloxacinu

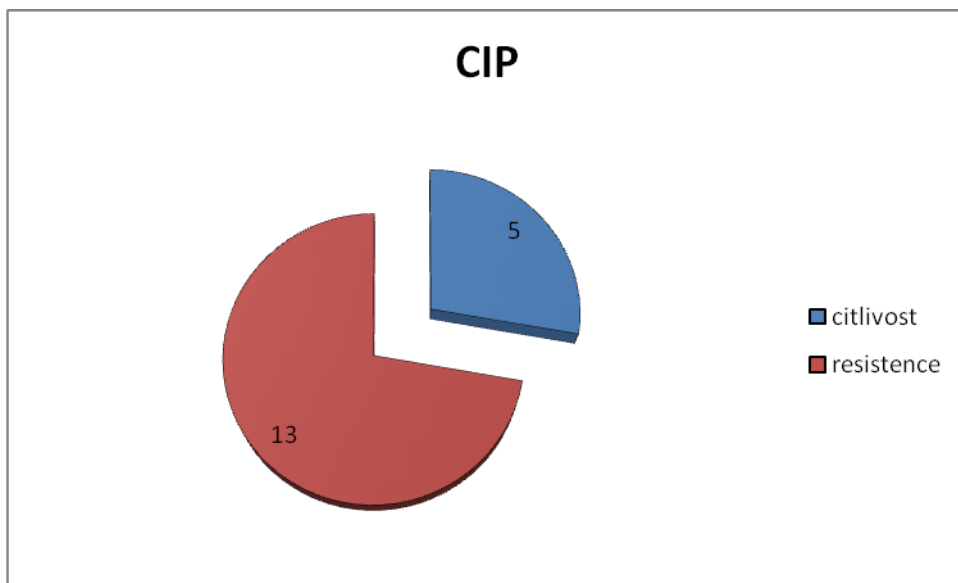


Obr. 12: Citlivost *Campylobacter jejuni* k doxycyklinu

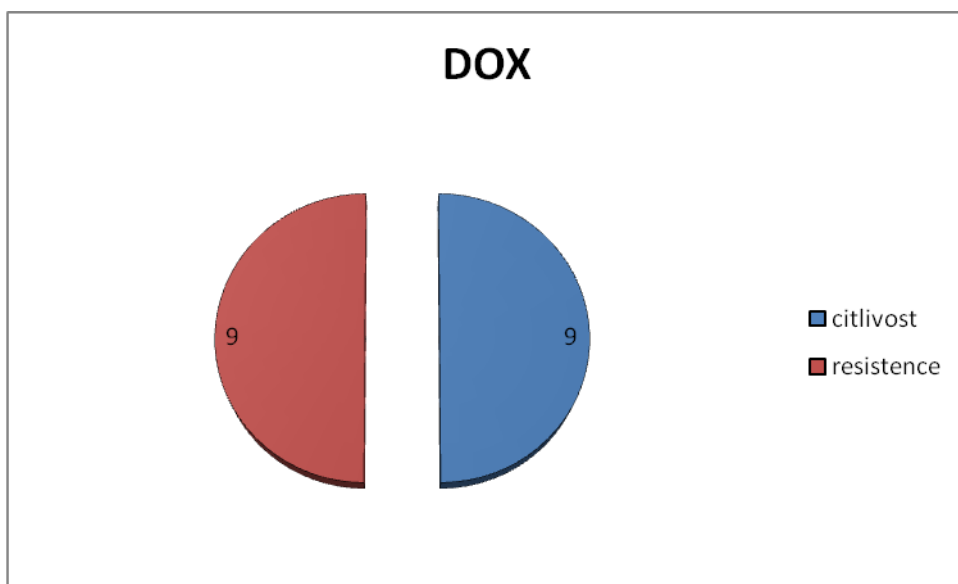
Stejně jako v předchozím případě se i u *Campylobacter coli* provádí u každého pozitivního nálezu citlivost na antibiotika (viz Tab. X). Citlivost ke clarithromycinu je opět 100 %. Obr. 13 a Obr. 14 předkládá počet citlivých a rezistentních kmenů *Campylobacter coli* k ciproflaxinu resp. doxycyklinu.

Tab. X: Přehled citlivosti a rezistence u *Campylobacter coli* k jednotlivým antibiotikům. Legenda: ATB – antibiotikum, CIP – ciprofloxacin, DOX – doxycyklin, CLA – clarithromycin

ATB	Počet kmenů	Citlivost (počet)	Citlivost (%)	Rezistence (počet)	Rezistence (%)
CIP	18	5	28	13	72
DOX	18	9	50	9	50
CLA	18	18	100	0	0



Obr. 13: Citlivost *Campylobacter coli* k ciprofloxacinu



Obr. 14: Citlivost *Campylobacter coli* k doxycyklinu

## 5. Diskuze

Infekce *Campylobacter jejuni* má v posledních letech i přes stále se zlepšující diagnostické metody konstantní či zvyšující se výskyt. Je nejčastější oproti střevním infekcím způsobenými jinými mikroby. *Campylobacter jejuni* je původcem kamylobakterióz. Vzhledem ke stále častému výskytu infekce je překvapivé, že patogeneze onemocnění není v porovnání např. se salmonelózou zdaleka tolik objasněna. V současné době je k dispozici řada diagnostických metod, které potvrdí infekci. Pro přímý průkaz infekce se odebírá vzorek stolice.

Cílem této práce bylo porovnání a ověření diagnostických metod, zjištění výskytu *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* během roku, následně detekce a kultivace a provedení testů citlivosti na antibiotika.

Na pracovišti Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. se vzorek diagnostikuje přímým průkazem kultivací a hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Kultivací však nelze zaručeně rozeznat *Campylobacter jejuni* od *Campylobacter coli*. I z důvodu správné indikace antibiotik a identifikace kamylobakterů do druhu, je nutné v rutinní laboratoři používat přesnější metodu. K tomuto účelu slouží hmotnostní spektrometrie. Využívá se hlavně pro svou rychlost a nenáročnost. Nevýhodou však je, že není dostupná všem laboratořím z důvodu vysoké pořizovací ceny samotného přístroje a jeho nákladné údržby.

Další v této práci zmiňované metody diagnostiky jsou buď náročné na provedení, především určení druhu kamylobaktera fenotypickou řadou a molekulárně genetickým testováním. Druhou nevýhodou jiných metod je jejich nespolehlivost. Taková metoda je například hippurátová reakce (u kamylobakterů pozitivní) s příliš závažnými chybami. Zvolená metoda by měla být co nejvíce citlivá, spolehlivá s vysokou mírou reprodukovatelnosti.

Za rok 2014 bylo na pracovišti Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. identifikováno 296 pozitivních průkazů infekce *Campylobacter jejuni*. Nejčastější záchyt byl v červenci – celkem 41 případů a velmi vysoký byl i přes letní měsíce. Z Obr. 6 je patrné, že výskyt infekce je sezónní, nikoliv přes celý rok konstantní. Na základě získaných výsledků se dá vyvrátit hypotéza H2: Během roku je výskyt *Campylobacter jejuni* stejný v každém měsíci. Rozdíl v počtu infikovaných mužů a žen není rozdílný. Obě pohlaví jsou k infekci náchylná stejně. Sezónnost výskytu infekcí způsobených *Campylobacter jejuni* potvrzuje ve svých studiích Ambrožová (2006, 2011). Časové rozmezí mezi těmito studii a této předkládané práce napovídá tomu, že se trend výskytu nemění. Trend výskytu byl sledován i u *Campylobacter coli*. Za celý rok 2014 bylo však identifikováno o mnoho méně případů infekce než v případě *Campylobacter jejuni*. I přes tuto skutečnost se dá říci, že i u tohoto druhu je výskyt sezónní přes léto, což ukazuje Obr. 8. Nárůst výskytu u obou druhů rodu *Campylobacter* je zapříčiněn vzrůstající oblibou grilování, kdy může dojít ke konzumaci nedostatečně tepelně zpracovaného masa.

Hypotéza H1: Během roku je výskyt *Campylobacter jejuni* větší než *Campylobacter coli* lze z dat převzatých z databáze pracoviště Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. potvrdit. Výskyt *Campylobacter coli* je během roku výrazně nižší než výskyt *Campylobacter jejuni* (viz Tab. VI a Tab. VII).

*Campylobacter* je od roku 2007 vedoucím patogenem ve výskytu střevních infekčních onemocnění. Z Obr. 10 je možné vidět, že trend výskytu infekcí způsobených kamylobaktery je ustálený. Pohybuje se okolo 250 – 300 případů za rok. Výjimkou je rok 2010, kdy se na Českobudějovicko dostal fenomén v podobě automatů na mléko a výskyt kamylobakterů byl více jak dvojnásobný. Je tedy patrné, že je třeba dbát nejen na důkladnou úpravu masa ale i ostatních živočišných produktů.

Z důvodu ochrany osobních údajů nebylo možné zpracovat výskyt infekce v závislosti na věku, ale jak uvádí Příkazská a kol. (2004), v roce 2003 bylo až 96 % pacientů ve věku 1 – 4 roků. To si lze vysvětlit obecně menší opatrností dětí a sníženou starostí o hygienickou péči.

U infekce kampylobaktery je jako první volbou indikace ATB skupina makrolidů. Podle Tab. IX a Tab. X je tato volba správná. U všech 296 kmenů *Campylobacter jejuni* a všech 18 kmenů *Campylobacter coli* byla citlivost k makrolidům – clarithromycin 100%. Podobný výsledek uvádí i Národní referenční laboratoř pro antibiotika a studie Žemličkové a kol. (2014), kdy rezistence nedosahuje ani 1%. Velmi znepokojivý je výsledek citlivostí ciprofloxacinu, s ohledem druhé volby léčby ATB fluorochinolony. U obou druhů *Campylobakter* byla rezistence k těmto ATB 72%. Podle studie Giacomelli (2014) se rezistence k chinolonům, pohybuje mezi 65% až 100%. Jiná studie (Lazou et al., 2013) ovšem potvrzuje rezistenci k chinolonům menší než 50%. Toto lze vysvětlit schopností mikrobů vytvořit si rezistenci při soustavném podávání ATB a tím vytvoření selekčního tlaku. Při výběru ATB k použití by měl rozhodovat nejen přínos a rizika léčby, cena přípravku samotného, ale i riziko vzniku rezistence.



## 6. Závěr

*Campylobacter jejuni* je posledních 10 let nejčastějším původcem střevních infekcí v ČR. V práci byly porovnány metody diagnostiky využívané na pracovišti Bakteriologického oddělení Nemocnice České Budějovice, a.s. Pro přímý průkaz infekce se využívá samotná kultivace mikrobů a hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF.

V roce 2014 bylo takto diagnostikováno 296 pozitivních nálezů kmene *Campylobacter jejuni* a 18 pozitivních nálezů kmene *Campylobacter coli*. Výsledky potvrdily sezónní výskyt, začínající od května a končící v říjnu. Proto by se hlavně v těchto měsících měla zpřísnit epidemiologická opatření a správně dodržovat hygienické zásady a s nastupujícím létem informovat obyvatelstvo o možném riziku nákazy.

Základním postupem léčby zůstává stále rehydratace a onemocnění ve většině případů odezní pouze při zachování diety. První volbou léčby antibiotiky jsou makrolidy. Tento fakt potvrzují výsledky této práce, jelikož právě clarithromycin má 100% citlivost k oběma druhům sledovaných mikrobů. Znepokojivá je rezistence k ciprofloxacinu jako zástupce fluorochinolonů, která byla u obou druhů *Campylobacter* 72%. Časté předepisování antibiotik má za následek vznik více rezistentních kmenů. Proto se nedoporučuje indikace antibiotik u každé střevní infekce.

Kampylobaktery jsou vysoce specializované mikroorganismy s velkým rizikem propuknutí epidemie. Samotné onemocnění – kampylobakterióza patří celosvětově k nejčastějším alimentárním nákazám. Je tedy nezbytné průběžně monitorovat epidemiologické rysy, klinické a mikrobiologické charakteristiky a upravovat terapii podle aktuální situace.

## 7. Seznam použité literatury

**Amar, Ch., Kittl, S., Spreng, D., Thomann, A., Korczak, B. M., Burnens, A. P., Kuhnert, P., 2014:** Genotypes and antibiotics resistance of canine *Campylobacter jejuni* isolates. *Veterinary Microbiology*, 168; 124-130 p. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.006.

**Ambrožová, H., 2006:** Infekční průjmy u dětí a jejich léčba. *Pediatric pro praxi*, 3; 154-156 s.

**Ambrožová, H., 2011:** Letná průjmy. *Medicína pro praxi*, 8; 214-218 s.

**Backert, S., Hofreuter, D., 2013:** Molecular methods to investigate adhesion, transmigration, invasion and intracellular survival of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Journal of Microbiological Methods*, 95; 8-23 p. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.031

**Bednář, M., Fraňková, V., Schindler, J., Souček, A., Vávra, J., 1996:** *Lékařská mikrobiologie – bakteriologie, virologie, parazitologie*. Triton, Praha; 560 s. ISBN-10: 80-2380-297-6

**Bardon, J., Kolar, M., Cekanova, L., Hejnar, P., Koukalova, D., 2009:** Prevalence of *Campylobacter jejuni* and its resistance to antibiotics in poultry in the Czech Republic. *Zoonoses and Public Health*, 56; 111-116 p. DOI: 10.1111/j.1863-2378.2008.01176.x

**Barletta, F., Mercado, E. H., Lluque, A., Ruiz, J., Cleary, T. G., Ochoa, T. J., 2013:** Multiplex Real-Time PCR for detection of *Campylobacter*, *Salmonella* and *Shigella*. *Journal of Clinical Microbiology*, 51; 2822-2829 p.

**Carvalho, A. F., Silva, D. M., Azevedo, S. S., Piatti, R. M., Genovez, M. E., Scarcelli, E., 2013:** Detection of CDT toxin genes in *Campylobacter spp.* strains isolated from broiler carcasses and vegetables in Sao Paulo, Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, 44; 693-699 p.

**Castillo, S. L., Heredia, N., Contreras, J. F., García, S., 2011:** Extracts of edible and medicinal plants in inhibition of growth, adherence and cytotoxin production of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Journal of Food Science, 76; 421-426 p. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02229.x

**Cullen, T. W., O'Brien, J. O., Hendrixson, D. R., Giles, D. K., Hobb, R. I., Thompson, S. A., Brodbelt, J. S., Trent, M. S., 2012:** EptC of *Campylobacter jejuni* mediates phenotypes involved in host interactions and virulence. Infection and Immunity, 81; 430-440 p. DOI: 10.1128/IAI.01046-12

**Deckert, A. E., Taboada, E., Mutschall, S., Poljak, Z., Reid-Smith, R. J., Tamblyn, S., Morrell, L., Seliske, P., Jamieson, F. B., Irwin, R., 2014:** Molecular Epidemiology of *Campylobacter jejuni* Human and Chicken Isolates from Two Health Units. Foodborne Pathogens and Disease, 11; 150-155 p. DOI: 10.1089/fpd.2013.1610

**Díaz-Sánchez, S., Sánchez, S., Herrera-Léon, S., Porrero, C., Blanco, J., Dahbi, G., Blanco, J. E., Mora, A., Mateo, R., Hanning, I., Vidal, D., 2013:** Prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella spp.* and *Campylobacter spp.* in large game animals intended for consumption: Relationship with management practices and livestock influence. Veterinary Microbiology, 163; 274-281 p. DOI: 10.1016/j.vetmic.2012.12.026

**Donatin, E., Buffet, S., Quentin, L., Didier, R., Drancourt, M., 2013:** A DNA microarray for the versatile diagnosis of infectious diarrhoea. APMIS, 121; 634-642 p. DOI: 10.1111/apm.12081

**Ellström, P., Feodoroff, B., Hänninen, M-L., Rautelin, H., 2013:** Characterization of clinical *Campylobacter jejuni* isolates with special emphasis on lipooligosaccharide locus class, stative virulence factors and host response. International Journal of Medical Microbiology, 303; 134-139 p.

**Epps, S. V. R., Harvey, R. B., Hume, M. E., Phillips, T. D., Anderson, R. C., Nisbet, D. J., 2013:** Foodborne *Campylobacter*: Infections, Metabolism, Pathogenesis and Reservoirs. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10; 6292-6304 p. DOI:10.3390/ijerph10126292

**Ghosh, R., Uppal, B., Aggarwal, P., Chakravarti, A., Jha, A. K., Dubey, A. P., 2014:** A comparative study of conventional and molecular techniques in diagnosis of *Campylobacter* gastroenteritis in children. Annals of Clinical and Laboratory Science, 44; 42-48 p.

**Giacomelli, M., Salata, C., Martini, M., Montesissa, C., Piccirillo, A., 2014:** Antimicrobial Resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Poultry in Italy. Microbial Drug Resistance, 20; 181-188 p. DOI: 10.1089/mdr.2013.0110

**González-Hein, G., Huaracán, B., García, P., Figueroa, G., 2013:** Prevalence of virulence genes in strains of *Campylobacter jejuni* isolated from human, bovine and broiler. Brazilian Journal of Microbiology, 44; 1223-1229 p.

**Haddad, N., Saramago, M., Matos, R. G., Prévost, H., Arraiano, C. M., 2013:** Characterization of the biochemical properties of *Campylobacter jejuni* RNase III. Bioscience Reports, 33; 889-901 p. DOI: 10.1042/BSR20130090.

**Hoppe. S., Bier, F. F., Nickisch-Rosenegk, M., 2013:** Rapid Identification of novel immunodominant proteins and characterization of a specific linear epitope of *Campylobacter jejuni*. PLOS ONE, 8; DOI: 10.1371/journal.pone.0065837

**Hu, Y., Huang, J., Jiao, X., 2014:** Screening of genes expressed in vivo during interaction between chicken and *Campylobacter jejuni*. Journal of Microbiology Biotechnology, 24; 217-224 p.

**Ivanovic, S., 2012:** *Campylobacter* as a cause of gastroenteritis in humans and animals. African Journal of Microbiology Research, 6; 1651-1657 p. DOI: 10.5897/AJMR11.1094

**Kolář, M., Látal T., Čermák P., 2002.** Klinicko - mikrobiologické podklady racionální antibiotické léčby. TRIOS, Praha. 56 s. ISBN 80-238-9301-7.

**Lazou, T., Houf, K., Soultos, N., Dovas, Iossifidou, E., 2014:** *Campylobacter* in small ruminants at slaughter: Prevalence, pulsotypes and antibiotik resistance. International Journal of Food Microbiology, 173; 54-61 p. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.011

**Lochmann, O., 1994.** Základy antimikrobní terapie. Triton, Praha. 175 s. ISBN 80-858-7505-5.

**Perez-Boto, D., Herrera-Leon, S., Garcia-Pena, F. J., Abad-Moreno, J. C., Echeita, M. A., 2014:** Molecular mechanisms of quinolone, macrolide, and tetracycline resistance among *Campylobacter* isolates from initial stages of broiler production. Avian Pathology, 43; 176-182 p. DOI: 10.1080/03079457.2014.898245.

**Pike, B. L., Guerry, P., Poly, F., 2013:** Global Distribution of *Campylobacter jejuni* Penner Serotypes: A Systematic Review. PLOS ONE, 8; DOI: 10.1371/journal.pone.0067375

**Platts-Mills A. J. et al., 2014:** Detection of *Campylobacter* in Stool and Determination of Significance by Culture, Enzyme Immunoassay, and PCR in Developing Countries. J. of Clin Mic, 52/4; 1074-1080 p.

**Polák P., Juránková J., Husa P., 2014:** Kamylobakteriůza. Klin mikrobiol inf l k, 20/2; 50-54 s

**Pr kazsk  M., Pr kazsk  V., Beneš,  ., 2004:** Trendy v skytu salmonel z a kamylobakteri z v  esk  republice. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 3; 100-105 s. ISSN 1210-7913

**Rokosz, N., Rastawicki, W., Wolkowicz, T., 2014:** Microbiological diagnosis of infections caused by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in humus. Postepy Higieny Medycyny Doswiadczalnej, 68; 48-56 p. DOI: 10.5604/17322693.1086079.

**Sarkar, S. R., Hossain, M. A., Paul, S. K., Ray, N. C., Sultana, S., Rahman, M. M., Islam, A., 2014:** Campylobacteriosis - an overview. Mymensingh Medical Journal, 23; 173-180 p.

**Silva, D. T., Tejada, T. S., Cunha, C. C., Lopes, N. A., Agostinetto, A., Collares, T., Leon, P. M. M., Timm, C. D., 2014:** Occurrence of *Campylobacter* in poultry, meat chicken and human feces, and cdt GENES research. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinaria e Zootecnia, 66; 297-304 p. ISSN 0102-0935

**Stef, L., Cean, A., Vasile, A., Julean, C., Drinceanu, D., Corcionivoschi, N., 2013:** Virulence characteristics of five new *Campylobacter jejuni* chicken isolates. Gut Pathogens, 5; 41-47 p. DOI:10.1186/1757-4749-5-41

**Steinhauserova. I., Ceskova, J., Nebola, M., 2002:** PCR/restriction fragment lenit polymorphism (RFLP) typing of human and poultry *Campylobacter jejuni* strains. Letters in Applied Microbiology, 34; 354-358 p.

**Stephen, L. W., 2013:** Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here?. Journal of Microbiological Methods, 95; 3-7 p. DOI: 10.1016/j.mimet.2013.06.011

**Versalovic, J., 2011:** Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington. 2630 s. ISBN: 978-1-55581-678-0

**Votava, M., 2000:** Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii, Brno, Hortus; 408 s. ISBN 80-238-5058-X.

**Votava, M., 2005:** Lékařská mikrobiologie obecná. Neptun, Brno. 351 s. ISBN 80-86850-00-5.

**Votava, M., 2006:** Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno. 495 s.  
ISBN 80-902896-6-5

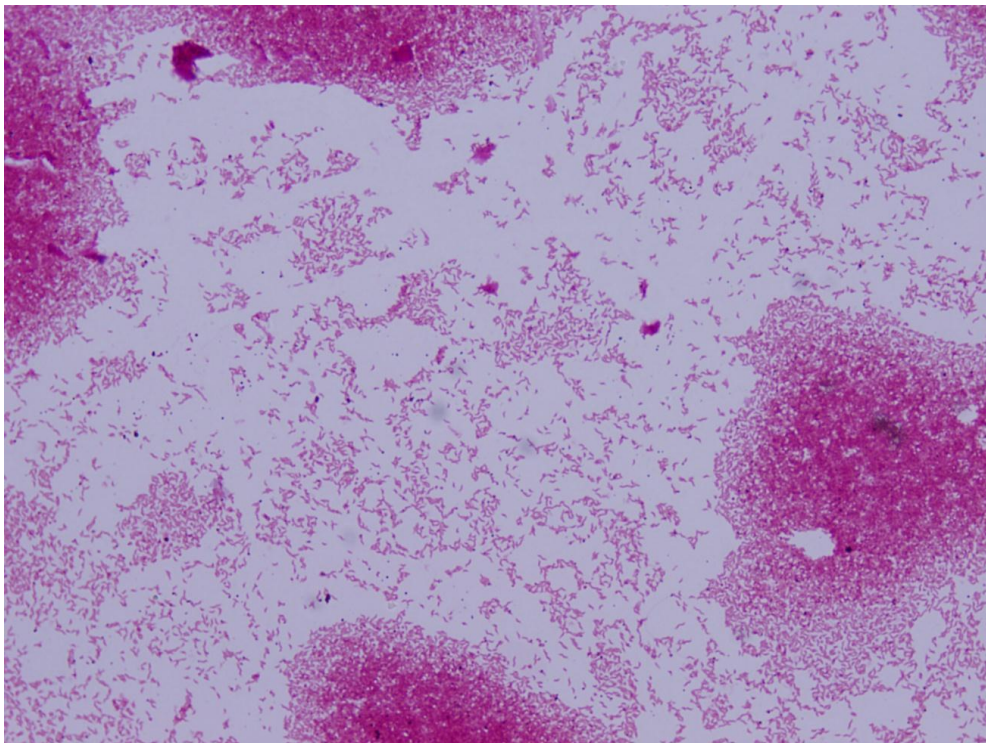
**Votava, M. a kolektiv. 2010:** Lékařská mikrobiologie vyšetřovací metody,  
Brno, Neptun; 504 s. ISBN 978-80-86850-04-8.

**Žemličková, H., Jakubů, V., Marejková, M., Urbášková, P., 2014:**  
Rezistence k erytromycinu, ciprofloxacinu a tetracyklinu u humánních izolátů  
*Campylobacter spp.* v České republice vyšetřena standardní metodou EUCAST.  
Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 63/3; 184-190 s

**Wang, H., Murdoch, D. R., 2004:** Detection of *Campylobacter* species in  
faecal samples by direkt Gram stain microscopy. Pathology, 34; 343-344 p

## 8. Přílohy

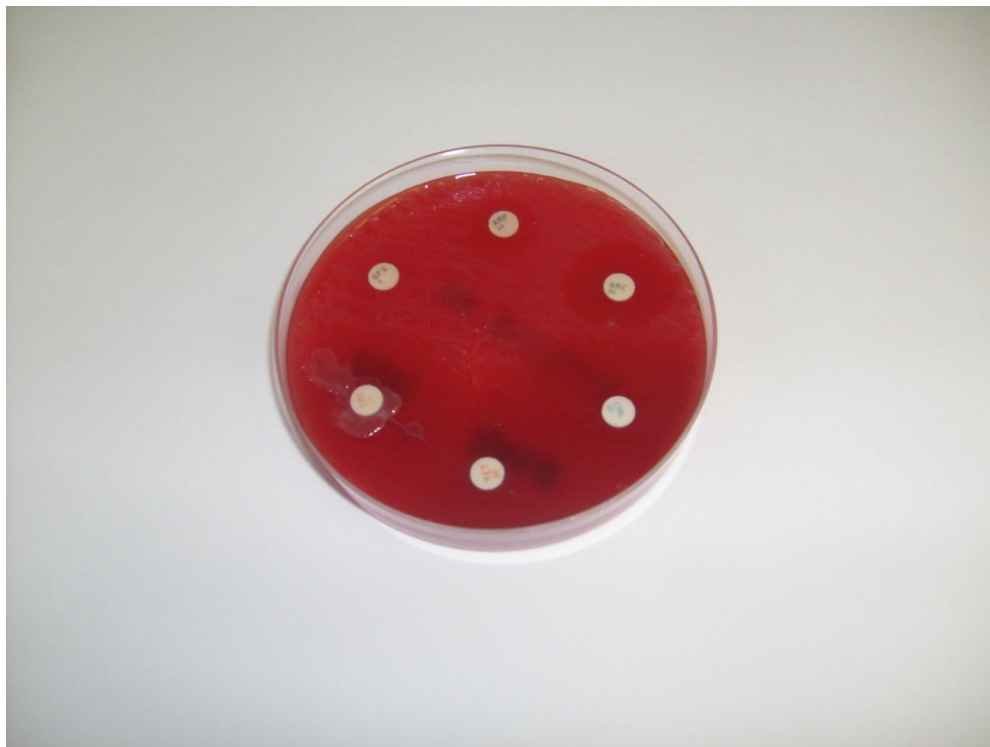
Příloha č. 1:



Obr. 15: Mikroskopický obraz *Campylobacter jejuni* z biologického vzorku  
(zdroj: vlastní)



Příloha č. 2:



Obr. 16: Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovým difuzním testem u *Campylobacter spp.* (zdroj: vlastní)

Příloha č. 3:



Obr. 17: *Campylobacter jejuni* na CSM agaru (zdroj: vlastní)

Příloha č. 4:



Obr. 18: Jednotlivé kolonie *Campylobacter jejuni* na Butzlerově selektivním mediu (zdroj: vlastní)