



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 a diagnostika *Campylobacter jejuni*
v České republice

Vypracoval: Lukáš Holer

Vedoucí práce: MUDr. Radim Kramář, CSc.

České Budějovice 2014

Abstrakt

Campylobacter jejuni je jednou z nejrozšířenějších bakterií, které jsou průvodcem alimentárních otrav. Již první zmínka o této bakterii byla publikována v roce 1886 Theodorem Escherichiem. Zástupci rodu byly dříve řazeny do rodu *Vibrio*. Až v roce 1973 byla vypracována komplexní taxonomie rodu *Campylobacter* a definovali se 4 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 bičků. *Campylobacter* vyžaduje v atmosféře přítomnost 3 – 5 % O₂ a 3 – 10 % CO₂. Je citlivý zejména k vyšší přítomnosti 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 katalasovou reakci. To se dále velmi dobře využívá k samotné diagnostice. Rozlišuje se dohromady okolo 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 choleře, Shiga toxiny a hepatotoxin.

Mezi nejčastější onemocnění patří gastroenteritida a kampylobakteriózy. Závažnou komplikací tohoto onemocnění je Guillain-Barré syndrom. Nejčastějším projevem je ale, lehký nebo střední vodnatý průjem. Léčba spočívá převážně v dehydrataci a podávání solných roztoků s glukózou. Jen v nejhorších případech jsou nasazována antibiotika na bázi makrolidů nebo chinolonů.

Ke kultivaci se používá nejčastěji CSM agar. Jako základní diagnostická metoda stále zůstává mikroskopie, ale 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 pracovišti mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o. Dále pak kultivace a stanovení citlivosti k antibiotikům.

Na pracovišti na pracovišti mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o. se diagnóza určuje ze vzorku stolice, která je zasílána především od praktických dětských doktorů. K diagnostice se zde používá mikroskopie a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.

V roce 2012 bylo zachyceno 287 pozitivních nálezů infekce *Campylobacter jejuni*. Z celkového počtu bylo 54 % mužů a 46 % žen. V roce 2013 jich bylo pozitivních nálezů 251, z toho bylo 59 % mužů a 41 % žen. Nejčastější záchyt byl v měsících červen, srpen a září v obou rocích. Nejvíce náchylnou skupinou jsou děti a mladiství. V roce 2013 až 74 % pacientů z této věkové skupiny.

U 206 kmenů *Campylobacter jejuni* byla stanovena citlivost k vybraným antibiotikům. 59 % kmenů bylo rezistentních k ampicilinu, 34 % kmenů k tetracyklinu, 35 % k erythromycinu a 71 % k oflaxacilinu.

Abstract

Campylobacter jejuni is one of the most spreaded bacteria that causes food poisoning . The very first mention of this 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 developer 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 % O₂ and 3-10 % CO₂ . 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: similar to cholera enterotoxin, Shiga toxins and hepatotoxin.

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

For cultivation is preferably used CSM agar. Microscoping is still basic diagnostic method, but 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 microbiological laboratory work Synlab Czech s.r.o. and furthermore, cultivation and susceptibility to antibiotics.

The diagnosis in the workplace of microbiological laboratories Synlab Czech s.r.o. is determined from a stool sample, which is sent particularly from children practicing doctors. The diagnosis uses microscopy and MALDI- TOF .

It was detected 287 positive findings of *Campylobacter jejuni* infection in 2012 of the total, 54 % of men and 46 % women. There were 251 positive findings , of which 59 % of men and 41 % women in 2013. The most common seizure was in the months of June, August and September in both years . The most vulnerable groups are children and adolescents . Up to 74% of patients in this age group in 2013.

Sensitivity to selected antibiotics was determined for 206 strains of *Campylobacter jejuni*. 59 % of the strains were resistant to ampicillin , 34 % of the strains to tetracycline , 35 % to erythromycin and 71 % to ofloxacin.

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 jejich internetových stránkách, a to se zachováním mého 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 (datum)

.....

(jméno a příjmení)

Poděkování

Děkuji svému školiteli MUDr. Radimu Kramářovi, CSc. za poskytnuté odborné rady, asistenci při provádění praktických pokusů, podporu a značnou trpělivost po dobu naší spolupráce. Dále děkuji zaměstnancům společnosti Synlab czech s.r.o. v Českých Budějovicích, kteří mi byli nápomocni při získávání dat na půdě mikrobiologické laboratoře. Také děkuji RNDr. Marii Šmilauerové, Ph.D. za pomoc při pořízení fotografií mikrobiologických preparátů. V neposlední řadě bych rád poděkoval mé rodině za její podporu během studia.

Obsah

1.	Úvod.....	11
2.	Současný stav.....	13
2.1	Charakteristika rodu <i>Campylobacter</i>	13
2.1.1	Taxonomie.....	13
2.1.2	Morfologie.....	14
2.1.3	Stavba buněčné stěny	14
2.2	Specifika <i>Campylobacter jejuni</i>	15
2.2.1	Výskyt	16
2.2.2	Metabolismus	17
2.2.3	Genetika.....	17
2.2.4	Faktory virulence.....	18
2.2.5	Onemocnění vyvolaná <i>Campylobacter jejuni</i>	21
2.2.6	Epidemiologie a přenos	23
2.2.7	Terapie infekce <i>Campylobacter jejuni</i>	24
2.2.8	Diagnostika infekce <i>Campylobacter jejuni</i>	26
3.	Cíle práce	33
4.	Metodika	34
4.1	Hypotézy	34
4.2	Vymezení spádové oblasti.....	34
4.3	Charakteristika souboru	34
4.4	Materiál	35
4.5	Metody	36

4.5.1	Kultivace	36
4.5.2	Mikroskopie.....	37
4.5.3	Hmotnostní spektrometrie	38
4.5.4	Stanovení citlivosti k antibiotikům.....	38
5.	Výsledky	40
6.	Diskuze	48
7.	Závěr	50
8.	Klíčová slova	51
9.	Seznam použité literatury	52
10.	Přílohy.....	57

Seznam použitých zkratek

AIN – amoxicilin

AMP – ampicilin

ATB – antibiotikum

CDT – cytolethal distending toxin

CMP - chloramfenikol

CSM – Charcoal-Based Selective Medium

DNA – deoxyribonucleic acid

ERY - erythromycin

GBS – Guillain-Barré syndrom

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

OFL – oflaxacilin

PCR – polymerase chain reaction

rRNA – ribosomal ribonucleic acid

tRNA – transfer ribonucleic acid

TET - tetracyklin

spp. – subspecie

1. Úvod

Campylobacter jejuni je jednou 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.

Campylobacter jejuni je od sedmdesátých let považován za nebezpečný potravinářský patogen a patrně je původcem přibližně dvojnásobného 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 je vážným patogenem u lidí. K infekci stačí minimální množství bakterií, v posledních 20. letech se alimentární otravy způsobené *Campylobacter spp.* vyskytovaly velmi často. Zdravé osoby nejsou nositeli tohoto patogenu 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* 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 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 morfologicky 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 r. 1963, na základě stanovení obsahu guaninu a cytosinu v molekule DNA a podle biochemických charakteristik *V. fetus* a *V. tubulus* se začlenili do nového rodu *Campylobacter*. O deset let později byla vypracována komplexní taxonomie tohoto rodu a definovali 4 druhy: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* a *C. sputorum*.

Téma této bakalářské práce jsem si zvolil z důvodu narůstající četnosti střevních onemocnění vůbec. Pro širší veřejnost není tento problém brán na větší zřetel. Přitom *Campylobacter jejuni*, jako původce nozokomiálních nálezů, nabývá stále většího významu. Nejrizikovější skupinou infekce jsou právě děti a mladiství do 18 let. V této práci se zabývám diagnostikou *C. jejuni* a to mikroskopií a hmotnostní spektrometrií. Také se zajímám o kultivaci a stanovení citlivosti k antibiotikům. Výsledkem mé práce je statistický přehled výskytu *C. jejuni* v závislosti na jednotlivých měsících a pohlaví během let 2012 a 2013 a dále už jen pro upřesnění v závislosti na věku za rok 2013. Při pozitivním nálezu je možné stanovit citlivost k antibiotikům, která je v práci také zpracována za rok 2013. Veškerá zpracování jsem prováděl na pracovišti mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o.

2. Současný stav

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 *Campylobacter* jsou známé jako významné původce 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 *Campylobacter*, které 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. Avšak za nevhodných podmínek přecházejí v kokovité útvary. Jsou široké 0,2 – 0,8 μm a dlouhé přibližně 0,5 – 0,6 μm . 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-laktamasy.

Bakterie žijí v prostředí pro ně hypotonickém. Tím pádem v jejich nepřírodném hypertonickeém 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*

Tento velmi úspěšný původce onemocnění z potravin má přísné nároky na své růstové podmínky, proto se běžně v potravinách nemnoží, pouze přežívá. *Campylobacter* je mikroaerofilní a vyžaduje v atmosféře přítomnost 3 – 5 % O₂ a 3 – 10 % CO₂. 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 jejuni* je citlivý k tepelnému opracování (D55 = 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). Při stejných hodnotách pH kyselina mléčná inhibuje růst *Campylobacter spp.* více než

kyselina chlorovodíková. 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⁻¹ 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. Redukují tedy dusičnan, ale dusitany již nikoliv. Z toho důvodu jsou tedy indol negativní. Ovšem 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 sekvencoval, 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

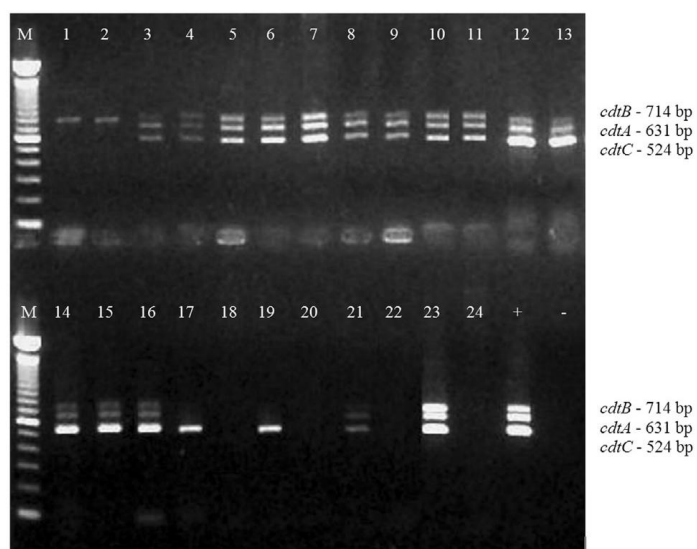
Bakterie *Campylobacter spp.* produkují řadu faktorů virulence. Kolonizace střeva je umožněna pohyblivostí bakterií za chemickým podnětem – chemotaxí a produkcí adhezivních proteinů. Přežití uvnitř vakuol epiteliálních buněk je bakteriím usnadněno produkcí katalázy a superoxiddismutázy, která inaktivuje 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 epiteliální 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 choleře, Shiga toxiny a hepatotoxin (Castillo et al., 2011)

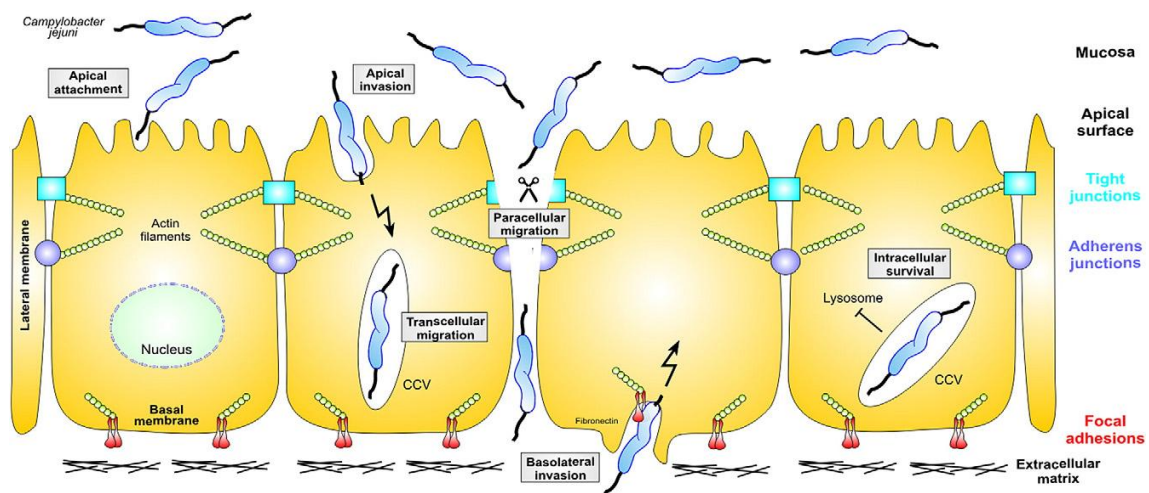
2.2.4.2 Enterotoxin

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

Toxin účinkující na střevo a vyvolávající poruchu některých jeho funkcí. 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. B pojednotka váže specifické glykolipidy na hostitelské buňce (Díaz-Sánchez et al., 2013). A podjednotka se rozděluje na dvě části. První se váže na ribozom a narušuje syntézu proteinů.



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

2.2.5 Onemocnění vyvolaná *Campylobacter jejuni*

2.2.5.1 Gastroenteritida

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 problémů (Ghosh et al., 2013). Již méně než 500 buněk může vyvolat onemocnění (Ivanovic, 2012).

2.2.5.2 Kampylobakteriózy

Toto onemocnění patří mezi zoonózy. Může být tedy přenosné ze zvířat na člověka. Je sledováno 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.

Termofilní druhy rodu *Campylobacter spp.*, zejména *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsou nejčastěji považovány za původce akutních bakteriálních gastroenteritid u lidí. Dalšími druhy, které byly prokázány za lidské patogeny způsobující kampylobakteriózy, jsou *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. fetus* a *C. sputorum*. Převážná většina kampylobakterióz 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 je zvýšený výskyt kampylobakterióz, kdy začíná sezóna grilování.

Příznaky se liší podle jednotlivců, kvůli variabilitě hostitele a infikujících organismů. Inkubační doba tohoto onemocnění je mezi 24 až 72 hodinami. Může 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 hlavně klouby a je diagnostikována 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, která je pro 3 – 10 % 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.

2.2.6 Epidemiologie a přenos

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 kampylobakteriíza nejčastějším onemocněním z potravin v ČR. V EU je situace podobná. Četnost kampylobakteriízy je 44,4 případů na 100 000 obyvatel s odhadem 9 milionů ročně. V období 200 – 2005 byla četnost vyšší. Lze tedy usoudit, že hygienická opatření EU jsou efektivní a dochází ke snižování výskytu kampylobakterií. 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).

Prevencí 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 (Maďar a kol., 2006).

2.2.7 Terapie infekce *Campylobacter jejuni*

Hlavním onemocněním způsobeným *Campylobacter jejuni* jsou průjmy. Základním postupem léčby zůstává stále rehydratace. Je nutné doplnit základní potřebu tekutin i ztráty způsobené průjmem, zvracením a horečkou. Po dehydrataci 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 probatik, 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, u septických forem. ATB se obvykle podávají v běžných dávkách pod dobu 3 – 5 dnů, u septických forem je léčba dlouhodobá a intravenózní pod dobu 14 dnů až několika měsíců podle stavu pacienta. U kamylobakterióz se podávají makrolidy, jako alternativa jsou chinoliny, které lze použít až od 17 let věku (Ambrožová, 2006)

2.2.7.1 Makrolidy

Principem účinku makrolidů je vazba na rRNA a inhibice proteosyntézy. Vznikající peptidická vazba brání uvolnění tRNA. Tento účinek je pouze bakteriostatický.

Základní makrolid 1. generace je erythromycin, odpovídá spektru penicilinu tím, že zasahuje především gramnegativní mikroby, tedy i *Campylobacter spp.* Erythromycin se většinou podává per os. Dobře proniká do buněk, kde nabývá vyšších hladin než v plasmě. I když je docela málo toxický, často se po něm dostavuje zvracení. Daleko lépe jsou snášeny takové formy erythromycinu, které bezpečně projdou kyselým žaludečním prostředím a jejichž vstřebávání není ovlivněno jídlem.

Jiným problémem je působení hepatotoxicky a ototoxicky při vyšších dávkách antibiotika. Nelze ho kombinovat s jinými léky, především s beta-laktamy a linkosamidy. Poté dochází k antagonistickým účinkům (Votava, 2005).

2.2.7.2 Chinolony

Chinolony působí na gramnegativní mikroby tím, že se važí 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 chinolinů je baktericidní.

Mezi klasické chinolony patří bakteriostatická kyselina nalidixová a baktericidní kyselina molinová. Jejich spektrum zahrnuje gramnegativní střevní tyčinky. I spektrum

další skupiny, fluorovaných chinolonů, je zaměřené spíše na gramnegativní bakterie, ovšem jejich použití by mělo být v komunitě velmi omezené. Jsou však velmi účinné díky obsahu fluoru v jejich molekule a jsou to systémově velmi využívané antimikrobiální látky (Votava, 2005).

2.2.8 Diagnostika infekce *Campylobacter jejuni*

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
Cefaloperazon	0,032
Vankomycin	0,02
Cyklohexamid	0,1

Naočkované půdy se dále nechají inkubovat v prostředí s 5 % kyslíku, 10 % CO₂ 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. Následný vzhled vzniklých kolonií se odvíjí od druhu mikroba.

Mimo charakteristického vzhledu kolonií na určených selektivně-diagnostických půdách představuje základní konfirmace hodnocení morfologie buněk po obarvení dle Grama, testování pohyblivosti, mikroaerofilního růstu při 25 °C, aerobního růstu při 42 °C a průkaz oxidázy (Wang et al., 2004).

Poslední studie však ukazují, že pohyblivost je důležitá, ale ne tolik efektivní při infekci mikrobem (Backert et al., 2013)

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 potvrzení 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 lze využít ke potvrzení 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 ° 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 s nimi 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.

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 stěžuje jejich identifikace a diferenciaci pomocí těchto testů. Většina z nich se založena na vyhodnocení morfologických znaků, nutričních požadavcích, rezistenci k agens, teplotní toleranci a biochemických testů.

Jak bylo výše uvedeno *Campylobacter jejuni* je oxidasa a katalasa pozitivní, redukuje dusičnany na dusitany. Roste za mikroaerofilních podmínek při teplotě 42 °C. Bylo navrženo 12 fenotypových testů, usnadňujících identifikaci 6 kmenů *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 *Campylobacter jejuni* existuje několik serotypizačních schémat. Tyto testy jsou jedny z běžných metod detailní fenotypové charakterizace.

Pennerova serotypizace je založena na pasivní hemaglutinaci s rozpustnými, tepelně stabilními antigeny, navázaných na erythrocyty se specifickými antiséry. Hlavní antigenní složkou jsou lipopolysacharidy. Reakce se též zúčastňují kapsulární polysacharidy. Nevýhodou Pennerovy metody je ovlivnitelnost výsledků variabilitou erythrocytů 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*. Nedostatkem této serotypizace je její špatné rozšíření

3. Cíle práce

- Detekce a kultivace *Campylobacter jejuni*
- Porovnání metod identifikace
- Zmapování výskytu *Campylobacter jejuni* u člověka během roku
- Zhodnocení věkové distribuce výskytu *Campylobacter jejuni* ve vzorku populace
- Zjištění citlivosti na antibiotika

4. Metodika

4.1 Hypotézy

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

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

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

4.2 Vymezení spádové oblasti

Spádovou oblastí pro sběr vzorků mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o. je Jihočeský kraj a Pacovsko. Vzorky přichází systematicky od tamních praktických lékařů, kteří nemají k dispozici adekvátní dopravu k transportu. V případě *Campylobacter jejuni* se jedná především o praktické dětské lékaře.

4.3 Charakteristika souboru

Praktickou část této práce jsem prováděl na pracovišti mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o. (dále jen pracoviště Synlab). 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. Avšak pro naplnění cílů práce jsem využil údaje za roky 2012 a 2013. K získání dat jsem použil databázi pracoviště mikrobiologické laboratoře.

Materiál: stolice k diagnostice *Campylobacter jejuni*

Metody: Mikroskopie

Hmotností spektrometrie MALDI-TOF

Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovým difuzním testem

4.4 Materiál

Pro mikrobiologické vyšetření je důležitý správný odběr biologického materiálu. Pro diagnostiku *Campylobacter jejuni* je nutné zaslat vzorek stolice, odebraného do sterilní plastové nádoby. Stolica by neměla být kontaminována příměsí krve či moči a její velikost by měla odpovídat zhruba velikosti 2,5 cm³. Častěji se však zasílá vzorek tekuté stolice.

Transport vzorků do mikrobiologické laboratoře musí být dostatečně rychlý. Nejlépe do 2 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 nádoby umístěny nejlépe ve svislé poloze a v pevné a nepropustné nádobě. V případě extrémních vnějších teplot je nutno nádoby 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 nádoby 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 laboratoř, kde se vyšetření provádí.

4.5 Metody

4.5.1 Kultivace

Pro úspěšný záchyt *Campylobacter jejuni* zajištěných z transportu materiálu se používá na pracovišti Synlab Karmaliho půda. Konečné pH Karmaliho půdy je 7,4.

Tab. II: Složení Karmaliho půdy

Složka	Množství [g]
Columbia agar	39
Aktivní uhlí	4
Hemin	0,032
Pyruvát sodný	0,1
Cefoperazon	0,032
Vankomycin	0,01
Cykloheximid	0,1

Naočkované půdy se dále nechají inkubovat v prostředí s 5 % kyslíku, 10 % CO₂ 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.

4.5.2 Mikroskopie

Mikrobiologický preparát se zhotovuje z každého zaslaného materiálu. Preparát se připravuje vždy a pouze z jedné kolonie natřené na podložní sklíčko. Sklíčko je poté řádně označeno číslem vzorku, které je vedeno v systému pracoviště, z opačné strany než je natřeno a následně ofixováno plamenem kahanu. Poté se přistupuje k barvení podle Gramma.

Tab. III: Postup barvení podle Gramma

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 2 minuty.

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

4.5.3 Hmotnostní spektrometrie

K rozpoznání kmene bakterie lze též použít hmotnostní spektrometrii MALDI TOF (MALDI – ionizace laserem za přítomnosti matrice, TOF analýza doby letu). Pomocí této techniky se identifikují bakterie a mikromycety. Zároveň to je jediný zaručený postup jak s jistotou na pracovišti Synlab rozeznat *Campylobacter jejuni* od *Campylobacter coli*.

Do přístroje se vkládají destičky umístěné na rovném povrchu. Jsou rozděleny do 48 pozic ve 3 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 µl matričního roztoku HCCA a nechá se zaschnout. Jako kontrolní vzorek se využívá referenční kmen *Escherichia coli*, který je umístěn stejně jako 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 hmotností 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 %.

4.5.4 Stanovení citlivosti k antibiotikům

Stanovení citlivosti k antibiotikům se na pracovišti Synlab 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 6 antibiotik. Inkubace se provádí v mikroaerofilním prostředí při 37 °C po 48 hodin. Poté se změří průměr inhibiční zóny okolo disku v mm a porovná se s hraniční hodnotou pro konkrétní antibiotikum.

Bakterie citlivá k antibiotiku neroste v okolí disku a zóna růstu je větší nebo rovna 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* se testuje citlivost k ampicilinu, ampicilinu, chloramfenikolu, tetracyklinu, erythromycinu a oflaxacilinu.

Tab IV: Hraniční hodnoty inhibičních zón pro *Campylobacter jejuni* u vybraných antibiotik

Zkratka ATB	ATB	Citlivost [mm]	Rezistence [mm]
AMP	ampicilin	≥ 17	17
AIN	amoxicilin	≥ 15	15
CMP	chloramfenikol	≥ 14	14
TET	tetracyklin	≥ 19	19
ERY	erythromycin	≥ 17	17
OFL	oflaxacilin	≥ 20	20

5. Výsledky

V roce 2013 bylo na pracovišti Synlab vyšetřeno 251 pozitivních vzorků stolice na *Campylobacter jejuni*. Pro průkaz infekce *Campylobacter jejuni* stačila pozitivita alespoň jednoho z diagnostických testů.

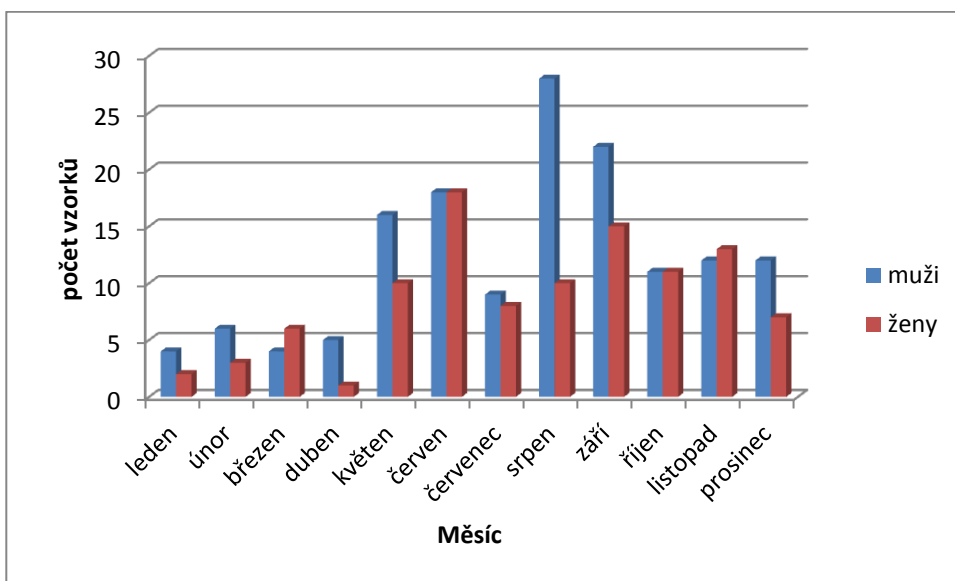
Nejčastěji byly vzorky zasílány praktickými dětskými lékaři.

Tab. V: Počet pozitivních nálezů ze vzorků za rok 2013

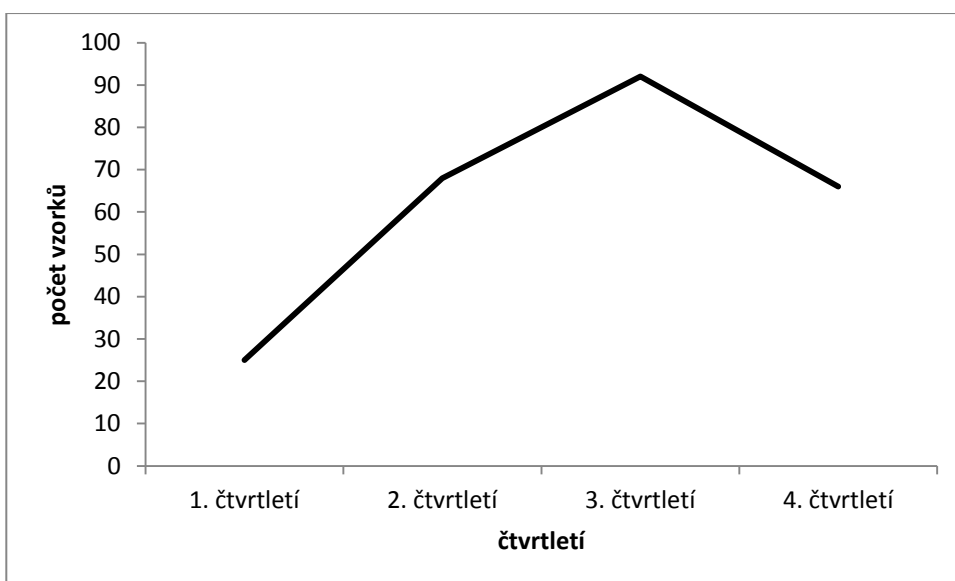
	Počet pozitivních nálezů		Celkem
	muži	ženy	
Leden	4	2	6
Únor	6	3	9
Březen	4	6	10
Duben	5	1	6
Květen	16	10	26
Červen	18	18	36
Červenec	9	8	17
Srpen	28	10	38
Září	22	15	37
Říjen	11	11	22
Listopad	12	13	25
Prosinec	12	7	19
Celkem	147	104	251

Z celkových 251 vzorků bylo 147 mužů (59 %) a 104 žen (41 %)

Nejvíce pozitivních nálezů bylo v měsíci červnu, srpnu a září



Obr. 3: Graf počtu pozitivních nálezů *Campylobacter jejuni* v jednotlivých měsících za rok 2013



Obr. 4: Graf výskytu infekce *Campylobacter jejuni* v průběhu roku 2013

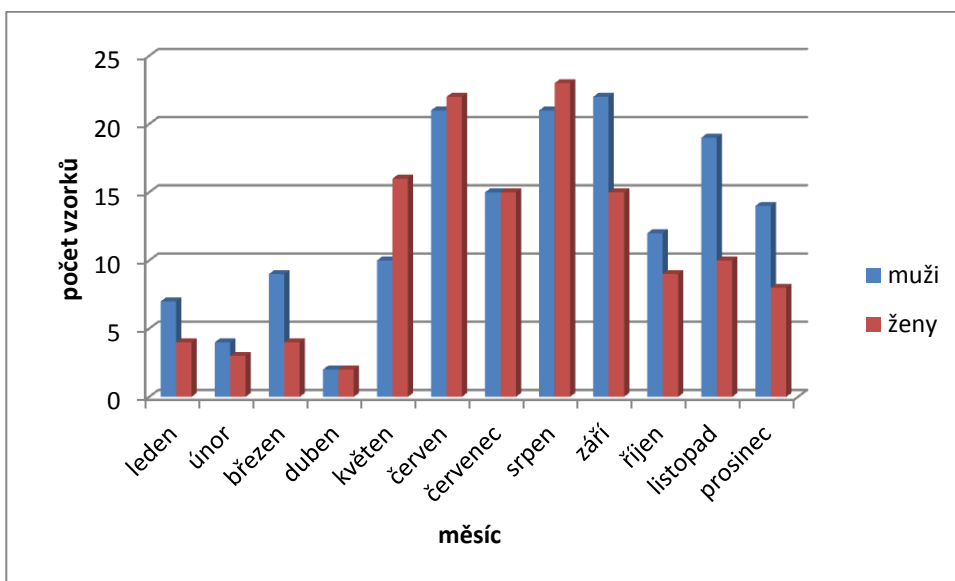
Pro ověření výskytu infekce *Campylobacter jejuni* jsou použita data i z roku 2012. Bylo nalezeno 287 pozitivních případů.

Tab. VI: Počet pozitivních nálezů ze vzorků za rok 2012

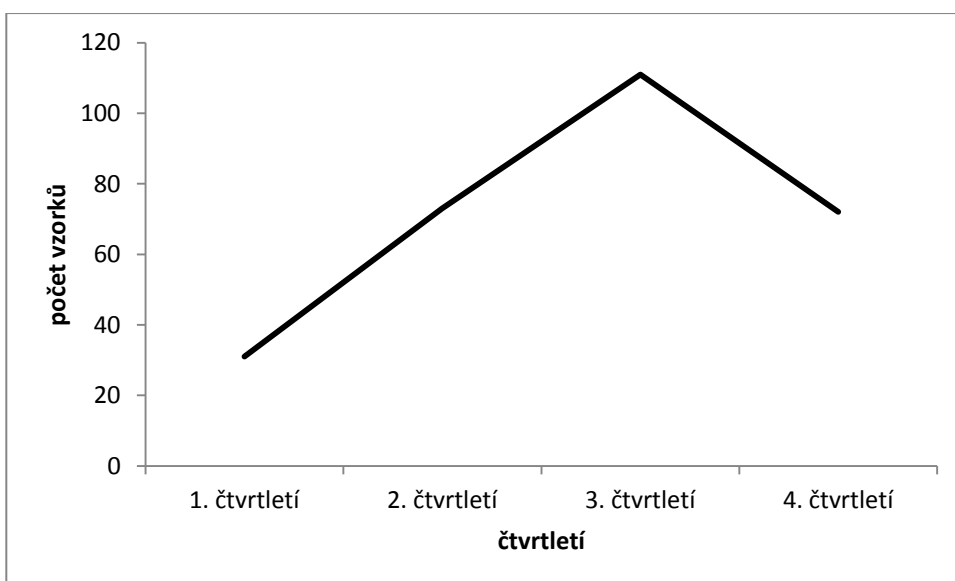
	Počet pozitivních nálezů		Celkem
	muži	ženy	
Leden	7	4	11
Únor	4	3	7
Březen	9	4	13
Duben	2	2	4
Květen	10	16	26
Červen	21	22	43
Červenec	15	15	30
Srpen	21	23	44
Září	22	15	37
Říjen	12	9	21
Listopad	19	10	29
Prosinec	14	8	22
Celkem	156	131	287

Z celkových 251 vzorků bylo 156 mužů (54 %) a 131 žen (46 %)

Nejvíce pozitivních nálezů bylo v měsíci červnu, srpnu a září



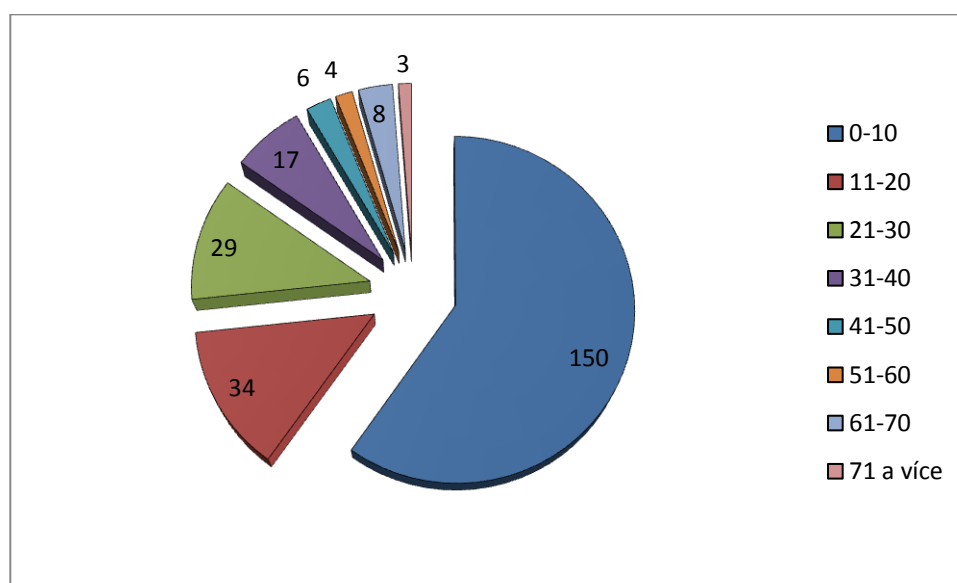
Obr. 5: Graf počtu pozitivních nálezů *Campylobacter jejuni* v jednotlivých měsících za rok 2012



Obr. 6: Graf výskytu infekce *Campylobacter jejuni* v průběhu roku 2012

Tab. VII: Počet pozitivních nálezů v závislosti na věku za rok 2013

Věková skupina	Pozitivní nálezy	Procentuální zastoupení (%)
0-10	150	60
11-20	34	14
21-30	29	12
31-40	17	6
41-50	6	2
51-60	4	2
61-70	8	3
71 a více	3	1



Obr. 7: Graf počtu pozitivních nálezů *Campylobacter jejuni* v závislosti na věku za rok 2013

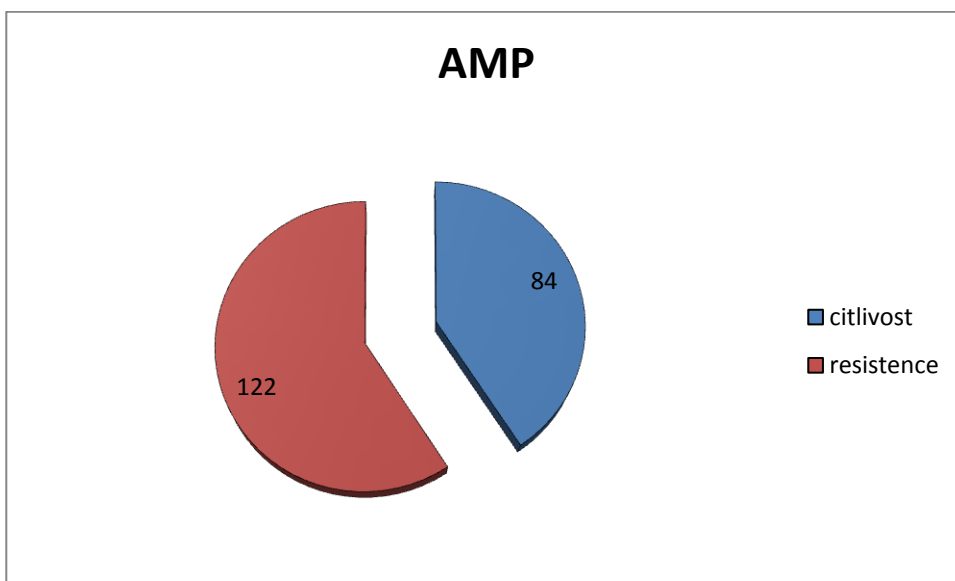
Nejvyšší záchyt infekce *Campylobacter jejuni* byl u věkové skupiny 0-10 let (60 %) poté následovala skupina 11-20 let (14 %).

U všech vyšetřovaných vzorků *Campylobacter jejuni* byla testována citlivost k antibiotikům diskovým difuzním testem. Z celkového počtu 251 vyrostla rezistence u 206 kmenů.

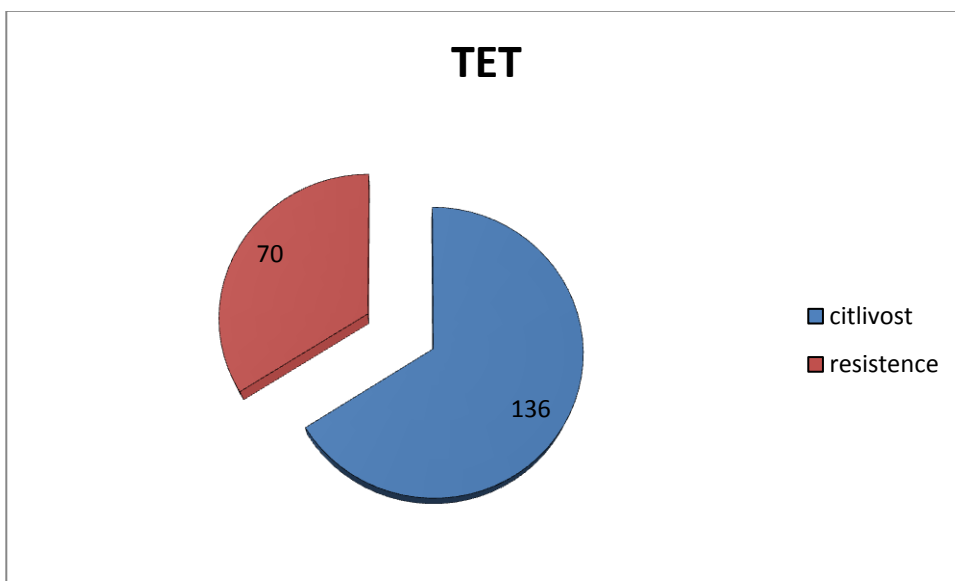
Tab. VIII: Přehled citlivosti a rezistence u *Campylobacter jejuni* k jednotlivým antibiotikům

ATB	Počet kmenů	Citlivost (počet)	Citlivost (%)	Rezistence (počet)	Rezistence (%)
AMP	206	84	41	122	59
AIN	206	206	100	0	0
CMP	206	206	100	0	0
TET	206	136	66	70	34
ERY	206	133	65	73	35
OFL	206	60	29	146	71

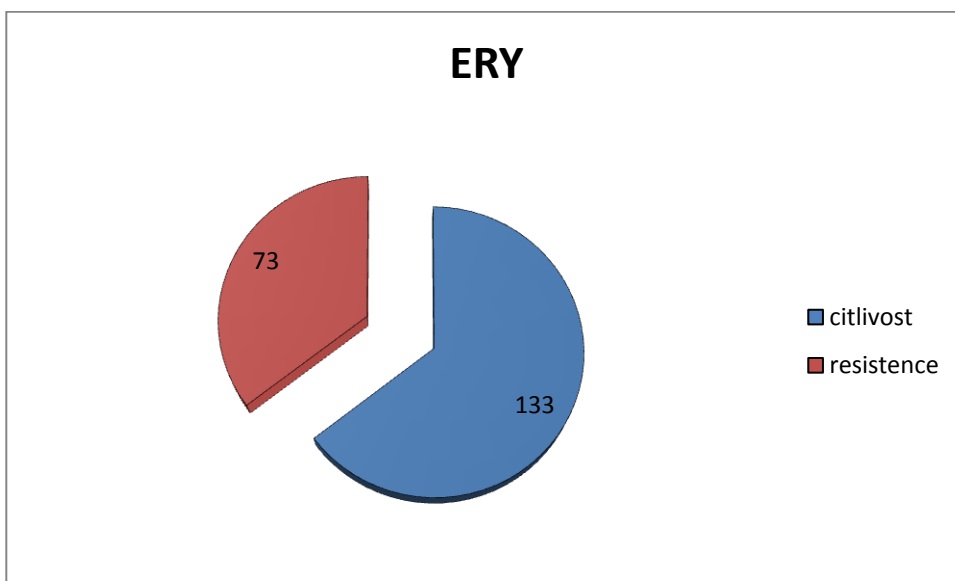
Pro lepší přehlednost je v následujících grafech znázorněna citlivost k jednotlivým antibiotikům. U AIN a CMP je citlivost 100%, proto graf chybí.



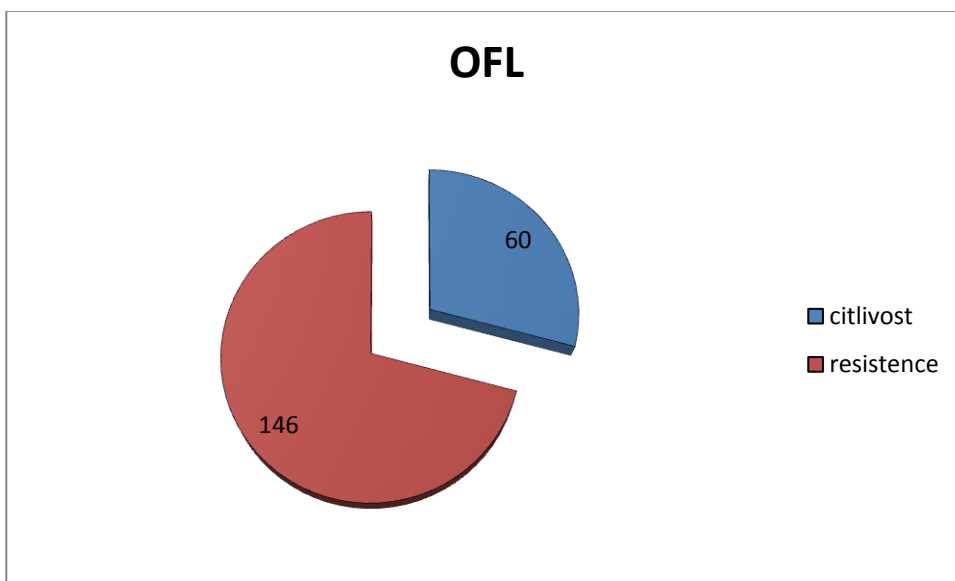
Obr. 9: Citlivost k ampicilinu



Obr. 10: Citlivost k tetracyklinu



Obr. 11: Citlivost k erythromycinu



Obr. 12: Citlivost k oflaxocilinu

6. Diskuze

Infekce *Campylobacter jejuni* má v posledních letech, i díky stále zlepšujícím se diagnostickým metodám, zvyšující se charakter. Je stále velmi častá oproti infekcím způsobených jinými mikroby. *Campylobacter jejuni* je původcem kampylobakterióz a gastroenteritid. V současné době je k dispozici řada diagnostických metod, které potvrdí infekci. Pro přímý důkaz infekce se odebírá vzorek stolice.

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

Na pracovišti Synlab se vzorek stolice vyšetřuje dvěma metodami. Přímým průkazem mikroskopie a hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF. Mikroskopie se provádí u všech zaslaných vzorků. Tou ale od sebe nejde zaručeně rozeznat *C. jejuni* a *C. coli*. K tomuto účelu slouží právě hmotnostní spektrometrie. Je tedy lepší využívat tuto metodu z důvodu vyšší citlivosti detekce. Nevýhodou však je, že není dostupná zatím všem laboratořím a je ve fázi zkoušení.

Za rok 2012 bylo na pracoviště Synlab identifikováno 287 pozitivních nálezů a za rok 2013 identifikováno 251 pozitivních nálezů infekce *Campylobacter jejuni*. Tímto se potvrzuje, klesající charakter výskytu infekcí. Nejčastější záchyt v obou rocích byl v měsících červen, srpen a září. Z Obr. 4 a Obr. 6 je tedy patrné, že výskyt infekce je sezónní, nikoliv přes celý rok stejný. Tímto 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 náchylné stejně. Sezónnost výskytu infekcí způsobených *Campylobacter jejuni* potvrzují ve svých studiích Ambrožová (2006, 2011). Rozmezí 5 a 3 let napovídá tomu, že se trend výskytu nemění.

Hypotéza H1: Během roku je výskyt *Campylobacter jejuni* větší než *Campylobacter coli* lze z dat převzatých z databáze pracoviště Synlab potvrdit. Výskyt *C. coli* je během roku výrazně nižší než výskyt *C. jejuni* (viz Příloha č. 4)

Za rok 2013 jsem vyhodnotil i výskyt infekce v závislosti na věku. Podle výsledků jsou nejrizikovější skupinou děti a mladiství do 20 roku života. Jak uvádí Příkazská a kol. (2004), kdy v roce 2003 bylo až 96 % pacientů ve věku 1 – 4 roků. Výsledek se tedy shoduje s již zjištěnými fakty z předešlých studií.

Za rok 2013 byla stanovena citlivost u 206 pozitivních vzorků. U zbylých 45 kmenů citlivost nevyrostla. Nejčastější volbou k léčbě infekce antibiotiky jsou makrolidy nebo jako alternativa chinolony. Z vyšetřovaných antibiotik na pracovišti Synlab do těchto skupin patří erythromycin a oflaxacilin. U erythromycinu bylo 133 kmenů citlivých. To představuje 65 % z celkového počtu záchytu. U oflaxacilinu je situace opačná. Více kmenů bylo k antibiotiku rezistentních, z celkového počtu 146 tedy vysokých 71 %. Podle studie Giacomelli (2014) se rezistence k chinolonům, ale i k jiným antibiotikům testovaných na pracovišti Synlab, jako tetracyklin a ampicilin, pohybuje mezi 65 % až 100 %. Jiná studie (Lazou et al., 2013) ovšem potvrzuje rezistenci k tetracyklinu menší než 50 %. Kvůli této kolísavosti není nejspíše tetracyklin volbou léčby infekce.

7. Závěr

Campylobacter jejuni je již posledních 10 let nejčastějším původcem střevních infekcí v ČR. V práci byly porovnány metody diagnostiky využívané na pracovišti mikrobiologické laboratoře Synlab czech s.r.o. Jsou jimi mikroskopie a hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. V roce 2012 a 2013 bylo takto diagnostikováno 538 pozitivních nálezů infekce. Nejrizikovější věkovou skupinou jsou děti a mladiství. Výsledky potvrdily sezónní výskyt. Proto si by se měl klást ještě větší důraz prevenci. To znamená ještě více zpřísnit epidemiologická opatření a hygienické zásady a vzhledem k rizikové skupině informovat s nastupujícím létem hlavně rodiny dětmi.

Z výsledků stanovení citlivosti k antibiotikům, u těch, které se doporučují k léčbě, měl nejlepší citlivost erytromycin. Jen 35 % kmenů za rok 2013 bylo rezistentních. A právě časté předepisování antibiotik má za následek vznik více rezistentních kmenů. Proto se nedoporučuje indikace antibiotik. Onemocnění ve většině případů odezní pouze při zachování diety

8. Klíčová slova

- *Campylobacter jejuni*
- Mikroaerofilní bakterie
- CDT toxin
- Guillain-Barré syndrom
- CSM agar
- Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

9. 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. DOI: 10.1016/j.vetmic.2013.10.006.

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

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

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. 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. 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.

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

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. 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. 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. 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. 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. 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

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. 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

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. 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

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. 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

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

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. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.011

Mad'ar, R., Podstatová, R., Řehořová, J., 2006: Prevence nozokomiálních nákaz v klinické praxi. Grada, Praha. 186 s. ISBN: 80-247-1673-9

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. 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

Príkazská M., Príkazský V., Beneš, Č., 2004: Trendy výskytu salmonelóz a kamylobakteriéz v České republice. Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie, 3; 100-105. 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. 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

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. 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. DOI:10.1186/1757-4749-5-41

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

Stephen, L. W., 2013: Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here?. Journal of Microbiological Methods, 95; 3-7. 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.

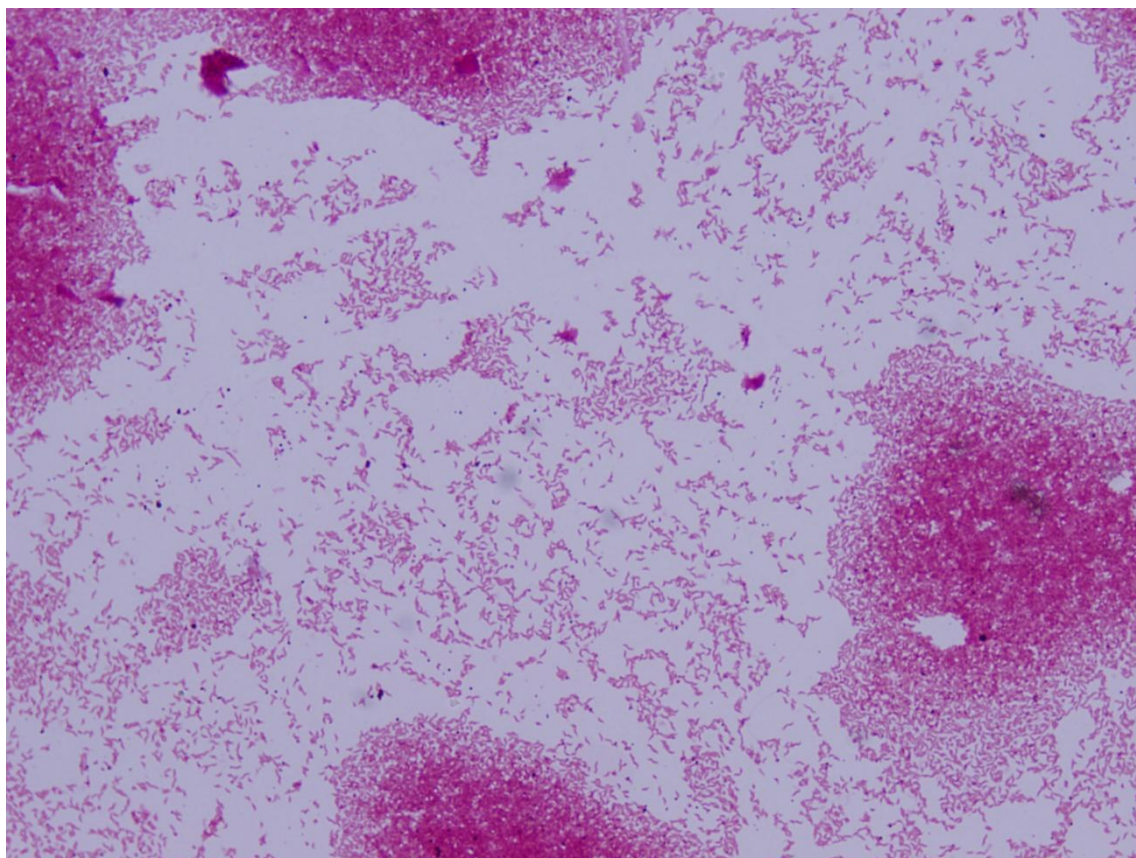
Votava, M., 2006: Lékařská mikrobiologie speciální. Neptun, Brno. 495 s. ISBN 80-902896-6-5

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

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

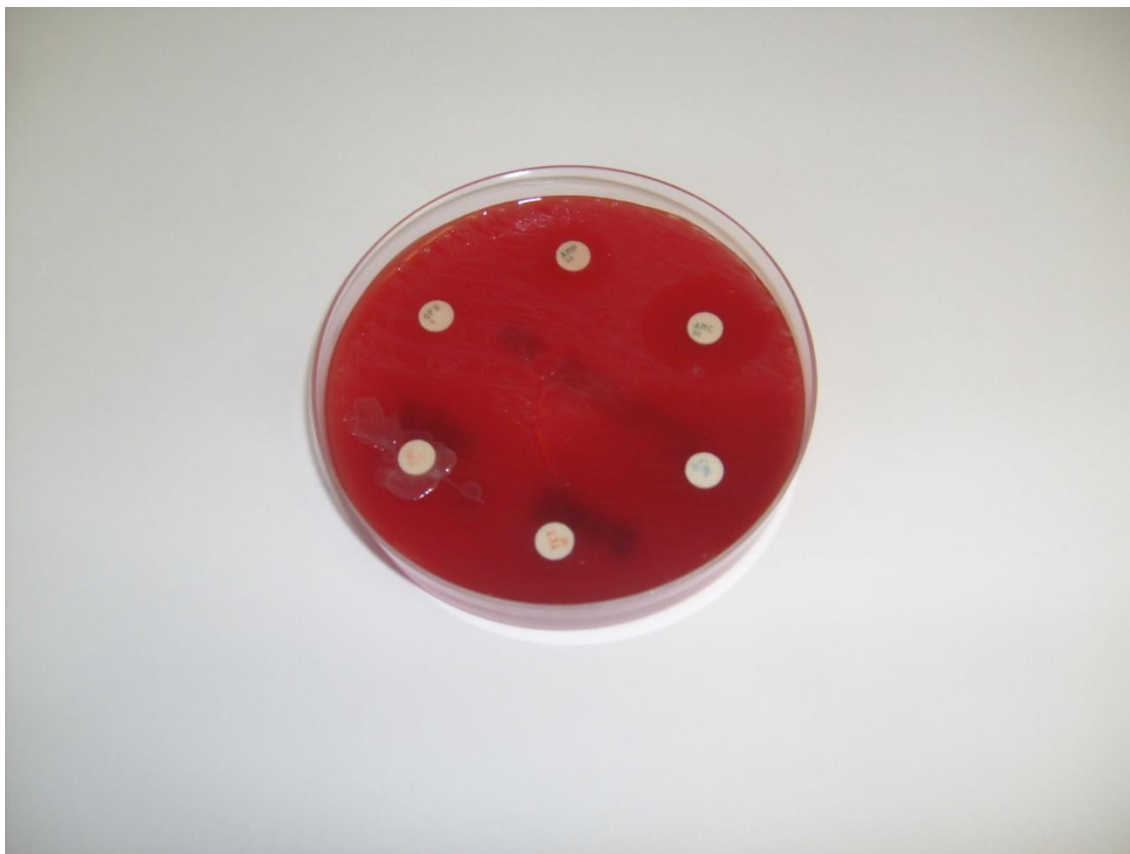
10. Přílohy

Příloha č. 1:



Obr. 13: Mikroskopický obraz *Campylobacter jejuni* z biologického vzorku

Příloha č. 2:



Obr. 14: Stanovení citlivosti k antibiotikům diskovým difuzním testem u *Campylobacter spp.*

Příloha č. 3:



Obr. 15: *Campylobacter jejuni* na CSM agaru

Příloha č. 4

Tab. IX: Výskyt *Campylobacter coli* v jednotlivých měsících

Měsíc	Leden	Únor	Březen	Duben	Květen	Červen
Počet	1	0	2	4	1	5

Měsíc	Červenec	Srpen	Září	Říjen	Listopad	Prosinec
Počet	2	5	6	0	1	1