

Význam a identifikace bakterií rodu *Campylobacter* v potravinách

Richard Sobel

Bakalářská práce
2010



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie a mikrobiologie potravin
akademický rok: 2009/2010

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Richard SOBEL**
Osobní číslo: **T07122**
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Význam a identifikace bakterií rodu Campylobacter v potravinách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. Charakteristika rodu *Campylobacter* a jeho jednotlivých druhů.
2. Výskyt kampylobakterů a zdroje nákazy.
3. Onemocnění způsobená kampylobaktery.
4. Identifikace bakterií rodu *Campylobacter*.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] ADAMS, R.M., MOOS, M. Food microbiology, third edition, Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008.

[2] MONTVILLE, T. J. Food microbiology an introduction, first edition, Washington: ASM Press, 2005.

[3] DE BLACKBURN, C. W. Food spoilage microorganisms, first edition, Cambridge: Woodhead publishing limited, 2006.

[4] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V. Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie, 1. vydání, Praha: Marvil, 1996.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Zuzana Vaňátková

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání bakalářské práce:

11. února 2010

Termín odevzdání bakalářské práce:

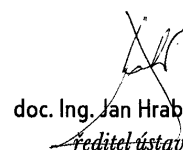
31. května 2010

Ve Zlíně dne 15. dubna 2010



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.

děkan



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.

ředitel ústavu

Příjmení a jméno: RICHARD SOBEL Obor: CHTP

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 25.5.2010

..... Sobel

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABSTRAKT

Campylobacter je v posledních letech stále více se rozšiřující mikroorganismus, jež způsobuje vážná onemocnění, zejména onemocnění alimentárního původu. Cílem této práce bylo charakterizovat a popsat jednotlivé druhy kamylobakterů, včetně jejich výskytu a zdrojů v přírodě a potravinách. Rovněž byly popsány nemoci a jejich komplikace způsobené kamylobaktery. Nakonec byly popsány možnosti identifikace kamylobakterů z prostředí a potravin klasickými plotnovými metodami a také jednou z nejvyužívanějších metod molekulární biologie (PCR = polymerázová řetězová reakce).

Klíčová slova: : *Campylobacter*, kamylobakteriosa, Guillan - Barré syndrom, CDT toxin, PCR

ABSTRACT

In recent years, the *Campylobacter* is increasingly expanding microorganism, which causes serious diseases, especially diseases of alimentary origin. The aim of this study was to characterize and describe particular species of campylobacters, including their prevalence and resources in nature and foodstuff. As well, diseases and their complications caused by campylobacters were described. Finally, possibilities of campylobacters identification from the environment and food by classical methods and also one of the most used method of molecular biology (PCR = polymerase chain reaction) were described.

Keywords: *Campylobacter*, campylobacteriosis, Guillan - Barré syndrom, CDT toxins, PCR

Poděkování, motto a čestné prohlášení, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická, nahraná do IS/STAG jsou totožné ve znění:

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	12
1 MORFOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI RODU CAMPYLOBACTER	13
1.1 CITLIVOST POPULACÍ KAMPYLOBAKTERŮ	14
2 JEDNOTLIVÉ DRUHY RODU CAMPYLOBACTER	15
2.1 <i>CAMPYLOBACTER FETUS</i>	15
2.1.1 <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>fetus</i>	16
2.1.2 <i>Campylobacter fetus</i> subsp. <i>venerealis</i>	17
2.2 <i>CAMPYLOBACTER COLI</i>	17
2.3 <i>CAMPYLOBACTER CONCISUS</i>	17
2.4 <i>CAMPYLOBACTER CURVUS</i>	18
2.5 <i>CAMPYLOBACTER GRACILIS</i>	19
2.6 <i>CAMPYLOBACTER HELVETICUS</i>	20
2.7 <i>CAMPYLOBACTER HOMINIS</i>	20
2.8 <i>CAMPYLOBACTER HYOINTESTINALIS</i>	21
2.8.1 <i>Campylobacter hyoitestinalis</i> subsp. <i>hyoitestinalis</i>	21
2.8.2 <i>Campylobacter hyoitestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	21
2.9 <i>CAMPYLOBACTER JEJUNI</i>	22
2.9.1 <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>jejuni</i>	23
2.9.2 <i>Campylobacter jejuni</i> subsp. <i>doylei</i>	23
3 ZDROJE NÁKAZY BAKTERIEMI RODU CAMPYLOBACTER	24
4 KAMPYLOBAKTERIOSA	27
4.1 <i>INFEKČNÍ DÁVKA</i>	29
4.2 LÉČBA KAMPYLOBAKTERIOSY	30
4.3 REZISTENCE KAMPYLOBAKTERŮ VŮČI ANTIBIOTIKŮM	31
4.4 OSTATNÍ NEMOCI ZPŮSOBENÉ KAMPYLOBAKTERY	32
4.5 TOXINY PRODUKOVANÉ KAMPYLOBAKTERY	32
5 IZOLACE A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU CAMPYLOBACTER	34
5.1 KULTIVACE NA POMNOŽOVACÍCH MÉDIÍCH	34
5.1.1 Základní média	35
5.1.2 Krevní média	36
5.1.3 Skladování půd.....	37
5.2 IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ METODAMI MOLEKULÁRNÍ BIOLOGIE	37
5.2.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR.....	38
5.2.2 Modifikace PCR.....	40
5.2.3 Izolace bakteriální DNA pro PCR.....	42

5.2.4	Identifikace kampylobakterů metodou PCR	43
ZÁVĚR	47
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	48
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	53
SEZNAM OBRÁZKŮ	54
SEZNAM TABULEK	55

ÚVOD

Termotolerantní bakterie *Campylobacter* se stávají stále významnějšími původci nemocí alimentárního původu v USA, Evropě a jiných vyspělých zemích. Prudký nárůst nemocí způsobených těmito bakteriemi byl od konce devadesátých let pozorován také v České republice [8]. Ve veterinární medicíně jsou bakterie rodu *Campylobacter* problémem již od počátku 20. století, kdy byly izolovány jako *Vibrio fetus*, který způsoboval potraty u skotu a ovcí [1, 4]. V roce 1931 byla rodu *Vibrio jejuni* připsána příčina zimního průjmu u telat. V roce 1946 byl podobný mikroorganismus izolován z krve pacientů, zejména těhotných žen, které trpěly akutními průjmy, horečkami a posléze i potratem. Tito pacienti byli nakaženi z mléka krav, ve kterém se daný mikroorganismus vyskytoval. O pár let později zkoumala paní Kingová lidskou krev a na základě svého výzkumu vytvořila dvě skupiny těchto bakterií podle optimální teploty růstu. Jedna skupina odpovídala rodu *Vibrio fetus*. Druhá skupina, tzv. termofilní, měla teplotní optimum okolo 42 °C a pocházela právě od pacientů trpících akutními průjmy.

Vzhledem k nedostatečným izolačním technikám byl počet identifikovaných nemocí způsobených *Campylobacter* nízký až do začátku sedmdesátých let. V roce 1963 spojili pánové Skald a Véron, na základě biochemických charakteristik a na množství cytosinu a guaninu v molekule DNA, obě zmíněné skupiny a vytvořili tak nový rod bakterií zvaný *Campylobacter* [1]. V 70. letech s rozvojem vhodných selektivních médií byla zpracována ucelená taxonomie *Campylobacter*, pány Véronem a Chatelianem, kteří popsali 4 druhy *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter sputorum* a *Campylobacter coli*. Bylo zjištěno, že právě *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* jsou jednou z příčin průjmových onemocnění. Tyto druhy začaly silně konkurovat rodu *Salmonella*, který byl do té doby považován za jediného původce průjmových onemocnění.

V roce 1984 byl vydán *Bergeys Manual of Systematic Bacteriology*, kde bylo popsáno osm druhů a poddruhů rodu *Campylobacter*. Vydání této publikace bylo průlomem ve výzkumu daného rodu. Vědci začali studovat systematiku a klinické účinky rodu *Campylobacter*. Tímto mimořádným zájmem se výrazně zvýšil počet rodů a v roce 1991 De Ley a Vandamme vytvořili novou čeleď *Campylobacteriaceae* [2]. V dnešní době patří do této čeledi 3 rody: *Campylobacter*, *Sulfurospirillum* a *Arcobacter* a špatně pojmenovaný druh *Bacteroides ureolyticus*.

Byly identifikovány další druhy, a to *Campylobacter laridis*, *Campylobacter concisus* a *Campylobacter hyointestinalis*. U některých pacientů trpících průjmami byl izolován *Campylobacter pylori*, tento druh však byl přejmenován na *Helicobacter pylori*. Tato bakterie je původcem žaludečních a střevních onemocnění, dokonce způsobuje vředy na dvanáctníku. Rod *Campylobacter*, stejně jako rod *Arcobacter*, je často spojován s potraty a záněty sliznice tenkého střeva u skotu a prasat [1, 2, 3]. Dnešní taxonomie zahrnuje 34 druhů, které si jsou geneticky více či méně podobné: *Campylobacter coli*, *Campylobacter cryaerophilus*, *Campylobacter cuniculorum*, *Campylobacter fennelliae*, *Campylobacter hyoilei*, *Campylobacter canadensis*, *Campylobacter helveticus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter curvus*, *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis*, *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter hominis*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *Campylobacter insualaeenigrae*, *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*, *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*, *Campylobacter lari* subsp. *concheus*, *Campylobacter lari* subsp. *lari*, *Campylobacter lanienae*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter mucosalis*, *Campylobacter mustelae*, *Campylobacter nitrofigilis*, *Campylobacter peloridis*, *Campylobacter pylori* subsp. *mustelae*, *Campylobacter pylori* subsp. *pylori*, *Campylobacter sputorum* subsp. *bubulus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter upsaliensis*, *Campylobacter sputorum* subsp. *sputorum*, *Campylobacter sputorum* subsp. *mucosalis*, *Campylobacter sputorum* [9, 22].

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 MORFOLOGICKÉ A BIOCHEMICKÉ VLASTNOSTI RODU *CAMPYLOBACTER*

Jedná se o nesporulující, gramnegativní bakterie, jejichž buňky jsou pleomorfní (délka 0,5 - 8 μm , šířka, 2 - 0,5 μm) [4]. Tyčinkovité buňky mají charakteristický štíhlý spirálovitý tvar, mohou tvořit jednu nebo dvě smyčky, v případě dvou smyček mají tvar písmene S [7]. Se vzrůstajícím věkem však dochází k přeměně tyčinek na kokoidní tvar. K této změně dochází pravděpodobně v důsledku degradace peptidoglykanové vrstvy působením enzymů [4, 7]. Kampylobaktery jsou devitalizovány snížením vodní aktivity pod 0,95 nebo přítomností organických kyselin. Značně citlivé jsou rovněž k běžně používaným dezinfekčním prostředkům a k působení UV záření [26].

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou velice pohyblivé, mají jediný polární bičík buď na jednom, nebo na obou koncích buňky. Výjimkami jsou nepohyblivý *Campylobacter gracilis* a *Campylobacter showae* s velkým počtem bičíků [2, 9]. Pohyblivost a bičíky jsou důležitými faktory při napadení cizí buňky. Úspěšná kolonizace či rozvoj infekce kmeny *Campylobacter* jsou mimo jiné závislé na pohyblivosti a na délce bičíku. Na expresi bičíkových vláken se podílejí dva geny [1, 2, 4].

Kampylobaktery jsou mikroaerofilní, chemoorganotrofní bakterie, jejichž zdrojem energie je metabolismus intermediátů trikarboxylových kyselin a metabolismus aminokyselin. Bakterie rodu *Campylobacter* nezkvašují ani neoxidují cukry, nehydrolyzují želatinu, kasein, škrob ani tyrosin. Testy na produkci methylčerveně, produkci acetoinu a redukci dusitanů jsou negativní, avšak testy na redukci dusičnanů jsou pozitivní [4, 7]. Některé kmeny *Campylobacter curvus* mají schopnost hydrolyzovat hippurát. Test na hydrolysu hippurátu se využívá k rozlišení nejvýznamnějších druhů *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni*. Některé kampylobaktery vykazují oxidasovou aktivitu, s výjimkou druhů *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis* a *Campylobacter concisus*. Ani jeden z druhů nevytváří pigmenty. Množství cytosinu a guaninu v molekule DNA je 29 - 47 %. *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* mají genom o velikosti 1,7 megabází, který byl stanoven pulzní elektroforézou a je o jednu třetinu větší než genom *Escherichia coli* [9].

Regulace genů, v reakci na změny životního prostředí, se stává důležitou oblastí výzkumu *Campylobacter*. Pochopení vlivu životního prostředí na růst, metabolismus a patogenitu *Campylobacter* by mohlo pomoci kontrolovat výskyt kampylobakterů v životním prostředí

a potravinovém řetězci. K tomuto zjištění existuje několik cest např. reakce na železo, oxidační stres, teplotní regulace, včetně chladových a tepelných šoků, hladovění aj. [22].

1.1 Citlivost populací kampylobakterů

Všechny druhy *Campylobacter* mají optimální teplotu růstu 35 – 37 °C. Pouze *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* mají vyšší optimální teplotu, a to 42 – 45 °C, avšak nejsou schopny přežít pasterizaci. Pod 30 °C druhy *Campylobacter* téměř nerostou, pouze výjimečně přežívají při pokojové teplotě okolo 25 °C. Životaschopnost kampylobakterů se během skladování v chladu nebo mrazu zhoršuje, ovšem mohou v těchto podmínkách přežít. Ve výkalech, moči, mléce nebo vodě přežívají tyto bakterie při teplotě 4 °C lépe než v jiných materiálech při teplotě 25 °C. Při teplotě 4 °C přežijí kampylobaktery nejdéle 3 týdny ve výkalech, 4 týdny ve vodě, 5 týdnů v moči a dokonce několik měsíců v mražené drůbeži [1, 2, 4, 7, 22]. *Campylobacter* je taktéž velice citlivý vůči nízkému pH. Smrtelná hodnota pH se pohybuje kolem hodnoty 4 [2, 3].

Vzhledem k citlivosti kampylobakterů vůči kyslíku, rostou tyto bakterie nejlépe při kombinaci 5 - 10 % oxidu uhličitého a 3 - 5 % kyslíku. Druhy *Campylobacter curvus*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter concisus*, *Campylobacter gracilis*, *Campylobacter showae* a *Campylobacter mucosalis* vyžadují vodík či mravenčany jako zdroj elektronů [2].

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* sp. a *Listeria monocytogenes*, které snesou mnohem větší dávky záření [1, 2].

Nejodolnější ze všech kampylobakterů je *Campylobacter jejuni*, neboť se velice dobře přizpůsobuje vnějším podmínkám. Tudíž tento druh přežívá dlouhou dobu mimo hostitele [1, 2].

2 JEDNOTLIVÉ DRUHY RODU *CAMPYLOBACTER*

2.1 *Campylobacter fetus*

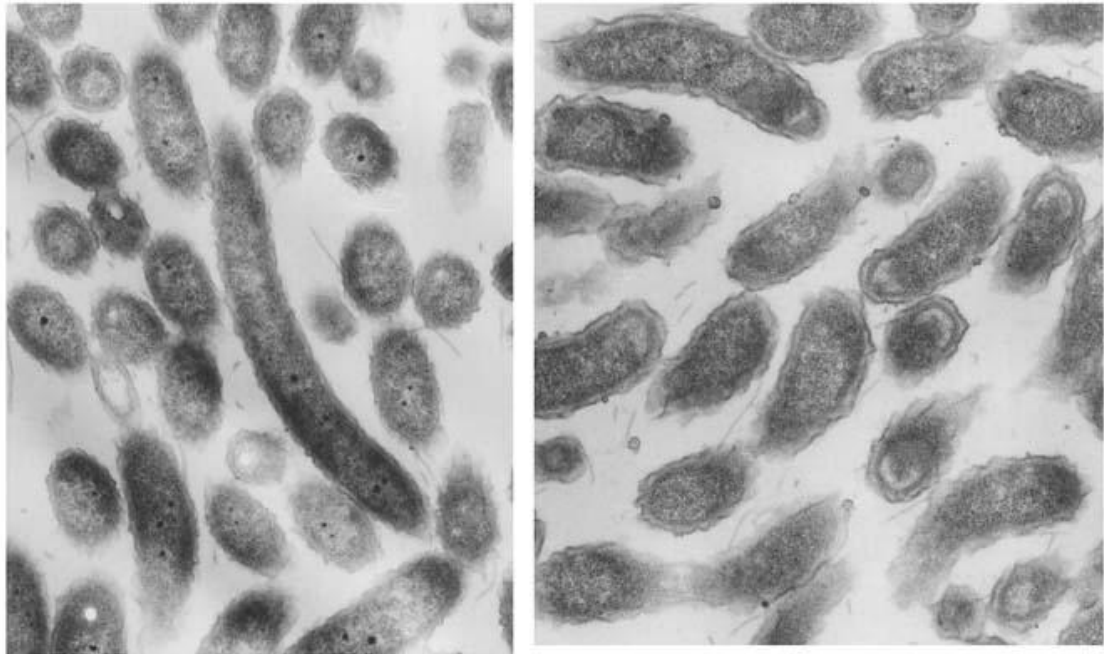
Druh *Campylobacter fetus* má štíhlé zakřivené tyčinky, široké 0,2 - 0,3 μm a dlouhé 1,5 - 5 μm tvaru písmene S. Staré kultury mívají kulatý nebo kokoidní tvar, tyčinky mohou být v tomto případě dlouhé až 8 μm . Tyto mikroorganismy jsou velice pohyblivé, pohybují se buď přímým směrem, nebo spirálovitě. Pohyblivost a otáčení buněk je tak rychlé, že někdy dochází k přehlédnutí jejich zakřiveného tvaru. Nejlépe se pozorují pod fázovým-kontrastním mikroskopem (Obr. 1) [1, 3 - 9].

Některé typy kolonií můžeme najít na agarech určených k primární izolaci (Bryner agar). *Campylobacter fetus* má většinou hladké, kulaté, mírně vypouklé, bezbarvé až lehce průsvitné kolonie s průměrem okolo 0,5 mm. Někdy mohou mít primárně izolované kolonie světle šedou až světle hnědou barvu. Kolonie rostoucí na agaru jsou nehemolytické, hladké, kulaté, vypouklé, konvexní, šedivé nebo bílé s průměrem 1 mm. Lesklé kolonie mají v průměru 1 mm, jsou kulaté, vypouklé, zrnité a mají zrcadlový povrch [2]. Drsné kolonie jsou vzácné, podobné hladkým koloniím, ovšem tyto kolonie jsou zrnité a neprůhledné. Mukózní kolonie jsou vazké, hladké, podobné lesklým koloniím [16].

Druh *Campylobacter fetus* roste na médiích obsahujících 1 - 1,5 % oxidované žluči při teplotě 30 °C. Neroste na médiích, které obsahují bifenyl-tetrazolium chlorid. Většina kmenů je tolerantní k 0,032% metyloranži a 0,1% deoxycholátu sodnému. Ačkoli dva poddruhy *Campylobacter fetus* souvisí s chorobami zvířat, jejich rozlišení není jasné. Klasické biochemické testy k diferenciaci těchto taxonů prokazují toleranci ke glycinu a schopnost produkovat sirovodík [9, 17].

Campylobacter fetus

Left: IUMU strain, Right: BI815 strain. *Campylobacter* is comma-like bacterium. Fragments of flagellum are seen among the bacteria.



Obr. 1. *Campylobacter fetus* [11].

2.1.1 *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*

Campylobacter fetus subsp. *fetus* tvoří hladké, bezbarvé nebo mírně krémové kolonie o průměru 1 mm. Po 6 až 8 denní inkubaci se hladké kolonie stávají hlenovitě. Drsné kolonie jsou kulaté, jemně zrnité, neprůhledné, mají bílou až krémovou, někdy světle hnědou barvu. Hladké kolonie v primárních kulturách nevznikají. Primárně izolované kolonie jsou často nízké, ploché, šedavé až žlutohnědé barvy, průsvitné s nepravidelným okrajem [9].

Kolonie *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* jsou na krevním agaru nehemolytické, hladké, kulaté, vypouklé, šedé, bílé až nahnědlé barvy o průměru 1 - 2 mm velké. Kolonie *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* nejlépe rostou na médiích, která obsahují safranin a 64 mg.l^{-1} cefoperazonu [9, 26]

Campylobacter fetus subsp. *fetus* je patogenní mikroorganismus, který způsobuje potraty u ovcí a sporadicky i u skotu. U lidí může občas tento mikroorganismus způsobit gastrointestinální potíže. Nákaza se šíří ústy. Nejčastěji je daný druh izolován z krve, míšň tekutiny, mrtvých plodů a z abscesů většiny částí lidského těla [2, 7].

2.1.2 *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis*

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* má podobné vlastnosti jako předchozí *Campylobacter fetus* subsp. *fetus*. *Campylobacter fetus* subsp. *venerealis* má tvar velkých spirál s průměrnou vlnovou délkou 2,43 nm a amplitudou 0,73 nm. Přibližně 67 % kmenů roste na půdách obsahujících 0,05 % safraninu a 64 mg.l⁻¹ cefoperazonu [9].

Campylobacter fetus subsp. *venerealis* je rovněž patogenní mikroorganismus pro skot, králíky, morčata, křečky a zárodky slepičích vajec. Způsobuje potraty a neplodnost u skotu. Tento mikroorganismus byl izolován z vaginálního hlenu nakažených krav, spermatu a předkožky býků, placenty a tkání krav [1, 9, 26].

2.2 *Campylobacter coli*

Campylobacter coli tvoří malé, zakřivené, těsně navinuté spirály ve tvaru písmene S (šířka 0,2 - 0,3 μm, délka 1,5 - 5 μm) (Obr. 2). Se vzrůstajícím věkem nebo vzrůstající koncentrací kyslíku přechází na kokoidní tvar. Kolonie jsou hladké, vypouklé, konvexní, lesklé, 1 - 2 mm velké. Na vlhkých médiích jsou kolonie ploché a šedé [1, 2, 4, 7, 25].

Většina kmenů je nehemolytická. Kolonie rostou na médiích obsahujících krev rychleji, ale krev není nezbytná pro jejich růst. Bakterie *Campylobacter coli* rostou na médiích obsahujících 1 - 1,5 % oxidované žluči, 0,02 % safraninu, 32 mg.l⁻¹ cefalotinu a 0,04 % bifenylní tetrazolia chloridu [9].



Obr. 2. *Campylobacter coli* [13].

2.3 *Campylobacter concisus*

Campylobacter concisus tvoří malé a zakřivené tyčinky, 0,5 μm široké a 4 μm dlouhé, se zaoblenými konci, pohybují se pomocí jednoho polárního bičíku. Kolonie jsou v průměru 1 mm velké, průsvitné, konvexní s rovnými okraji. Neroste v mikroaerobním prostředí

na agarech v atmosféře bez vodíku. Příliš rychle nerostou na polotekutém mediu (obsahující 0,16 % agaru), na vzduchu nebo v atmosféře, která obsahuje kyslík, oxid uhličitý a dusík v poměru 5: 10: 85. Anaerobní růst nastává na médiích, která obsahují formiát a fumarát. Formiát se oxiduje na vodík, oxid uhličitý a fumarát je redukován sukcinátem, který se hromadí v mediu. Růst je stimulován dusičnany, formiáty a fumaráty [18].

Kmeny nerostou na MacConkey agaru nebo na agarech, které obsahují 3,5 % NaCl, 32 mg.l⁻¹ cefalotoninu, 64 mg.l⁻¹ cefoperazonu nebo 0,04 % bifenyl tetrazolia chloridu. 70 - 80 % kmenů produkuje alkalické fosfatasy a rostou na médiích s obsahem 0,032 % metylované a 0,05 % NaCl. 14 - 29 % kmenů roste v přítomnosti 0,01 % Janusovy zeleně a 0,005 % fuchsinu [9].

Tento druh je fenotypově odlišný, tudíž je jeho konečná identifikace odlišná. Tyto mikroorganismy byly izolovány z dásňových trhlín, kde způsobuje zánět ozubice, a tudíž dochází k její degeneraci, dále byl izolován z lidských výkalů, lidské krve a lidského žaludku a jícnu [9].

2.4 *Campylobacter curvus*

Campylobacter curvus tvoří malé a zakřivené tyčinky, 0,5 - 1 μm široké a 2 - 6 μm dlouhé, se zaoblenými nebo zúženými konci. Buňky mohou mít rovněž rovný nebo šikmý tvar. Na každém konci buňky je membrána, která tvoří čepičku. Pohybují se pomocí jednoho polárního nebo bipolárního bičíku. Kolonie jsou průsvitné a rostou především na agaru, který obsahuje krev. Kolonie mají různé velikosti v průměru mohou mít od 1 mm až po 5 mm [9, 19].

Kolonie nerostou v mikroaerobním prostředí a v atmosféře, která neobsahuje vodík. Ve vzduchu, který je obohacen o oxid uhličitý nebo v atmosféře, která obsahuje kyslík, oxid uhličitý a dusík v poměru 5: 10: 85 nerostou příliš rychle. Anaerobní růst nastává na agaru, který je obohacen o formiát s fumarátem. Vodík s formiátem slouží jako zdroj energie. Formiát se oxiduje na vodík a oxid uhličitý, fumarát se redukuje na sukcinát. Fumarát, dusičnany, aspartát, asparagin a malát slouží jako elektronové akceptory [19].

Kmeny rostou v přítomnosti 0,005 % fuchsinu a 0,004 % trifenyl-tetrazolium chloridu. Téměř 80 % kmenů roste na médiích, která obsahují 64 mg.l⁻¹ cefoperazonu, 0,1 % manga-

nistanu draselného a 0,01 % Janusovy zeleně. Alkalické fosfatasy byly zjištěny u 40 % kmenů [9].

2.5 *Campylobacter gracilis*

Druh *Campylobacter gracilis* tvoří rovné a poměrně malé tyčinky, 0,4 μm široké a 4 - 6 μm dlouhé se zaoblenými nebo konickými konci. Jsou nepohyblivé. V buňkách tohoto druhu byly pozorovány intracytoplazmatické inkluze o velikosti 40 nm, které jsou vázané na membránu. Kolonie jsou průsvitné, rostou na krevním agaru. Kolonie mají velikost 1 - 5 mm v průměru [9, 20].

Optimálně rostou za aerobních podmínek. Za mikroaerobních podmínek nerostou, pokud atmosféra neobsahuje vodík. Na vzduchu, v atmosféře obohacené o oxid uhličitý a v atmosféře obsahující kyslík, oxid uhličitý a dusík v poměru 5: 10: 85 nerostou příliš rychle, pokud jsou kultivovány na běžných půdách. Anaerobní růst u nich nastává, je-li v mediu přítomen formiát s fumarátem. Formiát se oxiduje na vodík, oxid uhličitý a fumarát se redukuje na sukcinát. Fumarát, dusičnany, dusitany, neutrální červeň, aspartát, asparagin a malát slouží jako akceptory elektronů. Kolonie nerostou v přítomnosti 0,04 % trifenylyl-tetrazolium chloridu nebo 64 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ cefoperazonu. 14 % kmenů roste na půdách, které obsahují 0,01 % Janusovy zeleně. U tohoto kmenu nebyla zjištěna alkalická fosfatasa. *Campylobacter gracilis* je oxidasa - negativní mikroorganismus, ačkoliv jeho cytochromy připomínají cytochromy jiných kampylobakterů. Podle Kovacsova testu je činnost oxidasy kampylobakterů spojen s cytochromem c, který je přítomen u všech kampylobakterů. Vysvětlení, proč je oxidasa - negativní pravděpodobně spočívá v tom, že reaktant nemůže projít přes jejich buněčnou membránu nebo nízký potenciál cytochromu c [9, 20].

Skupina mikroorganismů *Campylobacter gracilis*, které jsou rezistentní vůči žluči, byla nedávno přearožena do nového rodu *Sutterella*. Tato nová taxonomická skupina je od kampylobakterií odlišná fylogeneticky. Liší se rozbohem mastných kyselin, dále enzymy dehydrogenas a větší odolností na některé antimikrobní látky. Tato odolnost se stala základem pro odlišení *Campylobacter gracilis* a *Sutterella* [9, 20].

Kmeny tohoto mikroorganismu byly izolovány z dásňových štěrbin, z infekcí napadajících hlavu nebo krk, z měkkých tkání, z plic postižených zápallem a ze zranění sedacího nervu.

Jeho patogenní účinky jsou však podceňovány, protože je nacházen ve zraněních hlubokých tkání a má vysokou rezistenci vůči spoustě antibiotik [9].

2.6 *Campylobacter helveticus*

Campylobacter helveticus vytváří malé zakřivené buňky ve tvaru písmene S, nebo mohou mít tvar spirálovitý, šířka buněk je 0,2 μm a délka 1,5 - 3 μm . Jsou velice pohyblivé, pohybují se prostřednictvím jednoho bipolárního bičíku. Kolonie jsou průsvitné, ploché, v průměru mají 0,5 mm, rostou převážně na krevním agaru po 48 hodinové inkubaci. Mohou se však také objevit na vlhkých agarových plotnách. Rostou v mikroaerobním prostředí za nepřítomnosti vodíku. Na vzduchu nebo v atmosféře obohacené o oxid uhličitý rostou velice pomalu. Tento kmen je fenotypově, genotypově i fylogeneticky podobný *Campylobacter upsaliensis*. *Campylobacter helveticus* roste kromě krevního agaru také na agarech, které obsahují žluč, fluorouracil nebo na MacConkeyho agaru. Tento druh je citlivý na antibiotika cefalotonin 32 mg.l^{-1} , avšak rezistentní vůči antibiotiku cefoperazonu 64 mg.l^{-1} [9, 20].

Kmeny byly izolovány z výkalů koček, v menší míře z psích výkalů. U těchto mikroorganismů není známa patogenita [20].

2.7 *Campylobacter hominis*

Campylobacter hominis tvoří malé a rovné buňky s tupými konci, nepohyblivé, široké 0,25 - 0,5 μm a dlouhé 0,5 - 1,8 μm , po desetidenní inkubaci. Byly však izolovány buňky, které byly pouze 4,8 μm široké a 1,0 μm dlouhé s nepravidelnou strukturou a jedním bičíkem. Podle Graye jsou kolonie konvexní, úplné a nepravidelně rostoucí na krevním agaru. Na žádném agaru nerostou pravidelně. Rostou za anaerobních podmínek při teplotě 37 °C, nerostou v anaerobiose ani za pokojové teploty. Špatně rostou v mikroaerobiose s obsahem vodíku 2 %. V atmosféře obohacené o oxid uhličitý a v atmosféře obsahující 5 % kyslíku, 10 % dusíku a 85 % oxidu uhličitého rostou velice pomalu. Kolonie rostou v přítomnosti 0,1% fluoridu sodného, ale nerostou v přítomnosti 0,04% trifemyl-tetrazolia chloridu.

Alkalická fosfatasa nebyla u tohoto kmenu zjištěna. Kmeny byly izolovány z asymptomatických lidských výkalů, patogenita není známa [9, 20].

2.8 *Campylobacter hyointestinalis*

Campylobacter hyointestinalis má tvar zakřivených tyčinek, má jeden bipolární bičík a pohybuje se pro něho charakteristickým pohybem. Byly však také pozorovány buňky, které měly dva bičíky na jednom konci. Šířka buněk je 0,2 - 0,5 μm a délka buněk je 1,2 - 2,5 μm . Na starých koloniích mají vláknitou formu. Po 48 hodinové inkubaci jsou kolonie v průměru 1,5 - 2,0 mm velké, mají kruhový tvar, jsou konvexní, na vlhkých agarrech netvoří shluky, mají charakteristickou špinavou nažloutlou barvu a jsou mírně mukosní [20].

Pokud jsou pěstovány na krevním agaru, některé kolonie rostou za mikroaerobních podmínek bez vodíku. Mnoho z buněk je slabě hemolytických, což je obvykle doprovázeno slabě nazelenalým odstínem kolem kolonií. Kmeny rostou v přítomnosti 1,0% žluči a 0,032% metyloranže. Většina kmenů jsou citlivé na cefalotonin (32 mg.l^{-1}) [9].

Elektroforetická analýza proteinů buněk ukázala značnou rozmanitost v rámci tohoto druhu a zároveň se tato analýza ukázala jako užitečná metoda typizace [9].

Kmeny byly izolovány ze střev prasat, křečků, žaludku prasat, skotu, jelenů a lidských výkalů. Tyto kmeny mohou být spojeny se záněty sliznice tenkého střeva. Patogenita není u tohoto kmenu známa [20].

2.8.1 *Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis*

Morfologie a vlastnosti *Campylobacter hyointestinalis subsp. hyointestinalis* jsou stejné jako u kmenu *Campylobacter hyointestinalis*. Kmeny rostou v přítomnosti 0,01% Janusovy zeleně, většina kmenů roste v přítomnosti 1,5% žluči. Nebyla zde prokázána alkalická fosfatasa. Kmeny byly izolovány ze střev prasat, křečků a jelenů, dále z lidských výkalů. Patogenita nebyla prokázána, tento poddruh však může být spojen se záněty sliznice tenkého střeva a průjmy u zvířat a lidí [20].

2.8.2 *Campylobacter hyointestinalis subsp. lawsonii*

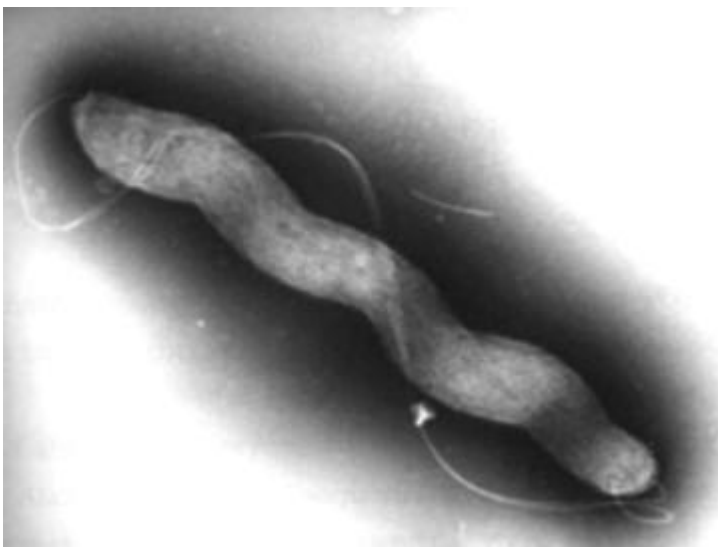
Campylobacter hyointestinalis subsp. lawsonii má spirálovitý tvar zahnuté tyče, 0,2 μm široké a 1,42 μm dlouhé. Morfologii a vlastnosti má stejné jako *Campylobacter hyointestinalis*. Jen asi 11 % kmenů roste na 1,5% žlučových agarrech. Alkalická fosfatasa byla prokázána u 22 % kmenů, 44 % kmenů může růst na 0,01% Janusovém mediu. Kmeny byly izolovány ze žaludku prasat. Patogenita nebyla prokázána [9, 20].

2.9 *Campylobacter jejuni*

Campylobacter jejuni má tvar pevně stočených spirál nebo jsou stočené ve tvaru písmene S (Obr. 3), se vzrůstajícím věkem nebo přítomností většího množství toxického kyslíku se mění na kokoidní formu. Pozorování pod elektronovým mikroskopem ukázala také prstenovitý tvar, který je pravděpodobně přechodným tvarem ze spirálovitého tvaru na kokoidní tvar. Většina kmenů je hemolytická a roste na krevním agaru. U *Campylobacter jejuni* jsou pozorovány dva typy kolonií. Jedny kolonie jsou malé, ploché, šedavé, jemně zrnité, průsvitné s nepravidelným okrajem a s tendencí ke splývání kolonií. Druhý typ kolonií je kulatý s velikostí 1 - 2 mm, kolonie jsou vyvýšené, průsvitné, lesklé, hladké, vypouklé s průsvitnými okraji a tmavším neprůhledným středem [1, 2, 6, 9]. Tento druh lze celkem snadno rozpoznat od ostatních díky jeho schopnosti hydrolysy hippurátu, rezistenci k cefalotoninu a citlivosti k nalidixové kyselině [7].

Většina kmenů je slabě hemolytická, rostoucí na krevním agaru. Hemolytickou vlastnost ovlivňuje složení půdy, její pH, složení atmosféry, teplota a délka inkubace. Hemolytická aktivita byla zaznamenána u králíků, ovcí, koz, koní, skotu, kuřat a dokonce i u lidí [26, 30].

Všechny kmeny rostou v přítomnosti 1,0% žluči. Pohybují se pomocí jediného polárního bičíku, na jednom nebo obou koncích buňky, který je důležitým faktorem virulence trávicího traktu [7].



Obr. 3. *Campylobacter jejuni* [12].

2.9.1 *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*

Morfologie a vlastnosti *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* jsou stejné jako u kmenu *Campylobacter jejuni*. Buněčné stěny tohoto mikroorganismu obsahují buď pouze D - galaktosu, nebo D - galaktosu a D - glukosu, nebo jen D - manosu. Kmeny rostou na agarech obsahujících 1,0% žluč a 0,02% safranin. Redukce a tolerance 0,04% trifenyl - tetrazolia chloridu je u 90 % kmenů. 90 - 95 % kmenů roste v přítomnosti 100 mg.l⁻¹ 5 - flouracilu a 32 mg.l⁻¹ cefalotinu [9].

Campylobacter jejuni subsp. *jejuni* je patogenní, způsobuje potraty u ovcí a koz. U zvířat může také způsobovat průjemy a u ptáků je spojován se záněty jater. U lidí je považován jako jedna z nejčastějších příčin bakteriálních gastroenteritid, sepsí a potratů. Infekce některými kmeny *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni* může být predisponující faktor k rozvoji neurologických poruch jako je Guillain - Barré syndrom a Miller - Fisherův syndrom. Za mechanismus patogeneze se považují mimikry, které způsobují právě tyto poruchy nervového systému, které se podobají lidským ganglionům. Kmeny tohoto mikroorganismu byly také nalezeny ve střevní mikroflóře drůbeže, prasat, psů a králíků [1, 2].

2.9.2 *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei*

Buňky *Campylobacter jejuni* subsp. *doylei* mohou být spirálovité ve tvaru písmene S nebo mohou mít rovný tyčovitý tvar. Kultury často prokazují pleomorfismus, který se zvyšuje s věkem. Kolonie jsou šedé, 1 mm velké, hladké, lesklé, po 2 - 3 denním růstu na krevním agaru jsou konvexní. Optimální teplota růstu je 35 - 37 °C, při teplotě 42 °C rostou velice špatně. Rostou v přítomnosti 0,04% trifenyl-tetrazolia chloridu. Na půdách, které obsahují 0,02% safranin nebo 32 mg.l⁻¹ cefalotoninu, nerostou vůbec. Patogenita nebyla prokázána, kmen byl však izolován ze žaludečních vředů, průjmů, krve lidí, zejména dětí [9].

3 ZDROJE NÁKAZY BAKTERIEMI RODU *CAMPYLOBACTER*

Bakterie rodu *Campylobacter* bývají často izolovány z vody, která patří mezi zdroje nákazy. Taktéž velká spousta zvířat může být zdrojem nákazy bakteriemi *Campylobacter jejuni* pro člověka. Mezi tato zvířata patří králíci, hlodavci, divocí ptáci, ovce, koně, krávy, prasata a drůbež (Obr. 4). Zdrojem infekce může být také maso, masné výrobky, syrové nebo nedostatečně tepelně upravené mléko, zelenina, ústřice, houby, krabi, hřebenatky a slávky [3, 10]. Díky vysoké optimální teplotě růstu jsou *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* schopny adaptace na vyšší tělesnou teplotu ptáků. I když se zdá, že tyto kampylobaktery nedokáží přežít mimo tělo hostitele, mohou být běžně izolovány z povrchových vod. Vědecký výzkum v Norsku ukázal, že bakterie *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter laridis* jsou schopny přežít v nechlorované vodě při teplotě 4 °C 15 dní, při teplotě 12 °C 10 dní a ve znečištěné vodě jsou při 12 °C schopny přežít až 12 dní [2, 10]. Ani za nepříznivých podmínek prostředí neztrácí bakterie rodu *Campylobacter* schopnost infekce [10].

Campylobacter jejuni se ve vodě vyskytuje také v neúčinné formě, což je „životaschopný, ale nekultivovatelný“ stav. Tedy za nepříznivých podmínek zůstává mikroorganismus neúčinný a naočkovat ho na živnou půdu je velice složité. Úloha těchto forem mikroorganismu, jako zdroje infekce pro člověka, není dosud známá [1].

Druh	Zdroj	Onemocnění	
		člověk	zvířata
<i>C. canadensis</i>	jeřáb bělohřbetý (<i>Grus americana</i>)	?	?
<i>C. coli</i>	prase, drůbež, skot, ovce ptáci	gastroenteritis, septikémie	gastroenteritis
<i>C. concisus</i>	člověk	nemoci dásní, gastroenteritis	žádné
<i>C. curvus</i>	člověk	nemoci dásní, gastroenteritis	žádné
<i>C. fetus subsp. fetus</i>	skot, ovce	gastroenteritis, septikémie, potrat	spontánní aborty skotu a ovcí
<i>C. fetus subsp. veneralis</i>	skot	septikémie	infekční sterilita skotu
<i>C. gracilis</i>	člověk	nemoci dásní, empyema, absces	žádné
<i>C. helveticus</i>	kočka, pes	žádné	gastroenteritis
<i>C. hominis</i>	člověk	gastroenteritis	?
<i>C. hyointestinalis subsp. hyointestinalis</i>	prase, skot, křeček, vysoká zvěř	gastroenteritis	enteritis prasat a skotu
<i>C. hyointestinalis subsp. lawsonii</i>	prase	žádné	?
<i>C. isulaenigræ</i>	tuleň, sviňucha	žádné	žádné
<i>C. jejuni subsp. doylei</i>	člověk	gastroenteritis, gastritis, septikémie	žádné
<i>C. jejuni subsp. jejuni</i>	drůbež, prase, skot, ovce, pes, kočka	gastroenteritis, septikémie, meningitis, potrat, proctitis, Guillain-Barré syndrom	gastroenteritis, hepatitida ptáků
<i>C. lanienae</i>	skot, prase, člověk	žádné	žádné
<i>C. lari</i>	ptáci, pes, kočka, opice, koně, tuleň, voda	gastroenteritis, septikémie	gastroenteritis ptáků
<i>C. mucosalis</i>	prase	žádné	nekrotizující enteritis a ileitis prasat
<i>C. rectus</i>	člověk	nemoci dásní	žádné
<i>C. showae</i>	člověk	nemoci dásní	žádné
<i>C. sputorum</i> bv. Faecalis	ovce, skot	žádné	žádné
<i>C. sputorum</i> bv. Sputorum	člověk, skot, prase	gastroenteritis, absces	žádné
<i>C. upsaliensis</i>	pes, kočka	gastroenteritis, septikémie, absces	gastroenteritis psů a koček

Obr. 4. Zdroj a onemocnění vyvolaná nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter* [8].

Od roku 1978 do roku 1996 bylo v Centru pro kontrolu a prevenci nemocí ve Spojených státech amerických hlášeno 111 případů ohnisek střevního kataru způsobeného bakterií *Campylobacter*. Tato ohniska postihla 9 913 jedinců. Zdroj nákazy enteritid se za posledních dvacet let změnil. Zatímco mezi léty 1978 až 1987 byla ve více než polovině případů zjištěna nákaza z vody nebo nepasterizovaného mléka, mezi léty 1988 a 1996 bylo ve více než 80 % případů jako zdroj nákazy zjištěno drůbeží a hovězí maso. V průběhu 10 let, od roku 1981 do roku 1990 bylo hlášeno 20 ohnisek nákazy a nakaženo bylo 1 013 jedinců.

Většinu tvořily děti, které se nakazily nejčastěji na mléčných farmách, přitom účinnost nákazy byla 45 % [2].

Sezónní rozložení ohnisek je poněkud odlišné od ojedinělých případů. Mléčná a vodní ohniska se nejčastěji vyskytují na jaře a na podzim, v letních měsících se vyskytují spíše ojedinělé případy. V letním období je nejčastějším zdrojem nákazy především drůbeží maso, které je nedostatečně tepelně opracováno [34].

I když *Campylobacter* nevytváří infekční ohniska často, ve Spojených státech amerických je hlavní příčinou onemocnění z potravin [34]. V roce 1995, vyvinulo Centrum pro kontrolu a prevenci nemocí, ministerstvo zemědělství Spojených států amerických a Správa řízení potravin a návykových látek Spojených států amerických systém, pro aktivní dozor nemocí pocházejících z potravin, včetně infekcí způsobených *Campylobacter*, nazvaný Síť aktivního dozoru nemocí z potravin, také známý spíše jako FoodNet [2].

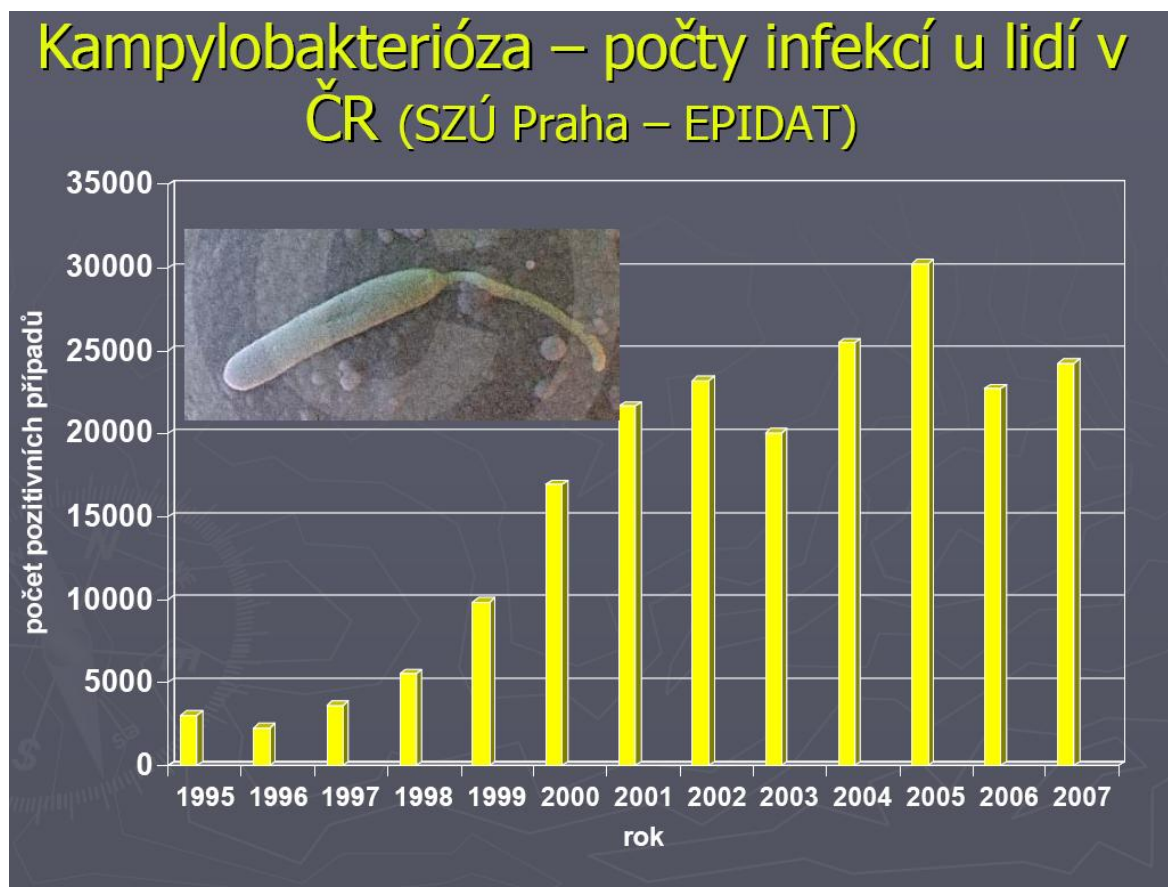
Z nejrůznějších dat, včetně dat z FoodNet a Americké sčítací kanceláře, vyplývá, že každým rokem je v USA kolem 2,4 milionů lidí nakaženo bakterií *Campylobacter*. Vzhledem k tomu, že kampylobakteriosa je samolikvidní nemoc, lze počet skutečně nakažených jen odhadnout. Podobný výskyt kampylobakteriosy je ve Velké Británii a v jiných rozvinutých zemích [3, 10].

Ve Spojených státech amerických a v Evropě byl z vepřového a drůbežího masa izolován nový rod *Arcobacter*, který pravděpodobně taktéž způsobuje průjmová onemocnění. Fyziologicky se však rod *Arcobacter* výrazně liší od rodů *Campylobacter* a *Helicobacter*. Spojitost mezi průjmovými onemocněními a *Arcobacter* nebyla stoprocentně prokázána [3, 10].

4 KAMPYLOBAKTERIOSA

Campylobacter jejuni a *Campylobacter coli* způsobují nemoc zvanou kampylobakteriosa (Obr. 5), (Tab. 1, 2, 3). Inkubační doba těchto kampylobakterů je 1 - 11 dní, nejčastěji se však pohybuje mezi třemi až pěti dny. Hlavní symptomy kampylobakteriosy jsou silná bolest v dutině břišní a následný průjem. Projevem této nemoci jsou velice vodnaté, krvavé, páchnoucí a dysenterické průjmy (obsah 10^6 - 10^9 buněk.g⁻¹). Samotný průjem trvá přibližně jeden týden, avšak občas se vrací. Občasné průjmy přetrvávají 2 až 3 týdny. Bolest v dutině břišní může být v některých případech nepřetržitá a intenzivní, dokonce může komplikovat průběh nemocí tím, že se šíří do pravé kyčelní jamky. U 15 % pacientů se po 1 - 2 dnech objevují krvavé průjmy. Dalšími příznaky kampylobakteriosy jsou horečka, bolest hlavy, nevolnost, zvracení, závrať a svalová bolest [4, 6]. Poněkud odlišný je průběh kampylobakteriosy u dětí, často se vyskytuje zvracení, naopak horečka se vyskytuje málo. Krev ve stolici je charakteristická hlavně u dětí do 1 roku, kdy se vyskytuje u 92 % případů kampylobakteriosy [4].

Úmrtí, která můžeme přisoudit infekci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, jsou velice vzácná [4]. Samotná kampylobakteriosa není životu příliš nebezpečná, mnohem závažnější jsou její komplikace. Případnými komplikacemi mohou být zánět těhového vaku, infekce močových cest, zánět mozkových blan, zánět vnitřní výstelky srdce, zánět pobřišnice, rudnutí kůže, akutní zánět slinivky břišní, potrat, novorozenecké sepse, zánět kloubů a Guillan - Barré syndrom (zánět periferní nervové soustavy) [1, 8, 9]. Guillan - Barré syndrom se projevuje poruchami smyslů, silnou bolestí, ochabnutím dýchacích svalů a slabostí dolních i horních končetin. Tento syndrom se projevuje jako sled nákaz způsobených *Campylobacter jejuni* [29]. Imunitní odpověď na tento syndrom pravděpodobně zprostředkovávají bakteriální lipopolysacharidy. Tyto protilátky přijímají nejen lipopolysacharidy hostitelské buňky, ale dokonce periferní nervové tkáně. Toto je pravděpodobně hlavní cesta mechanismu Guillan - Barré syndromu přivozeného bakterií *Campylobacter* [19].



Obr. 5. *Kampylobakteriόza – počty infekcí u lidí v ČR* [23].

Tab. 1. *Kampylobakteriόza – nemocnost v ČR a ve sledovaných regionech v letech 1999-2001* [14].

Rok	2001		2000		1999
	počet případů	nemocnost na 100 000 obyvatel	počet případů	nemocnost na 100 000 obyvatel	nemocnost na 100 000 obyvatel
Benešov	361	407	300	338	31
Brno	2 313	606	1 546	403	265
Č.Budějovice	305	171	267	150	82
H.Králové	73	45	59	37	25
Jablonec n. N.	0	0	0	0	0
Ostrava	1 173	366	812	253	180
Plzeň	751	450	489	292	87
Praha	2 771	235	2 989	251	133
Šumperk	182	143	90	71	61
Ústí n.L.	143	121	154	130	54
Znojmo	133	116	99	87	99
Žďár n.S.	238	189	232	184	64
ČR	21 653	210	16 916	164	95

Tab. 2. *Campylobacteriosa* - distribuce v ČR a vybraných regionech podle pohlaví v období 1998-2001 [14].

Region	1998		1999		2000		2001	
	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy	muži	ženy
Brno	317	265	208	188	805	741	1 192	1 121
Č.Budějovice	56	58	47	42	136	131	161	144
Ostrava	205	173	157	165	397	415	600	573
Plzeň	61	49	43	37	235	254	391	360
Praha	228	163	38	31	1595	1394	1 440	1 331
Žďár n.Sázavou	98	82	126	86	120	112	138	100
ČR	3049	2493	1967	1656	8 840	8 076	11 396	10 257

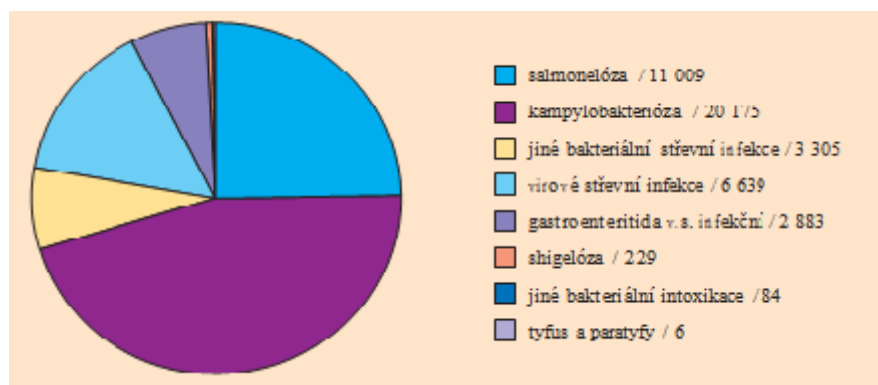
Tab. 3. *Campylobacteriosa* – věková distribuce v roce 2001 [14].

Věkové skupiny	ČR		Praha		Brno		Ostrava	
	2000	2001	2000	2001	2000	2001	2000	2001
0	722	862	97	105	49	73	27	42
1-4	3 485	4 458	444	456	238	316	104	143
5-9	2 239	2 743	334	292	196	233	92	115
10-14	1 636	1 988	325	201	157	196	75	139
15-19	1 571	1 984	360	280	141	219	65	115
20-24	1 842	2 330	410	353	214	318	119	148
25-34	2 122	2 912	451	467	219	391	123	213
35-44	1 051	1 345	167	172	90	173	76	110
45-54	939	1 242	153	183	79	158	46	64
55-64	601	803	130	117	67	111	42	40
65-74	464	614	81	85	59	79	28	34
75+	244	372	37	60	37	46	15	10
Celkem	16 961	21 653	2 989	2 771	1 546	2 313	812	1 173

4.1 Infekční dávka

Campylobacter jejuni je citlivý na nízké pH, tudíž kyselost žaludku zabíjí většinu kampylobakterů. Avšak infekční dávka *Campylobacter jejuni* není vysoká, je to méně než 1 000 buněk.g⁻¹ organismu. Infekční dávka závisí na mnoha faktorech, jako je virulence kmene, potravina, ve které byl mikroorganismus přenesen do organismu, citlivost jedince

aj. Mezi nejcitlivější jedince patří děti od 1 do 4 let a mladí lidé ve věku 15 - 24 let. Schopnost vyvolat infekci se mezi kmeny liší. U kmene A3249 onemocnělo 18 % dobrovolníků při 10^8 KTJ, ale při nákaze jiným kmenem (81 - 176) onemocnělo 49 % dobrovolníků při stejném množství KTJ [2]. Po vypuknutí kampylobakteriosy u dobrovolníků při požití syrového mléka se počet nemocných a závažnost onemocnění zvyšovala se vzrůstajícím množstvím konzumovaného mléka (do organismu se dostávalo víc a víc kampylobakterů). Kampylobakteriosa je stále více se rozšiřující nemoc alimentárního původu způsobená mikroorganismy (Obr. 6). V posledních letech dokonce předběhla dosud nejrozšířenější nemoc způsobenou nákazou z potravin - salmonelosu [10].



Obr. 6. Výskyt alimentárních onemocnění v ČR v roce 2008 [15].

4.2 Léčba kampylobakteriosy

Campylobacter jejuni a *Campylobacter coli* jsou citlivé na řadu antibiotik, jako jsou makrolidy, fluorochinolony, aminoglykosidy, chloramfenikol a v menší míře tetracyklin. Pro léčbu trávicí soustavy napadené *Campylobacter jejuni* se používá erytromycin, dobrou alternativou je také ciproflaxin. Při včasné léčbě infekce *Campylobacter* erytromycinem nebo ciprofloxacinem je velká šance na odstranění kampylobakterů ze stolice. Taktéž se může zkrátit doba příznaků spojených s infekcí [2, 6].

Campylobacter jejuni je obecně náchylný k erytromycinu se stupněm rezistence 5 %. Stupeň rezistence vůči erytromycinu u *Campylobacter coli* se podle různých studií liší až o 80 %. Přestože je ciprofloxacin účinný v léčbě kampylobakteriosy, objevily se rezistentní kmeny. Tato rezistence může být spojená s používáním podobných antibiotik, jako jsou

fluorochinolony např. u drůbeže. Centrum potravin a léků pro veterinární lékařství ve Spojených státech amerických navrhl zákaz používání fluorochinolonů [8, 9].

4.3 Rezistence kampylobakterů vůči antibiotikům

Frekvence rezistence kampylobakterů vůči antibiotikům se u pacientů trpících akutní kampylobakteriosou zvyšuje jak v rozvinutých, tak v rozvojových zemích. Odolnost kampylobakterů vůči řadě antibiotik byla dokázána Piddockem. Například v Thajsku se rezistence kampylobakterů vůči antibiotiku fluorochinolonu zvýšila z 0 % na 84 % za téměř 5 let. Tato odolnost mikroorganismů je způsobena používáním antibiotik ve veterinární medicíně jako ochranného a stimulujícího prostředku v chovu zvířat. Rezistentní kmeny *Campylobacter* způsobují problémy prodlužováním doby léčby kampylobakteriosy a ohrožují tak pacienty trpící touto nemocí [1, 2].

I přes nedostatek údajů o molekulární patogenezi kampylobakterů se předpokládá, že antibiotická rezistence je zprostředkovaná chromosomálně nebo pomocí plasmidů. Byla testována citlivost termofilních kampylobakterů izolovaných z environmentálních vzorků. U *Campylobacter jejuni* byla zjištěna souvislost mezi přítomností plasmidu a jeho rezistencí vůči antibiotikům. Například odolnost *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* vůči tetracyklinu je zprostředkována právě plasmidy [1, 2].

Citlivost *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *Campylobacter lari* byla hodnocena metodou diskové difuze. Poté byl daným mikroorganismům odňat plasmid. Z výsledků vyplynulo, že všechny tyto izolované kmeny byly citlivé na ciprofloxacin, avšak byly rezistentní vůči cefotaximu, cephallexinu a ampicilinu. Dále bylo u těchto izolovaných kampylobakterů zjištěno, že více než polovina byla odolná vůči chloramfenikolu a erytromycinu. Například bylo zjištěno, že jeden z konzervovaných kmenů *Campylobacter jejuni*, konkrétně kmen F44, byl citlivý na chloramfenikol a odolný vůči erytromycinu. Z toho vyplynulo, že u většiny testovaných izolovaných kampylobakterů byla rezistence vůči chloramfenikolu zprostředkována plasmidy a rezistence vůči erytromycinu byla zprostředkována chromosomy. Proto jsou geny z plasmidů způsobující rezistenci kampylobakterů vůči některým antibiotikům předávány mezi kampylobaktery. Ty pak zprostředkovávají jejich přímý přenos na lidskou populaci, nejčastěji z potravin živočišného původu, a způsobují rezistenci kmenů u lidí nakažených kampylobaktery [2].

V oblasti veřejného zdraví však vznikají obavy z kampylobakterů. Dochází ke vzniku stále většího počtu rezistentních kmenů. S tímto tématem souvisí stále větší mikrobiální bezpečnost potravin. Řešením omezení kampylobakterů v potravinách je lepší monitorování a kontrola programů mezi orgány veřejného zdraví [29].

4.4 Ostatní nemoci způsobené kampylobaktery

Kampylobaktery jsou spojeny s nákazami, které pocházejí z potravin včetně těch, které pochází z potravy zvířat. Proto vznikají opatření zaměřená na bezpečnost potravin, která mají zabránit a snížit předávání kampylobakteriosy a jiných nemocí, především Guillan - Barré syndrom [29].

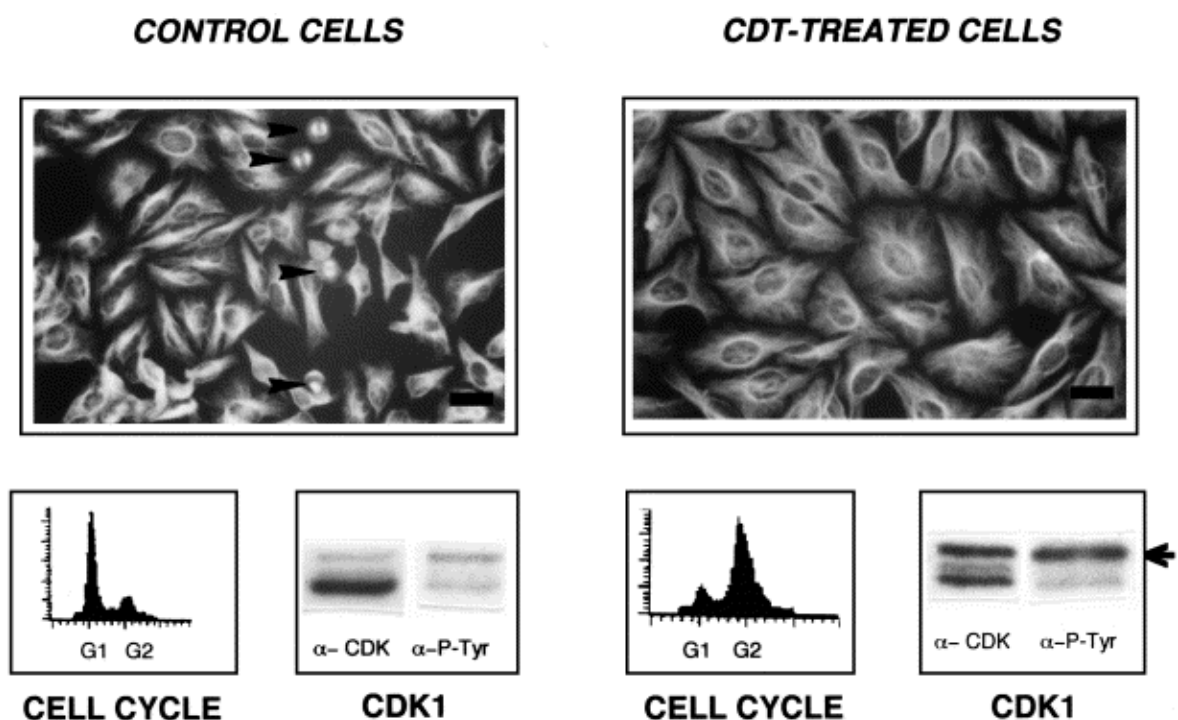
Na rozdíl od *Campylobacter coli* není *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* příliš spojován se střevními potížemi, ale především s potraty, záněty kloubů, záněty mozkových blan, záněty vnitřního povrchu srdce, mykotickým aneuryzmatem, záněty žil, záněty pobřišnice a záněty vejcovodů u lidí [6]. Je velmi málo případů potíží trávicího ústrojí způsobených *Campylobacter fetus*. Tento mikroorganismus totiž roste nejlépe při 42 °C a tudíž nemá ve střevech optimální podmínky. Neúčinnější antibiotikum vůči *Campylobacter fetus* je cefalotin.[9].

4.5 Toxiny produkované kampylobaktery

Přesný mechanismus, kterým *Campylobacter* způsobuje nemoci, není zcela znám. Byla popsána a prokázána značná invazivnost kampylobakterů v buněčných kulturách, ve kterých produkují cytotoxiny nebo toxiny, které jsou podobné toxinu cholery. Role cytotoxinů a toxinů podobných choleře byla zpochybněna po sestavení genomu *Campylobacter*, neboť se nepodařilo identifikovat sekvenci genomu známých toxinů. Jedinou výjimku tvoří cytotoxický (CDT toxin) toxin (Obr. 7), který byl v malém počtu objeven také u kmenů *Escherichia coli* a *Shigella*. Existují však důkazy, že některé rysy nemoci jsou výsledkem zánětlivé reakce těla [29].

Některé z kampylobakterů mohou produkovat enterotoxin (CDT toxin) podobný toxinu cholery [2, 4]. Většina kmenů *Campylobacter jejuni* se v produkci tohoto enterotoxinu liší [2]. Důkaz výskytu enterotoxinu poskytuje poškození smyčky střeva králičího modelu. Tyto testované kmene způsobují střevní krvácení, otoky a množství jiných poškození.

Cytolethal distending toxins (CDT), patří mezi toxiny, jenž jsou geneticky příbuzné s bakteriálními proteinovými toxiny, které mají schopnost zastavit buněčné množení. Zastavení buněčného dělení cytoletálním toxinem spočívá ve schopnosti vyvolat v cílových buňkách signální dráhy. Signální dráhy brání přechodu mezi G2 a M fázemi buněčného cyklu. Z několika gramnegativních mikroorganismů produkujících CDT toxin, včetně *kampylobakterů*, byly odebrány vzorky. Z těchto vzorků bylo určeno, že CDT toxin je určen třemi geny (*cdtA*, *cdtB*, *cdtC*), které kódují proteiny (CDT-A, CDT-B, CDT-C), jejichž role není dosud pořádně známa. CDT-B protein pravděpodobně představuje homologii několika savčích a bakteriálních fosfodiesteras. Domnělá nukleasová činnost CDT-B proteinu vyvolává aktivaci CDT toxinu na přechodu G2 a M fáze buněčného cyklu. Aktivace CDT toxinu vyvolává zatím nepopsanou změnu DNA. Efektivní vstup CDT toxinu do buněk a následná translokace do jádra, nebyla dosud prokázána přímými metodami. Protože CDT toxin je poměrně nový a dosud řádně neprostudovaný toxin, není jednoznačně známa jeho role v mikroorganismu. Diskutuje se o vztahu tohoto toxinu mezi poškozením DNA a jeho rolí jako jednoho z faktorů virulence mikroorganismů [36].



Obr. 7. Porovnání kontrolní buňky a buňky, u níž byl zaznamenán cytopatický efekt způsobený CDT toxinem [36].

5 IZOLACE A IDENTIFIKACE BAKTERIÍ RODU *CAMPYLOBACTER*

Jedny z metod izolace kampylobakterů jsou kultivace na selektivních médiích a filtrační metody. Filtrační metody se používají především k testování klinického materiálu díky obsahu převážně vitálních buněk kampylobakterů. Princip filtračních metod spočívá v pohyblivosti kampylobakterů, které projdou filtrem a oddělí se tak od ostatních mikroorganismů [7 - 9, 24].

Další možností izolace bakterií rodu *Campylobacter* je použití selektivních půd. Tato metoda se používá především k izolaci kampylobakterů z potravin, surovin pro výrobu potravin, vody a v neposlední řadě ze životního prostředí. V potravinách a životním prostředí se však nachází jen malé počty těchto bakterií [7 - 9, 24]. Většinu separačních metod a živných médií vhodných pro *Campylobacter jejuni* lze použít i pro *Campylobacter coli* a *Campylobacter laridis* [22].

5.1 Kultivace na pomnožovacích médiích

K izolaci kolonií kampylobakterů se používají selektivní média, která slouží k izolaci i jiných mikroorganismů. Avšak k izolaci poměrně nízkého počtu kampylobakterů vyskytujících se v potravinách se využívá několik selektivních médií. Tato selektivní média obsahují antibiotika jako je polymyxin, trimethoprim, vankomycin, colistin, rimfapicin nebo bacitracin [1, 2, 22]. Význam antibiotik v selektivních půdách spočívá v tom, že podporují růst kampylobakterů a zároveň zabraňují růstu nežádoucích mikroorganismů. Polymyxin zabraňuje růstu gramnegativních bakterií, až na bakterie rodu *Proteus*, z nichž některé vykazují rezistenci vůči polymyxinu. Proto se do půd kromě polymyxinu přidává trimethoprim zabraňující růstu bakterií rodu *Proteus*. Někdy se používá polymyxin spolu s colistinem, jež má podobné vlastnosti. Dále obsažený vankomycin zabraňuje růstu grampozitivních bakterií. Oproti tomu rimfapicin zabraňuje růstu jak grampozitivních, tak gramnegativních bakterií. Avšak antibiotika vankomycin a rimfapicin se nesmí kombinovat [22].

V mnoha případech jsou buňky kampylobakterů izolované z potravin smrtelně poškozeny. Toto poškození buněk v potravinách vzniká v důsledku nepříznivých podmínek, jako je mraz, velké sucho nebo horko, dále také v přítomnosti velkého množství antibiotik, kyslíku a jeho derivátů. Znamená to tedy, že buňky musí být nejprve oživeny na neselektivních

půdách po dobu 4 hodin při teplotě 37 °C, aby pak byly schopny růst na obvyklých selektivních médiích [1, 2, 22].

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou velice náročné na živiny a přítomnost kyslíku, který je pro tyto mikroorganismy toxický. Proto musí pomnožovací média obsahovat dostatek živin a látek, které dokáží potlačit kyslíkové radikály (krev, aktivní uhlí, pyruvát, železné soli), nebo by měla inkubační atmosféra obsahovat 5 - 6 % kyslíku a 10 % oxidu uhličitého. K pomnožování kampylobakterů se používají agary s přídavkem krve, popřípadě bazální médium bez krve. Dosud však neexistuje žádný všeobecný způsob izolace kampylobakterů z potravin [22]. Navíc žádná z uvedených pomnožovacích půd nepodporuje růst úplně všech bakterií rodu *Campylobacter* [9].

Zaočkované půdy se inkubují při teplotě 35 – 37 °C, čímž se omezuje růst termofilních druhů. Termofilní druhy kampylobakterů mají optimum růstu v rozmezí 42 – 43 °C [8, 22].

Hodnota pH většiny půd (Bolton agar, Skirrow agar, Preston agar aj.) pro izolaci kampylobakterů není stanovena, ale většina půd se blíží pH bazální půdy, tedy neutrálnímu pH. Hodnotu pH větší než neutrální mají některé kapalné půdy např. Wesley agar, který má pH 8,0. Někdy je vysoké pH půdy výhodou, protože tím dochází k vyrovnávání produkce kyselin, které podporují růst kampylobakterů. Tato schopnost půd obohacovat půdy o kyseliny závisí na zkoumané potravine [28].

5.1.1 Základní média

Přestože kampylobaktery, obecně rostly na relativně náročnějších živných médiích, většina vědců používala bazální média vyvinutá pro jiné náročnější kapnofilické nebo anaerobní patogeny, jako je například *Brucella*. Jednalo se o thioglykolátová média, média s krevním základem nebo Miller - Hinton bujón. V roce 1982 si Preston a Robertson vybrali čistý na živiny bohatý bujón, který se stal základem pro jejich Preston agar. Cílem vytvoření tohoto média bylo zjednodušit izolaci kampylobakterů z lidských a zvířecích vzorků. Později se toto médium začalo používat také k izolaci kampylobakterů z životního prostředí [21, 22].

Základ Preston agaru spočívá v živném bujonu, Oxoid CM67, ztuženém 1,2% agarem a obohaceném o lysovanou koňskou krev [38]. Selektivní inhibiční složky Preston agaru jsou polymyxin, rimfapicin, trimethoprim a cykloheximidin. *Campylobacter* zde vytváří

velké, vlhké, šedě zbarvené, ploché kolonie, zatímco většina nežádoucích a kontaminujících organismů je potlačována. Preston agar je tedy základní kapalná i tuhá půda pro izolaci bakterií rodu *Campylobacter* [21].

Existují také i média k pomoci kampaňobakterů bez krve. Základní složkou těchto medií je aktivní uhlí a pyruvát sodný. Mezi taková média patří CCDA (Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar) nebo Karmali agar. Pyruvát má za úkol zvyšovat toleranci kmenů vůči toxickému účinku kyslíku, aktivní uhlí zase odstraňuje osmotické metabolity. Do jiných pomnožovacích půd se za stejným účelem přidává navíc disířičitan sodný a síran železnatý [38].

5.1.2 Krevní média

Většina krevních medií obsahuje 5 až 15 % krve. Některá média používají defibrinovanou krev z různých zvířat, jiná zase používají lysovanou koňskou krev, která je obsažena pouze v Stelzer - Jacob agaru [22].

Mezi nejvýznamnější krevní agary patří Skirrow agar, který byl vytvořen pro izolaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* z lidských výkalů. Tato půda tak nahradila metodu selektivní filtrace přes póry o průměru 0,65 μm . Selektivní filtrace byla do doby objevení Skirrow agaru jediná metoda k izolaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Skirrow agar obsahuje živiny a látky vytvářející ideální podmínky pro růst kampaňobakterů tzn. látky omezující přítomnost kyslíku a zajišťující dostatečný příjem oxidu uhličitého. Selektivní inhibiční složky této půdy jsou trimethoprim, vankomycin a polymyxin B. Přídavek amfotericinu B a cefalotinu ke zmíněným antibiotikům tuto selektivní půdu dále vylepšil. Tato antibiotika mají za úkol inhibovat doprovodnou mikroflóru [28]. Dále Skirrow agar obsahuje lysovanou koňskou krev. Přítomnost trimethoprimu je důležitá díky potlačení růstu gramnegativních bakterií rodu *Proteus* [24]. Typické kolonie kampaňobakterů na Skirrow agaru jsou našedlé, často s kovovým leskem, ploché a vlhké, s tendencí se rozrůstat. Mohou se rovněž vyskytovat jiné formy kolonií [25].

Dalšími krevními agary jsou Karmali a Bolton agar. Na Karmali agaru jsou charakteristické kolonie šedavě zbarvené, ploché, vlhké, s tendencí se šířit [25]. Bolton agar je významná půda z hlediska pomnožování kampaňobakterů, neboť obsahuje živiny, které resuscitují poškozené buňky. Kolonie na Bolton agaru jsou poměrně velké, šedé, vlhké a ploché [28].

George agar a Hoffmann agar obsahují látku označenou anglickou zkratkou, tzv. FBP (ferrous – bisulfite - pyruvate). FBP se skládá z kombinace síranu železnatého, disiřičitanu sodného a pyruvátu sodného. Koncentrace FBP se pohybuje v rozmezí 0,25 až 0,5 gramů na litr dané půdy. Hlavním úkolem FBP v selektivních médiích je oslabení účinku kyslíku. Některé půdy určené k izolaci kampylobakterů obsahují směs krve a FBP (Gilchrist agar, Weber agar, Stern agar aj.). Většina půd však obsahuje buď jen krev nebo jen FBP [9]. Taktéž se hledají alternativy krve a FBP, mezi něž můžeme zařadit hnědé uhlí nebo hematin. Jako další alternativní systém objevil Weinrich směs lignitu (z huminové kyseliny) a 0,05% síranu železnatého. Mechanismus účinku tohoto suplementu není dodnes jasný, ale přispívá k neutralizaci peroxidu vodíku, singletového kyslíku a iontů superoxidů [22].

5.1.3 Skladování půd

V roce 1979 Hoffman konstatoval, že růst kampylobakterů je podstatně snížen, jsou-li plotny s půdami vystaveny přímému světlu a zejména vzduchu. Ke stejným závěrům došli i Bolton s Juvenem a Rosenthalem o šest let později. Přidáním aerotolerantních přípravků do médií (FBP a krev) se eliminuje kyslík. Účinek těchto látek však není 100% [28].

Preston agar, který bývá uložen aerobně při pokojové teplotě, brzdí růst *Campylobacter lari* ve větší míře než růst *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Taktéž bylo zjištěno, že ztráta vlhkosti naočkovaných ploten rovněž způsobuje zpomalení růstu *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*.

Plotny, které jsou připraveny k očkování kampylobakterů by měly být použity okamžitě, nebo by měly být uskladněny v temnu za anaerobních podmínek při pokojové teplotě, či v lednici za aerobních podmínek s preventivními opatřeními zabraňujícími dehydrataci. Maximální doba skladování takto připravených ploten je 5 dní [21].

5.2 Identifikace mikroorganismů metodami molekulární biologie

Klasické mikrobiologické metody identifikace mají v některých případech jistá omezení. Tyto metody jsou méně citlivé, mají omezenou schopnost identifikovat špatně kultivovatelné či nekultivovatelné mikroorganismy. Biochemické testy vycházející z fenotypových vlastností mikroorganismů, proto jsou v některých případech rovněž nejednoznačné. Často

dochází k mylným závěrům, protože terénní kmeny a jejich vlastnosti se liší od kmenů sbírkových, podle kterých se biochemické testy vyhodnocují [8].

Tato omezení lze vyřešit využitím metod molekulární biologie. Metody molekulární biologie jsou nezávislé na kultivaci a jsou specifické svou vysokou citlivostí, rychlostí a specifi-
tostí [8]. Metody molekulární biologie se zakládají na detekci specifického úseku DNA nebo RNA pozorovaného mikroorganismu. Molekulární techniky našly v mikrobiologii své uplatnění při detekci mikroorganismů, které nemají příliš zdlouhavou kultivaci, nekultivo-
vatelných mikroorganismů, mykobakterií či virů. V potravinářské mikrobiologii často vyu-
žívá metod molekulární biologie ke zjištění přítomnosti určitých mikroorganismů v potravine [26].

5.2.1 Identifikace mikroorganismů metodou PCR

PCR neboli polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction) je speciální identi-
fikační metoda, která byla objevena v roce 1983 Karry Mullitem. Již v roce 1985 byla vy-
dána první odborná publikace, ve které byla poprvé použita metoda PCR. PCR je základní
používaná molekulární metoda, která spočívá v identifikaci genů. Použití druhově i rodově
specifických PCR umožňuje správnou identifikaci mikroorganismů [25, 27].

Tato metoda umožňuje *in vitro* zmnožení daného úseku DNA bez přítomnosti živých orga-
nismů. Podstatou metody PCR je opakující se enzymová syntéza nových řetězců vybraných
úseků dvouřetězové DNA, ke které dochází po připojení dvou primerů vázajících se na
protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3`OH-konce směřují proti sobě [37]. Jako primery se
používají dva uměle připravené krátké oligonukleotidy o přibližné délce 18 – 30 bází. Oli-
gonukleotidy jsou odvozené z koncových sekvencí určených k amplifikaci [27, 37]. Je třeba
navrhnout vhodný pár primerů, pomocí něhož se bude amplifikovat konkrétní požado-
vaný úsek templátové DNA. Primery jsou chemicky syntetizované sekvence, komplemen-
tární k určitým úsekům na obou řetězcích molekuly DNA. Je potřeba zajistit, aby při návr-
hu primerů tyto primery hybridizovaly jen s ucelenou sekvencí DNA při stejné teplotě. Ty-
to dva primery musí mít stejnou nebo téměř stejnou teplotu tání. Teplota tání závisí na mo-
lekulové délce a na poměru A - T a C - G párů v pořadí. Teplotu tání daného pořadí prime-
rů je možno určovat experimentálně nebo výpočtem. Ideální pár primerů je v současnosti
možno určit pomocí moderních počítačových programů [30].

V metodě PCR se používají termostabilní polymerasy. Termostabilní polymerasy jsou enzymy izolované z termofilních bakterií, které žijí v hlubokých mořích blízko podmořských sopek. Díky jejich bílkovinné struktuře odolávají určitou dobu i teplotám kolem 95 °C. Nejběžněji se využívá *Taq* polymerasa, která je izolována z bakterie *Thermus aquaticus* [25, 27]. *Taq* polymerasy odolávají teplotám, při nichž DNA denaturuje. Odolnost *Taq* polymerasy vůči denaturujícím teplotám umožňuje průběh syntézy DNA v opakujících se cyklech, při nichž se v závislosti na teplotě reakční směsi pravidelně střídají 3 kroky [37]:

1. denaturace dvouřetězových molekul DNA, při teplotě 94 – 98 °C,
2. připojení primerů k odděleným DNA – řetězcům, při teplotě 30 – 65 °C,
3. polymerizační reakce, při teplotě 65 – 75 °C.

Jeden cyklus trvá zhruba 5 minut a celá technika byla zautomatizována. V současnosti je možno naklonovat fragment DNA bez použití buněk během několika hodin na rozdíl od několikadenního standardního postupu. Z celé molekuly DNA, která je použita k reakci, je zmožen pouze úsek mezi primery, protože DNA – polymerasa pro zahájení replikace na jiném místě chybí [27].

Termocykler je zařízení (Obr. 8), pomocí něhož můžeme řídit cyklické změny teplot reakční směsi v určitých časových intervalech [27, 37]. Teplota termocyklu je řízena uživatelem a zkumavky s reakční směsí jsou v tomto zařízení uloženy v kovovém bloku. Aby docházelo k rychlé změně teplot, probíhají reakce v mikrozkušnicích. Pro zabránění brzké aktivity *Taq* polymerasy se reakční směs připravuje na ledu [27].



Obr. 8. DNA Engine® Peltier Thermal Cycler [32].

Podle délky amfplikovaného úseku DNA a konkrétní sekvence primerů se optimalizuje přesná teplota a doba trvání jednotlivých kroků syntézy DNA. K zahájení reakce stačí pouze malé množství výchozích molekul DNA. Teoreticky by stačila pouze jedna. Ke zdvojnásobení a poté exponenciálnímu nárůstu počtu požadovaných úseků na DNA dochází v průběhu 20 – 30 cyklů [37]. Pro dosažení převažujícího produktu reakce, tzn. vzniku molekul stejné sekvence a stejné délky, je potřeba, aby primery nasedaly jen na vybrané sekvence DNA. Vzniklé molekuly stejné délky a stejné sekvence se budou při dělení v gelu pohybovat rovnoměrnou rychlostí a po jejich obarvení je zobrazen jeden určitý fragment, jehož molekulová hmotnost odpovídá předpokládané délce sekvence DNA při srovnání se standardem [31].

Stanovení výsledných fragmentů v reakční směsi se prokazuje [37]:

1. stanovením jejich velikosti elektroforesou v polyakrylamidovém nebo agarózovém gelu,
2. Southernovou hybridizací se značenou sondou komplementární k části sekvence amfplikovaného úseku,
3. stanovením sekvence DNA.

Díky PCR je taktéž možné detekovat rozlišné polymorfismy DNA ve vztahu k chorobám, které jsou geneticky podmíněné [31]. Celkově lze říci, že techniky, které jsou založené na PCR, našly v molekulární biologii velké uplatnění díky své citlivosti a jednoduchosti. Díky těmto vlastnostem, nahradily PCR techniky v mnoha případech různé postupy, které jsou založené na klonování DNA ve vektorech. PCR techniky se používají zejména pro detekci mutací, identifikaci bakteriálních a virových patogenů, klonování a vyhledávání specifických sekvencí, určení typu nádorů, v soudním lékařství atd. [37].

Metoda PCR, díky své citlivosti, dokáže detekovat virové infekce již v počátečních stadiích. Jako primery se při této reakci používají krátké úseky DNA odvozené z virové sekvence a po několikanásobném zmnožení lze dokázat přítomnost či absenci i jediné kopie v malém vzorku krve. Pro většinu virových infekcí je PCR nejcitlivější metodou určení viru, založenou na použití protilátek, namířených proti plášťovým proteinům viru [27].

5.2.2 Modifikace PCR

1. obrácená neboli inverzní PCR (IPCR) - pomocí IPCR lze amplifikovat úseky DNA o neznámé sekvenci, která ohraničuje na obou koncích DNA o známé sekvenci,

2. zpětná neboli reverzní PCR (RT – PCR) – zpětná PCR je určena k amplifikaci RNA. Nejdříve dochází k přepisu zpětné transkriptasy do cDNA, která se pak amplifikuje standardním postupem,
3. asymetrická PCR – při této PCR se používá pouze jeden primer. Využívá se při automatickém sekvencování,
4. *In situ* – PCR – tato metoda umožňuje amplifikovat specifické sekvence nukleových kyselin přímo v chromosomech, buňkách a cytologických preparátech tkání. Produkty této reakce můžeme vizualizovat specifickou sondou metodou hybridizace *in situ*. Při této metodě dochází k k amplifikaci cílových sekvencí, tudíž je tato metoda mnohem citlivější. Díky citlivosti metody lze identifikovat i sekvence v několika málo kopiích,
5. PCR pomocí vnitřních a vnějších primerů (odstupňovaná PCR) – odstupňovaná PCR metoda používá dvě sady primerů. Tyto sady umožňují dosáhnout mnohem vyšší specifity amplifikace požadované sekvence. Část produktů, které získáme pomocí první sady primerů (tzv. vnějších primerů) je poté amplifikována pomocí druhé sady primerů (tzv. vnitřních primerů), které jsou navázány na vnitřní úsek primárního produktu,
6. PCR s degenerovanými oligonukleotidovými primery (DOP – PCR) – u této metody jsou použity degenerované oligonukleotidy jako primery. Degenerované oligonukleotidy jsou směsí uměle syntetizovaných oligonukleotidů, které mají z části odlišné sekvence. Pomocí DOP – PCR lze amplifikovat a vyhledat nové nebo nedefinované sekvence DNA. Tuto metodu lze rovněž použít jako první stupeň pro amplifikaci vzorků, které mají velice nízké koncentrace. Takto získané produkty lze dále amplifikovat pomocí specifických primerů,
7. náhodná PCR (AP – PCR, RAPD – PCR) – je možností PCR, která se používá k detekci polymorfismů v DNA. Při této metodě se používá jeden krátký oligonukleotidový primer, který se na cílovou DNA navazuje pouze na náhodně vybraných místech. Výsledkem náhodné PCR je ucelený soubor amplikonů, které představují otisk DNA, jenž je charakteristický pro určitý organismus,
8. PCR sledovaná v reálném čase (online PCR) – díky této metodě je umožněna přímá kvantifikace amplifikačního produktu během reakce. Této kvantifikace během reakce je možné dosáhnout pomocí barviva, které fluoreskuje. Se vzrůstajícím množstvím PCR produktů se fluorescenční signál zvětšuje. V dalším případě lze kvantifikace amplifikačního produktu dosáhnout použitím fluorescenčně značené hybridizační sondy. SONDY SE KOM-

plementárně vážou na vnitřní část amfplikované sekvence. Ke vzniku fluorescence dochází pouze po navázání sond v těsné blízkosti, kdy dojde k přenosu energie mezi fluorochromy navázanými na 3' - a 5' - konci sond. Online PCR metoda je použitelná např. k detekci bodových mutací.

5.2.3 Izolace bakteriální DNA pro PCR

Izolace DNA probíhá ve třech krocích [27]:

1. lyse buněk - dochází k odbourávání buněčné stěny a buněčné membrány,
2. separace DNA od ostatních nízkomolekulárních a vysokomolekulárních částic,
3. uchování vzorku a jeho úprava.

K odbourávání buněčných stěn a membrán se využívá záhřev na teplotu 100 °C nebo působení různých chemikálií, nejčastěji dodecylsulfátu sodného. Lyse buněčných stěn a membrán však musí být provedena co nejšetrněji, aby poškození nukleových kyselin bylo co možná nejmenší. Po rozrušení buněčných stěn a membrán dochází k uvolnění obsahu buňky včetně nukleových kyselin do tlumivého roztoku obsahujícího etylendiaminotetraoctovou kyselinu (EDTA) a detergenty. EDTA působí jako chelatační činidlo a navazuje na sebe ionty vápníku nebo jiné kationty, které mají funkci kofaktorů nukleas. Tyto kofaktory nukleas jsou enzymy, které se současně uvolňují s DNA z lysované buňky a současně DNA rozkládají. Některé detergenty fungují jako inhibitory nukleas, a proto se používají při lysi buněk. Důležitá je také přítomnost vápníku, který inaktivuje nukleasy [26, 27].

Metodou vytřepávání ve směsi isoamylalkoholu, fenolu a chloroformu se provádí odstranění proteinů, kdy nukleové kyseliny zůstanou rozpuštěny v pufru (vodném prostředí) a ostatní složky jsou odstraněny. Dojde k rozdělení směsi na dvě fáze, dolní chloroformovou a horní vodnou. Chloroform je rozpouštědlo organického původu a nedochází tedy ke smísení s vodným roztokem buněčného lysátu. Protřepáním dochází k mísení obou fází a díky přítomnosti fenolu dochází ke srážení proteinů ve vodném lysátu. Díky isoamylalkoholu přejde fenol do chloroformové části, protože zvyšuje rozpustnost fenolu v chloroformu. Poté dochází k odstředění roztoku, aby došlo k oddělení obou fází. Horní vodná fáze obsahující nukleové kyseliny je přenesena do čisté zkumavky. Na rozhraní chloroformové a vodné fáze vzniká bílý prstenec tvořený proteiny. Aby bylo odstranění

proteinů dokonalé, je nutno opakovat extrakci směsí isoamylalkohol, chloroform a fenol [30].

Po přidání etanolu k vodné fázi dojde k vysrážení nukleových kyselin. Následně se směs odstředí a na dně zkumavky vzniká zakalená usazenina. Použitím solí se zvýší účinnost srážení nukleových kyselin. Soli dávají usazenině charakteristické mléčné zbarvení, před použitím je však třeba soli promýt etanolem. Přesrážené nukleové kyseliny je možné rozpustit v určeném pufru nebo vodě. Dojde-li ke sražení ribonukleových kyselin RNA s DNA v isopropanolu nebo etanolu, je možné je odstranit enzymy, tzv. RNázami [25, 27, 30].

Jiným způsobem získání DNA z vodné fáze je přidání roztoku silikátových částic a chaotropních solí. DNA v přítomnosti chaotropních solí, které snižují strukturovanost vody, přilíná na roztok silikátových částic. Následným protřepáváním roztoku dochází ke zlepšení adheze DNA na silikátové částice. Odstředěním ostatních částic roztoku, zůstane pouze čistá adherovaná DNA. Adherovaná DNA se odstraňuje ze silikátových částic přidáním vhodného pufru, neobsahujícího chaotropní soli, nebo vody. Po dalším odstředění zůstávají na dně zkumavky silikátové částice a nad těmito částicemi je dokonale čistý roztok DNA [30].

Dalším způsobem extrakce DNA je použití komerční soupravy tzv. kitu. Tento typ extrakce využívá metody přilnavosti na silikát. Největší výhodou této metody je rychlost, přesnost a pohodlnost. Kity poskytují standardizované výsledky a jsou koncipovány pro určité množství a typ vzorku. Kity využívají místo silikátu speciálně upravené pryskyřice a navíc mají speciální složení pufrů. Takto upravené pufrы dávají přednost molekulám DNA určité velikosti [25, 27, 30].

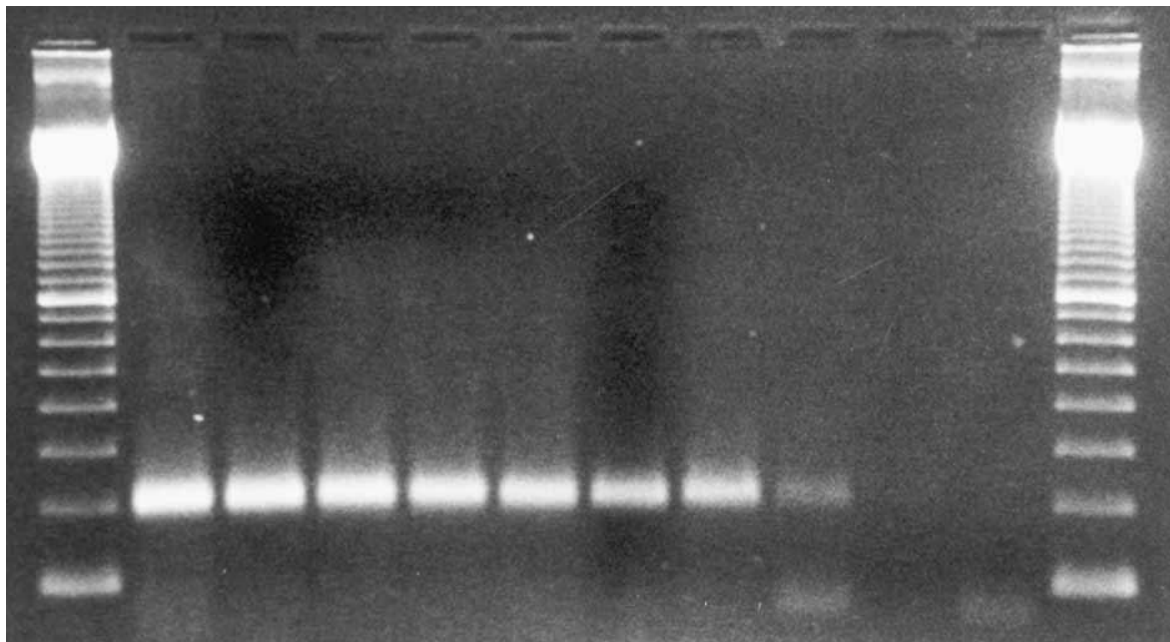
DNA se krátkodobě uchovává při teplotách 4 – 8 °C, pro delší skladování (několik měsíců) se používají teploty -20 °C a k dlouhodobému skladování se používají teploty až -80 °C. DNA se uchovává ve skladovacích roztocích, kterými mohou být TE pufr nebo 70% etanol po vysrážení DNA [31].

5.2.4 Identifikace kampylobakterů metodou PCR

Debryne a kol. zkoumal citlivost a specifitu 7 PCR testů popsaných pro identifikaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Tyto testy byly provedeny s lysaty buněk zís-

kaných z kolekce 100 referenčních kmenů *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* a s příbuznými druhy *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Arcobacter*. Různé testy se značně lišily v citlivosti a specifitě ke zkoumaným cílovým druhům. Pro *Campylobacter coli* byly 4 z 5 testů citlivé a specifické ze 100 %. Naopak žádný z 5 testů nebyl 100% citlivý ani specifický pro *Campylobacter jejuni*. Následně bylo vybráno 263 vzorků z belgické kolekce 1 906 lidských izolátů *Campylobacter*. Tato druhá sbírka byla použita k dalšímu hodnocení 2 vybraných multiplex PCR testů. Tato zkouška prokázala, že PCR identifikace s využitím 2 multiplex PCR testů je velice spolehlivá. Výsledky těchto testů by měly pomoci při výběru vhodného testu PCR pro identifikaci *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni* [30].

V práci Sailse a kol. byl vyvinut PCR test na základě výsledné hybridizace kolometrického koncového bodu pro detekci formátu (PCR ELISA) (Obr. 9) pro identifikaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. PCR primery byly navrženy tak, aby cílové sekvence genu byly druhově specifické. Pět biotin označených sond, zaměřených na specifitu druhu, byly zkoumány pro detekci označených dioxygenových PCR produktů z *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* pomocí PCR ELISA formátu. Byly identifikovány dvě sondy (CC2), které reagují jak s *Campylobacter jejuni*, tak *Campylobacter coli* cílových sekvencí a jedna sonda (CJ2), která reaguje pouze s cílovou sekvencí *Campylobacter jejuni*. Specifičnost testu s CC2 a CJ2 sondami byla porovnávána s řadou jiných mikroorganismů jako *Campylobacter* sp., *Arcobacter* sp., *Helicobacter* sp., a řadou jiných nezávislých organismů. PCR ELISA test a sondy byly prokázány jako specifické pro *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Citlivost metody PCR ELISA prokázala, že zkoumaná metoda byla 10 - 100 krát účinnější než gelová metoda PCR. Daný PCR ELISA test byl citlivý, specifický a výrazně zkracoval dobu potřebnou pro identifikaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*, což umožňuje včasné odhalení těchto střevních patogenů [31].



Obr. 9. Srovnání PCR – ELISA metody a metody elektroforesy PCR koncového bodu [31].

Grennan a kol. vyvinuli metodu PCR ELISA k detekci druhů *Campylobacter* a rozlišení *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni* ve vzorcích drůbeže. Test PCR se zaměřil na 16S/26S ribozomální RNA intergenetický prostor rodu *Campylobacter* s DNA primery vytvořenými pro specifickou detekci *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni*. Druhy *Campylobacter* byly znehybněny v jamkách NucleoLink™ a hybridizovány s PCR produkty modifikovanými podílem biotinu. Byly testovány ty vzorky drůbeže, u kterých se předpokládá výskyt kampylobakterů. Metoda PCR ELISA potvrdila přítomnost kampylobakterů ve 100 % vzorků, přičemž u 55 % vzorků se vyskytovaly smíšené kultury *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* [25].

Na rozdíl od *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* je *Campylobacter lari* jen zřídka spojován se záněty střev. Jeho rozlišení od výše zmíněných kampylobakterů se opírá o několik biochemických testů, jejichž účinnost je zpochybňována. Proto výskyt a přenos tohoto mikroorganismu nebyl doposud dobře prostudován. Na základě Oyarzabalovy studie byly pro metodu PCR navrženy primery specifické pro oblast 16S rRNA genu *Campylobacter lari*. Použitím těchto primerů byly získány PCR produkty o velikosti 579 bp. Žádný PCR produkt nebyl získán při amplifikaci DNA izolované z *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Salmonella*, *Helicobacter*, *Escherichia* a *Listeria*, což svědčí o specifitě použitých primerů. Tedy rychlá identifikace *Campylobacter lari* danou metodou PCR může pomoci porozumět výskytu a epidemiologii této bakterie [33].

Rahimi a kol. Ve své práci odebrali vzorky z kůží krůtího masa v závodu na zpracování drůbeže v iránském Isfahánu. U těchto vzorků byla vyšetřována přítomnost kampylobakterů pomocí metody PCR. Kampylobaktery se nacházely ve 214 vzorcích z 348, což činilo 62,1 %. Z těchto 214 izolátů bylo 175 vorků určeno jako *Campylobacter jejuni* (81 %) a zbylých 41 (19 %) vzorků bylo určeno jako *Campylobacter coli*. Poté byl proveden test na přítomnost kampylobakterů po porážce, vykuchání a během chlazení. Bezprostředně po porážce obsahovalo krůtí maso 75,9 % kampylobakterů, po vykolení obsahovalo 77,6 % kampylobakterů a během chlazení se počet kampylobakterů snížil na 32,8 %. Výsledky dokazují, že k dekontaminaci krůtího masa kampylobaktery, došlo během porážky a při vykuchání. Naopak chlazení významně snižuje množství kampylobakterů na povrchu kůže [35].

ZÁVĚR

Bakterie rodu *Campylobacter* jsou pro většinu veřejnosti neznámými mikroorganismy, na rozdíl od salmonel, u kterých je jejich základní problematika všeobecně známa. Cílem práce bylo seznámení se s danými mikroorganismy, zjištění jejich výskytu a významu. Dále se práce zabývala studiem možností identifikace bakterií rodu *Campylobacter*.

Kampylobaktery jsou mikroorganismy, které můžeme nalézt ve spoustě potravin a dokonce i ve vodě. Mezi nejrizikovější potraviny patří drůbež (zejména kuřata), hovězí, skopové, kozí a králíčí maso, dále mléko (kravské, ovčí, kozí). Nebezpečí výskytu kampylobakterů ve vodě je, že mohou přežívat i nízké teploty kolem 4°C. Bakterie rodu *Campylobacter* se vyskytují rovněž u zvířat, která nekonzumujeme např. psi, kočky, divocí ptáci, křečci, morčata, případně někteří živočichové moří. Další výskyt pro kampylobaktery je společný pro spoustu mikroorganismů, jako jsou výkaly, jak lidské tak zvířecí, mrtvá těla živočichů, vnitřnosti aj.

Kampylobaktery způsobují nemoc zvanou kampylobakteriosa, která se projevuje bolestmi břicha, horečkami, nevolností, někdy zvracením a hlavně průjmami. Nebezpečí této nemoci spočívá v tom, že v některých případech může způsobovat komplikace např. Guillan – Barré syndrom, zánět mozkových blan, zánět močových cest, potraty, infekce močových cest, akutní záněty slinivky břišní aj.

Izolace kampylobakterů byla donedávna poměrně komplikovaná. K izolaci a se používaly filtrační metody a izolační metody na selektivních půdách (krevní agary i agary bez přítomnosti krve). I když se tyto metody stále využívají, vytlačily je biologické molekulární metody, z nichž nejznámější je metoda PCR (polymerázová řetězová reakce), která se používá od 80. let. PCR metoda se vyznačuje přesností, rychlostí a vysokou citlivostí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] ADAMS, R. M., MOOS, M. Food microbiology. 3rd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2008. 463 s. ISBN 978-85404-284-5.

[2] MONTVILLE, T. J. Food microbiology an introduction. 1st ed. Washington: ASM Press, 2005. ISBN 1-55581-308-9.

[3] DE BLACKBURN, C. W. Food spoilage microorganisms. 1st ed. Cambridge: Woodhead publishing limited, 2006. ISBN 10:1-85573-966-6.

[4] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V. Lékařská mikrobiologie, bakteriologie, virologie, parazitologie. 1. vyd. Praha: Marvil, 1996. 558 s. ISBN

[5] KLABAN, V. Ilustrovaný mikrobiologický slovník. 1.vyd. Praha: Galén, 2005. 654 s. ISBN 80-7262-341-9.

[6] VOKURKA, M., HUGO, J., a kol. Velký lékařský slovník. 5. vyd. Praha: MAXDORF, 2005. 1001 s. ISBN 80-7345-058-5.

[7] VOTAVA, M. Lékařská mikrobiologie obecná. 1. vyd. Brno: Neptun, 2001. 247 s. ISBN 80-902896-2-2.

[8] Metody detekce a charakterizace *Campylobacter* sp. [on-line]. [cit.2009-10-26]. Dostupný z WWW: < [http:// www.chemicke-listy.cz](http://www.chemicke-listy.cz) >.

[9] EUZÉBY, P. J. Genus *Campylobacter*. [on-lin]. [cit. 2009-10-26]. Dostupný z WWW:

< [http:// www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html](http://www.bacterio.cict.fr/c/campylobacter.html) >.

[10] Microorganisms in foods. 2 nd ed. New York: Plenum Publishers, 2005. 763 s. ISBN 0-7514-0430-6.

[11] *Campylobacter fetus* [on-line]. [cit. 2010-03-03]. Dostupný z WWW: < http://www.affrc.go.jp/AVEM/english/em_en/bacteria0.html >.

[12] Molecular mechanisms influencing genetic diversity of *Campylobacter jejuni* [on-line]. [cit. 2010-03-01]. Dostupný z WWW: < <http://www.uu.nl/EN/faculties/veterinarymedicine/Current/agenda/Pages/DissertationEstherGaasbeek.aspx> >.

[13] Food Poisoning [on-line]. [cit. 2010-03-03]. Dostupný z WWW: < <http://www.foodpoisoning.pritzkerlaw.com/archives/cat-campylobacter.html> >.

[14] Kampylobakteriosy [on-line]. [cit. 2010-03-01]. Dostupný z WWW: < <http://www.chpr.szu.cz/monitor/tds01c/4alim/3kampylo.pdf> >.

[15] Vybrané výsledky kontrolní činnosti - 2008 [on-line]. [cit. 2010-02-03]. Dostupný z WWW: < [http:// www.khsstc.cz/file.aspx?id=914&name 2008.doc](http://www.khsstc.cz/file.aspx?id=914&name 2008.doc) >.

[16] OYARZABAL, O. A., WESLEY, I. V., HARMON, K. M. Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. *Veterinary Microbiology*. 1997, roč. 58, č. 1, s. 61-71.

[17] ZONIONS, D. I., PANAVIDAKOPOULOS, G. D. Molecular epidemiology of *Campylobacter fetus* subsp. *fetus* on bovine artificial insemination stations using pulsed field gel electrophoresis. *Journal of Infection*. 2005, roč. 51, č. 4, s. 329-332.

[18] BASTYNS, K., CHAPELLE, S., VANDAMME, P. Specific detection of *Campylobacter concisus* by PCR amplification of 23S rDNA areas. *Molecular and Cellular Probes*. 1995, roč. 9, č. 4, s. 247-250.

[19] KOGA, M., YUKI, N., TAKAHASHI, M. Are *Campylobacter curvus* and *Campylobacter upsaliensis* antecedent infectious agents in Guillain–Barré and Fisher’s syndromes?. *Journal of the Neurological Science*. 1999, roč. 163, č. 1, s. 53-57.

[20] ROWE, M. T., MADDEN, H. R. *CAMPYLOBACTER*/ introduction. *Encyclopedia of Food Microbiology*. 2005, s. 335-341.

[21] BILLINGHAM, J. D. A comparison of two média for the isolation of campylobacter in the tropics. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1981, roč. 75, č. 5, s. 645-646.

[22] CORRY, E. L. J., POST, D. E. Culture média for the isolation of campylobacters. *International Journal of Food Microbiology*. 1995, roč. 26, č. 1, s. 43-76.

[23] Problematika kamylobakteriových infekcí [on-line]. [cit. 2010-02-05]. Dostupný z WWW: < [http:// www.bpp.cz/solan/PDF/blok5/23.pdf](http://www.bpp.cz/solan/PDF/blok5/23.pdf) >.

[24] CORRY, E. L. J., a kol. Skirrow *Campylobacter* selective agar. *Progress in Industrial Microbiology*. 1995, č. 34, s. 440-441.

[25] GRENNAN, B., O’SULLIVAN N. A. PCR-ELISAs for Detection of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in Poultry Symplex. *Bio Techniques*. 2001, roč. 30, č. 3, s. 602- 610.

[26] BURDYCHOVÁ, R. SLÁDKOVÁ, P. Mikrobiologická analýza potravin. 1. vyd. Brno: Editační středisko MZLU, 2007. 218 s. ISBN 978-80-7375-116-6.

[27] ČIKOŠ, Š., KOPPEL, J., KANTÍKOVÁ, M. Polymerázová reťazová reakcia a jej použitie v biologickom výskume a diagnostike. 1. vyd. Košice: Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, 2001. 203 s.

[28] Microbiology Manual, 12. ed. Berlin: MERCK, 2008. 688 s.

[29] YAN, S. S., PENDRAK, L. M., FOLEY, S. L. *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome public health concerns from a microbial food safety perspective. Clinical and Applied Immunology Reviews. 2005, roč. 5, č. 5, s. 285-305.

[30] DEBRUYNE, L., SANYM, E., De BRANDT, E. Comparative performance of different PCR assays for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Research in Microbiology. 2008, roč. 159, č. 2, s. 88-93.

[31] SAILS, D. A., FOX, J. A., BOLTON, J. F. Development of a PCR ELISA assay for the identification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. Molecular and Cellular Probes. 2001, roč. 15, č. 5, s. 291-300.

[32] DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler by Bio-Rad Life Sciences [on-line]. [cit. 2010-03-01]. Dostupný z WWW: < [http:// www.selectscience.cn/.../dna-engine-dyad-peltier-thermal-cycler/](http://www.selectscience.cn/.../dna-engine-dyad-peltier-thermal-cycler/) >.

[33] OVARZABAL, A. O., WESLEY, V. I., BARBAREE. Specific detection of *Campylobacter lari* by PCR. Journal of Microbiological Methods. 1997, roč. 29, č. 1, s. 97-102.

[34] SKIRROW, B. M. Campylobacteriosis. Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition. 2003, 790-795.

[35] RAHIMI, E., MONTAY, H., BONZADIAN. PCR detection of *Campylobacter* sp. from turkey carcasses during processing plant in Iran. Food kontrol. 2010, roč. 21, č. 5, s. 692-694.

[36] DE RYCKE, J., OSWALD, E. Cytolethal distending toxin (CDT): a bacterial weapon to control host cell proliferation?. FEMS Microbiology Letters. 2001, roč. 203, č. 2, s. 141-148.

[37]] ROSYPAL, S., a kol. Úvod do molekulární biologie. 3. vyd. Brno: GRAFEX, 2002. 1199 s. ISBN 80-902562-4-4.

[38] VOTAVA, M. Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii. 1. vyd. Brno: Hortus, 2000. 403 s. ISBN 80-238-5058.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

- CDT Cytotoxic distending toxins.
- DNA Deoxyribonucleic acid.
- FBP Ferrous – bisulfite – pyruvate.
- PCR Polymerase chain reaction.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. <i>Campylobacter fetus</i>	16
Obr. 2. <i>Campylobacter coli</i>	17
Obr. 3. <i>Campylobacter jejuni</i>	22
Obr. 4. Zdroje a onemocnění vyvolaná nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu <i>Campylobacter</i>	25
Obr. 5. <i>Kampylobakteriosa</i> – počty infekcí u lidí v ČR.....	28
Obr. 6. Výskyt alimentárních onemocnění v ČR v roce 2008.....	30
Obr. 7. Porovnání kontrolní buňky a buňky u níž byl zaznamenán cytopatický efekt způsobený CDT toxinem.....	33
Obr. 8. DNA Engine® Peltier Thermal Cycler	39
Obr. 9. Srovnání PCR – ELISA metody a metody elektroforesy PCR koncového bodu.....	45

SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Kamylobakteriosa – nemocnost v ČR a ve sledovaných regionech v letech 1999 – 2001.....	28
Tab. 2. Kamylobakteriosa – distribuce v ČR a vybraných regionech podle pohlaví v období 1999 – 2001	29
Tab. 3. Kamylobakteriosa – věková distribuce v roce 2001	29