

METODY DETEKCE A CHARAKTERIZACE *Campylobacter* sp.

IGOR HOCHEL

Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technická v Praze, Technická 5, 166 28 Praha 6
igor.hochel@vscht.cz

Došlo 27.4.09, přijato 5.6.09.

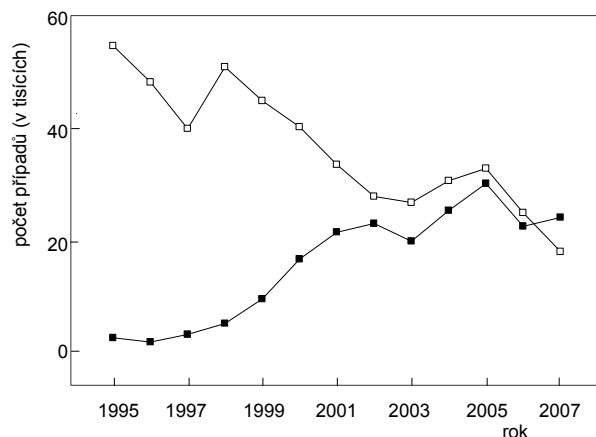
Klíčová slova: *Campylobacter*, gastroenteritis, Gullain-Barré syndrom, fenotypizace, genotypizace, serotypizace

Obsah

1. Úvod
2. Morfologické a biochemické vlastnosti a metabolismus kampylobakterií
3. Klinické projevy onemocnění způsobené kampylobakteriemi, výskyt a způsob přenosu
4. Izolace kampylobakterií
5. Rychlé metody detekce termofilních kampylobakterií
 - 5.1. Imunochemické metody
 - 5.2. Molekulárně biologické metody
6. Metody identifikace a charakterizace kampylobakterií
 - 6.1. Fenotypové testy
 - 6.2. Serologické testy
 - 6.3. Molekulárně biologické metody
 - 6.4. Ostatní metody

1. Úvod

Termotolerantní bakterie rodu *Campylobacter* se v posledních více jak deseti letech stávají významnými původci alimentárních nákaz v Evropě, USA a dalších rozvinutých zemích. Např. v roce 2005 bylo v celé Evropské unii zaznamenáno 195 426 potvrzených případů kampylobakterios¹. V řadě zemí počet případů onemocnění vyvolaných kampylobakteriemi přerostl počet enteritid způsobených salmonelami^{2,3}. Prudký nárůst kampylobakterií byl zaznamenán od konce 90. let minulého století až do roku 2005 také v České republice (obr. 1). Kampylobakterie byly původně popsány jako zvířecí patogeny a byly zařazeny do rodu *Vibrio*. 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



Obr. 1. Počet případů onemocnění způsobené bakteriemi rodu *Campylobacter* a *Salmonella* v České republice v letech 1995 až 2007; ■ kampylobacteriémie, □ salmonelózy, zdroj: <http://www.szu.cz/data/infekce-v-cr>

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 navrhli Sebald a Véron⁴ začlenit *V. fetus* a *V. bubulus* do nového rodu *Campylobacter*. O deset let později Véron a Chatelain⁵ vypracovali komplexní taxonomii tohoto rodu a definovali 4 druhy: *C. fetus*, *C. coli*, *C. jejuni* a *C. sputorum*. Rod *Campylobacter* byl postupně rozšiřován a revidován, a v roce 1991 Vandamme a De Ley⁶ navrhli vytvořit novou čeleď *Campylobacteriaceae*. Současná taxonomie zahrnuje do této čeledi 3 rody: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Sulfurospirillum* a nesprávně pojmenovaný druh *Bacteroides ureolyticus*. Samotný rod *Campylobacter* je tvořen 18 více či méně genotypicky homologními druhy: *Campylobacter canadensis*, *C. coli*, *C. concisus*, *C. curvus*, *C. fetus* subsp. *fetus*, *C. fetus* subsp. *veneralis*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hominis*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. hyointestinalis* subsp. *lawsonii*, *C. insulaenigrae*, *C. jejuni* subsp. *doylei*, *C. jejuni* subsp. *jejuni*, *C. lanienae*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. rectus*, *C. showae*, *C. sputorum* bv. *Faecalis*, *C. sputorum* bv. *Sputorum* a *C. upsaliensis*.

2. Morfologické a biochemické vlastnosti a metabolismus kampylobakterií

Buňky většiny druhů kampylobakterií jsou spirálovité, nebo zakřivené gram negativní tyčinky, o rozměrech

0,2–0,8 × 0,5–5 µm. Tyčinky mohou vytvářet jednu nebo více smyček. Ve starých kulturách přecházejí spirálovité buňky na kokoidní formu. K těmto morfologickým změnám dochází pravděpodobně v důsledku enzymové degradace peptidoglykanové vrstvy⁷. Buňky netvoří spory. Většina druhů je pohyblivá, a to prostřednictvím polárního bičíku na jednom nebo obou koncích buňky. Ostatní druhy, jako je *C. gracilis*, jsou nepohyblivé, nebo jsou naopak vybaveny mnohonásobnými bičíky (*C. showae*). Příležitostně může být u druhu *C. hyointestinalis* pozorována difference v počtu bičíků.

Kampylobakterie jsou chemoorganotrofní mikroorganismy, které nejsou schopny fermentovat ani oxidovat sacharidy. Energií získávají z metabolismu aminokyselin a z metabolismu intermediátů trikarboxylových kyselin. Nehydrolyzují tyrosin, kasein, škrob, ani želatinu. Test na produkci acetoinu (Voges-Proscauer) a test na methylerveň jsou negativní. S výjimkou *C. gracilis* a některých kmenů *C. concisus* a *C. showae* vykazují oxidázovou aktivitu. Redukují dusičnany, avšak nikoliv dusitany. *C. jejuni* a některé kmeny *C. curvus* jsou schopny hydrolyzovat hippurát. Tohoto testu se v diagnostice používá k diferenciaci klinicky nejvýznamnějších druhů *C. jejuni* a *C. coli*. Žádné species nevytváří pigmenty. Obsah guaninu a cytosinu v molekule DNA se pohybuje v rozmezí od 29 do 47 mol. %.

Optimální růstová teplota je 35–37 °C, růst termofilních druhů je při izolaci kampylobakterií zvýhodněn kultivací při teplotě 42–43 °C. Všechny kampylobakterie rostou za mikroaerofilních podmínek s koncentrací kyslíku v rozmezí 3–15 %. Druhy *C. concisus*, *C. curvus*, *C. gracilis*, *C. rectus*, *C. mucosalis* a *C. showae* vyžadují pro mikroaerobní růst, jako donor elektronů, přítomnost mravenčanu nebo vodíku.

3. Klinické projevy onemocnění způsobené kampylobakteriemi, výskyt a způsob přenosu

Kampylobakterie jsou mikrobiálními patogeny člověka a zvířat. Jsou identifikovány jako agens, které vyvolává u člověka akutní průjemová onemocnění, zvláště pak u dětí jak v průmyslově rozvinutých, tak rozvojových zemích. Enteritis vyvolaná kampylobakteriemi vykazuje podobné symptomy jako onemocnění vyvolané salmonelami, nebo shigelami. Jednoznačná diagnóza může být učiněna pouze detekcí kampylobakterií v klinickém materiálu. Mezi nejvýznamější patogeny se řadí termofilní druhy *C. jejuni*, *C. coli*, *C. hyointestinalis* a druh *C. fetus* subsp. *fetus*. Nebude-li uvedeno jinak, bude se následující text týkat převážně termofilních kampylobakterií.

Kampylobakteriíza vyvolaná *C. jejuni* nebo *C. coli* je choroba, která se projevuje po 1–7 dnech inkubace bolestmi břicha následované průjmy. Postižení mohou vykazovat další nespecifické příznaky, jako je horečka, bolest hlavy, závrať, myalgie, popř. zvracení. Bolest břicha se může stávat nepřetržitou, intenzivní a může se šířit do pravé

jámy kyčelní a tak komplikovat diagnózu. Po 1 až 2 dnech onemocnění se u 15 % pacientů objevuje ve stolici krev. Průběh onemocnění u dětí je poněkud odlišný. Horečka se často nevyskytuje, naopak zvracení je časté. Až u 92 % infikovaných dětí ve věku do 1 roku se objevuje krev ve stolici⁸. Ačkoliv vlastní kampylobakteriíza není obvykle život ohrožující onemocnění, závažnější jsou komplikace popř. postinfekční následky, jako je apendicitis, colitis, erythema nodosum u žen, masivní střevní krvácení, bakterémie zvláště u pacientů s oslabeným imunitním systémem, hepatitis, pankreatitis, cholecystitis, potrat, hemolyticko-uremický syndrom, reaktivní artritida, Reiterův syndrom a Guillain-Barré syndrom (GBS)⁹. GBS je zánětlivá polyneuropatie způsobující neuromuskulární paralýzu. Klinicky se syndrom projevuje smyslovými poruchami, bolestí, rychle postupující slabostí dolních a horních končetin, ochabnutím dýchacích svalů, popř. svalovou paralýzou. Onemocnění vyvolaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter* jsou uvedena v tab. I.

Kampylobakterie se vyskytují ve střevním traktu mnoha volně žijících i domácích zvířat a ptáků^{10–13}. Člověk se nejčastěji nakazí konzumací kontaminovaných potravin, vody a syrového, nebo nedostatečně pasterizovaného mléka. *Campylobacter* sp. byl izolován z drůbežího, hovězího a vepřového masa a masných výrobků, ústřic, slávek, hřebenatky a krabů, hub a zeleniny¹⁴. Maso a masné výrobky jsou obvykle kontaminovány v průběhu porážky a následného zpracování masa^{15,16}. Kampylobakterie jsou citlivé na zvýšené teploty, avšak jsou schopny přežít v potravinách při teplotách nižších než 0 °C až po dobu 112 dní. Infekce proto může být způsobena manipulací a konzumací nedostatečně tepelně ošetřených potravin a kontaminací potravin, které nebyly tepelně upraveny¹⁷, avšak může být šířena nejen kontaminovanými potravinami, ale i přímým kontaktem s infikovanými zvířaty¹⁸, nebo přenosem z člověka na člověka¹⁹.

4. Izolace kampylobakterií

Kampylobakterie je možné izolovat jednak filtrační metodou, nebo kultivací na selektivním médiu. Filtrační metody jsou používány především pro testování klinického materiálu, který je bohatý na vitální buňky kampylobakterií. Sterilní filtr s póry o velikosti 0,65 nebo 0,45 µm je umístěn na neselektivní popř. selektivní krevní agar. Na filtr se aplikuje 10–12 kapek vzorku emulzifikovaného ve fyziologickém roztoku. Využívá se tak pohyblivosti kampylobakterií, které procházejí póry filtru a separují se od ostatní mikroflóry^{20,21}. Jinou alternativní filtrační metodou je aplikace membránových filtrů Sartorius. Po přefiltrování vzorku se filtrát aplikuje na neselektivní nebo selektivní růstové médium²². Kultivace se provádí za mikroaerofilních podmínek, izolace H₂ dependentních druhů probíhá v atmosféře obsahující 15 % CO₂ a 85 % H₂.

Další možností izolace kampylobakterií je aplikace selektivních médií. Metoda se uplatňuje nejen při zpracování klinického materiálu, ale také při izolaci *Campylo-*

Tabulka I

Onemocnění vyvolaná, nebo indukovaná jednotlivými druhy rodu *Campylobacter*

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</i> subsp. <i>hyointestinalis</i>	prase, skot, křeček, vysoká zvěř	gastroenteritis	enteritis prasat a skotu
<i>C. hyointestinalis</i> subsp. <i>lawsonii</i>	prase	žádné	?
<i>C. isulaenigrae</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

bacter sp. z potravin a potravinářských surovin, vody a vzorků životního prostředí. Protože vzorky potravin a vzorky životního prostředí obsahují jen nízké počty buněk kampylobakterií, většinou stresovaných popř. subletálně poškozených, je nezbytné provádět nabohacování kultur. Kampylobakterie jsou nutričně náročné a citlivé na přítomnost kyslíku v růstovém médiu. Selektivní a nabohacovací média proto musí nejen splňovat tyto nutriční nároky, ale musí obsahovat nezbytná zhášedla kyslíkových radikálů (krev, aktivní uhlí). Byly popsány různé kultivační půdy využívající krevní agar popř. agar bez přítomnosti

krve jako bazální médium. Jako selektivní agens jsou využívány různé směsi antibiotik^{23–30}. Avšak žádné z těchto médií nepodporuje růst všech druhů kampylobakterií.

Inkubace zaočkovaných půd při teplotě 42–43 °C podporuje růst termofilních kampylobakterií a inhibuje růst většiny doprovodné mikroflóry. Na druhé straně však bude potlačen růst některých druhů mezofilních kampylobakterií. Izolace mezofilních druhů je náročnější, vzorky se kultivují při teplotě 37 °C, obvykle s prodlouženou dobou kultivace.

V České republice je pro izolaci a průkaz termofilních

kampylobakterií ve výrobcích určených k lidské výživě nebo ke krmení zvířat platná norma ČSN ISO 10272-1 *Mikrobiologie potravin a krmiv – horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp.* Testovaný vzorek se suspenduje do bujony podle Boltona, které obsahuje cefoperazon, vankomycin, trimetoprim a amfotericin B, v poměru 1:10 a kultivuje se za mikroaerofilních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 4–6 h a poté při teplotě 41,5 °C po dobu 44–48 h. Pomnožená kultura se očkuje na desoxycholátový agar s aktivním uhlím, cefoperazonem a amfotericinem B a na druhé volitelné médium (modifikovaný agar podle Butzlera, agar podle Skirrowa, agar podle Karmaliho, agar podle Prestona) a to proto, aby se zvýšila pravděpodobnost zachytu požadovaného mikroorganismu. Plotny se inkubují za mikroaerofilních podmínek při teplotě 41,5 °C po dobu 44–48 h. Z každé plotny se vybere 5 charakteristických kolonií a provedou se předběžné testy. Suspektní kolonie jsou pak dále charakterizovány pomocí předepsaných biochemických testů.

5. Rychlé metody detekce termofilních kampylobakterií

5.1. Imunochemické metody

Imunochemické metody představují alternativní techniky detekce kampylobakterií v různých typech vzorků. Výhodou těchto metod je jejich jednoduchost, nízké náklady a možnost testovat velký počet 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* subsp. *fetus* (Campyslide, BBL Microbiology System); 2) různým sérotypům *C. jejuni* (Microscreen, Mercia Diagnostics); 3) flagelárnímu antigenu *C. jejuni* (Meritec-Campy, Meridian Diagnostics). Hodinka a Gilligan³¹ prokázali, že Campyslide pozitivně reagoval se 110 izoláty kampylobakterií, avšak vykazoval rovněž křížové interakce s některými kmeny *Pseudomonas aeruginosa*. Nachamkin a Barbagallo³² testovali systém Meritec-Campy, který reagoval se všemi 77 kmeny *C. jejuni*, 17 kmeny *C. coli* a 2 kmeny *C. upsaliensis*, avšak selhal při detekci 6 kmenů *C. lari* a 3 kmenů *C. fetus* subsp. *fetus*. Další autoři testovali komerční test Microscreen a zjistili, že systém reaguje s kmeny druhu *C. jejuni* a *C. coli*, avšak také poskytuje slabou odezvu s ostatními druhy rodu *Campylobacter* a *Helicobacter*, pokud je koncentrace buněk ve vzorku vyšší než 10^5 cfu ml⁻¹ (cit.³³). Komerčně dostupné aglutinační testy byly použity pro detekci kampylobakterií v kuřecím mase³⁴. Falešně negativní výsledky byly pozorovány u vzorků s vysokou koncentrací doprovodné mikroflóry v nabohacovacím médiu.

Byly připraveny protilátky pro detekci a identifikaci

pouze určitých druhů kampylobakterií. Taylor a Chang³⁵ připravili specifickou protilátku proti hlavnímu proteinu vnější membrány (OMP) *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. upsaliensis*. Jako detekční systém využili autoři metody imunoblotu a ELISA. Lu a spol.³⁶ připravili monoklonální protilátky proti *Campylobacter jejuni* sérotypu 6 (Lior). Tyto protilátky reagovaly se všemi testovanými kmeny *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari*. Rozpoznávanou buněčnou komponentou byl vždy jeden protein, a to: flagelin (62 kDa), protein bičíkového háčku (92 kDa) a protein o molekulové hmotnosti 31 kDa. Autoři rovněž vyvinuli nepřímou kompetitivní metodu ELISA. Detekční limit stanovení se pohyboval v rozmezí 10^5 – 10^7 cfu ml⁻¹. V další studii byly popsány čtyři monoklonální protilátky proti základnímu řetězci (core) lypopolysacharidů *C. fetus*. Jedna protilátka reagovala se všemi 42 kmeny *C. fetus*, ostatní protilátky pak reagovaly s 41 kmeny testovaného souboru. Všechny monoklonální protilátky reagovaly jak se sérotypem A, tak se sérotypem B. Autoři použili připravené preparáty k vývoji nepřímé ELISA. Dosažené detekční limity se lišily podle použité protilátky a pohybovaly se v rozmezí 10^4 – 10^7 cfu ml⁻¹ (cit.³⁷). Hochel a spol.^{38,39} připravili králičí IgG a slepičí IgY proti *C. jejuni* O:23 (Penner) *C. coli* a *C. fetus* subsp. *fetus* a vyvinuli nepřímou kompetitivní ELISA. Králičí protilátky byly specifické, slepičí IgY proti *C. jejuni* O:23 vykazovaly křížové interakce s kmeny *C. jejuni* sérotyp O:3, O:9 (Penner) a sérotypy 10, 18 a 22 (Kahlich). Další křížové interakce byly pozorovány s druhem *C. upsaliensis* a *C. sputorum* bv. *Sputorum*. Byly pozorovány také slabé křížové reakce IgY proti *C. fetus* subsp. *fetus* s kmeny *C. fetus* subsp. *veneralis*. Detekční limity enzymového imunochemického stanovení se pohybovaly v rozmezí $0,3$ – $3,2 \cdot 10^6$ cfu ml⁻¹ pokud byly použity králičí IgG, nebo v rozmezí $0,5$ – $1,8 \cdot 10^5$ cfu ml⁻¹ v případě využití IgY. Autoři testovali vyvinuté techniky ELISA na limitovaném počtu přirozeně a uměle kontaminovaných vzorcích potravin a dosažené výsledky porovnali s výsledky získanými standardní kultivační metodou, PCR a komerčně dostupným testem Singlepath *Campylobacter* Rapid Test (Merck). Horák a Hochel⁴⁰ použili magnetické poly(glycidyl methakrylátové) částice s kovalentně vázanými slepičími IgY při vývoji metody ELISA pro detekci *Campylobacter jejuni*. Detekční limit metody byl $4,8 \cdot 10^6$ cfu ml⁻¹.

Na principu enzymového imunochemického stanovení jsou založeny i další komerčně dostupné testy VIDAS *Campylobacter* kit (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francie) pro detekci *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* a EIA-Foss *Campylobacter* enzyme-immunosorbent assay kit (Foss Electric, Dánsko) pro detekci *C. jejuni* a *C. coli*. Hoofar a spol.⁴¹ testovali VIDAS *Campylobacter* kit (EIA-1) a EIA-Foss *Campylobacter* enzyme-immunosorbent assay kit (EIA-2) na vzorcích výkalů skotu a prasat. Citlivost EIA-1 95 % (skot) a 84 % (prasata), citlivost EIA-2 dosáhla hodnot 88 % (skot) a 69 % (prasata). Avšak při studiu specifity dosáhl test EIA-2 pouze 32 %. Bailey a spol.⁴² porovnali Tecra *Campylobacter* Visual Immunoassay (TCVIA)

s kultivačními metodami detekce kampylobakterií v 350 vzorcích kuřat. TCVIA poskytla u 317 vzorků pozitivní výsledek, z toho 4 výsledky byly falešně pozitivní a 22 bylo falešně negativních. Pomocí kultivačních metod se podařilo zjistit přítomnost mikroorganismu v 280 vzorcích, 48 vzorků bylo falešně negativních. Jiná skupina testovala komerčně dostupnou soupravu ProSpecT Microplate Assay na 1205 klinických vzorcích. Nebyly prokázány křížové interakce s doprovodnou mikroflórou. Specifita stanovení byla 97,7 % a citlivost 89,1 % (cit.⁴³). Wei a spol.⁴⁴ použili 4 komerčně dostupné protilátky při vývoji SPR senzoru založeném na povrchové plasmonové rezonanci. Vyvinutý systém byl vysoce specifický k druhu *C. jejuni*. Detekční limit dosáhl hodnoty 10^3 cfu ml⁻¹ v čisté kultuře i ve vzorcích kuřecího masa.

Specifické protilátky mohou být využity nejen pro přímou detekci, ale také pro separaci patogenního mikroorganismu ze vzorku. Yu a spol.⁴⁵ použili magnetických částic s imobilizovaným streptavidinem, na které navázali komplex biotinu a protilátky proti *C. jejuni*. Takto aktivované částice byly smíchány s homogenizovaným vzorkem. Poté byly magnetické částice odděleny od vzorku a aplikovány na Karmaliho agar. Pomocí této metody bylo možné detegovat 10^4 buněk *C. jejuni* v 1 g vzorku. Aby zabránili inhibici polymerázové řetězové reakce komponentami vzorku, použili Docherty a spol.⁴⁶ magnetické částice s imobilizovanou specifickou protilátkou na separaci buněk kampylobakterií od matrice vzorků mléka a kuřecího masa.

5.2. Molekulárně biologické metody

Molekulárně biologické metody založené na řetězové polymerázové reakci (PCR) jsou v současné době široce využívány jak pro detekci kampylobakterií v různých typech vzorků, tak pro další charakterizaci izolovaného mikroorganismu. PCR metody jsou založeny na multiplikaci krátkého fragmentu bakteriálního genomu. Vzniklý produkt je pak separován a vizualizován elektroforézou na agarosovém gelu. Podle požadované specifity mohou být využity různé oblasti genomu. Je-li požadována detekce pouze na úrovni rodu, využívají se vysoce konzervativní úseky 16S rRNA, v případě požadavku na rozpoznání jednotlivých druhů se využívají druhově specifické geny. Např. pro detekci *C. jejuni* byly použity amplikony genu *HipO* pro hippurikasu⁴⁷ nebo *mapA* pro membránový protein A (cit.⁴⁸). Birkenhead a spol.⁴⁹ vyvinuli techniku PCR založenou na primerech odvozených z genu *flaA* kódující flagelin. Štěpení amplikonů *C. jejuni* pomocí *Alu I* prokázalo značný polymorfismus v délce restričních fragmentů. Metody PCR jsou poměrně citlivé, avšak v závislosti na druhu vzorku se mohou objevit určité problémy. V potravinách v životním prostředí se vyskytují jednotlivé druhy bakterií v malém zastoupení a je proto nezbytné provádět nabohacování vzorku, čímž se ztrácí výhoda přímé detekce patogenu ve vzorku. Vzorky mohou obsahovat inhibitory řetězové polymerázové reakce, což vyžaduje zavedení dodatečných purifikačních postupů⁴⁶. Určitou

nevýhodou je i skutečnost, že řada laboratoří vyvinula vlastní specifické postupy, které však znesnadňují přenositelnost výsledků mezi laboratořemi.

6. Metody identifikace a charakterizace kampylobakterií

6.1. Fenotypové testy

Identifikace a diferenciaci kampylobakterií je poměrně obtížná vzhledem k tomu, že jsou tyto bakterie náročné na růstové podmínky a nefermentují sacharidy. Většina identifikačních a rozlišujících fenotypových testů je založena na vyhodnocení morfologických znaků, nutričních požadavcích, rezistenci mikroorganismu k různým druhům agens včetně antibiotik, teplotní toleranci a na poměrně malém počtu biochemických (enzymových) testů^{50,51}. Např. *C. jejuni*, *C. coli* a *C. lari* jsou oxidasa a katalasa pozitivní, redukují dusičnany na dusitany, rostou za mikroaerofilních podmínek při teplotě 42 °C, avšak nikoli při 25 °C. Druh *C. lari* je rezistentní k nalidixové kyselině, *C. jejuni* a *C. coli* jsou na přítomnost tohoto antibiotika citlivé. Hydrolýza hippurátu je standardní test pro rozlišení *C. jejuni* od *C. coli* a *C. lari*^{52,53}. Diferenciace *C. jejuni* subsp. *jejuni* a *C. jejuni* subsp. *doylei* je založena na schopnosti prvně jmenovaného poddruhu redukovat dusičnany a seleničitany. Odlišit *C. fetus* od běžně se vyskytujícího druhu *C. sputorum* ve veterinárních vzorcích je možné pomocí rychlého testu na důkaz produkce H₂S. Diferenciace *C. fetus* subsp. *fetus* a *C. fetus* subsp. *veneralis* se provádí na základě schopnosti mikroorganismu tolerovat přítomnost 1% glycerolu v růstovém médiu. Další doplňkovou a jednoduchou metodou, jak rozpoznat oba poddruhy, je stanovení jejich sérotypu. *C. fetus* subsp. *fetus* tvoří 2 sérotypy (A nebo B), zatímco *C. fetus* subsp. *veneralis* tvoří jediný sérotyp A (cit.⁵⁴). Přestože biochemické testy poskytují rychlé údaje pro předběžnou identifikaci i subtypizaci kampylobakterií, je třeba získané výsledky obezřetně vyhodnotit vzhledem k určité variabilitě v interpretaci a reprodukovatelnosti jednotlivých testů. Tyto rozdíly mohou být způsobeny velikostí inokula, typem kultivačního média, způsobem provedení biochemických testů, tj. použitými reakčními podmínkami popř. stářím kultury^{55–57}. Další problém představují mutatiní kmeny daného druhu, jako je např. hippurát negativní *Campylobacter jejuni* subsp. *jejuni*⁵⁸.

Problémy spojené s nejednoznačnými výsledky při vyhodnocování fenotypových charakteristik kampylobakterií vedly některé pracovníky k vývoji standardizovaných postupů, které by umožnily objektivní vyhodnocení získaných dat. Bolton a spol.⁵⁹ navrhl dvanáct fenotypových testů, jejichž výsledky umožní uživateli vypočítat numerický kód. Ten pak usnadňuje identifikaci 6 druhů rodu *Campylobacter*. Malý počet rozpoznávaných druhů je největším omezením využitelnosti takto navrženého systému. Byly rovněž vypracovány pravděpodobnostní tabulky pro

identifikaci kampylobakterií. Barrett a spol.⁶⁰ popsal výsledky studia 205 kmenů kampylobakterií pomocí 24 fenotypových testů. Kombinace standardizovaných fenotypových testů v podobě miniaturizovaných komerčně dostupných souprav a pravděpodobnostních tabulek pro přesnou identifikaci kampylobakterií pak představuje možnost, jak usnadnit charakterizaci těchto mikroorganismů, omezit možnost chybné identifikace a jak zabezpečit přenositelnost výsledků mezi laboratořemi. Pravděpodobnostní tabulky je možné snadno revidovat v případě taxonomických změn, v okamžiku, kdy jsou pro nový taxon k dispozici porovnatelné údaje.

V současné době platná norma ČSN ISO 10272-1 *Mikrobiologie potravin a krmiv – horizontální metoda průkazu a stanovení počtu Campylobacter spp.* požaduje pro identifikaci a další charakterizaci kampylobakterií následující fenotypové a biochemické testy: vyhodnocení morfologie mikroorganismu, pohyblivost, růst při teplotě 25 °C za mikroaerofilních podmínek, růst při teplotě 41,5 °C za aerofilních podmínek, průkaz cytochromoxidasy a katalasy, citlivost mikroorganismu k cefalotinu a kyselině nalidixové, schopnost hydrolyzovat hippurát a indoxylacetát. Růstové podmínky a definovaný soubor identifikačních testů umožňují rozlišit čtyři klinicky nejvýznamější druhy termofilních kampylobakterií (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. upsaliensis*).

6.2. Serologické testy

Serotypizace je jedna z běžných metod detailní fenotypové charakterizace bakterií. Pro kmeny *C. jejuni* a *C. coli* bylo navrženo několik serotypizačních schémat. Penner a Hennessy⁶¹ vyvinuli pasivní hemaglutinaci založenou na interakci rozpustných, tepelně stabilních antigenů, imobilizovaných na povrch erythrocytů se specifickými antiséry. V současnosti je pomocí této metody popsáno 66 sérotypů. Hlavní antigenní komponentou jsou lipopolysacharidy, avšak některé studie naznačují, že se imunochemické reakce účastní také kapsulární polysacharidy^{62,63}. Penerova metoda serotypizace má dva nedostatky: 1) detekčním systémem je pasivní hemaglutinace, přičemž reprodukovatelnost výsledků může být ovlivněna variabilní kvalitou jednotlivých šarží erythrocytů⁶⁴, 2) v metodě se používají heterologními kmeny nesycená antiséra, takže značný počet izolátů aglutinuje s více jak jedním antiserem⁶⁵. Frost a spol.⁶⁶ modifikovali Pennerovo serotypizační schéma *C. jejuni* a *C. coli* použitím sycených antiser proti tepelně stabilnímu antigenu a využitím přímé aglutinace bakteriálních buněk jako detekčního systému. Oba uvedené systémy jsou, vzhledem k různému způsobu přípravy protilátek a metodologii, srovnatelné pouze částečně.

Lior a spol.⁶⁷ navrhli serotypizační metodu založenou na protilátkách proti tepelně labilnímu antigenu a na přímé skříčkové agglutinaci. Vakcinace králíků byla prováděna bakteriálními buňkami ošetřenými 0,5% formaldehydem. Nežádoucí křížové interakce protilátek byly potlačeny sycením antiser příslušnými heterologními kmeny. Kahlich a spol.⁶⁸ připravili specifická antiséra vakcinací králí-

ků živými kulturami *Campylobacter jejuni*. Jako detekční systém byla použita přímá skříčková aglutinace. Titr antisér se pro homologní kmeny *C. jejuni* pohyboval v rozmezí 1:128 až 1:2048. Heterologní kmeny většinou v přítomnosti séra neaglutinovaly, pokud byly křížové interakce pozorovány, tak pouze při velmi nízkých titrech 1:4. Křížové reakce tak bylo možné potlačit ředěním séra v poměru 1:8 a více. Autoři definovali 25 sérotypů *C. jejuni* a vyslovili předpoklad, že aglutinačním agens je flagelin⁶⁹. Určitým nedostatkem serotypizace podle Kahliche je skutečnost, že metoda nedoznala většího rozšíření, a že nebyly uveřejněny konverzní tabulky s již dříve zavedenými technikami.

6.3. Molekulárně biologické metody

Byla popsána řada molekulárně biologických technik pro identifikaci a další charakterizaci kampylobakterií. Většina těchto metod je založena na technice polymerázové řetězové reakce (PCR). Tyto metody byly obvykle vyvinuty pro přímou detekci mikroorganismu s různou úrovní rozlišení. Harmon a spol.⁷⁰ vyvinuli multiplexovou metodu PCR (MPCR) pro simultánní detekci *C. jejuni* a *C. coli*. Byly aplikovány primery cílového genu *flaA* kódující flagelin a primery C1 a C4 proti blíže nespecifikovanému genu použité k identifikaci *C. jejuni*. Amplifikace DNA *C. jejuni* poskytovala 2 amplikony o velikosti 160bp a 460 bp, zatímco amplifikace DNA *C. coli* poskytla amplikon o velikosti 460 bp. Person a Olsenová⁷¹ vyvinuli MPCR pro rutinní detekci *C. coli* a *C. jejuni*. Cílovým genem použitých primerů byl gen *hipO* kódující hippuricasu (*C. jejuni*) a sekvence částečně pokrývající gen *asp* kódující aspartokinasu (*C. coli*). Citlivost metody byla závislá na způsobu přípravy testovaného materiálu (klinické vzorky) a na způsobu extrakce templátové DNA. Detekční limit se tak pohyboval v rozmezí 10^2 – 10^5 buněk ml⁻¹ vzorku. Jiná skupina vyvinula PCR pro souběžnou identifikaci *C. jejuni* a *C. coli*, s využitím primerů komplementárních k cílovému genu *ceuE* (*C. coli*) a genu kódujícímu oxidoreduktasu (*C. jejuni*)⁷². Yamazaki-Matsume⁷³ popsali MPCR pro identifikaci *C. coli*, *C. fetus*, *C. hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *C. jejuni*, *C. lari* a *C. upsaliensis*. Autoři použili kombinaci 6 druhově specifických primerů. Cílovými geny byly gen pro 23S rRNA (*C. hyointestinalis*), *ask* (*C. coli*), *cstA* (*C. fetus*), *glyA* (*C. lari*), *cj414* (*C. coli*) a *lpxA* (*C. upsaliensis*). Amplikony získané pro jednotlivé druhy byly jednoznačně rozlišitelné podle své velikosti po elektroforetické separaci na agarosovém gelu. Účinnost metody byla ověřena na 142 kmenech kampylobakterií různého původu. Rovněž byla popsána real-time PCR pro přímou kvantifikaci *C. jejuni* a *C. lanienae* ve veterinárních vzorcích. Pro *C. jejuni* byl použit primer komplementární s genem *mapA*, pro *C. lanienae* byly testovány 3 primery komplementární k 16S rRNA. Detekční limit amplifikace *C. jejuni* byl $3 \cdot 10^3$ cfu g⁻¹, detekční limit amplifikace *C. lanienae* dosáhl hodnoty 250 cfu g⁻¹ (cit.⁷⁴). Dionisi a spol.⁷⁵ použili real-time PCR k identifikaci ciprofloxacin rezistentních

kmenů *C. jejuni*. Autoři použili primery komplementární s úsekem cílového genu *gyrA*, protože substituce C→T na 86 kodonu tohoto genu je spojována s rezistencí k ciprofloxacinu. Hong a spol.⁷⁶ vyvinuli PCR-ELISA pro rychlou detekci *C. coli*, *C. jejuni* a *Salmonella enterica* v kuřatech. V této metodě jsou do amplikonu začleněny značené nukleotidy a výsledný PCR produkt je detegován použitím komplexu enzym-protilátka, která rozpoznává použitou unikátní značku. Detekční limit metody pro průkaz přítomnosti salmonel byl $2 \cdot 10^2$ cfu ml⁻¹, detekční limit pro průkaz přítomnosti kampylobakterií činil $4 \cdot 10^1$ cfu ml⁻¹.

Studer a spol.⁷⁷ testovali vzorky z životního prostředí z kuřecích farem na přítomnost kampylobakterií. Vzorky byly analyzovány jak kultivační metodou, tak pomocí PCR. Všechny produkty PCR byly dále typovány na základě analýzy délkového polymorfismu restrikčního fragmentu (RFLP), s využitím restrikční endonukleasy *DraI*. Byly nalezeny 3 RFLP profily a jejich vzájemné kombinace. Vacherová a spol.⁷⁸ vyvinuli kombinovanou techniku založenou na PCR a RFLP pro detekci bodových mutací odpovídajících za rezistenci kampylobakterií k makrolidům.

Pro subtypizaci kampylobakterií byly použity i další metody, jako je makrorestrikční profilování pomocí pulsní elektroforézy (PFGE)^{79–82}, *flaA* typizace⁸⁰, náhodná amplifikace polymorfni DNA (RAPD)^{83,84} a ribotypizace^{81,85}. Sekvenování genomu *C. jejuni* usnadňuje zavádění technologie mikročipů, která je založena na umístění vysokého počtu specifických sond DNA na velmi malé ploše, což umožňuje testovat velký počet vzorků s minimální spotřebou výchozího materiálu a reagensií^{86,87}.

6.4. Ostatní metody

Byla popsána řada specifických bakteriofágů a jejich využití pro detailní charakterizaci kmenů *C. jejuni* a *C. coli*^{88–90}. Kombinace metod serotypizace a fagotypizace byla použita ve Velké Británii při charakterizaci 2407 kmenů *C. jejuni* a 182 kmenů *C. coli*⁹¹. Wareing a spol.⁹² použili serotypizaci podle Pennera, fagotypizaci za použití 16 lytických bakteriofágů a biotypizaci ke studiu fenotypové diversity 831 kmenů kampylobakterií získaných ze sporadických infekcí v různých geografických oblastech Velké Británie. Izoláty *C. jejuni* byly rozděleny do 40 fagotypových skupin, přičemž 16 skupin se vyskytovalo s frekvencí větší než 1 %. Celkem 17,9 % izolátů nebylo typovatelných. Nejfrekventovanější fagotypy (PG52, PG121 a PG55) byly přiřazeny k nejčastěji se vyskytujícímu sérotypu O:1, O:2 a O:4.

Méně běžnými metodami identifikace a charakterizace kampylobakterií je analýza profilů buněčných mastných kyselin^{93–96}, studium proteinových profilů lysovaných buněk^{97,98}, popř. měření molekulové hmotnosti druhově specifických proteinových biomarkerů hmotnostní spektrometrií MALDI-TOF^{99,100}.

Tato práce byla podpořena z prostředků Výzkumných záměrů MŠMT MSM 6046137305.

LITERATURA

1. Bryan F. L., Doyle M. P.: J. Food Protect. 58, 326 (1995).
2. Jimenez A., Velázquez J. B., Rodríguez J., Chomón B., Villa T. G.: J. Infect. 29, 305 (1994).
3. Anonym: EFSA J. 130, 353 (2007).
4. Sebald M., Véron M.: Ann. Inst. Pasteur (Paris) 105, 897 (1963).
5. Véron M., Chatelain R.: Int. J. Syst. Bacteriol. 23, 122 (1973).
6. Vandamme P., De Ley J.: Int. J. Syst. Bacteriol. 41, 451 (1991).
7. Amano K., Shibata Y.: Microbiol. Immunol. 36, 961 (1992).
8. Karmali M. A., Fleming P. C.: J. Pediatr. 94, 527 (1979).
9. Chan Skirrow M. B., Blaser M. J.: v knize: *Campylobacter* (Nachamkin I., Blaser M. J., ed.), 2. vyd., str. 69. ASM Press, Washington DC 2000.
10. Pacha R. E., Clark G. W., Williams E. A., Carter A. M.: Can. J. Microbiol. 34, 80 (1988).
11. Atabay H. I., Corry J. E. L.: J. Appl. Microbiol. 83, 619 (1997).
12. Atabay H. I., Corry J. E. L.: J. Appl. Microbiol. 84, 733 (1998).
13. Aydin F., Atabay H. I., Akan M.: J. Appl. Microbiol. 90, 637 (2001).
14. Jacobs-Reitsma W., v knize: *Campylobacter* (Nachamkin I., Blaser M. J., ed.), 2. vyd., str. 467. ASM Press, Washington DC 2000.
15. Logue C. M., Sherwood J. S., Elijah L. M., Olah P. A., Dockter M. R.: J. Appl. Microbiol. 95, 234 (2003).
16. Nesbakken T., Eckner K., Høidal H. K., Røtterud O.-J.: Int. J. Food Microbiol. 80, 231 (2003).
17. De Boer E., Hahne M.: J. Food Protect. 53, 1067 (1990).
18. Svedhem A., Norkrans G.: Lancet I, 713 (1980).
19. Blaser M. J., Waldman R. J., Barrett T., Erlandson A. L.: J. Pediatr. 98, 254 (1981).
20. Dekeyser P., Gossuins-Detrain M., Butzler J. P., Sternon J.: J. Infect. Dis. 125, 390 (1972).
21. Steele T. W., McDermott S. N.: Pathology 16, 263 (1984).
22. Gebhart C. J., Ward G. E., Chang K., Kurtz H. J.: Am. J. Vet. Res. 44, 361 (1983).
23. Goosens H., Vlaes L., Galand I., Van den Borre C., Butzler J.-P.: J. Clin. Microbiol. 27, 1077 (1989).
24. Skirrow M. B.: Brit. Med. J. 2, 9 (1977).
25. Bolton F. J., Robertson L.: J. Clin. Pathol. 35, 462 (1982).
26. Bolton F. J., Hutchinson D. N., Coates D.: J. Clin. Microbiol. 19, 169 (1984).
27. Karmali M. A., Simor A. E., Roscoe M., Fleming P. C., Smith S. S., Lane J.: J. Clin. Microbiol. 23, 456 (1986).
28. Griffith B. M., Park R. W. A.: J. Appl. Bacteriol. 69, 281 (1990).

29. Aspinall S. T., Wareing D. R. A., Hayward P. G., Hutchinson D. N.: J. Clin. Pathol. 46, 829 (1993).
30. Tran T. T.: Lett. Appl. Microbiol. 26, 145 (1998).
31. Hodinka R. L., Gilligan P. H.: J. Clin. Microbiol. 26, 47 (1988).
32. Nachamkin I., Barbagallo S.: J. Clin. Microbiol. 28, 817 (1990).
33. Sutcliffe E. M., Jones D. M., Pearson A. D.: Lett. Appl. Microbiol. 12, 72 (1991).
34. Hazeleger W. C., Beumer R. R., Rombouts F. M.: Lett. Appl. Microbiol. 14, 181 (1992).
35. Taylor D. E., Chang N.: Mol. Cell. Probes 1, 261 (1987).
36. Lu P., Brooks B. W., Robertson R. H., Nielsen K. H., Garcia M. M.: Int. J. Food Microbiol. 37, 87 (1997).
37. Brooks B. W., Robertson R. H., Lutze-Wallace C. L., Pfahler W.: Vet. Microbiol. 87, 37 (2002).
38. Hochel I., Viochna D., Škvor J., Musil M.: Folia Microbiol. 49, 579 (2004).
39. Hochel I., Slavičková D., Viochna D., Škvor J., Steinhauserová I.: Food Agric. Immunol. 18, 151 (2007).
40. Horák D., Hochel I.: e-Polymers no. 061, (2005). <http://www.e-polymers.org>
41. Hoorfar J., Nielsen E. M., Stryhn H., Andersen S.: J. Microbiol. Methods 38, 101 (1999).
42. Bailey J. S., Fedorka-Cray P., Richardson L. J., Cox N. A., Cox J. M.: J. Rapid Meth. Autom. Microbiol. 16, 374 (2008).
43. Dediste A., Vandenberg O., Vlaes L., Ebraert A., Douat N., Bahwere P., Butzler J.-P.: Clin. Microbiol. Infect. 9, 1085 (2003).
44. Wei D., Oyarzabal O. A., Huang T.-S., Balasubramanian S., Sista S., Simonian A. L.: J. Microbiol. Methods 69, 78 (2007).
45. Yu L. S. L., Uknalis J., Tu S.-I.: J. Immunol. Methods 1-2, 11 (2001).
46. Docherty L., Adams M. R., Patel P., McFadden J.: Lett. Appl. Microbiol. 22, 288 (1996).
47. Bang D. D., Wedderkopp A., Pedersen K., Madsen M.: Mol. Cell. Probes 16, 359 (2002).
48. Inglis G. D., Kalischuk L. D.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 3435 (2003).
49. Birkenhead D., Hawkey P. M., Heritage J., Gascoyne-Binzi D. M., Kite P.: Lett. Appl. Microbiol. 17, 235 (1993).
50. Lior H.: J. Clin. Microbiol. 20, 636 (1984).
51. Vandamme P., Dewhirst F. E., Paster B. J., On S. L. W., v knize: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Garrity G. M., Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T., ed.), 2. vyd., Vol. 2, The Proteobacteria, Part C The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria, str. 1147. Springer, New York 2005.
52. Morris G. K., El Sheerbeny M. R., Patton C. M., Kodaka H., Lombard G. L., Edmonds P., Hollis D. G., Brenner D. J.: J. Clin. Microbiol. 22, 714 (1985).
53. Skirrow M. B., Benjamin J.: J. Clin. Pathol. 33, 1122 (1980).
54. Perez-Perez G. I., Blaser M. J., Bryner J. H.: Infect. Immun. 51, 209 (1986).
55. On S. L. W., Holmes B.: J. Clin. Microbiol. 29, 923 (1991).
56. On S. L. W., Holmes B.: J. Clin. Microbiol. 29, 1785 (1991).
57. On S. L. W., Holmes B.: J. Clin. Microbiol. 30, 746 (1992).
58. Totten P. A., Patton C. M., Tenover F. C., Barrett T. J., Stamm W. E., Steigerwalt A. G., Lin J. Y., Holmes K. K., Brenner D. J.: J. Clin. Microbiol. 25, 1747 (1987).
59. Bolton F. J., Holt A. V., Hutchinson D. N.: J. Clin. Pathol. 37, 677 (1984).
60. Barrett T. J., Patton C. M., Morris G. K.: Lab. Med. 19, 96 (1988).
61. Penner J. L., Hennessy J. N.: J. Clin. Microbiol. 12, 732 (1980).
62. Karlyshev A. V., Linton D., Gregson N. A., Lastovica A., Wren B. W.: Mol. Microbiol. 35, 529. (2000).
63. Chart H., Frost J. A., Oza A. N., Thwaites R. T., Gillanders S. A., Rowe B.: J. Appl. Bacteriol. 81, 635 (1996).
64. Fricker C. R., Alemohammed M. M., Park R. W. A.: Can. J. Microbiol. 33, 33 (1987).
65. Jones D. M., Sutcliffe E. M., Abbott J. D.: Eur. J. Clin. Microbiol. 4, 562 (1985).
66. Frost J. A., Oza A. N., Thwaites R. T., Rowe B.: J. Clin. Microbiol. 36, 335 (1998).
67. Lior H., Woodward D. L., Edgar J. A., Gill P.: J. Clin. Microbiol. 15, 761 (1982).
68. Kahlich R., Aldová E., Paleček A., Šourek J.: Syst. Appl. Microbiol. 6, 82 (1985).
69. Kahlich R., Aldová E., Kušák I., Hausner O., Roch P., Potužník V., Radovnický V.: Syst. Appl. Microbiol. 12, 306 (1989).
70. Harmon K. M., Ransom G. M., Wesley I. V.: Mol. Cell. Probes 11, 195 (1997).
71. Persson S., Olsen K. E. P.: J. Med. Microbiol. 54, 1043 (2005).
72. Nayak R., Stewart T., Nawaz M. S.: Mol. Cell. Probes 19, 197 (2005).
73. Yamazaki-Matsune, Taguchi M., Seto K., Kawahara R., Kawatsu K., Kumeda Y., Kitazato M., Nukina M., Misawa N., Tsukamoto T.: J. Med. Microbiol. 56, 1467 (2007).
74. Inglis G. D., Kalischuk L. D.: Appl. Environ. Microbiol. 70, 2296 (2004).
75. Dionisi A. M., Luzzi I., Carattoli A.: Mol. Cell. Probes 18, 255 (2004).
76. Hong Y., Berrang M. E., Liu T., Hofacre C. L., Sanchez S., Wang L., Maurer J. J.: Appl. Environ. Microbiol. 69, 3492 (2003).
77. Studer E., Lüthy J., Hübner P.: Res. Microbiol. 150, 213 (1995).
78. Vacher S., Ménard A., Bernard E., Mégraud F.: Antimicrob. Agents Chemother. 47, 1125 (2003).
79. Broman T., Waldenstöm J., Dahlgren D., Carlsson I.,

- Eliasson I., Olsen B.: *J. Appl. Microbiol.* 96, 834 (2004).
80. Lorenz E., Lastovica A., Owen R. J.: *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 179 (1998).
81. Gibson J. R., Fitzgerald C., Owen R. J.: *Epidemiol. Infect.* 115, 215 (1995).
82. Salama S. M., Tabor H., Richter M., Taylor D. E.: *J. Clin. Microbiol.* 30, 1982 (1992).
83. Hernandez J., Fayos A., Ferrus M. A., Owen R. J.: *Res. Microbiol.* 146, 685 (1995).
84. Madden R. H., Moran L., Scates P.: *Lett. Appl. Microbiol.* 23, 167 (1996).
85. Fayos A., Owen R. J., Desai M., Hernandez J.: *FEMS Microbiol. Lett.* 95, 87 (1992).
86. Keramas G., Bang D. D., Lund M., Madsen M., Rasmussen S. E., Bunkenborg H., Telleman P., Christensen C. B. V.: *Mol. Cell. Probes* 17, 187 (2003).
87. Keramas G., Bang D. D., Lund M., Madsen M., Bunkenborg H., Telleman P., Christensen C. B. V.: *J. Clin. Microbiol.* 42, 3985 (2004).
88. Grajewski B. A., Kusek J. W., Gelfand H. M.: *J. Clin. Microbiol.* 22, 13 (1985).
89. Salama S. M., Bolton F. J., Hutchinson D. N.: *Epidemiol. Infect.* 104, 405 (1990).
90. Khakira R., Lior H.: *Epidemiol. Infect.* 108, 403 (1992).
91. Frost J. A., Kramer J. M., Gillanders S. A.: *Epidemiol. Infect.* 123, 47 (1999).
92. Wareing D. R. A., Bolton F. J., Fox A. J., Wright P. A., Greenway D. L. A.: *J. Appl. Microbiol.* 92, 502 (2002).
93. Curtis M. A.: *Med. Lab. Sci.* 40, 333 (1983).
94. Lambert M. A., Patton C. M., Barrett T. J., Moss C. W.: *J. Clin. Microbiol.* 25, 706 (1987).
95. Coloe P. J., Slattery J. F., Cavanaugh P., Vaughan J.: *J. Hyg.* 96, 225 (1986).
96. Goodwin C. S., McConnell W., McCulloh R. K., McCullough C., Hill R., Bronsdon M. A., Kasper G.: *J. Clin. Microbiol.* 27, 938 (1989).
97. Vandamme P., Dewettinck D., Kersters K.: *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 402 (1992).
98. Diker K. S., Esendal O. M., Akan M.: *J. Vet. Med., Ser. B* 47, 739 (2000).
99. Winkler M. A., Uher J., Cepa S.: *Anal. Chem.* 16, 3416 (1999).
100. Mandrell Robert E., Harden Leslie A., Bates Anna, Miller William G., Haddon William F., Fagerquist Clifton K.: *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6292 (2005).

I. Hochel (*Department of Biochemistry and Microbiology, Institute of Chemical Technology, Prague, Czech Republic*): **Methods of Detection and Characterization of *Campylobacter* sp.**

Campylobacters are ubiquitous microorganisms responsible for infections in humans and animals. The enteritis caused by these bacteria is characterized by diarrhoea, fever and abdominal pain. Although it is usually a self-limiting disease that does not require antimicrobial therapy, the infection can lead, though rarely, to serious sequelae such as reactive arthritis and the Guillain-Barré syndrome. The pathogens are frequently found in the environment and in many foods of both animal and plant origin. This review is focused on recent methods used for isolation, identification and characterization of clinically important *Campylobacter* species.

Chemické listy

Vážení autoři,

vzhledem ke zvyšujícím se nákladům a v souvislosti se snahou udržet dosavadní kvalitu časopisu se vedení Chemických listů a České společnosti chemické rozhodlo upravit částku za poděkování grantovým agenturám v uveřejněných člancích na 1500 Kč za každý uvedený grant. Opatření platí od 1. 1. 2010. Věříme, že toto opatření přijmete s pochopením.

redakce časopisu