

KLINICKÁ MIKROBIOLOGIE A INFEKČNÍ LÉKAŘSTVÍ

Interdisciplinární časopis vydávaný pod záštitou
Společnosti infekčního lékařství, Společnosti pro lékařskou mikrobiologii
a Společnosti pro epidemiologii a mikrobiologii České lékařské společnosti Jana Evangelisty Purkyně

REDAKČNÍ RADA

Šéfredaktor

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci

Zástupci šéfredaktora

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Klinika infekčních nemocí LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
Státní veterinární ústav, Olomouc

Redakční rada

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Infekční klinika 3. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Centrum očkování a cestovní medicíny, Hradec Králové
Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Ústav klinické mikrobiologie LF UK a FN Hradec Králové
Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Odd. klinické mikrobiologie Thomayerova nemocnice, Praha
MUDr. Pavel Dlouhý
Infekční oddělení a AIDS centrum,
Krajská zdravotní, a. s., Ústí nad Labem
Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Ústav mikrobiologie FNOL a LF UP v Olomouci
Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Klinika infekčních chorob, LF MU a FN Brno
RNDr. Dittmar Chmelář, Ph.D.
NRL pro anaerobní bakterie, LF Ostravské Univerzity
Doc. RNDr. Jarmila Jelínková, CSc.
Institut postgraduálního vzdělávání ve zdravotnictví, Praha
Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Ústav imunologie a mikrobiologie, 1. LF UK v Praze
Prof. MUDr. Daniela Kotulová, Ph.D.
Čestná členka Slovenskej spoločnosti klinickej
mikrobiologie, SLS
MUDr. Pavla Křížová, CSc.
Státní zdravotní ústav, Praha
MUDr. Roman Kula, CSc.
Anesteziologicko-resuscitační klinika, FN Ostrava
Ing. Mgr. Tomáš Látal
TRIOS, spol. s r. o., Praha
Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D.
Státní zdravotní ústav, Praha
MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK a FN Motol, Praha
MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Infekční klinika 1. LF UK, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Klinika infekčního lékařství, FN Ostrava
MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Odd. lék. mikrobiol. a imunol. Oblast. nemocnice Trutnov
Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.
Klinika pre infekčné choroby, LF UPJŠ, Košice
Doc. MUDr. Anna Součková, CSc.
Ústav lék. mikrobiologie 2. LF UK Praha
Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Infekční klinika 1. LF, Nemocnice Na Bulovce, Praha
Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Ústav farmakologie, FN a LF UP v Olomouci
Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc.
Mikrobiologický ústav LF MU a FN u sv. Anny v Brně
MUDr. Eva Zampachová
Centrální laboratoře, laboratoř virologie, Nemocnice
České Budějovice, a. s.

OBSAH

ÚVODNÍK

J. Bardoň

35

PŮVODNÍ PRÁCE

Psi jako možný zdroj kamylobakterových infekcí člověka

*I. Kolářková, M. Dušková, H. Vojtkovská,
J. Bardoň, V. Pudová, R. Karpíšková*

36

Výskyt a vlastnosti kmenů MRSA izolovaných u prasat na farmách, na jatkách a ve vepřovém mase v tržní síti ČR

R. Karpíšková, K. Koukalová, I. Kolářková

41

Identifikace bakteriálních původců zoonóz metodou MALDI TOF MS

J. Bardoň, N. Štromerová

46

PŘEHLEDOVÝ ČLÁNEK

In vazivní infekce vyvolané *Pasteurella multocida*: popis dvou případů a přehled literatury

D. Smíšková, O. Džupová

51

Na bovinní tuberkulózu není ještě možné zapomenout ani v České republice

I. Pavlík

56



VYDAVATEL

a adresa redakce:

TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouňlova 142, 149 00 Praha 4-Chodov
Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563
redakce@trios.cz, http://kmil.trios.cz
Redakce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.
Mgr. Hedvíka Nevečeřalová

Inzerce: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Sazba: SILVA, s. r. o., Táborská 31, Praha 4
Tisk: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.
Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

Časopis je indexován a excerptován v databázích Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica Database a Scopus.

Všechny příspěvky kromě zpráv a dopisů redakci procházejí nezávislou recenzí.

Vychází 4x ročně, roční předplatné 540,- Kč.

Povoleno Ministerstvem kultury ČR pod č. MK ČR 7352.

ISSN 1211-264X

Podávání novinových zásilek povolila Česká pošta, s. p., odštěpný závod Praha, čj. nov. 5449/95 ze dne 7. 12. 1995. Vydavatel nese odpovědnost za údaje a názory autorů jednotlivých článků nebo inzerce. Současně si vyhrazuje právo na drobné stylistické úpravy článků. Žádná část tohoto časopisu nesmí být bez předchozího písemného souhlasu vlastníka autorských práv kopírována a rozmnožována za účelem dalšího rozšiřování v jakékoliv formě či jakýmkoliv způsobem (ať mechanickým, nebo elektronickým – včetně pořizování fotokopii, nahrávek či informačních databází).



CLINICAL MICROBIOLOGY AND INFECTIOUS DISEASES

Interdisciplinary journal published under the auspices
of the Societies for Clinical Microbiology, for Epidemiology and Microbiology and for Infectious Diseases,
Members of the Czech Medical Association of Jan Evangelista Purkyně

EDITORIAL BOARD

Editor in Chief

Prof. MUDr. Milan Kolář, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Editors

Doc. MUDr. Stanislav Plíšek, Ph.D.
Department of Infectious Diseases, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MUDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
State Veterinary Institute, Olomouc

Prof. MUDr. Jiří Beneš, CSc.
Dept. Infect. Dis. 3rd Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Prof. MUDr. Jiří Beran, CSc.
Vaccination Centre and Travel Medicine, Hradec Králové

Doc. RNDr. Vladimír Buchta, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Univ. Hospital Hradec
Králové and Fac. of Medicine Hradec Králové, Charles Univ.

Doc. MUDr. Pavel Čermák, CSc.
Dept. of Clinical Microbiology, Thomayer Univ. Hospital,
Prague

MUDr. Pavel Dlouhý
Department of Infectious Diseases and AIDS Centre,
Masaryk Hospital in Ústí nad Labem

Doc. MUDr. Petr Hamal, Ph.D.
Department of Microbiology, Faculty of Medicine
and Dentistry, Palacký University in Olomouc

Prof. MUDr. Petr Husa, CSc.
Department of Infectious Diseases, Faculty of Medicine,
Masaryk University and University Hospital in Brno

RNDr. Dittmar Chmelař, Ph.D.
Dpt. of Biomedical Sciences, University
of Ostrava's Faculty of Medicine

Doc. RNDr. Jarmila Jelínková, CSc.
Institute for Postgraduate Medical Education, Prague

Prof. RNDr. Libuše Kolářová, CSc.
Inst. of Immunol. and Microbiol., 1st Fac. of Med., Charles
Univ. in Prague and General Univ. Hosp. in Prague

Prof. MUDr. Daniela Kotulová, PhD.
Honorary member of Slovak Society of Clinical Microbiology

MUDr. Pavla Křížová, CSc.
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Roman Kula, CSc.
Dept. of Anaesthesiology and Resuscit., Univ. Hosp. Ostrava

Ing. Mgr. Tomáš Látal
Trios, spol. s r. o., Prague

Doc. RNDr. Alexandr Nemeč, Ph.D.
National Institute of Public Health, Prague

MUDr. Otakar Nyč, Ph.D.
Inst. Med. Microbiol. Charles Univ. 2nd Med. Fac. Prague

MUDr. Hanuš Rozsypal, CSc.
Dept. of Infect. Dis, 1st Med. Faculty, Charles Univ. Prague

Doc. MUDr. Luděk Rožnovský, CSc.
Dept. Infectious Diseases, University Hospital Ostrava

MUDr. Josef Scharfen, CSc.
Dept. Med. Microbiol. Immunol. Regional Hospital Trutnov

Prof. MUDr. Ivan Schréter, CSc.
Clinic of Infectious Diseases, Medical faculty, Košice

Doc. MUDr. Anna Součková, CSc.
Dept. Med. Microbiol. Charles Univ. 2nd Med. Fac., Prague

Doc. MUDr. Marie Staňková, CSc.
Dept. Infect. Dis, 1st Med. Faculty, Charles Univ., Prague

Doc. MUDr. Karel Urbánek, Ph.D.
Dept. of Pharmacology, Univ. Hospital Olomouc and Faculty
of Medicine and Dentistry, Palacký Univ. Olomouc

Prof. MUDr. Miroslav Votava, CSc.
Microbiol. Dept., Masaryk Univ. and St. Anna's Hosp. Brno

MUDr. Eva Žampachová
Central Laboratories, The Laboratory of Virology,
Hospital České Budějovice



spol. s r. o.

PUBLISHER

and Editorial Office:

Redakce TRIOS, spol. s r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov

Tel.: +420 267 912 030, Fax: +420 267 915 563

redakce@trios.cz, http://knil.trios.cz

Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

Mgr. Hedvika Nevečfalová

Advertising: Mgr. Sabina Janovicová, DiS.

DTP: SILVA, s. r. o., Tábořská 31, Praha 4

Printed by: GRAFOTECHNA Plus, s. r. o.

Lýskova 1594/33, 155 00 Praha 13-Stodůlky

CONTENTS

EDITORIAL

J. Bardoň

35

ORIGINAL ARTICLE

Dogs as a possible source of human *Campylobacter* infections

*I. Koláčková, M. Dušková, H. Vojtkovská,
J. Bardoň, V. Pudová, R. Karpíšková*

36

Prevalence and characteristics of MRSA strains isolated from pigs on farms, at slaughterhouses and in pork meat at retail sale in the Czech Republic

R. Karpíšková, K. Koukalová, I. Koláčková

41

Identifikation of zoonotic bacterial pathogens by the MALDI TOF MS method

J. Bardoň, N. Štromerová

46

REVIEWS

Invasive *Pasteurella multocida* infections: Two clinical cases and literature review

D. Smíšková, O. Džupová

51

Bovine tuberculosis still not to be forgotten even in the Czech Republic

I. Pavlík

56

This journal is Indexed in Medline/Index Medicus, Embase/Excerpta Medica
Database and Scopus.

A peer – reviewed journal

4 issues per volume.

ISSN 1211-264X

Copyright © Trios Ltd. All rights reserved.

The views expressed in this journal are not necessarily those of the Editor or Editorial Board.

Úvodník

Vážené kolegyně, vážení kolegové,

píší úvodník druhého čísla našeho časopisu KMIL v době horkých dnů, kdy teploty atakují 30 °C ve stínu. Teplé letní dny se kromě příjemných chvil u vody či na horách vyznačují také vyšším výskytem některých bakteriálních zoonóz. Chladírenský řetězec potravin se v tropických dnech hůře udržuje a řada lidí tráví dovolené v cizině, mnohdy exotické. Klasickou alimentární zoonózou, jejíž výskyt vrcholí v letních měsících, je např. kamylobakteriíza. O problematice kontaminace potravinového řetězce člověka termotolerantními kamylobakteriemi bylo na stránkách KMIL pojednáno už několikrát. V tomto čísle, které je již tradičně věnováno zoonózám, přinášíme trochu jiný pohled na epidemiologii této nákazy. Jedná se o možnosti získat tuto infekci od domácích zvířat, zejména mladých psů. Další původní práce tohoto čísla už spadá do oblasti alimentárních zoonóz. Věnuje se výskytu a vlastnostem MRSA ve vepřovém mase. Důležitou součástí práce mikrobiologů je rychlá a přesná diagnostika patogenních bakterií ve vyšetřovaném materiálu. Velký pokrok v jejich identifikaci znamenal zavedení metody MALDI – TOF MS do rutinní praxe laboratoří. Třetí původní práce v tomto čísle hodnotí možnosti této metody pro rychlou identifikaci vybraných původců bakteriálních zoonóz. Kategorii kazuistik reprezentuje prá-

ce pražských kolegyně věnovaná invazivním infekcím vyvolaným *Pasteurella multocida*. V rámci přehledových prací pak nabízíme čtenářům pohled na bovinní tuberkulózu v Evropě. Věřím, že si v obsahu každý najde článek, který ho zaujme.

Čtenáře, kteří se chystají na Slovensko, bych chtěl informovat, že v červenci byl ve Spišské Staré Vsi hlášen další pozitivní případ vztekliny u lišky, která napadla hlídacého psa. Nákaza se šíří ze sousedního Polska, kde se ji nedaří eliminovat, a jsou zde registrovány pozitivní případy i u domácích zvířat. Je však otázkou, je-li KMIL věnovaný zoonózám vhodné čtivo na dovolenou. Vzpomínám, jak jsem si před třemi lety vzal na Lago di Garda sborník prací pojednávající o leptospirách v italských jezerech a z koupání jsem pak neměl ten pravý požitek.

Přeji Vám hodně zdraví a krásné léto, s přátelským pozdravem,

doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
zástupce šéfredaktora

Psi jako možný zdroj kampylobakterových infekcí člověka

I. KOLÁČKOVÁ¹, M. DUŠKOVÁ^{1,2}, H. VOJKOVSKÁ¹, J. BARDOŇ^{3,4},
V. PUDOVÁ⁴, R. KARPÍŠKOVÁ^{1,2}

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, ²Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno,
³Státní veterinární ústav, Olomouc, ⁴Ústav mikrobiologie Lékařské fakulty, Univerzita Palackého v Olomouci

SOUHRN

Koláčková I., Dušková M., Vojkovská H., Bardoň J., Pudová V., Karpíšková R.: **Psi jako možný zdroj kampylobakterových infekcí člověka**

Cíl práce: Cílem studie bylo získat aktuální informace o prevalenci a druhovém zastoupení bakterií rodu *Campylobacter* u psů na Moravě a zhodnotit rizikové faktory ovlivňující jejich výskyt s ohledem na možný přenos do humánní populace.

Materiál a metody: Od května 2013 do prosince 2014 byly vyšetřovány rektální výtěry psů získané v rámci rutinní praxe veterinárních lékařů z Jihomoravského a Olomouckého kraje. Základní vyšetření bylo provedeno v laboratoři Státního veterinárního ústavu Olomouc a Veterinární a farmaceutické univerzity Brno. K průkazu bakterií rodu *Campylobacter* byla využita kultivace na půdě mCCDA (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem). Suspektní kolonie byly potvrzeny metodou MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex, Bruker) nebo pomocí specifické PCR umožňující odlišení druhů *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* a *C. upsaliensis*. Podrobnější anamnestické údaje o vyšetřených zvířatech byly čerpány z dotazníků vyplněných chovatelem.

Výsledky: Z celkem 258 vyšetřených rektálních výtěrů bylo potvrzeno 41 pozitivních vzorků (16 %). Z hlediska druhového zastoupení byl nejčastěji detekován *C. jejuni*, následně *C. upsaliensis* a *C. coli*. Druh *C. lari* byl zjištěn pouze jedenkrát. Po vyhodnocení informací z dotazníků bylo zjištěno, že četnost výskytu bakterií rodu *Campylobacter* i jejich druhové zastoupení se liší v závislosti na věku zvířat, složení krmné dávky a klinických příznacích onemocnění zvířete.

Závěr: Za rizikovou skupinu z hlediska možného přenosu kampylobakterových infekcí z domácích zvířat na člověka je možno považovat psy mladších věkových kategorií s průjemem, krmené doma připraveným krmivem. V domácnostech s malými dětmi, které v ČR i v zemích EU představují nejvíce postiženou věkovou skupinu, by proto měl být v případech chovu psů a zejména štěnat kladen vysoký důraz na dodržování základních hygienických pravidel.

Klíčová slova: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, pes, zoonózy

SUMMARY

Koláčková I., Dušková M., Vojkovská H., Bardoň J., Pudová V., Karpíšková R.: **Dogs as a possible source of human *Campylobacter* infections**

Objectives: The aims of this study were to obtain current information on the prevalence and species representation of bacteria of the genus *Campylobacter* in dogs in Moravia and to evaluate the risk factors affecting their occurrence with respect to possible transmission to the human population.

Material and Methods: Rectal swabs of dogs obtained in the routine practice of veterinarians in the South Moravian and Olomouc regions were examined from May 2013 to December 2014. The basic tests were performed in laboratories of the State Veterinary Institute in Olomouc and the University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences Brno. To detect *Campylobacter* spp., the samples were cultured on mCCDA (modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar). Suspected colonies were confirmed by MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex, Bruker) or using specific PCR which allows to distinguish between the species *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* and *C. upsaliensis*. A detailed history was obtained from questionnaires completed by the dog owners.

Results: From a total of 258 rectal swabs examined, 41 samples were positive (16%). The most frequently detected species was *C. jejuni*, followed by *C. upsaliensis* a *C. coli*. There was only one sample of *C. lari*. The evaluation of the questionnaire data showed that the frequency of *Campylobacter* spp. and their species representation depended on the age of the animals, the composition of feed and the clinical signs of the disease.

Conclusion: Young dogs on a homemade diet and with diarrhea may be considered a risk group in terms of possible transmission of *Campylobacter* infections from pets to humans. Households with young children are the most affected group in the Czech Republic and EU countries. As such, they should be given a high priority with respect to the basic hygiene rules if they breed dogs, especially puppies.

Keywords: *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari*, dog, zoonoses

Klin mikrobiol inf lék 2015;21(2):36–40

Adresa: MVDr. Ivana Koláčková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 70, Brno 621 00, e-mail: kolackova@vri.cz

Došlo do redakce: 15. 5. 2015
Přijato k tisku: 1. 7. 2015

Úvod

Kampylobakterióza je celosvětově nejčastěji hlášeným bakteriálním onemocněním gastrointestinálního traktu v lidské populaci. V Evropě byla zaznamenána v roce 2013 průměrná nemocnost 64,8 případů na 100 000 obyvatel, v USA je každý rok diagnostikováno průměrně 14 případů kampylobakterióz na 100 000 obyvatel [1,2]. Česká republika se vzhledem k aktivnímu systému surveillance, podobně jako v případě salmonelóz, řadí mezi země s nejvyšším hlášeným výskytem těchto infekcí [2].

Onemocnění člověka je způsobeno zejména termotolerantními zástupci rodu *Campylobacter*, jejichž zdrojem je gastrointestinální trakt domácích i volně žijících ptáků a savců. Infekční dávka je poměrně nízká (řádově stovky buněk) s inkubační dobou od dvou do pěti dnů. K nejčastějším projevům onemocnění patří průjem s příměsí hlenu, popř. krve, který může být doprovázen bolestmi břicha, hlavy a horečkou. V závažných případech může následně dojít k rozvoji syndromu Guillaina-Barrého. K nejvíce ohroženým skupinám obyvatelstva patří děti, imunokompromitovaní pacienti nebo senioři [3,4].

Jako nejvýznamnější zdroj kampylobakterů pro člověka je uváděna jatečně opracovaná drůbež a její nedostatečná tepelná úprava nebo nesprávná manipulace při kuchyňském zpracování. Četné studie [5–8] srovnávající subtypy kampylobakterů izolované z drůbeže a lidské populace ukazují vysokou klonální diverzitu v obou skupinách. To je způsobeno zejména vysokou vnitrodruhovou heterogenitou kampylobakterů. Na druhé straně to ale vede k úvahám o dalších možných zdrojích této infekce, např. kontaminované vody v přírodních nádržích a kontaktu s domácími zvířaty, zejména pak se psy [2,9].

Informace o ekologii kampylobakterů u domácích mazlíčků jsou omezené. Byly publikovány studie popisující prevalenci kampylobakterů u psů, a to jak klinicky zdravých, tak s průjmovým onemocněním. Také detekované druhy kampylobakterů se v různých publikacích liší. Kromě druhů *C. upsaliensis*, *C. jejuni* a *C. coli*, které jsou považovány u psů za dominantní, byly izolovány také druhy vzácnější (*C. concisus*, *C. fetus*, *C. gracilis*, *C. helveticus*, *C. hyointestinalis*, *C. lari*, *C. mucosalis*, *C. showae* a *C. sputorum*) [3,10].

Cílem naší studie bylo získat aktuální informace o prevalenci a druhovém zastoupení bakterií rodu *Campylobacter* u psů chovaných jako zájmová zvířata na Moravě. Vyhodnocení dotazníků vyplněných chovateli dále umožnilo sledovat faktory spojené s výskytem této bakterie u vyšetřovaných zvířat a nastínit tak kategorie psů, které představují zvýšené riziko z hlediska možného přenosu infekce na člověka.

Materiál a metody

Původ a odběr vzorků

Do studie bylo zařazeno 258 rektálních výtěrů psů, které byly získány v rámci rutinní praxe spolupracujících veterinárních lékařů z Jihomoravského a Olomouckého kraje. Základní vyšetření bylo provedeno v laboratoři Státního veterinárního ústavu Olomouc (Národní referenční laboratoř pro kampylobaktery) a Veterinární a farmaceutické univer-

zity Brno. Odběry vzorků byly prováděny od května 2013 do prosince 2014. Jednalo se o vzorky pocházející od zvířat s průjmovým onemocněním nejasné etiologie.

Bakteriologické vyšetření

Vzhledem k cíli studie byla mikrobiologická analýza zaměřena pouze na průkaz bakterií rodu *Campylobacter*. Vlastní zpracování vzorku probíhalo následovně: nejprve byl proveden přímý nátěr rektálního výtěru tampónem na selektivní půdu mCCDA (modifikovaný deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem, Oxoid, UK; Trios CZ) a současně byl vzorek homogenizován v pomnožovacím médiu (bujón podle Boltona s přísadkou krve, Oxoid, UK; Trios CZ). Bujón byl inkubován po dobu 18–24 hodin mikroaerofilně při teplotě 41,5–42 °C a následně vyočkován opět na agarové médium mCCDA. Inkubace probíhala opět při teplotě 41,5–42 °C po dobu 44 h ± 4 h v mikroaerofilní atmosféře (Campygen, Oxoid, UK). Suspektní kolonie byly pro potvrzení inokulovány na krevní agar podle Muellera a Hintona (Labmediaservis, CZ), který byl inkubován za obdobných podmínek jako médium mCCDA.

Druhová identifikace izolátů

Identifikace suspektních kolonií probíhala metodou MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex, Bruker) nebo pomocí druhově specifické PCR umožňující odlišení druhů *C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis* a *C. lari* [11–14]. Kontrola kvality byla ověřována referenčním kmenem *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

Dotazník

Majitelé zvířat, jejichž vzorky byly doručeny k vyšetření, byli požádáni o vyplnění dotazníku. Ten zahrnoval informace o věku zvířete, způsobu chovu (doma, venku), podávaném krmivu (komerční granulace, doma připravené krmivo), anamnéze, včetně případné předchozí terapie, aktuálním zdravotním stavem zvířete a informace o výskytu průjmových onemocnění u dalších zvířat chovaných v domácnosti nebo u rodinných příslušníků chovatele.

Statistická analýza

K vyhodnocení byl použit statistický program GraphPad Prism 5.04 (GraphPad, Inc., San Diego, USA).

Výsledky

Z celkem 258 odebraných vzorků bylo potvrzeno 41 pozitivních nálezů bakterií rodu *Campylobacter* (16 %). Z hlediska druhového zastoupení byl nejčastěji detekován *C. jejuni* (23; 56,1 %) a následně *C. upsaliensis* (12; 29,3 %) a *C. coli* (5; 12,2 %). Druh *C. lari* byl zjištěn pouze jedenkrát. Vyhodnocení nálezů ve vztahu k věku, typu krmení a zdravotnímu stavu zvířat bylo prováděno na základě informací z dotazníku.

Analýza dat z dotazníků

V rámci souboru 65 vzorků, k nimž chovatelé poskytli detailnější údaje o stáří zvířete nebo způsobu jeho chovu, byly bakterie rodu *Campylobacter* detekovány celkem čtrnáctkrát (21,5 %). Druhová identifikace potvrdila nálezy

C. upsaliensis v 7 případech (50 %), pětkrát *C. jejuni* (35,7 %) a dvakrát *C. coli* (14,2 %). Druh *C. lari* v tomto souboru zjištěn nebyl.

Vliv věku zvířete

Na základě dodaných informací byl soubor rozdělen podle věkových skupin na zvířata do jednoho roku věku a psy starší. Přehled pozitivních nálezů včetně druhového zastoupení izolovaných kampylobakterů uvádí *graf 1*. Byl zjištěn statisticky vysoce významný rozdíl ($P < 0,01$) mezi prevalencí pozitivních záchytů u zvířat mladších (41,7 %) oproti starší věkové kategorii, ve které byly bakterie rodu *Campylobacter* detekovány jen u 9,7 % psů. Statistická analýza pozitivních nálezů ve sledovaných skupinách (Fisher's exact test) prokázala, že šance (odds ratio) výskytu kampylobakterů ve skupině mladších zvířat je 6,6krát vyšší než u zvířat starších.

V závislosti na věku se liší i druhové zastoupení kampylobakterů. U zvířat starších jednoho roku převažoval druh *C. upsaliensis*. *C. jejuni* nebyl detekován v žádném případě starších jedinců, převažoval ovšem u zvířat mladších. Shodně po jednom případě byl v obou věkových skupinách detekován druh *C. coli*.

Vliv typu krmení

Srovnatelný počet majitelů psů uvedl jako typ podávaného krmiva granule (54 %) a krmivo doma připravené (46 %). Bakterie rodu *Campylobacter* byly detekovány častěji u zvířat krmených doma připravenou směsí (32 %), zatímco u zvířat krmených granulemi byl výskyt pozitivních nálezů detekován méně často (14,7 %). Rozdíl v prevalenci pozitivních vzorků ale nebyl statisticky významný ($P > 0,05$).

Rozdíly byly zjištěny i v počtu detekovaných druhů a jejich zastoupení. U zvířat krmených granulemi byly nalezeny pouze dva druhy (*C. jejuni* a *C. upsaliensis*), s výraznou převahou druhu *C. upsaliensis* (80 %). U zvířat krmených doma připravenou směsí byl prokázán i *C. coli*, ale nejčastější nálezy byly konfirmovány jako druh *C. jejuni* (44,4 %). Podrobné výsledky jsou uvedeny v *tabulce 1*.

Analýza podle typu klinických příznaků onemocnění

V *tabulce 2* jsou shrnuty výsledky dotazníkového šetření zaměřeného na klinické příznaky onemocnění vyšetřených psů. Sledován byl výskyt průjmu bez příměsí krve a s její příměsí, případně zvracení a chronické průjmové problémy přetrvávající několik týdnů. Z tabulky jsou patrné rozdíly mezi sledovanými skupinami. Nejvyšší prevalence bakterií rodu *Campylobacter* byla zjištěna u skupiny zvířat s chronickými střevními problémy a s nejčastěji detekovaným druhem *C. upsaliensis* (63 %). Průjem s příměsí krve byl zaznamenán jen u zvířat s pozitivním nálezem *C. jejuni*. Analýza těchto výsledků (chí-kvadrát test) prokázala statistickou významnost prevalence positivity u zvířat s dlouhodobými gastrointestinálními problémy ($P < 0,05$).

Vliv dalších faktorů

Průjmové onemocnění u rodinných příslušníků nahlásil pouze jeden majitel (kampylobakterióza u dcery), ale u sledovaného psa s klinickými příznaky gastrointestinálního onemocnění se následně výskyt kampylobakterů nepotvrdil.

U žádného ze zvířat chovaných výhradně ve venkovním výběhu (18 %) nebyl výskyt kampylobakterů prokázán.

Celkem 12 chovatelů uvedlo, že zvířata v předchozím období prodělala antibiotickou terapii. V této skupině byl

Tabulka 1
Pozitivní nálezy a druhy kampylobakterů v rektálních výtěrech psů v závislosti na typu podávaného krmiva

Typ podávaného krmiva	Počet odebraných výtěrů	Počet pozitivních výtěrů	Detekovaný druh rodu <i>Campylobacter</i>		
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. upsaliensis</i>
granule	33	5 (14,7 %)	1 (20,0 %)	0	4 (80,0 %)
doma připravené	28	9 (32,0 %)	4 (44,4 %)	2 (22,2 %)	3 (33,3 %)
neuvedeno	4	0	0	0	0

Tabulka 2
Pozitivní nálezy kampylobakterů včetně jednotlivých druhů v závislosti na klinických příznacích onemocnění

Klinické příznaky	Počet odebraných výtěrů	Počet pozitivních výtěrů	Detekovaný druh rodu <i>Campylobacter</i>		
			<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. upsaliensis</i>
průjem s krví	12	3 (25,0 %)	3	0	0
průjem a zvracení	33	3 (9,1 %)	1	0	2
chronický průjem	20	8 (40,0 %)	1	2	5

v jednom případě prokázán *C. coli*. Jednalo se o čtyřměsíční štěně s prolapsem rekta a paralelní parazitární infekcí.

Diskuze

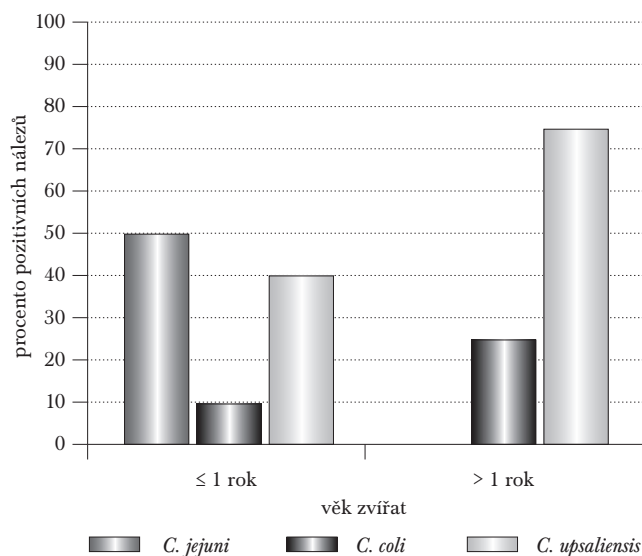
Na možnost přenosu kampylobakterií ze psů na jejich chovatele upozornili ve své práci např. Holmberg a kol. (2015), kteří vyšetřili 180 psů a v 67 případech izolovali bakterie rodu *Campylobacter* [15]. Nejčastěji byl izolován *C. upsaliensis*. U sedmi izolátů *C. jejuni* provedli autoři této studie jejich subtypizaci metodou MLST (multilocus sequence typing) a zjistili, že všechny detekované sekvenční typy náležejí k typům běžně nacházeným i u člověka. Whiley a kol. (2013) se domnívají, že chov psů a koček v domácnosti zvyšuje dvojnásobně riziko onemocnění členů domácnosti kampylobakterií [16]. Chaban a kol. (2010) uvádí, že stolice nemocných zvířat obsahuje 10^3 až 10^8 bakterií na 1 gram.

Navzdory důležitému faktu, že zvířata jsou rizikem pro vznik zoonotických onemocnění člověka, bylo zjištěno, že praktičtí humánní lékaři neberou na zřetel roli zvířat při přenosu tohoto onemocnění na lidi a tento problém považují za ryze veterinární. Nicméně většina pacientů se nedívá na veterinárního lékaře jako na zdroj informací týkajících se lidského zdraví a neuvažují o možném riziku onemocnění spojeném s vlastnictvím domácího zvířete [17–19]. Pro zlepšení situace, zejména pro lepší posouzení a zvládnutí rizik přenosu onemocnění mezi lidmi a zvířaty, je potřeba více komunikace a užší spolupráce mezi humánními a veterinárními lékaři. Tato otázka je obzvláště důležitá u osob s chronickými poruchami imunitního systému, které chovají zvířata jako své společníky a mají s nimi velmi blízký fyzický i emocionální kontakt [17,19]. Význam užší komunikace a spolupráce mezi veterinárními a humánními lékaři zdůrazňují také Wong a kol. (1999). Domácí mazlíčci (pets) sice představují významný prvek v psychosomatickém rozvoji dětí i v životě starých a nemocných osob, na druhé straně však představují zvýšené riziko vzniku infekce. Zmíněný autor akcentuje kredo: „*Healthy pets, healthy people*“.

Průjmová onemocnění domácích mazlíčků bývají častým důvodem návštěvy veterinárního lékaře. Obecně lze tato onemocnění rozdělit na neinfekční – dietetické chyby – a infekční způsobené virovými, parazitárními a/nebo bakteriálními agens. Z bakteriálních původců se na vzniku onemocnění mohou podílet bakterie rodu *Salmonella*, enteroinvazivní *Escherichia coli* (původce granulomatozní kolitidy), *Clostridium difficile*, *C. perfringens*, ale také *Campylobacter* spp. [21].

Schopnost kampylobakterů vyvolávat průjmové onemocnění u masožravých zvířat (včetně psů) není zcela jednoznačně prokázána. Experimentálně bylo zjištěno, že *C. jejuni* je schopen vyvolat onemocnění pouze u štěňat do 6 měsíců věku, ale totéž nebylo potvrzeno např. u koťat nebo starších zvířat. Pokud se klinické onemocnění podařilo u psů vyvolat, mělo podobu lehkých vodnatých průjmů, výjimečně s příměsí krve nebo doprovázené horečkou [22–24]. Častější nálezy kampylobakterů u mláďat jsou vysvětlovány nedostatečně vyvinutou intestinální mikroflórou nebo imunitou [25,26]. V literatuře jsou také uváděny nálezy kampylobakterů jako ko-infekce virových onemocnění,

Graf 1
Druhové zastoupení kampylobakterů v závislosti na věku zvířat



např. parvovirozy, která se projevuje zejména hemoragicko-nekrotickou enteritidou štěňat ve věku 6–18 týdnů [27].

Četnost výskytu kampylobakterů u psů se v různých studiích liší, jsou uváděny prevalence v rozmezí 0 až 97 % v závislosti na zdravotním stavu vyšetřovaných zvířat, způsobu odběru vzorků a použité metodě detekce etiologického agens [3,9,10,25,28]. Výsledky naší práce ukazují ve sledované skupině nižší prevalenci kampylobakterů (16 %) ve srovnání s citovanými autory.

Tato studie byla zaměřena na detekci termotolerantních kampylobakterů. Již dříve bylo popsáno, že existují druhy citlivé k přísadkům antibiotik obsažených v běžně používaných kultivačních půdách [29,30], takže již vlastní kultivace může docházet k selekci určitých druhů, zejména těch, které do skupiny termotolerantních nepatří.

Při detailnější analýze vzorků, ke kterým byly k dispozici informace z dotazníku chovatele, bylo podobně jako v jiných studiích [3,10] potvrzeno, že výskyt kampylobakterů je vyšší u zvířat mladších a u těch, která jsou krmena doma připraveným krmivem. Z dalších faktorů, které se v jiných studiích jeví jako související s výskytem kampylobakterů u domácích mazlíčků, to byl zejména přístup a koupání v přírodních vodních zdrojích [25].

Z hlediska druhového zastoupení je u psů popsán výskyt celé škály různých druhů kampylobakterů. Variabilita zastupců je ovlivněna zdravotním stavem zvířete, ale nepochybně závisí i na použité detekční metodě (kultivačním médiu). V případě použití kultivačně nezávislých metod (např. kvantitativní PCR přímo ze vzorku feces) bylo detekováno až 14 různých druhů kampylobakterů [9]. Ve většině předchozích studií zabývajících se prevalencí kampylobakterů u psů byl nejčastěji detekovaným druhem *C. upsaliensis* bez ohledu na to, zda sledovaná zvířata trpěla průjmem či nikoliv. Jeho prevalence činila od 5,9 až do 85 % [9,10]. Naše výsledky ukazují 28% prevalenci pozitiv-

ních izolátů náležejících k tomuto druhu. Analýza výskytu podle věku psů uvedeného v dotazníku ukázala, že jeho nálezy převažovaly u psů starších jednoho roku, ale také u zvířat, která trpěla chronickými průjmy nebo byla krmena granulami. Vzhledem k tomu, že *C. upsaliensis* bývá často detekován i u klinicky zdravých zvířat, jsou psi obecně považováni za jeho rezervoár [31]. Tento druh se však na vzniku onemocnění člověka příliš nepodílí. EFSA (2015) uvádí prevalenci humánních onemocnění vyvolaných tímto druhem pouze 0,08 % [2]. V České republice bylo v roce 2014 hlášeno 7 případů (0,03 %) kampylobakterií způsobených tímto druhem. V roce 2015 pak byl popsán případ pacienta s melénou, u kterého byl *C. upsaliensis* diagnostikován v hemokultuře, ovšem kontakt se psy nebyl prokázán [30]. Ve studii autorů Parsons a kol. (2012) byla provedena i genotypová analýza metodou MLST se zaměřením na sledování podobnosti izolátů *C. upsaliensis* humánního a zvířecího původu. Byla zjištěna nejen velká klonální diverzita obou souborů, ale také nízká shoda mezi testovanými skupinami (pouze 1 klon byl detekován současně v humánním souboru i u psů).

V humánní populaci jsou jako nejčastější původci kampylobakterií uváděny druhy *C. jejuni* a *C. coli* [2,9]. V naší práci byl *C. jejuni* celkově nejčastěji detekovaným druhem. Stejně jako v podobných studiích v zahraničí [3,25,33] bylo potvrzeno, že se *C. jejuni* ve vyšší míře vyskytuje u psů mladších jednoho roku a u zvířat krmených doma připravovanou stravou nebo se závažnější formou průjmu.

Závěr

Kontakt s domácími zvířaty, zejména se psy, je považován za možné riziko pro přenos kampylobakterových infekcí na člověka. Podle poznatků vyplývajících z naší studie představují hlavní riziko pro člověka psi mladších věkových kategorií s průjmem, krmení domácí stravou. V rodinách s malými dětmi, které v ČR i v zemích EU představují nejvíce postiženou věkovou skupinu, by proto měl být v případě chovu psů, zejména štěňat, kladen vysoký důraz na dodržování základních hygienických pravidel. Malé děti mohou být vystavovány vyšším dávkám kampylobakterů v důsledku nižšího hygienického standardu a bližšího fyzického kontaktu se zvířaty v domácnostech.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory grantu IGA MZ ČR č. NT/14392 a projektu LO1218 v rámci programu NPU I MŠMT.

Autoři velmi děkují RNDr. Vladimíru Babákovi za provedení statistických analýz.

Literatura

- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Surveillance for Foodborne Disease Outbreaks, United States, 2012, Annual Report. Atlanta, Georgia: US Department of Health and Human Services, CDC, 2014.
- Centers for Disease Control and Prevention and European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*. 2015;13:3991.
- Carbonero A, Torralba A, Borge C, García-Bocanegra, I, Arenas A, Perea A. *Campylobacter* spp., *C. jejuni* and *C. upsaliensis* infection-associated factors in

healthy and ill dogs from clinics in Cordoba, Spain. Screening tests for antimicrobial susceptibility. *Comp Immunol Microb*. 2012;35:505–512.

- Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:555–567.
- Lyhs U, Katzav M, Isohanni P, Heiska H, Maijala R. The temporal, PFGE and resistance pattern associations suggest that poultry products are only a minor source of human infections in Western Finland. *Food Microbiol*. 2010;27:311–315.
- Djordjevic SP, Unicomb LE, Adamson PJ, et al. Clonal complexes of *Campylobacter jejuni* identified by multilocus sequence typing are reliably predicted by restriction fragment length polymorphism analyses of the *flaA* gene. *J Clin Micro*. 2007;45:102–108.
- Wassenaar TM, Newell DG. Genotyping of *Campylobacter* spp. *App Env Microb*. 2000;66:1–9.
- Gormley FJ, MacRae M, Forbes KJ, et al. Has retail chicken played a role in the decline of human campylobacteriosis? *App Env Microb*. 2008;74:383–390.
- Chaban B, Ngeleka M, Hill JE. Detection and quantification of 14 *Campylobacter* species in pet dogs reveals an increase in species richness in feces of diarrheic animals. *BMC Microbiol*. 2010;10:73–79.
- Amar C, Kittl S, Spreng D, Thomann A, Korczak BM, Burnens AP, Kuhnert P. Genotypes and antibiotic resistance of canine *Campylobacter jejuni* isolates. *Vet Microbiol*. 2014;168:124–130.
- Linton D, Lawson AJ, Owen RJ, Stanley J. PCR detection, identification to species level, and fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* direct from diarrheic samples. *J Clin Microb*. 1997;35:2568–2572.
- Winters DK, O'Leary AE, Slavik MF. Polymerase chain reaction for rapid detection of *Campylobacter jejuni* in artificially contaminated foods. *Lett Appl Microbiol*. 1998;27:163–167.
- Yamazaki-Matsune W, Taguchi M, Seto K, Kawahara R, Kawatsu K, et al. Development of a multiplex PCR assay for identification of *Campylobacter coli*, *Campylobacter fetus*, *Campylobacter hyointestinalis* subsp. *hyointestinalis*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari* and *Campylobacter upsaliensis*. *J Med Microb*. 2007;56:1467–1473.
- Wang G, Clark CG, Taylor TM, Pucknell CH, Barton C, et al. Colony multiplex PCR assay for identification and differentiation of *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, and *C. fetus* subsp. *fetus*. *J Clin Microb*. 2002;40:4744–4747.
- Holmberg M, Rosendal T, Engvall EO, Ohlson A, Lindberg A. Prevalence of thermophilic *Campylobacter* species in Swedish dogs and characterization of *C. jejuni* isolates. *Acta Vet Scand*. 2015;57:19.
- Whiley H, van den Akker B, Giglio S, Bentham R. The role of environmental reservoirs in human campylobacteriosis. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Nov;10(11):5886–5907.
- Grant S, Olsen CW. Preventing zoonotic diseases in immunocompromised persons: The role of physicians and veterinarians. *Emerg Infect Dis*. 1999;5:159–163.
- Kahn LH. Confronting zoonoses, linking human and veterinary medicine. *Emerg Infect Dis*. 2006;12:556–561.
- Kahn LH. Managing zoonotic disease risk: Need for greater physician and veterinarian collaboration. *Journal of Chinese Clinical Medicine*. 2007;2:105–109.
- Wong SK, Feinstein LH, Heidmann P. Healthy pets, healthy people. *J Am Vet Med Assoc*. 1999;215:335–338.
- Marks SL, Rankin SC, Byrne BA, Weese JS. Enteropathogenic bacteria in dogs and cats: Diagnosis, epidemiology, treatment and control. *J Vet Intern Med*. 2011; 25:1195–1208.
- Macartney L, Al-Mashat RR, Taylor DJ, et al. Experimental infection of dogs with *Campylobacter jejuni*. *Vet Rec*. 1988;122:245–249.
- Olson P, Sandstedt K. *Campylobacter* in the dog: A clinical and experimental study. *Vet Rec*. 1987;12:99–101.
- Brown C, Martin V, Chitwood S. An outbreak of enterocolitis due to *Campylobacter* spp. in a Beagle colony. *J Vet Diagn Invest*. 1999;11:374–376.
- Procter TD, Pearl DL, Finley RL, Leonard EK, Janecko N, et al. A cross-sectional study examining *Campylobacter* and other zoonotic enteric pathogens in dogs that frequent dog parks in three cities in south-western Ontario and risk factors for shedding of *Campylobacter* spp. *Zoonoses Public Health*. 2014;61:208–218.
- Wieland B, Regula G, Danuser J, Wittwer M, Burnens AP, et al. *Campylobacter* spp. in dogs and cats in Switzerland: Risk factor analysis and molecular characterization with AFLP. *J Vet Med*. 2005;52:183–189.
- Workman SN, Mathison GE, Lavoie MC. Pet dogs and chicken meat as reservoirs of *Campylobacter* spp. in Barbados. *J Clin Microbiol*. 2005;43(6):2642–2650.
- Cinquelpalmi V, Monno R, Fumarola L, Ventrella G, Calia C, et al. Environmental contamination by dog's faeces: A public health problem? *Int. J. Environ. Res. Public Health*. 2013;10:72–84.
- Silva J, Leite D, Fernandes M, Mena C, Gibbs PA, Teixeira P. *Campylobacter* spp. As a foodborne pathogen: A review. *Front Microbiol*. 2011;2:1–12.
- Ježek P, Marejková M, Barďoň J, Koukolová K, Lébr J. *Campylobacter upsaliensis* a kazuistika pacienta s melénou. *Zprávy CEM*. 2015;24:18–21.
- On SLW. Isolation, identification and subtyping of *Campylobacter*: Where to from here? *J Microb Met*. 2013;95:3–7.
- Parsons BN, Portera CJ, Staviskya JH, Williams NJ, Birtles RJ, et al. Multilocus sequence typing of human and canine *C. upsaliensis* isolates. *Vet Microb*. 2012; 157:391–397.
- Hald D, Pederson K, Wainø M, Jørgensen JC, Madsen M. Longitudinal study of the excretion patterns of thermophilic *Campylobacter* spp. in young pet dogs in Denmark. *J Clin Microb*. 2004;42:2003–2012.

Výskyt a vlastnosti kmenů MRSA izolovaných u prasat na farmách, na jatkách a ve vepřovém mase v tržní síti ČR

R. KARPÍŠKOVÁ¹, K. KOUKALOVÁ^{1,2}, I. KOLÁČKOVÁ¹

¹Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Brno, ²Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

SOUHRN

Karpíšková R., Koukalová K., Koláčková I.: **Výskyt a vlastnosti kmenů MRSA izolovaných u prasat na farmách, na jatkách a ve vepřovém mase v tržní síti ČR**

Cíl práce: Detekovat a charakterizovat kmeny meticilin-rezistentních bakterií *Staphylococcus aureus* (MRSA) v chovech prasat, na porážce a ve vzorcích masa v tržní síti.

Materiál a metody: Celkem bylo v letech 2013–2015 vyšetřeno 890 vzorků, z prvovýroby (prasat na farmách) pocházelo 59 vzorků, ze zpracovatelských podniků (jatek) pocházelo 463 stěrů a z tržní sítě bylo odebráno 368 vzorků vepřového masa a jater. K detekci MRSA byla použita kultivační metoda. Po homogenizaci vzorků bylo provedeno neselektivní pomnožení v pufrované peptonové vodě při 37 °C po dobu 18–24 hodin a dále bylo provedeno dvoustupňové selektivní pomnožení. Pět mililitrů PPV bylo přeneseno do média Mueller-Hinton s 6,5% přidavkem NaCl a po inkubaci, která probíhala ve všech krocích při 37 °C po dobu 18–24 hodin, byl 1 ml inokulován do trypton-sojového bujónu s cefoxitinem a aztreonamem. Další den pak byla suspenze vyočkována na Baird-Parker a Brilliance™ MRSA 2 agary. Suspektní kolonie byly potvrzovány metodou PCR, byl detekován fragment SA442 specifický pro kmeny druhu *S. aureus*, *mecA* gen kódující rezistenci k meticilinu a bylo provedeno potvrzení příslušnosti izolátu ke klonálnímu komplexu CC398. Dále byla stanovena rezistence k panelu 11 antimikrobiálních látek za použití diskové difuzní metody.

Výsledky: V rámci studie bylo získáno 51 kmenů MRSA, 15 pocházelo od živých prasat, 31 izolátů z jatek a 5 bylo detekováno ve vzorcích z tržní sítě. Ke klonálnímu komplexu CC398 náleželo 47 (92,2 %) kmenů MRSA. Čtyři izoláty non-CC398 byly získány z prostředí dvou porážek a pocházely od zvířat ze tří různých farem. Izoláty často vykazovaly vícečetnou rezistenci. U izolátů MRSA byla detekována rezistence k erytromycinu (36; 70,6 %), tetracyklinu (29; 56,9 %), fluorochinolonom (7; 13,7 %), ko-trimoxazolu (6; 11,8 %) a aminoglykosidům (4; 7,8 %).

Závěr: V potravinách živočišného původu byly detekovány izoláty MRSA náležející do klonálního komplexu CC398, jenž pochází z chovů hospodářských zvířat. Tyto kmeny jsou často charakterizovány vícečetnou rezistencí. Role potravního řetězce v šíření LA-MRSA zatím není jednoznačně objasněna.

Klíčová slova: *Staphylococcus aureus*, *meticilin*, *antimikrobika*, *potravní řetězec*

SUMMARY

Karpíšková R., Koukalová K., Koláčková I.: **Prevalence and characteristics of MRSA strains isolated from pigs on farms, at slaughterhouses and in pork meat at retail sale in the Czech Republic**

Objectives: To detect and characterize strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) on pig farms, at slaughterhouses and meat samples at retail sale.

Material and Methods: A total of 890 samples were examined in the years 2013–2015, comprising 59 samples from primary production (pig farms), 463 swabs from processing plants (slaughterhouses) and 368 samples of pork meat and liver collected at retail sale. The culture method was used for the detection of MRSA. After homogenization, the samples were enriched in buffered peptone water at 37 °C for 18–24 hours and two-stage selective enrichment was performed. Five milliliters of PPV were transferred to Mueller-Hinton medium with addition of 6.5% NaCl and after incubation at 37 °C for 18–24 hours, 1 ml was inoculated into tryptone soy broth with cefoxitin and aztreonam. The suspension was plated onto Baird-Parker and Brilliance™ MRSA 2 agar on the next day. Suspected colonies were confirmed by PCR, the specific *S. aureus* fragment SA442, the *mecA* gene encoding resistance to methicillin and relation to the clonal complex CC398 were detected. Further, resistance test to a panel of 11 antimicrobial agents using the disk diffusion method was performed.

Results: Within this study, 51 MRSA strains were obtained, of which 15 originated from live pigs, 31 isolates were from slaughterhouses and 5 were detected in retail samples. Forty-seven (92.2 %) MRSA strains belonged to the clonal complex CC398. Four non-CC398 isolates were obtained from two slaughterhouses and came from three farms. The strains often showed multiple resistance. In some MRSA isolates, resistance to erythromycin (36; 70.6 %), tetracycline (29; 56.9 %), fluoroquinolones (7; 13.7 %), co-trimoxazole (6; 11.8 %) and aminoglycosides (4; 7.8 %) was detected.

Conclusion: MRSA isolates of the clonal complex CC398 dominate in foods of animal origin. These strains originate from livestock and are often characterized by multiple resistance to antimicrobials. The role of the food chain in the spread of LA-MRSA is not yet clearly understood.

Keywords: *Staphylococcus aureus*, *methicillin*, *antimicrobials*, *food chain*

Klin mikrobiol inf lék 2015;21(2):41–45

Adresa: Doc. MVDr. Renáta Karpíšková, Ph.D., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i., Hudcova 70, 621 00 Brno, e-mail: karpiskova@vri.cz

Došlo do redakce: 18. 5. 2015

Přijato k tisku: 5. 8. 2015

Úvod

Rezistence bakterií k antimikrobiálním látkám je významným celosvětovým jevem. U stafylokoků byla již v padesátých letech minulého století popsána rezistence k penicilinu a pouze několik málo let po zahájení používání látky oxacilinu (metecilinu) byly popsány rezistentní kmeny, které byly později označeny jako MRSA (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) [1]. Tyto bakterie se následně začaly šířit po celém světě.

Na základě vlastností se kmeny MRSA dělí na nemocniční (Hospital-Acquired, HA-MRSA) a komunitní (Community-Associated, CA-MRSA). Zástupci obou skupin se od sebe odlišují zejména genetickou linií, umístěním a velikostí chromozomálních kazet (*SCCmec*) a v některých případech přítomností genu *pvl* kódujícího tvorbu Pantonova-Valentinova leukocidinu (PVL). Pro HA-MRSA je charakteristická přítomnost větších chromozomálních kazet *SCCmec* (např. typů I, II nebo III), pro CA-MRSA menších kazet *SCCmec* (např. typů IV, V, VI, VII, VIII). Všeobecně jsou kmeny CA-MRSA považovány za citlivější k antimikrobiálním látkám a jsou spojovány zejména s kožními infekcemi a infekcemi měkkých tkání. Někteří autoři popisují u skupiny CA-MRSA častější produkci PVL a exfoliativních toxinů, naopak u HA-MRSA bývá popisována četnější produkce enterotoxinů případně i toxinu syndromu toxického šoku [2–5].

V populaci zvířat byly kmeny MRSA poprvé popsány u dojnice s mastitidou, a to v roce 1972 v Belgii [6]. K masivnějšímu rozšíření kmenů MRSA zejména u potravinových

vých zvířat však došlo až po roce 2005. Tyto kmeny náleží zejména do klonálního komplexu CC398 a byly označeny jako nová skupina Livestock-Associated MRSA (LA-MRSA). Výsledky studie celogenomové sekvenace prokázaly, že tyto kmeny se vyvinuly z původně humánních metecilinsenzitivních kmenů *S. aureus* (MSSA), které se rozšířily i do chovů hospodářských zvířat, a získaly chromozomální kazety *SCCmec* IV a V, v nichž jsou mimo jiné umístěny i geny zodpovědné za rezistenci k metecilinu [7].

Tyto kmeny se rozšířily v chovech prasat, méně často i skotu, malých přežvýkavců a drůbeže. Dále se šíří nejenom mezi zvířaty v chovech, ale mohou se také přenášet na ošetřující personál [8,9]. Kmeny MRSA CC398 se vyskytují jak v humánní, tak animální populaci. Verkade a Kluytmans [10] uvádí, že se tyto dvě skupiny od sebe liší zejména přítomností imunomodulačních genů nesených na profágu Sa3, které jsou typické pro humánní kmeny a rezistencí k tetracyklinu kódovanou genem *tet(M)*, jehož přítomnost je typická zejména pro animální izoláty. Současné studie dokumentují, že LA-MRSA jsou schopné kolonizovat a případně i vyvolat invazivní onemocnění u lidí [11]. Cesty přenosu LA-MRSA CC398 ze zvířat na lidi se dějí přímým kontaktem se zvířaty, kontaminovaným životním prostředím (s intenzivní živočišnou výrobou) či manipulací se syrovým masem.

Cílem této studie bylo detekovat a charakterizovat kmeny MRSA získaných v chovech prasat, na porážce a ve vzorcích masa v tržní síti.

Tabulka 1

Přehled vyšetřených vzorků odebraných na farmách prasat a charakteristika získaných izolátů metecilin-rezistentních *S. aureus*

Farma	Počet a typ vzorků				<i>S. aureus</i>	MRSA	CC398	Profil rezistence MRSA
	Celkem	PT	NS	TR				
A	4	1	3	0	1	0	0	-
B	5	1	4	0	0	0	0	-
C	4	1	3	0	4	4	2	OX, TE, AMC, CTX
D	6	2	4	0	6	6	5	OX, TE, E, AMC, CN, CTX
E	12	2	3	7	3	0	0	-
F	5	1	4	0	0	0	0	-
G	8	1	4	3	3	1	1	OX, TE, E, AMC, CTX, CIP
H	2	0	0	2	0	0	0	-
I	5	1	4	0	4	4	4	OX, AMC, CTX
J	5	1	4	0	1	0	0	-
K	3	0	0	3	0	0	0	-
Celkem	59	11	33	15	22	15	15	-

Poznámka: PT – povrch těla, NS – nosní sliznice, TR – trus.

Tabulka 2
Přehled vyšetřených stěrů na porážce prasat a charakteristika získaných izolátů *S. aureus*

Jatka	Farma	Počet vzorků		<i>S. aureus</i>		MRSA		CC398	Profil rezistence MRSA	
		celkem	NS/JUT	celkem	NS/JUT	celkem	NS/JUT			
1	I	5	2/3	0	0	0	0	0	-	
	II	15	8/7	8	4/4	2	1/1	2	OX, TE, E, AMC, CTX	
	III	10	5/5	2	1/1	2	1/1	1	OX, TE, E, AMC, CN, CTX	
	IV		10	5/5	8	5/3	7	4/3	1	OX, TE, E, AMC, CTX
									6	OX, TE, E, AMC, CTX
	V	20	10/10	8	0/8	0	0	0	-	
	VI	20	10/10	4	0/4	1	0/1	1	OX, TE, E, AMC, CTX	
	VII	10	5/5	2	1/1	1	0/1	1	OX, TE, E	
VIII	10	5/5	5	2/3	0	0	0	-		
2	V	20	10/10	6	0/6	0	0	0	-	
5	IX	35	7/28	9	4/5	2	0/2	2	OX, TE, SXT, CTX	
	X	20	10/10	1	1/0	0	0	0	-	
	XI	20	10/10	0	0	0	0	0	-	
6	XII	44	22/22	5	3/2	3	3/0	2	OX, TE, SXT, CTX, CIP	
								1	OX, TE, CTX, CIP	
	XIII	6	3/3	1	1/0	0	0	0	-	
	XIV	6	3/3	1	1/0	1	1/0	0	OX, TE, E, AMC, CTX	
	XV	6	3/3	0	0	0	0	0	-	
	XVI	43	17/26	1	0/1	0	0	0	-	
	XVII	6	3/3	0	0	0	0	0	-	
	XVIII	3	1/2	0	0	0	0	0	-	
	XIX	4	0/4	0	0	0	0	0	-	
7	XX	20	10/10	2	0/2	0	0	0	-	
	XXI	20	10/10	0	0	0	0	0	-	
	XXII	20	10/10	13	5/8	4	4/0	4	OX, TE, E, AMC, CTX	
	XXIII	10	5/5	5	0/5	0	0	0	-	
	XXIV	10	5/5	3	3/0	0	0	0	-	
	V	10	5/5	0	0	0	0	0	-	
	VIII		45	20/25	15	5/10	8	3/5	1	OX, TE, E, SXT, CTX, CIP
									1	OX, TE, E, AMC, CTX, CIP
									1	OX, TE, E, SXT, AMC, CTX
									3	OX, TE, E, AMC, CTX
								1	OX, TE, CTX	
							1	OX, TE, E, CTX		
XXV	10	5/5	1	1/0	0	0	0	-		
XXVI	5	0/5	0	0	0	0	0	-		
Celkem		463	209/254	100	37/63	31	17/14	27	-	

Poznámka: NS – nosní sliznice, JUT – jatečně upravené tělo.

Materiál a metody

Odběry vzorků

Vzorky byly odebírány na 11 náhodně vybraných farmách prasat ve čtyřech regionech Čech a Moravy se zaměřením na získání charakteristik izolátů MRSA z prvovýroby. Pomocí vatového tamponu byl odebírán stěr z nosní sliznice (nejméně 4 vzorky na jedné farmě), pomocí houbiček (3M™ Sponge-stick, USA) byly odebírány stěry z povrchu těla, zejména v místech kožních lézí a dále směsné vzorky trusu.

Na sedmi porážkách byly sterilním tamponem odebírány stěry z nosní sliznice a houbičkou povrch jatečně upravených těl prasat po veterinární prohlídce.

V tržní síti byly odebírány vzorky baleného vepřového masa a jater a po transportu do laboratoře byl houbičkou proveden stěr z jejich povrchu. Všechny vzorky byly po odběru neprodleně dopraveny do laboratoře ke zpracování.

Zpracování vzorků a izolace bakterií *Staphylococcus aureus*

V laboratoři byly stěry vloženy do zkumavek s 10 ml pufovanou peptonovou vodou (PPV, Oxoid, UK) a zhomogenizovány na vortexu, stěrové houbičky byly umístěny do sáčků s 30 ml pufované peptonové vody a zhomogenizovány na zařízení typu Stomacher. Obdobně byly zpracovány i vzorky trusu, u kterých bylo 10 g zhomogenizováno s 90 ml pufo-

rované peptonové vody. Po inkubaci vzorků při 37 °C po dobu 18–24 hodin bylo provedeno dvoustupňové selektivní pomnožení, 5 ml pomnožené suspenze v PPV bylo přeneseno do média Mueller-Hinton (Oxoid, UK) s 6,5% přidavkem NaCl a po inkubaci, která probíhala ve všech krocích při 37 °C po dobu 18–24 hodin, byl 1 ml inokulován do trypton-sojového bujonu s cefoxitinem (5 µg/ml) a aztreonamem (7,5 µg/ml) (Labmediaservis, CZ). Další den pak byla suspenze vyočkována na Baird-Parker agar a Brilliance™ MRSA 2 agar (Oxoid, UK). Typické kolonie ze selektivních agarů byly vyočkovány na půdu s přidavkem 5 % ovčí krve (Labmediaservis, CZ) a uchovány pro následnou charakteristiku.

Identifikace suspektních bakterií *S. aureus*

Suspektní kolonie vykultivované na selektivních médiích byly konfirmovány metodou PCR, byl detekován fragment SA 442 specifický pro bakterie *S. aureus* o velikosti 108 bp [12].

Detekce genu *mecA* a příslušnosti ke klonálnímu komplexu CC398 metodou PCR

Všechny kmeny konfirmované jako *S. aureus* byly metodou PCR testovány na přítomnost genu *mecA*, kódujícího rezistenci k meticilinu [13], dále bylo provedeno potvrzení příslušnosti izolátu ke klonálnímu komplexu CC398 [14].

Stanovení rezistence k antimikrobiálním látkám

U kmenů *S. aureus* bylo provedeno stanovení rezistence k panelu 11 antimikrobiálních látek za použití diskové difuzní metody s antibiotickými disky firmy Oxoid (UK) na médiu Mueller-Hinton (Oxoid, UK). Byla sledována rezistence k panelu látek: OXA, oxacilin (1 µg); AMC, amoxicilin s kyselinou klavulanovou (20/10 µg), TET, tetracyklin (30 µg); E, erytromycin (15 µg); SXT, sulfometoxazol s trimetoprimem (25 µg); CN, gentamicin (10 µg); C, chloramfenikol (30 µg); CTX, cefotaxim (30 µg); CIP, ciprofloxacín (5 µg); RD, rifampicin (5 µg); TEC, teikoplanin (30 µg). Jako kontrola byl použit kmen *S. aureus* ATCC 25923. Výsledky byly interpretovány podle standardů CLSI [15].

Výsledky a diskuze

Na přítomnost bakterií MRSA bylo v letech 2013–2015 vyšetřeno 890 vzorků. Z prvovýroby (farmy prasat) pocházelo 59 vzorků, ze zpracovatelských podniků (7 jatek) pocházelo 463 stěrů a z tržní sítě bylo odebráno 368 vzorků vepřového masa a jater. Jednalo se o výrobky převážně čes-

kého původu, které pocházely od 23 výrobců. Pouze 16 (4,4 %) vzorků pocházelo od čtyř výrobců polského původu. Ze vzorků pocházejících od živých zvířat bylo získáno 22 (37,3 %), ze stěrů z jatek 100 (21,6 %) a ze vzorků z tržní sítě 55 (14,9 %) izolátů *S. aureus*. Celkem bylo v této studii získáno 51 kmenů MRSA, 15 (25,4 %) pocházelo od živých prasat, 31 (6,7 %) izolátů z jatek a 5 (1,4 %) bylo detekováno ve vzorcích vepřového masa a jater z tržní sítě. Bylo potvrzeno, že kmeny MRSA se v prvovýrobě prasat vyskytují, postiženy byly čtyři (36,4 %) z jedenácti náhodně vybraných farem. Nejnižší prevalence kmenů MRSA (1,4 %) byla zjištěna u vzorků masa a jater z tržní sítě, všechny kmeny byly získány z masa tuzemského původu.

Většina izolátů MRSA náležela ke klonálnímu komplexu CC398 (47; 92,2 %). Čtyři izoláty, které nenáležely k tomuto klonálnímu komplexu (non-CC398), byly získány z prostředí dvou porážek a byly izolovány od zvířat pocházejících ze tří farem. Tyto kmeny obvykle nejsou popisovány v souvislosti s chovy prasat, a je možné, že jejich zdrojem byl personál nebo skot, který je na jatcích také porážen a k přenosu může docházet i nedostatečně nebo nesprávně prováděnou sanitací. Bližší informace, které mohou naznačit možný zdroj kontaminace, budou k dispozici až po provedené *spa* typizaci, která však není součástí této studie.

Přehled izolovaných kmenů MRSA a jejich charakteristiky jsou uvedeny v tabulkách 1–3. Všechny izoláty *S. aureus*, které nesly gen *mecA*, vykazovaly diskovou metodou rezistenci k oxacilinu a často i k dalším beta-laktamovým antibiotikům. Ve sledovaném souboru nebyly detekovány kmeny, které by vykazovaly rezistenci k oxacilinu a přitom nenesly gen *mecA*. Z toho lze usuzovat, že výskyt genu *mecC*, jenž byl poprvé popsán u izolátu ze skotu, se v populaci prasat v ČR nevyskytuje a podobně jako v jiných zemích je u kmenů MRSA pocházejících od hospodářských zvířat velmi vzácný. Izoláty často vykazovaly vícečetnou rezistenci (k více než třem skupinám antimikrobiálních látek). U některých izolátů MRSA byla dále detekována i rezistence k erytromycinu (36; 70,6 %), tetracyklinu (29; 56,8 %), fluorochinolonom (7; 13,7 %), ko-trimoxazolu (6; 11,8 %) a aminoglykosidům (4; 7,8 %).

U humánních kmenů MRSA je rezistence k erytromycinu častá, podle Urbáškové a kol. [16] dosahuje téměř 94 %. Rezistence indukovaná erytromycinem činí bakterie odolné i ke klindamycinu. Testování citlivosti diskovou difuzní metodou však není dostačující. Kmeny jeví se jako senzitivní mohou vykazovat inducibilní rezistenci, která se *in vitro* projeví pouze za současné přítomnosti erytromycinu.

Tabulka 3

Přehled vyšetřených vzorků vepřového masa a jater z tržní sítě prasat a charakteristika získaných izolátů *S. aureus*

Počet vyšetřených vzorků	Počet izolátů <i>S. aureus</i>	MRSA	CC398	Profil rezistence MRSA
368	55	5	2	OX, TE, E, AMC, CN, C, CTX, CIP
			1	OX, TE, E, SXT, AMC, CTX
			1	OX, TE, AMC, CTX
			1	OX, TE, SXT, AMC, CTX

Rezistence k antibiotikům skupiny MLS_B může být způsobena různými mechanismy. Nejčastěji je řízena geny *erm* (u stafylokoků jsou to geny *ermA*, *ermB* a *ermC*). Studium tohoto typu rezistence však nebylo součástí této studie.

Často byla u MRSA kmenů získaných v této studii také zjišťována rezistence k tetracyklinu, což je v souladu i s údaji dalších autorů [10].

Výskyt kmenů MRSA klonálního komplexu CC398 je v posledních letech popisován také u lidí. Autoři Berning a kol. [17] popisují dva případy onemocnění lidí v Německu s fatálním průběhem. V prvním případě se jednalo o 79letou pacientku s destruktivní chronickou polyartritidou s imunosupresivní terapií, u které se objevila dyspnoe a bolesti v oblasti ramene a zad. V nazálních výtěrech, hemokultuře a punktátu z ramenního kloubu byla potvrzena přítomnost MRSA. Následně byla echokardiografickým vyšetřením potvrzena také endokarditida. Antibiotická léčba byla zahájena přípravky ampicilin/sulbaktam, gentamycin a klindamycin, posléze byl podáván i vankomycin. Třetí den po přijetí, po ukončeném bakteriologickém vyšetření, byl podáván daptomycin a šestý den i fosfomycin.

V druhém případě se jednalo o 46letou ženu, u které se po transplantaci plic rozvinul septický šok a pneumonie. Ze vzorku tracheálního aspirátu a stěru z perinea byla potvrzena přítomnost kmene MRSA. Pacientka byla cíleně léčena teicoplaninem, který byl posléze nahrazen linezolidem.

Izoláty MRSA obou pacientek byly podrobeny detailní charakterizaci a bylo potvrzeno, že oba patřily do klonálního komplexu CC398, jeden ke *spa* typu t011 a druhý t2576. U obou pacientek byl v anamnéze uveden kontakt s prasaty, jedna na farmě žila a jedna pocházela z rodiny chovatele prasat. Zatímco přímý přenos kmenů LA-MRSA ze zvířat na člověka byl opakovaně potvrzen, není role potravního řetězce v jejich šíření v současnosti jednoznačně objasněna, a situaci je proto nutné dále monitorovat.

Závěr

Výsledky studie ukazují, že se také v České republice kmene MRSA vyskytují v potravním řetězci člověka. Mezi izoláty MRSA dominují kmene klonálního komplexu CC398, jež jsou vázány na chovy hospodářských zvířat, ale mohou se podílet i na vzniku onemocnění lidí. Tyto kmene jsou často charakterizovány vícečetnou rezistencí.

Poděkování

Výsledky byly získány za finanční podpory projektu NA-ZV KUS QJ 1210284, NAZV KUS QJ1510216 a LO1218 v rámci programu NPU I MŠMT.

Literatura

- Barber M. Methicillin-resistant staphylococci. *Journal of Clinical Pathology*. 1961;14(4):385–393.
- Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Efernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Rreverdý ME, Etienne J. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* carrying Pantón-Valentine leukocidin genes: worldwide emergence. *Emerging Infectious Diseases*. 2003;9(8):978–984.
- Piao C, Karasawa T, Totsuka K, Uchiyama T, Kikuchi K. Prospective surveillance of community-onset and healthcare-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from a university-affiliated hospital in Japan. *Microbiology and Immunology*. 2005;49(11):959–970.
- Boyle-Vavra S, Daum R. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: the role of Pantón-Valentine leukocidin. *Laboratory Investigation*. 2007;87(1):3–9.
- Deurenberg RH, Stobbering EE. The evolution of *Staphylococcus aureus*. *Infection, Genetics and Evolution*. 2008;8(6):747–763.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C, Wulf M. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(12):1965–1966.
- Price LB, Stegger M, Hasman H, Aziz M, Larsen J, Andersen PS et al. *Staphylococcus aureus* CC398: Host Adaptation and Emergence of Methicillin Resistance in Livestock. *mBio*. 2012;3(1), e00305–11. doi:10.1128/mBio.00305-11.
- Leonard FC, Markey BK. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in animals: a review. *Veterinary Journal*. 2008;175(1):27–36.
- Wulf M, Voss A. MRSA in livestock animals – an epidemic waiting to happen? *Clinical Microbiology and Infection*. 2008;14(6):519–521.
- Verkade E, Kluytmans J. Livestock-associated *Staphylococcus aureus* CC398: Animal reservoirs and human infections. *Infection, Genetics and Evolution*. 2014;21:523–530.
- Cui S, Li J, Hu Ch, Jin S, Li F, Guo Y, Ran L, Ma Y. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2009;64(4):680–683.
- Martineau F, Picard JF, Roy HP, Ouellette M, Bergeron MG. Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 1998;36(3):618–623.
- Boşgelmez-Tmaz G, Ulusoy S, Aridoğan B, Coşkun-Ari F. Evaluation of different methods to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus aureus* and their clinical laboratory utility. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2006;25(6):410–412.
- van Wamel WJB, Hansenová Maňásková S, Verbrugh H, van Belkum A. Short term micro-evolution and PCR-detection of methicillin-resistant and susceptible *Staphylococcus aureus* sequence type 398. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2010;29(1):119–122.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. CLSI Document M100-S22. *Clinical and Laboratory Standards Institute*, USA, Pa, 2012.
- Urbášková P a Pracovní skupina pro monitorování antibiotické rezistence. Stav citlivosti klinických izolátů stafylokoků, enterokoků a pneumokoků z 16 lokalit České republiky k antibiotikům včetně linezolidu. *Remedia*. 2002;12(5):334–338.
- Berning Ch, Lanckohr Ch, Baumgartner H, Drescher M, Becker K, Peters G, Köck R, Kahl B. Fatal infections caused by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of clonal complex 398: case presentations and molecular epidemiology. *JMM Case Reports*. 2015;2(2):1–4.

Identifikace bakteriálních původců zoonóz metodou MALDI TOF MS

J. BARDOŇ^{1,2}, N. ŠTROMEROVÁ¹

¹Oddělení speciální mikrobiologie, Státní veterinární ústav, Olomouc,

²Ústav mikrobiologie, Lékařská fakulta UP v Olomouci

SOUHRN

Bardoň J., Štromerová N.: **Identifikace bakteriálních původců zoonóz metodou MALDI TOF MS**

Cíl práce: Ověřit možnosti metody MALDI TOF MS pro rychlou identifikaci vybraných původců bakteriálních zoonóz izolovaných z různých druhů materiálů v reálných podmínkách rutinního provozu laboratoře.

Material a metodika: Od srpna 2010 do dubna 2015 bylo metodou MALDI TOF MS na přístroji Microflex LT (Bruker Daltonics) provedeno celkem 4 174 identifikací vybraných původců bakteriálních zoonóz (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* a *Cronobacter sakazakii*). Bakteriální izoláty byly připraveny k testování jednoduchou přípravou vzorku pomocí zakápnutí bakteriální kultury na terčiku kovové destičky speciální matricí. Vyhodnocení výsledků proběhlo pomocí standardního protokolu programem MALDI Biotyper v provozních podmínkách.

Výsledky: U 74,8 % testovaných izolátů sledovaných bakteriálních druhů bylo dosaženo hodnoty identifikačního skóre (IS) v rozmezí 2–3, což z hlediska interpretace výsledku představuje v praxi uspokojivý výsledek. Urychlení diagnostiky bakterií *Campylobacter* spp. a *Listeria monocytogenes* testováním suspektních kultur získaných přímo ze selektivně–diagnostických půd v těchto případech snížilo identifikační skóre.

Závěr: MALDI TOF MS je vhodná a rychlá metoda k identifikaci sledovaných původců bakteriálních zoonóz.

Klíčová slova: MALDI TOF MS, bakteriální zoonózy, rychlá identifikace, selektivně–diagnostická média

SUMMARY

Bardoň J., Štromerová N.: **Identification of zoonotic bacterial pathogens by the MALDI TOF MS method**

Objective: To verify whether the MALDI TOF MS method can be used for rapid identification of selected zoonotic bacterial pathogens isolated from various types of materials in the real conditions of routine laboratory work.

Material and methods: Between August 2010 and April 2015, the Bruker's MALDI TOF MS system was used for 4,174 identifications of selected zoonotic bacterial pathogens (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* and *Cronobacter sakazakii*). The samples were prepared for the test by simply mixing a bacterial culture with a matrix on a steel target plate. The results were evaluated with a standard protocol of the system using the MALDI Biotyper software under operating conditions.

Results: In 74.8% of the tested isolates of the above bacterial species, the identification scores ranged between 2 and 3, which is satisfactory for result interpretation in routine practice. Acceleration of identification of *Campylobacter* spp. and *Listeria monocytogenes* by testing suspicious cultures obtained directly from selective–diagnostic media decreased the identification scores in these cases.

Conclusion: MALDI TOF MS is a suitable and rapid method for identification of the selected zoonotic bacterial pathogens.

Keywords: MALDI TOF MS, bacterial zoonoses, rapid identification, selective–diagnostic media

Klin mikrobiol inf lék 2015;21(2):46–50

Adresa: Doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA, Státní veterinární ústav, Olomouc, Jakoubka ze Stříbra 1, 779 00 Olomouc, e-mail: jbardon@svuol.cz

Došlo do redakce: 20. 4. 2015

Přijato k tisku: 1. 7. 2015

Úvod

Současná medicína zná více než 800 onemocnění vyskytujících se u lidí i zvířat, která jsou vzájemně přenosná. Tato onemocnění jsou označovaná jako zoonózy a představují pro zdraví člověka vážná rizika, včetně život ohrožujících infekcí. V případě nově se objevujících infekčních agens

v 75 % jedná právě o zoonózy [1]. Termín zoonózy definoval v roce 1958 Expertní výbor WHO jako „onemocnění a infekce, které se přirozeně přenáší mezi ostatními obratlovci a lidmi“. Tato definice je stále ještě platná, i když se vedou diskuze o její novelizaci [2]. Některé zoonózy, u kterých se zdálo, že jsou již eradikované, se objevily znovu.

Existuje několik faktorů, které jsou možnou příčinou vzestupu významu bakteriálních infekcí, a často souvisí s fenoménem globalizace. Epidemiologická data, vedená na národní úrovni (EPIDAT), či evropská data sumarizovaná na úrovni EFSA (European Food Safety Authority) a ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) hovoří o významu zoonóz pro lidské zdraví jasně. Např. podle Státního zdravotního ústavu bylo v roce 2014 v ČR hlášeno přes 13 tisíc případů humánní salmonelózy, téměř 21 tisíc případů kamylobakterií, 49 případů tularémie a 37 případů listerií. Skutečný počet onemocnění bude, zejména v prvních dvou případech, určitě podstatně vyšší [3]. EFSA a ECDC ve své souhrnné zprávě za rok 2013 uvádí 215 tisíc potvrzených případů kamylobakterií, 83 tisíc případů salmonelózy, 2 tisíce případů listerií (191 úmrtí), 6,5 tisíce případů yersinií, 360 případů brucelózy a 280 případů tularémie v rámci humánní populace členských států EU [4].

Bakterie *Salmonella enterica*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Yersinia pseudotuberculosis*, *Francisella tularensis*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis* a v případě novorozenců i *Cronobacter sakazakii* lze označit za patogeny mající potenciál vyvolat závažná onemocnění člověka, ať ve formě jednotlivých případů, nebo epidemií. Jedná se o původce zoonóz, kteří mají rezervoár v animální populaci, případně potravinách živočišného původu [4].

Mikrobiologická laboratoř má za úkol potvrdit, nebo vyloučit přítomnost patogenních mikroorganismů v doručeném vzorku. Může se jednat o vzorky potravin, vody a prostředí nebo klinický či sekční materiál pocházející z člověka i zvířat. Ve všech případech je zapotřebí případné patogeny identifikovat přesně a rychle. Na pozitivní nález výše uvedených bakterií v jakémkoliv vzorku ve většině případů bezprostředně navazují přijímaná opatření. Ať už se jedná o nasazení kauzální terapie pacienta, zamezení kontaktu s okolím, stažení potravin z tržní sítě, vyhlášení ohniska zoonóz s izolací zvířat, všechna opatření mají společného jmenovatele – musí být provedena rychle. Ze strany klinických pracovníků, epidemiologů, epizootologů a hygieniků je tak na mikrobiologa číhán tlak, aby konečný závěr vyšetření doručeného vzorku sdělil co nejdříve. Klasický diagnostický proces založený na přímém průkazu sledovaných agens začíná primokultivací doručeného vzorku. V případě, že není zapotřebí nejprve materiál inokulovat do tekuté pomnožovací půdy, zabere primokultivace 24 až 48 hodin, u *Brucella* spp. i déle. Na základě posouzení primokultivace mikrobiolog vysloví podezření na přítomnost sledovaného agens, které musí pomocí identifikace potvrdit, nebo vyvrátit. Pochopitelně dnes již lze v řadě případů použít i molekulárně-biologické metody, které identifikují specifickou DNA daného bakteriálního druhu přímo ve vyšetřovaném materiálu. Přesto izolace bakteriálního kmene, se kterým lze dále pracovat, je stále ještě zlatým standardem mikrobiologické diagnostiky. Je-li k dispozici čistá kultura suspektního patogena, někdy stačí dobře izolovaná kolonie, je možné provést identifikaci pomocí MALDI TOF MS.

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem (MALDI TOF MS, Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) je chemotaxonomická metoda,

u které je proces identifikace založen na analýze ribozomálních a dalších proteinů v bakteriální buňce. Ribozomální proteiny představují asi 20 % veškerých buněčných bílkovin a asi 3 % celkové hmoty bakterií. Tyto makromolekuly jsou specifické pro jednotlivé bakteriální druhy a díky tomu mohou být považovány za vhodné biomarkery. Jde o šetrnou ionizační metodu, při níž proteiny buněčných extraktů nejsou po zásahu laseru štěpeny, ale pouze ionizovány. Ozáření o vlnové délce 337 nm trvá 4 ns. Matrice zajistí kontakt analyzované molekuly s laserem tak, aby biomolekula nebyla atakována přímo a štěpena nežádoucím způsobem. Matrice také zprostředkovává přenos energie, kdy excitované molekuly matrice za vysokého tlaku ionizují molekuly analytu přenosem protonu. Ionty, které přešly do plynné fáze, postupují přes silné elektrické pole do vakuové trubice hmotnostního analyzátozu založeném na detekci doby letu částic (TOF – Time of Flight), kde se ionizované částice pohybují rychlostí odpovídající jejich hmotnosti a náboji. Přístroj měří dobu letu částice, lehčí či více nabitě ionty dorazí k detektoru dříve. Detektor je propojen s počítačem a pomocí software (SW) jsou data zpracována. Pro každý kmen je vytvořeno hmotnostní spektrum (profil) jeho proteomu. Profily proteinů jsou pro daný druh mikroorganismu vysoce charakteristické. Vlastní identifikace mikroorganismů následně spočívá ve srovnávání proteinového spektra izolátů se spektry referenčních kmenů v databázi MALDI Biotyper. Míra spolehlivosti identifikace (podobnost izolátů s referenčním kmenem v databázi) se vyjadřuje jako identifikační skóre. Pokud je skóre vyšší než hodnota 2,3 – jedná se o vysoce pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu. Skóre v rozmezí 2,3–2,0 potvrzuje vysoce pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu. Pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu mají kmeny s hodnotou skóre 2,0–1,7. Výsledky s hodnotami pod 1,7 signalizují, že kmen nebyl identifikován [5].

Materiál a metodika

Od srpna 2010 do dubna 2015 bylo na biologickém analyzátozu Microflex LT (Bruker Daltonics) metodou MALDI TOF MS v podmínkách rutinního provozu provedeno 4 174 identifikací deseti vybraných původců bakteriálních zoonóz. Spektrum identifikovaných bakterií a počet identifikovaných izolátů je uveden v tabulce 1. Testované bakteriální izoláty byly získány z různých druhů materiálů (potravin, prostředí, klinický materiál lidí a zvířat, sekční materiál zvířat). Identifikace každého izolátu probíhala v podmínkách reálné praxe s cílem maximálně urychlit získání a export výsledku zadavateli vyšetření. Proto byla identifikace v řadě případů prováděna přímo z kolonií na selektivně-diagnostických půdách. Jednalo se o *Listeria monocytogenes* – RAPID[®] *L.mono* (Biorad), *Campylobacter jejuni*, *C. coli* – CCDA (cefoperazone charcoal desoxycholate agar – Trios) a *Salmonella* spp. – COLOREX/TM/Rambach agar (Trios). Příprava kultury k identifikaci spočívala ve všech případech v jednoduché preparaci vzorku. Testovaná bakteriální kultura byla dřevěným párátkem nanášena na terčík kovové destičky a zakápnuta komerční maticí (HCCA, Bruker Daltonics). Po zaschnutí zakápnutých kultur byla provedena

identifikace na přístroji Microflex LT v automatickém režimu nastaveném výrobcem. Identifikace byla následně vyhodnocena pomocí SW přístroje s rozčleněním výsledků dle dosaženého skóre do čtyř základních kategorií [5], které jsou na obrazovce (protokolu) rozlišeny i barevně jako „zelená (2 kategorie), žlutá a červená zóna“. Vysoce pravděpodobná identifikace druhu (skóre 2,3–3,0) společně s vysoce pravděpodobnou identifikací rodu a pravděpodobnou identifikací druhu (skóre 2,0–2,29) jsou označeny jako zelená zóna. Pravděpodobná identifikace rodu (skóre 1,7–1,99) je označena jako žlutá zóna a nedostatečná identifikace (skóre 0–1,6) jako zóna červená.

Výsledky

Výsledky identifikace 4 174 izolátů sledovaných původců zoonóz získané v podmínkách reálného provozu laboratoře dokumentuje *tabulka 1*. Z tabulky vyplývá, že výsledky u 74,8 % testovaných izolátů všech sledovaných bakteriálních druhů byly identifikovány v zelené zóně, tzn. dosáhly skóre v rozmezí 2 až 3, což z hlediska interpretace výsledku představuje v praxi uspokojivý výsledek. Pouze rodová identifikace (žlutá zóna) byla dosažena v 19,4 %. V řadě případů byl tento výsledek identifikace při současném posouzení vzhledu bakteriální kultury dostačující pro nahlášení suspektního nálezu, a to zejména obligátních patogenů např. z rodů *Francisella*, *Brucella* či *Salmonella*, kde pro klinika nemá druhové určení (určení sérotypu) pro primární opatření až tak zásadní význam. Neuspokojivé výsledky identifikace (červená zóna) byly získány v 5,8 % případů. Na základě těchto výsledků nebylo možno identifikaci uza-

vřít a musela být zopakována, ať už přeočkováním kultury na krevní agar a po 24 až 48 hodinách novou identifikací MALDI TOF MS, nebo za použití jiných metod (PCR, biochemie). Na nevyhovujících výsledcích identifikace (skóre méně než 1,7) se nejvíce podílela *Listeria monocytogenes* a *Cronobacter sakazakii*. Naopak nejlepších výsledků bylo dosaženo při identifikaci salmonel, brucel, yersinií a *Francisella tularensis*.

Diskuze

Cílem této práce bylo zhodnotit potenciál metody MALDI TOF MS v podmínkách reálné rutinní praxe laboratoře, která je orientovaná na rychlé získání výsledku a operativní informací zadavatele vyšetření. Do hodnoceného souboru bylo zařazeno 10 druhů bakteriálních původců zoonóz, kteří byli izolováni z doručených vzorků. Je zřejmé, že vzájemné porovnávání výsledků identifikací jednotlivých druhů v souborech s tisíci, stovkami nebo jednotlivými vzorky není zcela statisticky průkazné. Na druhé straně vzhledem k příznivé nakažové situaci např. u brucelózy a tularémie na území ČR jsou terénní izoláty některých původců v laboratořích ČR vzácné. Navíc většina tuzemských laboratoří disponujících MALDI TOF MS systémem s jejich identifikací nemá zkušenosti vůbec žádné. Pokud laboratoř na svém analyzátoru nemá dostupnou speciální databázi obsahující diagnostická spektra agens zneužitelných pro biologické zbraně („vojenská“ databáze), nejsou tyto druhy schopni identifikovat vůbec. To bylo také důvodem, proč jsme nepočtený soubor těchto bakterií do hodnocení nakonec zahrnuli. Pokládali jsme za užitečné ověřit, že i obligátní pato-

Tabulka 1
Počet a výsledky identifikací podle dosaženého skóre

Sledovaná bakterie	Počet identifikací	Prům. IS*	Výsledky identifikace podle IS v %			
			0–1,69	1,7–1,99	2,0–2,29	2,3–3,0
<i>Francisella tularensis</i>	4	2,32	0	25	25	50
<i>Brucella suis</i>	4	2,20	0	25	50	25
<i>Brucella melitensis</i>	15	2,20	0	13	27	60
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	27	2,26	0	4	48	48
<i>Yersinia enterocolitica</i>	82	2,23	2	2	52	44
<i>Cronobacter sakazakii</i>	198	1,98	12	34	50	4
<i>Campylobacter coli</i>	377	2,05	5	25	69	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	655	1,91	21	38	37	4
<i>Campylobacter jejuni</i>	967	2,01	14	24	55	7
<i>Salmonella enterica</i>	1 845	2,35	4	4	23	69
Celkem/průměr	4 174	2,12	5,8	19,4	43,6	31,2

*Prům. IS – průměrná identifikační skóre

geny, jako jsou *Brucella melitensis*, *Brucella suis* nebo *Francisella tularensis* lze touto technikou v praxi rychle identifikovat.

Oficiální metodika výrobce analyzátoru Microflex LT doporučuje provádět identifikace čerstvých bakteriálních kultur z krevního agaru. V případě, že je materiál v rámci primokultivace inokulován nejprve na selektivně-diagnostická média, jako je tomu např. u *Listeria monocytogenes* na RAPID[®] *L.mono*, *Campylobacter* spp. na CCDA nebo *Salmonella* spp. na COLOREX/TM/Rambach agaru, je po přeočkování na krevní agar čistá kultura k dispozici až po dalších 24 nebo 48 (*Campylobacter* spp.) hodinách. Vzhledem k nízkým nákladům na spotřební materiál pro identifikaci jsme se v rámci urychlení pokoušeli o identifikaci izolátu ihned ze selektivně-diagnostické půdy za podmínky, že na plotně byla k dispozici čistá kolonie v S nebo M fázi růstu. Tato skutečnost zřejmě negativně ovlivnila výsledky identifikací listerií a kampylobakterů. Obdobný postup byl však realizován i při identifikaci suspektních kultur salmonel přímo z COLOREX/TM/Rambach agaru, kde byly výsledky identifikací velmi dobré.

Přesto, že je metoda identifikací bakterií metodou MALDI TOF MS relativně nová, existuje dnes v odborném písemnictví už řada prací hodnotících tuto metodu pro identifikaci bakterií, plísňů, ale i virů. Faktem je, že prací, které se cíleně věnují identifikaci původců bakteriálních zoonóz, je už méně a pocházejí spíše se země, kde daná zoonóza představuje epidemiologický problém.

Seibold a kol. (2010) testovali 50 různých izolátů rodu *Francisella* metodou MALDI TOF MS s cílem posoudit schopnost této metody identifikovat jednotlivé druhy a rozlišovat mezi poddruhy. Jako referenční druhy byly použity kmeny *Francisella philomiragia*, *Francisella tularensis* subsp. *tularensis*, *Francisella tularensis* subsp. *holarctica*, *Francisella tularensis* subsp. *mediasiatica* a *Francisella tularensis* subsp. *novicida*. Jako konfirmační metoda pro identifikaci kmenů z rodu *Francisella* bylo použito sekvenování genu 23S rRNA. Všechny kmeny byly správně identifikovány oběma metodami s perfektní shodou na úrovni druhu, jakož i na úrovni poddruhu. Metoda MALDI TOF MS je podle autorů vhodná k rychlé identifikaci druhů rodu *Francisella* [6]. V naší práci jsme měli možnost ověřit tuto metodu pouze na 4 terénních izolátech, přičemž ve třech případech jsme dosáhli uspokojivé druhové identifikace a v jednom případě pouze identifikace na úrovni rodu. Naše diagnóza byla následovně potvrzena metodou PCR. Proto se také domníváme, že metoda MALDI TOF MS je k diagnostice této patogenní bakterie vhodná.

Česká republika je brucelózy hospodářských zvířat prostá, ojediněle se vyskytují pozitivní nálezy *B. suis* u zajíců [7]. V případě humánní brucelózy se v ČR vyskytl např. sporadický případ importovaného onemocnění (Turecko) mladého muže, u kterého byla původcem *B. melitensis* [8]. V případě rodu *Brucella* jsme měli pro identifikaci k dispozici pouze 19 izolátů dvou druhů (*B. melitensis* – 15 a *B. suis* – 4). Ve většině případů jsme dosáhli uspokojivé druhové identifikace, žádný izolát nebyl hodnocen v kategorii nedostatečná identifikace. Lista a kol. (2011) ve své práci zhodnotili výsledky identifikace metodou MALDI TOF MS, které konfirmovali molekulárně-genetickými me-

todami u souboru 152 izolátů různých druhů brucel a dosáhli 99,3% shody [9]. Ferreira a kol. (2010) testovali identifikaci 131 klinických izolátů druhů *B. melitensis* biotyp 1, 2, 3; *B. abortus* biotyp 1, 2, 5, 9; *B. suis*, *B. canis*, *B. ceti* a *B. pinnipedialis* metodou MALDI TOF MS. Každý izolát byl identifikován v tripletu. Rodová identifikace byla vždy správná, ale v některých případech výsledek identifikací jednoho tripletu ukazoval rozdílné druhy [10].

Dalšími původci zoonóz rutinně testovanými v naší práci byla *Yersinia enterocolitica* (82 izolátů) a *Y. pseudotuberculosis* (27 izolátů). Průměrné identifikační skóre v prvním případě dosáhlo 2,23 a u *Y. pseudotuberculosis* 2,26, což v obou případech znamená vysoce pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu. Pouze ve 2 % případů testovaných izolátů *Y. enterocolitica* nebyla identifikace dostatečná (červená zóna). Identifikací yersinií se ve své práci zabývali Ayyadurai a kol. (2010). Druhové určení proběhlo bez problémů u 11 izolátů *Y. enterocolitica* s identifikačním skóre > 2. Problémy s druhovou identifikací nastaly v případě *Y. pestis*, která byla v některých případech chybně identifikována jako *Y. pseudotuberculosis* [11].

Cronobacter sakazakii je vzácným původcem závažných infekcí CNS novorozenců. V epidemiologii tohoto onemocnění sehrává významnou roli jeho velká odolnost k vysychání a schopnost tvořit biofilm. Zdrojem infekcí novorozenců bývá zejména sušená mléčná kojenecká výživa [12]. MALDI TOF MS potvrdili jako vhodnou metodu k identifikaci rodu i druhu např. Stephan a kol. (2010), kteří však doplnili komerční databázi vlastními spektry, což jim umožnilo odlišit *C. sakazakii* od dalších, klinicky méně významných druhů tohoto rodu [13]. V naší práci jsme otestovali 198 terénních izolátů *C. sakazakii* a dosáhli jsme průběrného identifikačního skóre 1,98 (pravděpodobná identifikace na úrovni rodu), 12 % izolátů nebylo identifikováno (skóre menší než 1,7) a 54 % bylo identifikováno velmi dobře i na úrovni druhu (skóre větší než 2,29).

Kampylobakteriáza je nejčastější bakteriální alimentární zoonóza v ČR i Evropě. O této nákaze již bylo pojednáno i na stránkách tohoto časopisu [14]. Druhová identifikace kampylobakterů pomocí fenotypových metod je z důvodu jejich nízké metabolické aktivity obtížná. Molekulárně-biologické metody jsou spolehlivější, avšak časově náročné. Bessède a kol. (2011) ve své studii porovnávali identifikaci 1 007 izolátů kampylobakterů pomocí tří různých metod: konvenční biochemické metody, molekulárně-biologické metody (real-time PCR a sekvenování) a MALDI TOF MS. Molekulárně-biologické metody byly považovány za zlatý standard. Metodou MALDI TOF MS bylo dosaženo 100% shody v porovnání se zlatým standardem pro všechny druhy rodu *Campylobacter*, s výjimkou *Campylobacter jejuni*, kde shoda činila 99,4 %. Na rozdíl od PCR však MALDI TOF MS nebyla schopna identifikovat směs dvou různých druhů kampylobakterů přítomných v jednom vzorku [15]. Podstatná část identifikací z našeho souboru 1 344 kampylobakterů (967 izolátů *C. jejuni* + 377 izolátů *C. coli*) byla prováděna z kolonií získaných přímo ze selektivně-diagnostické půdy CCDA, což zřejmě negativně ovlivnilo identifikační skóre kampylobakterů. To se podle druhu pohybovalo od 2,05 (*C. coli*) do 2,01 (*C. jejuni*), což znamená vysoce

pravděpodobnou identifikaci na úrovni rodu a pravděpodobnou identifikaci na úrovni druhu.

Obdobně úrovně identifikace (průměrné skóre 1,91) bylo dosaženo v naší práci u souboru 655 izolátů *Listeria monocytogenes*. Izoláty byly ve všech případech v rámci urychlení zpracovány k identifikaci přímo ze selektivně-diagnostické půdy RAPID' *L.mono*. Lepších výsledků identifikace dosáhli např. Hsueh a kol. (2014), kteří testovali 39 izolátů *Listeria monocytogenes* a správné druhové identifikace (skóre $\geq 2,0$) dosáhli v 89,7 % případů. Na rozdíl od naší práce však byly v tomto případě k identifikaci použity kolonie, které narostly na tryptózo-sójovém agaru s 5 % ovčí krve [16].

Velmi dobré výsledky jsme získali při identifikaci druhu *Salmonella enterica*, kde při vyhodnocení výsledků testování 1 845 izolátů průměrné identifikační skóre dosáhlo hodnoty 2,35 (vysoce pravděpodobná identifikace na úrovni druhu) a pouze 4 % vzorků z takto rozsáhlého souboru nebyla věrohodně identifikována. Dobrých výsledků identifikace bylo dosaženo i přesto, že část identifikací probíhala přímo z bakteriálních kultur, které narostly na selektivně-diagnostickém médiu COLOREX/TM/Rambach. SW MALDI Biotyper výsledky označil většinou jako „*Salmonella* sp.“. Jednotlivé sérotypy salmonel jsme vždy museli následně určit sklíčkovou aglutinací pomocí příslušných sér dle schématu White-Kauffmann-Le Minor. U některých izolátů salmonel SW chybně uvedl výsledek jako *Salmonella typhi*, případně *S. paratyphi*. Z našich zkušeností tedy vyplývá, že MALDI TOF MS identifikuje spolehlivě rod *Salmonella*, případně druh – *Salmonella enterica*, ale pro určení konkrétního sérovaru je vždy nutné použít klasickou serotypizaci. Dobrých výsledků při druhové identifikaci salmonel metodou MALDI TOF MS dosáhli i Dieckmann a Malorny (2011) [17].

Selektivně-diagnostické půdy, které jsou využívány k detekci původců zoonóz zejména v potravinách, ovlivňují kvalitu identifikace. Oficiální pracovní protokol přístroje Microflex LT proto ukládá provádět identifikace až po izolaci čisté kultury na krevním agaru. Tato izolace však znamená minimálně 24 až 48hodinové zpoždění uzavření výsledku, proto je snaha se pokoušet o identifikaci přímo ze selektivně-diagnostických půd. V případě CCDA u kampylobakterů a RAPID' *L.mono* u listerií to však výrazně snižuje identifikační skóre.

Závěr

Metoda MALDI TOF MS je vhodná pro rychlou identifikaci bakteriálních původců zoonóz. V případě kampylobakterů nelze používat k identifikaci přímo kultury z půdy CCDA a u listerií kultury z RAPID' *L.mono* média. Po přeočkování na krevní agar následná identifikace dosáhla dobrých výsledků. Bylo by vhodné provést studii, která ověří úspěšnost identifikace vybraných původců bakteriálních

zoonóz přímo z různých druhů selektivně-diagnostických půd používaných pro jejich průkaz, což by přispělo k rychlejší identifikaci.

Práce byla podpořena grantem MZd IGA č. NT/14392 a Státní veterinární správou ČR.

Literatura

- Taylor LH, Latham S, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Phil Trans R Soc Lond B*. 2001;356:983–989.
- Krauss H, Weber A, Appel M. Zoonoses. 3rd ed. Washington DC. ASM Press; 2003.
- Státní zdravotní ústav. Infekce v ČR – EPIDAT. Vybrané infekční nemoci v ČR v letech 2005–2014 – absolutně. Dostupné na <http://www.szu.cz/publikace/data/vybrane-infekcni-nemoci-v-cr-v-letech-2003-2012-absolutne>.
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal*. 2015;13:3991, 162 pp. Dostupné na www.efsa.europa.eu/efsajournal.
- Bursová Š, Dušková M, Necidová L, Karpíšková R, Myšková P. Mikrobiologické laboratorní metody. Brno. Ústav hygieny a technologie mléka. Fakulta veterinární hygieny a ekologie. Veterinární a farmaceutická univerzita; 2014.
- Seibold E, Maier T, Kostrzewa M, Zeman E, Spletstößer W. Identification of *Francisella tularensis* by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry: Fast, Reliable, Robust, and Cost-Effective Differentiation on Species and Subspecies Levels. *J Clin Microbiol*. 2010;48:1061–1069.
- Bardoň J, Pijáček M, Harna J, Bzdil J, et al. *Brucella suis* – málo známé zoonotické agens. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2012;18:53–54.
- Bardoň J, Kohnová I, Prokeš Z, Skalka P, Bzdil J. Přímý průkaz původce maltské horečky – kasuistika. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2011;17:50–54.
- Lista F, Reubsaet FAG, De Santis R, et al. Reliable identification at the species level of *Brucella* isolates with MALDI-TOF-MS. *BMC Microbiol*. 2011;11:267. Published online. Dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3314589/>.
- Ferreira L, Castaño SV, Sánchez-Juanes F, et al. Identification of *Brucella* by MALDI-TOF Mass Spectrometry. Fast and Reliable Identification from Agar Plates and Blood Cultures. *PLoS One*. 2010;5(12):e14235. Published online. Dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2997794/>.
- Ayyadurai S, Flaudrops Ch, Raoult D, Drancour M. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2010;10:285. Published online. Dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2992509/>.
- Jaradat ZW, Rashdan AM, Ababneh QO, Jaradat SA, Bhunia AK. Characterization of surface proteins of *Cronobacter mytjensii* using monoclonal antibodies and MALDI-TOF Mass spectrometry. *BMC Microbiol*. 2011;11:148. Published online. Dostupné na <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3224122/>.
- Stephan R, Ziegler D, Pflüger V, Vogel G, Lehner A. Rapid genus- and species-specific identification of *Cronobacter* spp. by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2010;48:2846–2851.
- Polák P, Juránková J, Husa P. Kampylobakteriáza. *Klin Mikrobiol Inf Lék*. 2014; 20:50–54.
- Bessède E, Solecki O, Sifré E, Labadi L, Mégraud F. Identification of *Campylobacter* species and related organisms by matrix assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect*. 2011;17:1735–1739.
- Hsueh PR, Lee TF, Du SH, et al. Bruker Biotyper Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry System for Identification of *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Gordonia*, *Tsakumurella*, and *Listeria Species*. *J Clin Microbiol*. 2014;52:2371–2379.
- Dieckmann R, Malorny B. Rapid Screening of Epidemiologically Important *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Serovars by Whole-Cell Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry. *Appl Environ Microbiol*. 2011;77:4136–4146.

Invazivní infekce vyvolané *Pasteurella multocida*: popis dvou případů a přehled literatury

D. SMÍŠKOVÁ¹, O. DŽUPOVÁ²

¹I. infekční klinika, 2. LF UK v Praze,
²Klinika infekčních nemocí, 3. LF UK v Praze

SOUHRN

Smišková D., Džupová O.: **Invazivní infekce vyvolané *Pasteurella multocida*: popis dvou případů a přehled literatury**

Pasteurella multocida je běžný komenzál zažívacího a dýchacího traktu zvířat, především koček a psů. Kontaktem se zvířaty se přenáší na člověka a vyvolává nejčastěji rané infekce po pokousání. Systémové infekce jsou neobvyklé a postihují především imunokompromitované jedince. V článku jsou prezentovány dvě kazuistiky pasteurelové infekce. Raná infekce 75leté ženy po kousnutí vlastní kočkou byla provázena bakteriémií. Onemocnění mělo příznivý průběh již při léčbě klindamycinem, na který byla laboratorně prokázána rezistence. Druhým případem byla hnisavá meningitida 62leté ženy s mozkovými abscesy a přechodnou expresivní afázií. Pacientka byla v častém kontaktu s domácími zvířaty, ale nebyla jimi poraněna. K onemocnění centrálního nervového systému došlo pravděpodobně hematogenní diseminací. Nedostatečná odpověď na cefotaxim vedla ke změně nejprve na chloramfenikol a následně pro vznik anémie ke změně na kombinaci cefotaxim a ciprofloxacin. Po 6 týdnech intravenózní léčby a dalších 10 týdnech léčby perorálním ciprofloxacinem došlo k normalizaci nálezu na magnetické rezonanci a úplnému vymizení neurologického deficitu. V diskuzi jsou popsány epidemiologické, klinické a terapeutické aspekty pasteurelové infekce s literárními odkazy.

Klíčová slova: *Pasteurella multocida*, raná infekce, bakteriémie, meningitida, mozkový absces

SUMMARY

Smišková D., Džupová O.: **Invasive *Pasteurella multocida* infections: Two clinical cases and literature review**

Pasteurella multocida is a common commensal of the gastrointestinal and respiratory tracts of animals, especially cats and dogs. It is transmitted to humans through contact with animals. Bite wound infection is the most common clinical manifestation. Systemic infections are unusual and mainly affect immunocompromised individuals. The article presents two cases of *Pasteurella* infection. Wound infection in a 75-year-old female following a bite from her pet cat was associated with bacteremia. The disease course was favorable with the initial clindamycin treatment despite in vitro resistance. The other patient was a 62-year-old female diagnosed with acute bacterial meningitis with multiple brain abscesses and transient expressive aphasia. She reported frequent contacts with pets and domestic animals without a recent bite. Hematogenous dissemination of the infection was suspected. Because of poor therapeutic response, cefotaxime was switched to chloramphenicol which was later switched to a combination of cefotaxime with ciprofloxacin due to anemia. Following 6 weeks of intravenous antibiotic therapy and another 10 weeks of oral ciprofloxacin therapy, magnetic resonance imaging showed normal results and the neurological defect resolved. Epidemiological, clinical and therapeutic aspects of *Pasteurella* infection are discussed and literature is reviewed.

Keywords: *Pasteurella multocida*, wound infection, bacteremia, meningitis, brain abscess

Klin mikrobiol inf lék 2015;21(2):51–55

Adresa: MUDr. Dita Smíšková, Ph.D., 2. LF UK v Praze, I. infekční klinika a Nemocnice na Bulovce, Budínova 2, 180 01 Praha 8, e-mail: dita.smiskova@bulovka.cz

Došlo do redakce: 1. 6. 2015

Přijato k tisku: 13. 7. 2015

Úvod

Rány způsobené pokousáním psem nebo kočkou jsou obvykle kontaminovány různými bakteriemi. Tyto oportunní patogeny mohou nejen komplikovat lokální hojení, ale u pacientů s alterovanou imunitní odpovědí také vyvolat těžké invazivní infekce.

K nejvýznamnějším patří *Pasteurella multocida* – gram-negativní, fakultativně anaerobní nesporulující kokobacil. Vyskytuje se přirozeně v tlamě a faryngu zvířecích hostite-

lů, především koček (70–90 %) a psů (20–50 %), v menší míře kolonizuje i skot, koně a další domácí zvířata. Na člověka se přenáší nejčastěji kousnutím nebo olízáním porušené kůže [1].

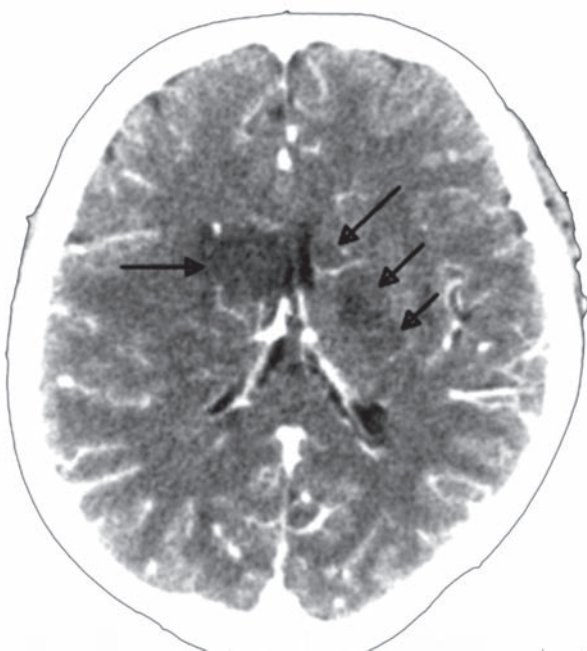
Kazuistika 1

75letá žena s arteriální hypertenzí a diabetem 2. typu byla přijata pro jeden den trvající horečku s maximem 38,5 °C,

zvracení a výraznou celkovou slabost. Objektivní interní nález byl chudý kromě erytému cca 12 × 5 cm s drobnou centrální exkoriací na zadní straně levého lýtko. Pacientka dodatečně doplnila, že dva dny před přijetím ji na lýtko pokousala její kočka. Kožní nález byl hodnocen jako erysipel, s méně typickým, lehce hemoragickým charakterem erytému. V laboratorních výsledcích byla pouze leukocytóza 16,4 × 10⁹/l s 90 % neutrofilních segmentů. C-reaktivní protein (CRP) byl 21 mg/l a prokalcitonin < 0,05 ng/ml. Na léčbě intravenózním klindamycinem 2,4 g/den došlo během tří dnů k výrazné regresí nálezu na kůži, pacientka byla od počátku hospitalizace afebrilní. V hemokultuře byla vykulitována *P. multocida* citlivá na všechna testovaná betalaktamová antibiotika, amikacin, ciprofloxacín a tetracyklin, rezistentní na klindamycin a erytromycin. Přestože u pacientky nebyly klinické ani laboratorní příznaky sepse, léčba byla 6. den změněna dle citlivosti na parenterální potencionovaný amoxicilin, 3 × 1,2 g/den. Při této terapii se 5. den na loktech a hýždích objevil mapovitý exantém, proto byla léčba dokončena perorálním doxycyklinem 200 mg/den, který pacientka užívala i po propuštění do celkové doby léčby 8 dní. Průběh hospitalizace byl komplikován dekompenzací hypertenze, nicméně 12. den byla pacientka v dobrém stavu propuštěna domů. V místě pokousání přetrvávala pouze drobná krusta a končetina byla mírně oteklá. Při ambulantní kontrole po 5 týdnech nadále přetrvával mírný pozánětlivý lymfedém končetiny. Na další kontroly se pacientka nedostavila.

Obr. 1

CT mozku po přijetí: Hypodenzní ložisko v oblasti bazálních ganglií vpravo a několik drobných hypodenzit ve stejné oblasti vlevo



Kazuistika 2

62letá žena s negativní osobní anamnézou měla od konce prosince příznaky respiračního infektu včetně horečky do 38,5 °C. Po týdnu symptomatické léčby a týdnu užívání klaritromycinu horečka přetrvávala, přidala se bolest hlavy a zvracení a následující den byla pacientka nalezena soporózní.

Při příjmu měla teplotu 38,5 °C, mírnou tachypnoi 28 dechů/min, saturaci 96–98 %, puls 98/min a tlak 145/90. Měla poruchu vědomí odpovídající GCS 10, tuhou šíjí, povšechně vyšší reflexy, lehce pozitivní iritační jevy na dolních končetinách, symetrické postavení bulbů, zornice izokorické s fotoreakcí, nebyla pozorována lateralizace. Ostatní nález byl fyziologický. Vstupní laboratorní vyšetření prokázala leukocytózu 20,0 × 10⁹/l s 82 % neutrofilních segmentů, CRP 345 mg/l, glykémii 11,7 mmol/l, AST 1,6 a ALT 1,7 μkat/l, příměs bílkoviny, glukózy a krve v moči. Další nálezy – červený krevní obraz, trombocyty, urea, kreatinin, bilirubin, ALP, GMT, INR, APTT-R a AT III – byly v normě.

Po přijetí bylo provedeno CT vyšetření mozku s nálezem hypodenzního ložiska 29 × 16 mm v oblasti bazálních ganglií (BG) vpravo a několika drobných hypodenzit velikosti do 3 mm ve stejné oblasti vlevo, bez známek krvácení nebo edému mozku (obr. 1). Vyšetření likvoru potvrdilo diagnózu hnisavé meningitidy: 1 233 segmentů/mm³, bílkovina 2 g/l, glukóza 2,5 mmol/l (při glykémii 11,7 mmol/l, glukózový kvocient 0,21) a laktát 11,8 mmol/l. Byla zahájena léčba cefotaximem 12 g/den a ampicilem 12 g/den, podán dexametazon a manitol.

V likvoru byly mikroskopicky prokázány gramnegativní koky a vykulitována *Pasteurella multocida* citlivá na penicilin, ampicilin, cefalosporiny, kotrimoxazol, chloramfenikol, fluorochinolony, imipenem, piperacilin/tazobaktam a tetracyklin. Léčba byla 4. den zredukována na cefotaxim ve vyšší dávce 16 g/den vzhledem k suspektnímu nálezu abscesů nebo cerebritidy na vstupním CT. Při CT kontrole 6. den bylo popsáno v oblasti BG vlevo mapovité ložisko 20 × 33 mm vzniklé zřejmě splnutím původních drobných ložisek a další hypodenzní ložisko parietálně vpravo velikosti 20 × 36 mm.

Během prvních 4 dnů léčby odezněly febrilie a hodnota CRP se téměř normalizovala. Kontrolní vyšetření likvoru svědčilo pro ústup zánětu: 2 segmenty/mm³, 133 lymfocytů/mm³, bílkovina 0,9 g/l, glukóza 2,6 mmol/l (kvocient 0,37) a laktát 2,5 mmol/l. Stav vědomí se zlepšil na úroveň somnolence odpovídající GCS 13. Leukocyty po úvodním poklesu stouply v 2. týdnu hospitalizace až na 37,0 × 10⁹/l s 29 % tyčí a následoval i nový vzestup CRP na 98 mg/l, současně se vrátila horečka charakteru kontinua kolem 38,5 °C. Celkový stav pacientky se nezhoršil, naopak se zlepšil kontakt, pacientka byla probuditelná, rozuměla pokynům a spolupracovala, avšak měla úplnou expresivní afázii. Ani další vyšetření (RTG hrudníku, CT břicha, echokardiografie, vyšetření moče včetně bakteriologického screeningu) neodhalila příčinu vzestupu zánětlivých parametrů. Kontrola likvoru provedená v době maxima zánětlivých ukazatelů 12. den potvrdila normalizovaný nález kromě stacionární mírné hyperproteinurie 0,9 g/l. CT mozku 13. den prokázalo dva abscesy v místě původní hypodenzity v BG vpravo a tvořící se absces ve stejném místě

vlevo a suspektní drobný absces ve stropu postranní komory vlevo. Neurochirurgické konzilium doporučilo pokračovat v konzervativní léčbě. S cílem zvýšit průnik antibiotika do abscesů byla léčba 13. den změněna na chloramfenikol v dávce 12 g/den. Během následujícího týdne se normalizovala teplota a zánětlivé ukazatele. Vyšetření magnetickou rezonancí 18. den prokázalo stacionární nález dříve zjištěných abscesů (obr. 2). Po 6 dnech léčby chloramfenikolem se však objevila zvolna progredující anémie, a proto byla léčba po 10 dnech změněna opět na cefotaxim 12 g v kombinaci s intravenózním ofloxacinem 800 mg/den. Anémie byla reverzibilní a odezněla bez nutnosti podání transfuze. Stav pacientky se dále zlepšoval, byla postupně vertikalizována a zhruba od 26. dne začala mluvit, číst a psát, byla zcela orientovaná. Na kontrolních CT obrazech 30. a 41. den léčby byla zřejmá regrese nálezů s postupným mizením abscesů a přetrváváním hypodenzity interpretované jako ložisko cerebritidy. Intravenózní antibiotická léčba byla ukončena po 44 dnech a byl ponechán ciprofloxacin perorálně ve zvýšené dávce 1 500 mg/den. Pacientka byla po 49 dnech v dobrém stavu propuštěna do domácí péče na léčbě ciprofloxacinem 1 000 mg/den. Při kontrolách za 1 a 2 měsíce po dimisi si stěžovala na nespavost, únavu a nejistotu při chůzi, objektivní neurologický nález byl fyziologický. Kontrolní MR provedená 4 měsíce po začátku onemocnění potvrdila kompletní regresi zánětlivých změn v obou hemisférách s reziduálními diskrétními přestavbovými změnami charakteru gliózy v bílé hmotě periventrikulárně. Poté byla ukončena léčba ciprofloxacinem.

Doplněním epidemiologické anamnézy bylo zjištěno, že rodina pacientky chovala kočky, psa a koně a pacientka byla se zvířaty v každodenním kontaktu. V době nemoci neměla žádné nápadné poranění, ale udávala opakovaně poškrábání kočkami.

Při kontrolách za jeden a dva roky si pacientka stále stěžovala na bolesti hlavy ve frontální a temporální oblasti s ústupem po analgetících. Na kontrolních CT byly popsány stacionární drobné postmalatické pseudocysty v místech původních abscesů.

Diskuze

Pasteurella multocida byla popsána Pasteurem v roce 1880 a po něm také pojmenována. Poprvé byla izolována již v roce 1878 podle jednoho literárního zdroje u ptáků s ptačí choleroou, podle jiného zdroje u divokých prasat [1,2]. První lidské onemocnění vyvolané pasteurelou byla buď puerperální sepse popsána v roce 1913, nebo pochřipková pneumonie s empyémem z roku 1918; i v této informaci se literární zdroje různí [1,2]. První popis pasteurelové meningitidy pochází z roku 1925 a rané infekce po kousnutí kočkou z roku 1930 [2].

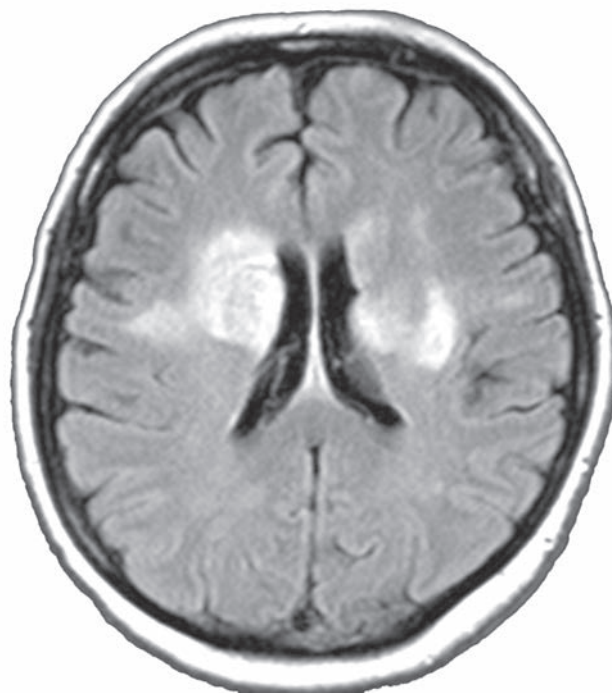
V rozvinutých zemích jsou nejčastějším zdrojem pasteurelové infekce doma chovaná zvířata. Agens se přenáší nejčastěji pokousáním nebo olizováním kůže s oděrkami. Po pokousání psem dochází obvykle k výraznějšímu zhmoždění tkání, ale při kousnutí kočkou pronikají bakterie kvůli tenkým a ostrým zubům hlouběji do tkáně [3]. Rány bývají kontaminovány pasteurelami zhruba u 5–30 % psích a 30–50 % kočičích kousnutí [4,5]. Různé formy pasteure-

lové infekce byly popsány také u lidí, kteří byli v kontaktu se zvířaty, avšak nebyli poraněni ani olizáni, a dokonce u osob bez známého kontaktu se zvířaty [1]. Z 29 dospělých pacientů s meningitidou 89 % uvedlo kontakt se zvířaty, ale jen 15 % bylo zvířetem kousnuto. U většiny tedy došlo k přenosu infekce olizáním kůže nebo kapátkovou infekcí při mazlení se zvířaty [2].

Pasteurella multocida je pro člověka oportunně patogenní a závažnost onemocnění často koreluje se stavem pacientovy imunity. Nejčastější manifestací je lokální infekce kůže a měkkých tkání. Přítomnost endotoxinu způsobuje až hemoragický charakter kožních projevů, pozorovaný i u pacientky v první kazuistice. Invazivní formy pasteurelové infekce jsou vzácnější a vznikají především u imunokompromitovaných pacientů a u okrajových věkových skupin [6–8]. Manifestují se jako sepse, nekrotizující fasciitida, artritida, osteomyelitida, endokarditida, meningitida, peritonitida. Infekce dýchacích cest vznikají u jedinců s chronickou sinusitidou nebo chronickou bronchitidou s bronchiektáziemi, kteří jsou asymptomaticky pasteurelami kolonizováni, a akutní infekce probíhá jako epiglottitida, sinusitida, bronchitida nebo pneumonie s empyémem [1]. Mezi 156 případy pasteurelové bakteriémie byly nejčastějšími klinickými manifestacemi septický šok (36,5 %), infekce kůže a měkkých tkání (26,9 %) a infekce respiračního traktu (21,8 %) [9]. Septický šok a těžké respirační infekce byly popsány také u imunokompetentních osob [9,10].

Obr. 2

MR mozku 18. den léčby: Vpravo stacionární dříve popsáný absces a další menší absces, vlevo cerebritida až počínající absces vzniklý splynutím původně popsáných tří malých ložisek



Obě popsané pacientky měly invazivní formu pasteurelové infekce s různou závažností. Ani u jedné nebylo zjištěno imunokompromitující onemocnění. U obou mohl být predisponujícím faktorem vyšší věk. V prvním případě měla pacientka po pokousání kočkou ranou infekci s bakteriemií, avšak bez rozvoje sepse nebo jiných komplikací. K bakteriémii, třeba jen krátkodobé, dochází zřejmě po pokousání psem nebo kočkou často, nicméně bývá zvládnuta mechanismy nespecifické imunity. Klinické zlepšení lokálního nálezu u pacientky na léčbě klindamycinem, který byl in vitro na pasteurely neúčinný, mohlo být nezávislé na podávání antibiotiku. Mohlo se jednat také o smíšenou ranou infekci, kde klindamycin zlikvidoval další bakterie podílející se na lokálním zánětu.

Závažnější byl průběh u pacientky s pasteurelovou meningitidou a mozkovými abscesy. Pasteurely jsou neobvyklí původci meningitidy a byly popsány především u malých dětí a starých osob. Většinu publikací představují kazuistiky ojedinělých případů. V období 1963–2011 bylo v anglickém, francouzském a německém písemnictví publikováno celkem 48 případů u dětí do 1 roku věku [11]. Kumar a Green uvádějí celkem 29 onemocnění dospělých popsaných do roku 1999 [2,12]. Od roku 1999 do současnosti jsme v literatuře našli dalších 11 kazuistik meningitidy dospělých [13–23].

U dospělých vzniká meningitida nejčastěji hematogenně ze vzdálené vstupní brány (buď rané infekce po kousnutí či škrábnutí, nebo kožní oděrky infikované olíznutím, nebo sliznice kontaminované při mazlení se zvířaty), méně často kontinuálním šířením z chronického zánětlivého ložiska, například otitidy, nebo následkem úrazu nebo operace v místě kolonizované sliznice nebo kůže [2,15]. Pasteurelové mozkové abscesy jsou velmi vzácné. Do roku 2012 bylo popsáno pouze 11 případů; nejčastěji absces vznikl přímým šířením infekce z parameningeálního ložiska, vzácně přímou inokulací při kousnutí zvířetem a zcela raritně hematogenní cestou [24,25]. Naše pacientka neměla žádný zánětlivý parameningeální fokus, který by mohl být zdrojem meningitidy nebo abscesu. Vícečetná ložiska cerebritidy či formujících se mozkových abscesů byla patrná již na vstupním CT vyšetření, po krátké anamnéze neurologických příznaků. Jednalo se tedy pravděpodobně o hematogenní rozsev pasteurelové infekce. Branou vstupu mohlo být drobné poranění kůže olízané kočkou nebo psem nebo sliznice kontaminovaná při kontaktu se zvířaty. V laboratorním obraze se meningitida nelišila od purulentní meningitidy jiné, běžnější etiologie. Menší buněčný nálezu odpovídá zánětu lokalizovanému z větší části v mozkové tkáni, a nikoli v likvorových cestách – cerebritidě či abscesu. Zvláštností v klinickém obraze byla přechodná úplná expresivní afázie. Ložiska cerebritidy a abscesů byla podle CT lokalizována v oblasti bazálních ganglií oboustranně a parietálně vpravo. Expresivní afázii by odpovídalo poškození v oblasti Brocova centra řeči v dolní části levého frontálního laloku. Tato oblast mohla být rovněž postižena zánětem, který však nezpůsobil změny viditelné pomocí CT ani MR vyšetření. V literatuře jsme našli jedinou zprávu o pasteurelové meningitidě provázené afázií v práci Bornarda a kol. z roku 2005 [14]. Nemocná byla mladá imunokompetentní žena, u níž byl nálezu CT vyšetření mozku opakovaně negativní a afázie rovněž přechodná.

P. multocida byla u našich pacientek identifikována kulti-vačně, u bakteriémie z krve a u meningitidy z likvoru. Bakterie není náročná a roste dobře na běžných kultivačních médiích. Obtíže mohou nastat při izolaci z primárně nesterilního materiálu, např. sputa [1].

Terapeutickou volbou jsou betalaktamová antibiotika s výjimkou oxacilinu a cefalosporinů I. generace. Byly již izolovány kmeny rezistentní na penicilin [3]. Další léčebnou alternativou jsou fluorochinolony, doxycyklin, kotrimoxazol a chloramfenikol. Pasteurela není citlivá na klindamycin, který je často používán k léčbě infekcí kůže a měkkých tkání; řada kmenů je také rezistentních na erytromycin. Při pokousání kočkou nebo psem je u imunokompromitovaných osob i s ohledem na jinou možnou bakteriální flóru doporučena antibiotická profylaxe amoxicilin-klavulanátem v běžné dávce po dobu 3–5 dní [5].

V obou případech jsme zaznamenali nežádoucí účinky antibiotické léčby. U pacientky s bakteriemií po změně léčby na amoxicilin došlo k rozvoji alergického exantému. Pacientka by se pravděpodobně uzdravila i během léčby „neúčinným“ klindamycinem nebo i bez antibiotika, avšak nereagovat na průkaz pasteurelové bakteriémie u staré ženy by bylo považováno za riskantní. U pacientky s meningitidou a mozkovými abscesy došlo po úvodní léčbě cefotaximem k rychlému zlepšení likvorového nálezu. Pro následné zhoršení systémových známek zánětu jsme nenalezli jiné vysvětlení než tvořící se mozkové abscesy s nedostatečným průnikem cefotaximu. Chloramfenikol byl logickou volbou, která však vedla k dřeňovému útlumu v červené krevní řadě a k nutnosti jeho podávání ukončit. Léčba pokračovala kombinací cefotaximu s ofloxacinem ve snaze dosáhnout lepšího průniku do abscesů. Po 6 týdnech intravenózní léčby a dalších dvou měsících léčby perorálním ciprofloxacinem došlo k úplné regresi abscesů a cerebritidy. Doporučená délka antibiotické léčby pasteurelové meningitidy je 14 dní. Léčba abscesů může být dostatečná v délce 6 týdnů při současné evakuaci abscesu; při konzervativní léčbě je nutné podávat antibiotika s průnikem do abscesu několik měsíců a délku léčby individualizovat podle ústupu nálezu na zobrazovacích vyšetřeních.

Pasteurelová sepsa a meningitida mají špatnou prognózu. Smrtnost meningitidy u dosud publikovaných případů byla 25–30 % a frekvence trvalých neurologických následků 17 % [2,12]. Obě popsané pacientky se uzdravily s mírnými následky – lehkým lymfedémem po rané infekci a intermitentní bolestí hlavy po meningitidě.

Závěrem lze konstatovat, že s ohledem na obrovské množství osob v pravidelném kontaktu se zvířaty a relativně malý počet případů pasteurelové infekce dochází k přenosu infekce poměrně vzácně. Přesto je třeba nezanedbat epidemiologickou anamnézu a na kontakt se zvířaty se cíleně ptát. Po poranění kočkou nebo psem u imunokompromitovaného jedince je vhodné k zabránění případné diseminace pasteurelové infekce profylakticky podat aminopenicilin potencionovaný inhibitorem betalaktamázy.

Literatura

- Zurlo JJ. Pasteurella species. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R (Eds). Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and practice of infectious diseases. 7. vyd. Philadelphia: Churchill Livingstone Elsevier; 2010, s. 2939–2942.

2. Green BT, Ramsey KM, Nolan PE. *Pasteurella multocida* meningitis: case report and review of the last 11 y. *Scand J Infect Dis*. 2002;34(3):213–217.
3. Oehler RL, Velez AP, Mizrahi M, et al. Bite-related and septic syndromes caused by cats and dogs. *Lancet Infect Dis*. 2009;9(7):439–447.
4. Holá V. Čeleď Pasteurellaceae. In: Votava M (ed). *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. vyd. Brno: Neptun; 2003, s. 77–78.
5. Černý Z. Infekce vyvolané *Pasteurella multocida*. In: Beneš J (ed). *Infekční lékařství*. 1. vyd. Praha: Galén; 2009, s. 227–228.
6. Drenjancevic IH, Ivic D, Drenjancevic D, et al. Fatal fulminant sepsis due to a cat bite in an immunocompromised patient. *Wien Klin Wochenschr*. 2008; 120(15–16):504–506.
7. Ip M, Teo JG, Cheng AF. Waterhouse-Friderichsen syndrome complicating primary biliary sepsis due to *Pasteurella multocida* in a patient with cirrhosis. *J Clin Pathol*. 1995;48(8):775–777.
8. Vondra M, Myers J. *Pasteurella multocida* bacteremia: Report of 12 cases in the 21st century and comprehensive review of the adult literature. *Infect Dis Clin Pract*. 2011;19(3):197–203.
9. Myers EM, Ward SL, Myers JP. Life-threatening respiratory pasteurellosis associated with palliative pet care. *Clin Infect Dis*. 2012;54(6):55–57.
10. Adler AC, Cestero C, Brown RB. Septic shock from *Pasteurella multocida* following a cat bite: case report and review of literature. *Conn Med*. 2011;75(10): 603–605.
11. Guet-Revillet H, Levy C, Andriantahina I, et al. Paediatric epidemiology of *Pasteurella multocida* meningitis in France and review of the literature. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2013;32(9):1111–1120.
12. Kumar A, Devlin HR, Vellend H. *Pasteurella multocida* meningitis in an adult: case report and review. *Rev Infect Dis*. 1990;12(3):440–448.
13. Armstrong GR, Sen RA, Wilkinson J. *Pasteurella multocida* meningitis in an adult: case report. *J Clin Pathol*. 2000;53(3):234–235.
14. Bornard L, Orban JC, Oregioni O, et al. *Pasteurella multocida* meningo-encephalitis with aphasia in a young adult. *Ann Fr Anesth Reanim*. 2005;24(7):823–825.
15. Brossier F, Clemenceau S, Lecso-Bornet M. Two concomitant but unrelated cases of *Pasteurella multocida* infection, including meningitis secondary to pituitary adenoma microsurgery. *Med Mal Infect*. 2010;40(10):590–592.
16. Hernandez-Febles M, Bordes-Benitez A, Alamo-Antunez I, et al. *Pasteurella multocida* meningitis: report of 2 cases. *Enferm Infecc Microbiol Clin*. 2009;27(8): 483–484.
17. Jordan EF, Nye MB, Luque AE. Successful treatment of *Pasteurella multocida* meningitis with aztreonam. *Scand J Infect Dis*. 2007;39(1):72–74.
18. Kawashima S, Matsukawa N, Ueki Y, et al. *Pasteurella multocida* meningitis caused by kissing animals: a case report and review of the literature. *J Neurol*. 2010; 257(4):653–654.
19. Lopez C, Sanchez-Rubio P, Betran A, et al. *Pasteurella multocida* bacterial meningitis caused by contact with pigs. *Braz J Microbiol*. 2013;44(2):473–474.
20. O'Neill E, Moloney A, Hickey M. *Pasteurella multocida* meningitis: case report and review of the literature. *J Infect*. 2005;50(4):344–345.
21. Per H, Kumandas S, Gumus H, et al. Meningitis and subgaleal, subdural, epidural empyema due to *Pasteurella multocida*. *J Emerg Med*. 2010;39(1):35–38.
22. Proulx NL, Freedman MS, Chan JW, et al. Acute disseminated encephalomyelitis associated with *Pasteurella multocida* meningitis. *Can J Neurol Sci*. 2003;30(2): 155–158.
23. Tjen C, Wyllie SA, Pinto A. *Pasteurella* meningo-encephalitis – a risk of household pets. *J Infect*. 2007;55(5):479–480.
24. Rada N, Arrad B, Draiss G, et al. *Pasteurella multocida*: a rare cause of cerebral abscess. *Med Mal Infect*. 2012; 42(10):525–6.
25. Wallace M, Lipsky BA. Hematogenous *Pasteurella multocida* brain abscess. *West J Med*. 1985;143(4):520–523.

Na bovinní tuberkulózu není ještě možné zapomenout ani v České republice

I. PAVLÍK

Fakulta regionálního rozvoje a mezinárodních studií, Mendelova univerzita v Brně

SOUHRN

Pavlik I.: **Na bovinní tuberkulózu není ještě možné zapomenout ani v České republice**

Bovinní tuberkulóza je způsobovaná dvěma obligátně patogenními druhy: *Mycobacterium bovis* a *M. caprae*, které vyvolávají závažná onemocnění zvířat a lidí. Přitom orální cesta infekce stojící za mimoplicní formou onemocnění je u lidí častější než aerogenní infekce způsobující plicní tuberkulózu. K významným rizikovým faktorům podmiňujícím vznik onemocnění u lidí patří především konzumace nedostatečně tepelně ošetřeného mléka, případně masa od infikovaných zvířat. Česká republika patří od roku 2004 mezi státy EU, které jsou oficiálně prosté bovinní tuberkulózy u skotu. S ohledem na stoupající počty jiných druhů infikovaných zvířat (zejm. jelenů lesních a prasat divokých) bovinní tuberkulózu v okolních státech je nutné na tuto situaci upozornit.

Klíčová slova: zoonóza, bezpečnost potravin, divocí přežvýkavci, prasata divoká

SUMMARY

Pavlik I.: **Bovine tuberculosis still not to be forgotten even in the Czech Republic**

Bovine tuberculosis is caused by two obligate pathogenic species, *Mycobacterium bovis* and *M. caprae*, that cause severe disease in animals and humans. The oral route of infection causing extrapulmonary forms of the disease in humans is more common than aerogenic infection causing pulmonary tuberculosis. Significant risk factors for the development of diseases in humans are mainly consuming insufficiently heat-treated milk or meat from infected animals. Since 2004, the Czech Republic has been listed among the EU countries that are officially free of bovine tuberculosis in cattle. In light of the increasing numbers of other animal species (esp. red deer and wild boars) infected with bovine tuberculosis in neighboring countries, it is necessary to draw attention to this situation.

Keywords: zoonoses, food safety, wild ruminants, wild boar

Klin mikrobiol inf lék 2015;21(2):56–62

Adresa: Prof. MVDr. Ivo Pavlík, CSc., Fakulta regionálního rozvoje a mezinárodních studií, tř. Generála Píky 7, 613 00 Brno, e-mail: ivo.pavlik@mendelu.cz

Došlo do redakce: 15. 6. 2015

Přijato k tisku: 16. 7. 2015

Úvod

V České republice, potažmo ve střední Evropě, nepředstavuje dnes již skot, resp. hovězí maso a produkty z něj vyráběné, prakticky žádné infekční riziko, protože bovinní tuberkulóza u skotu je v těchto zemích utlumena (viz obr. 1). Původci bovinní tuberkulózy jsou však diagnostikováni u různých druhů volně žijících divokých zvířat, jejichž zvěřina je s oblibou konzumována. Ve volné přírodě v ČR byla naposledy bovinní tuberkulóza diagnostikována u jednoho jelena lesního na Chomutovsku v roce 1991 [1]. Od té doby nebyl původce bovinní tuberkulózy u divokých zvířat žijících v ČR ve volnosti prokázán [2].

Přesto je nutné mít na paměti, že v celé řadě zemědělsky vyspělých zemí EU, včetně Velké Británie, Španělska,

Portugalska a dalších zemí, patří dosud bovinní tuberkulóza kvůli infikovaným rezervoárovým volně žijícím zvířatům stále k neutlumeným onemocněním [3]. Ve střední Evropě byl původce bovinní tuberkulózy ojediněle diagnostikován u prasat divokých (*Sus scrofa scrofa*), u jelenů lesních (*Cervus elaphus*), u srnců obecných (*Capreolus capreolus*) a u dalších volně žijících divokých zvířat [4].

Člověk se může infikovat původcem bovinní tuberkulózy nejenom inhalací aerosolu při kontaktu s nemocným zvířetem. Možný je také přenos nákazy přes poraněnou kůži při neopatrné manipulaci s infikovaným zvířetem. V oblasti bezpečnosti potravin však patří toto onemocnění bezesporu k nejzávažnějšímu mykobakteriálnímu onemocnění přenášenému nedostatečně tepelně upraveným mlékem, masem a výrobky z nich připravených [5].

Cílem předkládaného přehledného článku je proto nejenom vysvětlení současné platné taxonomie komplexu *Mycobacterium tuberculosis*, ale také výskyt bovinní tuberkulózy v Evropě.

Taxonomie zástupců komplexu *Mycobacterium tuberculosis*

Do komplexu *M. tuberculosis* je v současné době řazeno celkem 11 mykobakteriálních druhů. Zatím u žádného z těchto 11 druhů nebyla prokázána jejich schopnost množení se mimo hostitelský organizmus, i když ve tkáních, anebo po jejich vyloučení do prostředí, zůstávají mykobakteriální buňky živé a infekční až jeden rok [5].

Podle typických hostitelů je možné těchto 11 druhů rozdělit do pěti skupin. První skupinou jsou tři druhy, které způsobují humánní tuberkulózu. Ta bývá lokalizována ve více než 95 % případů v dýchacím traktu pacientů. Mimoplicní infekce bývají diagnostikovány v kostní dřeni, v parenchymatózních orgánech, v mozkových plenách, ve střevním nebo urogenitálním traktu a v jiných tkáních infikovaných osob. V případě silného infekčního tlaku způsobeného nejčastěji infikovaným majitelem nebo ošetřovatelem zvířat dochází ojediněle k infekci původci humánní tuberkulózy u zvířat zájmových (psi, kočky a papoušci), pracovních (sloni indičtí) nebo potravinových (skot, prasata a další). Jejich mízní uzliny hlavové, střevní a plicní, parenchymatózní orgány a zcela ojediněle i svalovina bývají infikovány i v případě absence makroskopických tuberkulózních změn [3]. Mezi původce humánní tuberkulózy jsou řazeny následující tři druhy [5]:

M. tuberculosis – původce humánní tuberkulózy na celém světě; ojediněle bývají infikována také zvířata v kontaktu s pacienty s otevřenou plicní formou onemocnění.

M. africanum – původce humánní tuberkulózy především u obyvatel v západní Africe; ojediněle bývají infikována také zvířata, především skot chovaný v těchto oblastech.

M. canettii – původce způsobuje zcela sporadicky u lidí plicní formu onemocnění; u zvířat nebyl tento druh dosud prokázán.

Druhou skupinu tvoří dva druhy, které způsobují bovinní tuberkulózu u skotu. Tito původci jsou nejčastěji přenášeni aerosolem z postiženého plicního traktu. Po inhalaci tohoto infikovaného aerosolu vzniká jak u skotu, tak i u člověka plicní tuberkulóza. Původci bovinní tuberkulózy jsou však přenášeni také mlékem, tkáněmi (především masem), krví, výkaly anebo močí infikovaných jedinců. Po pozření mykobakterií proniká původce sliznicí střevní do krevního oběhu s následnou infekcí jater (nejčastější forma mimoplicní tuberkulózy). U žen bývají v oblastech s vysokým výskytem bovinní tuberkulózy u skotu často diagnostikovány i případy bovinní tuberkulózy v pohlavních orgánech [6]. Těmito dvěma původci jsou:

M. bovis – primárním hostitelem, respektive rezervoárem, je skot, infikovaní však mohou být všichni savci včetně člověka; vyskytuje se na celém světě v oblastech s chovem skotu [3]. Pro intravitální testování skotu se využívá tuberkulin z kmene AN 5 (viz foto 1).

M. caprae – bylo popsáno až v roce 2003 [7], přičemž původně byl tento druh označován jako poddruh *M. bovis*; vyskytuje se především v bývalých zemích celé habsburské monarchie, které do ní patřily před jejím rozdělením na španělskou a rakouskou větev; má stejné hostitelské spektrum jako *M. bovis*, přičemž v ČR převládá v posledních letech jeho výskyt u lidí nad výskytem *M. bovis* [8,9].

Do třetí skupiny je možné zařadit dva druhy, které primárně způsobují tuberkulózu u drobných zemních savců, anebo u ploutvonožců. Tito živočichové jsou rovněž rezervoárovými zvířaty pro lidi, u kterých bývá postižen především dýchací trakt. Tyto případy však bývají zcela sporadické. Infekce prostřednictvím konzumace masa nebo masných výrobků nebyla zatím prokázána vůbec. Jedná se o následující dva druhy [5]:

M. microti – původce tuberkulózy drobných zemních savců především ve Velké Británii; infekce byla sporadicky prokazována v postižených oblastech u pastevně chovaného skotu a u ostatních druhů savců, např. koček a u zvířat chovaných v zoologických zahradách [10]; v ČR dosud nebyl tento původce diagnostikován ani u zvířat, ani u lidí.

M. pinnipedii – původce tuberkulózy u ploutvonožců žijících na jižní polokouli; těmito zvířaty byla infekce zavlečena do různých, především evropských zoologických zahrad, ve kterých byla později přenesena na ostatní chovaná zvířata, na ošetřovatele, veterinární lékaře a další pracovníky v těsném kontaktu s infikovanými jedinci; v ČR byl tento původce prokázán u jednoho lachtana hřivnatého chovaného v ZOO v roce 2009 [11,12].

Čtvrtou skupinu tvoří zatím tři nové druhy, které byly popsány v posledních několika letech a které dosud nebyly taxonomicky validovány:

M. mungi izolované od mangusty žíhané (*Mungos mungo*) v Africe [13].

M. orygis izolované od antilopy losí (*Taurotragus oryx*), jelenů a jiných druhů antilop v Africe [14,15].

M. surricatae izolované od surikat (*Suricata suricatta*) opět v Africe [16].

Pátou skupinu tvoří jen jeden druh, který nepatří mezi obligátně patogenní mykobakterie a který je dosud používaný k vakcinaci jak u lidí, tak u některých druhů zvířat:

M. bovis BCG – vznikl systematickou 13letou atenuací izolátu *M. bovis* pocházejícího z vemene mastitidní krávy; tento izolát byl získán veterinárním lékařem **Camillem Guérinem** a ve spolupráci s humánním lékařem **Albertem Calmettem** byl připraven jako vakcinační kmen, později označený začátečními písmeny jejich příjmení jako „BCG“ (Bacille de Calmette et Guérin) [17,18].

Výskyt bovinní tuberkulózy v ČR

Bovinní tuberkulóza byla u skotu a u prasat domácích naposledy diagnostikována v ČR v roce 1995 [19]. Přesto jsou dosud na jatkách při veterinárně-hygienické prohlídce

u skotu a prasat domácích zjišťovány tuberkulózní změny především v mízních uzlinách hlavových a v mezenteriálních, méně často v mízních uzlinách jaterních či plicních

Obr. 1
Země a regiony oficiálně prosté bovinní tuberkulózy
(EFSA, 23. 4. 2012)

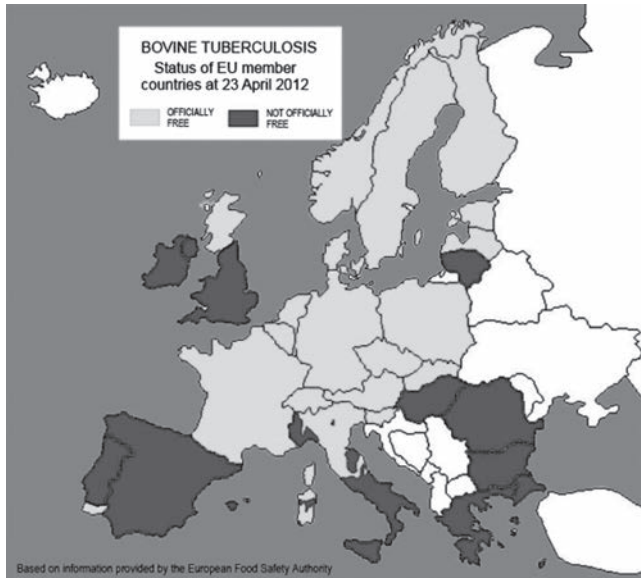
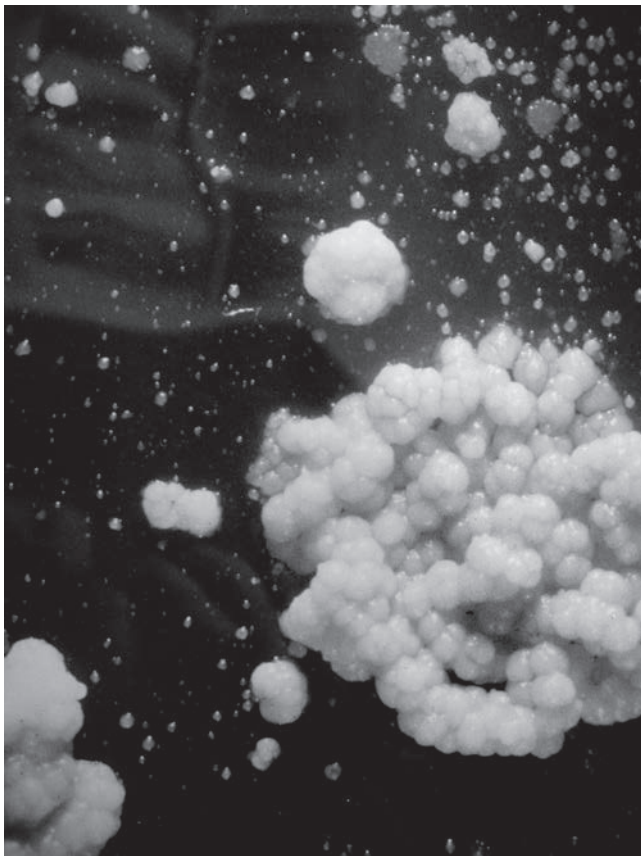


Foto 1
Kmen AN5 *Mycobacterium bovis*
používaný k výrobě tuberkulinu (foto I. Pavlík)



(foto 2–4), způsobené podmíněně patogenními mykobakteriemi [20,21]. U savců (zejm. u skotu a u prasat) byla v ČR miliární či generalizovaná forma bovinní tuberkulózy zjišťována zcela ojediněle [20–22]. Konzumace masa, mléka a produktů z nich vyrobených po tepelné úpravě je v dnešní době v ČR bezpečná. Z ostatních druhů mykobakterií byli v syrovém kravském mléce v ČR ojediněle prokázáni původci paratuberkulózy a aviární mykobakterií [23,24].

Výskyt bovinní tuberkulózy v okolních státech

Slovensko

V okolních státech, resp. ve státech střední Evropy, byla prokázána bovinní tuberkulóza na Slovensku naposledy u skotu v roce 1993 [25] a u prasat divokých v roce 1992 [26,27].

Maďarsko

V Maďarsku se u skotu vyskytuje zcela ojediněle bovinní tuberkulóza stále [2,27]. U volně žijících zvířat byla bovinní tuberkulóza prokázána u jelenů lesních a u prasat divokých v různých regionech [2]. Při studiu molekulární epidemiologie prostřednictvím metod RFLP, spoligotypizace a MIRU VNTR byl prokázán vzájemný přenos jednotlivých genotypů mezi pastevně chovaným skotem a prasaty divokými žijícími ve stejném regionu [28]. Bovinní tuberkulóza byla diagnostikována také u jednoho tygra sibiřského v zoologické zahradě, který byl s největší pravděpodobností krmem infikovaným hovězím masem [29]. Podobná situace týkající se výskytu bovinní tuberkulózy u masožravců chovaných v zoologických zahradách bývala zjišťována také v ČR před utlumením bovinní tuberkulózy u skotu. Infekce byla tehdy diagnostikována v různých zoologických zahradách, např. u lva v roce 1970, u tygra v roce 1978 a u vlků v roce 1980. Z ostatních masožravců byla v této době v ČR bovinní tuberkulóza diagnostikována na jedné farmě u norků v roce 1979 [30].

Polsko

V Polsku se bovinní tuberkulóza u skotu dosud vyskytuje zcela ojediněle [2,27]. Z ostatních druhů zvířat představuje největší problém výskytu bovinní tuberkulózy u volně žijícího zubra evropského (*Bison bonasus*). Tato populace byla infikována od pastevně chovaného skotu již v roce 1997, kdy byla diagnostikována generalizovaná bovinní tuberkulóza u jednoho zubra [31]. Od té doby jsou diagnostikovány stále nové případy i přes značné snahy o ozdravení chovu tohoto vzácného evropského savce, který žije ve volnosti v počtu pouze několik set kusů právě na území Polska a sousední Ukrajiny [4,32,33]. Z ostatních volně žijících zvířat byla bovinní tuberkulóza prokázána rovněž u prasat divokých, srnců obecných (*Capreolus capreolus*) a u jelenů lesních [34–36]. Většina těchto zvířat byla ulovena v příhraniční oblasti s ČR (Marek Lipiec, osobní sdělení, 2011), což z pohledu potenciální přeshraniční migrace zvíře představuje velké riziko pro možný přenos původce onemocnění i na naše území.

Rakousko

Za varující je nutné považovat nálezovou situaci v sousedním Rakousku. Z údajů OIE z let 2000–2010 [27] vyplývá, že boviní tuberkulóza zde byla prokázána po několikaleté přestávce v roce 2002 ve dvou stádech skotu se 20 zvířaty, v roce 2007 v jednom stádu skotu se 14 zvířaty, v roce 2008 ve 23 stádech skotu se 483 zvířaty, v roce 2009 v jednom stádu se 70 zvířaty a v roce 2010 v jednom stádu s 8 zvířaty. Z nálezového hlediska je závažné, že v těchto oblastech byla opakovaně orgánová boviní tuberkulóza diagnostikována u volně žijících jelenů lesních ve stejném časovém období a ve stejných regionech [37,38]. Nálezová situace zůstává v podstatě i v posledních 5 letech obdobná. Četné molekulárně biologické studie jednoznačně potvrzují přenos původce boviní tuberkulózy z volně žijících jelenů na pastevně chovaný skot [39].

Německo, Itálie a Švýcarsko

Kromě Rakouska je v současné době zaznamenán zvýšený výskyt boviní tuberkulózy u jelenů lesních a u prasat divokých také v zemích sousedících s Rakouskem. Rozsáhlé molekulárně epidemiologické studie potvrzují přenosy původce boviní tuberkulózy různými cestami včetně dálkové migrace divokých zvířat [39]. Ve Švýcarsku byla boviní tuberkulóza kromě jelenů lesních diagnostikována také u prasat divokých, což nálezovou situaci kvůli větší schopnosti migrace tohoto druhu zvířat ještě zhoršuje [40].

Francie, Španělsko a Portugalsko

Ve všech třech těchto zemích byla boviní tuberkulóza diagnostikována jak u prasat divokých, tak u jelenů lesních a příp. i u dalších volně žijících divokých zvířat. Kromě Francie, která získala statut země prosté boviní tuberkulózy u skotu, je v Portugalsku a ve Španělsku dosažení tohoto statusu s ohledem na značné proměnění populace prasat divokých boviní tuberkulózou velmi vzdálené [41–44].

Prevence boviní tuberkulózy u divokých zvířat

Prevence boviní tuberkulózy v populacích divokých zvířat spočívá v mnoha přístupech. V první řadě je nutné minimalizovat přenos původců onemocnění z infikovaných domácích zvířat (zejm. skotu) na volně žijící zvířata. Dalším přístupem jsou redukční odstřely volně žijících zvířat v případě jejich přemnožení, což je nyní realizováno v mnoha státech Evropy především u volně žijících prasat divokých. Orální vakcinace inaktivovanou nebo i živou vakcínou *M. bovis* BCG je zkoušena jak u jezevců lesních ve Velké Británii a Irsku, tak u prasat divokých ve Španělsku [45–47]. Výsledky jsou průběžně vyhodnocovány a je jisté, že ozdravení infikovaných chovů volně žijících zvířat si vyžadá ještě velké finanční i organizační úsilí.

Prevence boviní tuberkulózy u lidí

Dřívější přirozený strach konzumentů z infekce původci boviní tuberkulózy s ohledem na utlumení tohoto onemocnění u skotu ve většině zemí Evropy včetně ČR postupně opadá. K infekci vyvolané původci boviní tuberkulózy u osob manipulujících s masem a s masnými produkty mů-

že docházet jak na jatkách s poráženými infikovanými zvířaty, tak při jejich zpracování v domácnostech. V ČR je tento způsob přenosu původce boviní tuberkulózy prakticky vyloučen. Zcela zvláštní rizikovou skupinu však představují lovci divokých zvířat, kteří mohou být infikováni při neodborné manipulaci s těly ulovených zvířat, s jejich masem, s parenchymatózními orgány a s odpady, které mají být bezpečně likvidovány. Toto riziko je v současné době reálné

Foto 2

Bovinní tuberkulóza jater prasete domácího (foto I. Pavlík)



Foto 3

Miliární tuberkulóza jater prasete způsobená *Mycobacterium avium* subsp. *avium* (foto I. Pavlík)

v oblastech, kde se vyskytují volně žijící infikovaná zvířata, která jsou také intenzivně lovena. Těmito oblastmi jsou některé státy v USA (např. stát Michigan), v nichž se vyskytuje *M. bovis* u volně žijících jelenovitých [48], a Jihoafrická republika, v níž se vyskytuje *M. bovis* u vodních buvolů, antilop a u jiných volně žijících přežvýkavců v Krugerově národním parku [49]. Kožní bovinní tuberkulóza byla prokázána také na prstech rukou u ošetřovatelů infikovaných zvířat [50].

Při přenosu původců bovinní tuberkulózy mají mléko i samotné maso a výrobky z nich připravené bez předešlé tepelné úpravy význam pouze v určité fázi patogeneze onemocnění. Mykobakterie jsou intracelulárními parazity a období jejich přítomnosti v krvi je většinou u nově nakažených zvířat velmi krátké. Od zvířat s patologickými nálezy v mízních uzlinách nebo v parenchymatózních orgánech bývají při veterinárně-hygienické prohlídce na jatkách konfiskovány nejenom tyto tuberkulózně změněné mízní uzliny a orgány, ale také maso. Tím je konzument chráněn před případnou možností infekce. Druhou bariérou, která chrání konzumenty před infekcí, je tepelná úprava masa a masných výrobků před jejich konzumací. O rizikových faktorech přítomnosti původců bovinní tuberkulózy a dalších obligátně patogenních a podmíněně patogenních mykobakterií v mléce, krvi a mase zvířat je podrobně pojednáno v mnoha různých monografiích [5,51–53].

Rizika konzumace syrového masa jsou dostatečně známá (především v souvislosti s trichinelózou u prasat domácích a divokých). V naší myslivecké praxi je však v současné době běžné, že pokud je např. prase divoké vyšetřeno na trichinelózu s negativním výsledkem, bývají z jeho panenky nebo jiných druhů mas připravovány tatarské bifteky. Pro zjemnění je někdy přidáváno i syrové maso z panenky srnčí nebo jelení zvěře. Výše popsaná rizika jsou tedy i v současné době stále častěji podceňována. V některých případech jsou dokonce pojídána bezprostředně po ulovení syrová jät-

ra střelených jelenů, daňků nebo srnců s vírou, že síla uloveného jedince přejde do lovce.

Protože je v hospodářsky rozvinutých zemích fungující zdravotní péče, jsou alimentární onemocnění považována za snadno vyléčitelná, i když v některých případech mohou postiženého pacienta ohrozit i na životě. V případě bovinní tuberkulózy je nutné mít na mysli dlouhou inkubační dobu onemocnění, která může trvat dokonce i několik desítek let [54]. Zdroje ojedinělých případů diagnostikové bovinní tuberkulózy v ČR u osob mladších 35 let se nedaří i přes velké úsilí objasňovat, a není tedy vyloučena ani možnost alimentárního přenosu infekce (nepublikovaná data).

Přežívání původců bovinní tuberkulózy v masných výrobcích

Většina běžně používaných výrobních postupů pro masné výrobky zaručuje jejich bezpečnost z pohledu možné infekce původci bovinní tuberkulózy. Např. při výrobě tepelně ošetřených sedmi různých druhů párků a klobás bylo *M. bovis* devitalizováno při teplotách 70 až 82 °C, kterých bylo dosaženo uvnitř výrobku. Při výrobě pečením bylo dosaženo teplot 90 až 95 °C po dobu 50 až 150 min a při úpravě v páře bylo dosaženo teplot 80 až 95 °C po dobu 45 až 180 min, které bezpečně *M. bovis* a *M. caprae* devitalizují [55].

Při výrobě sicilského salámu z tepelně neošetřeného masa však bylo zjištěno, že *M. bovis* přežívalo v závislosti na jeho původu několik měsíců. V salámech vyrobených z přirozeně infikovaného hovězího masa od krav s miliární bovinní tuberkulózou bylo *M. bovis* kultivací prokázáno ještě 87. den (virulentní pro morče bylo jen 72 dnů). Při umělé kontaminaci však bylo *M. bovis* prokázáno živé ještě 117. den (virulentní pro morče bylo do 102. dne). Časové rozdíly v přežívání *M. bovis* ve výrobcích z přirozeně infikovaného masa a ve výrobcích uměle infikovaných *M. bovis* byly vysvětleny především vyšší koncentrací *M. bovis* při umělé kontaminaci díla salámu [56].

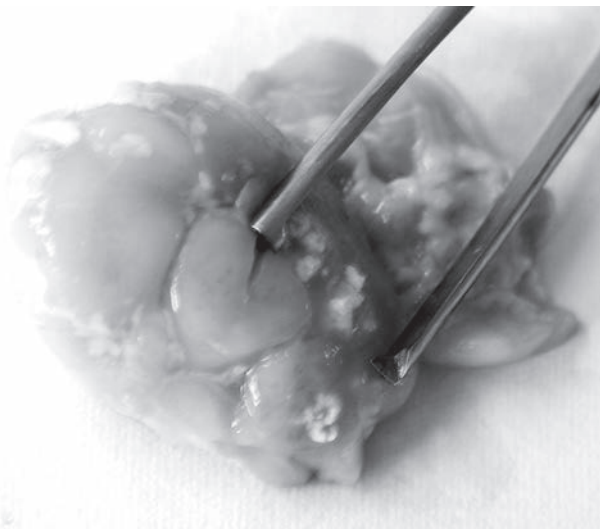
V Bulharsku bylo studováno přežívání tří druhů obligátně patogenních mykobakterií (*M. tuberculosis*, *M. bovis* a *M. avium* subsp. *avium*) přidaných v různých koncentracích do tří různých druhů salámů vyrobených ze syrového hovězího, vepřového a skopového masa sušením a uzením. Přežívání všech tří druhů mykobakteriálních původců se pohybovalo v závislosti na druhu mykobakterií a na druhu salámu mezi 150 až 180 dny [57].

Zkřížená kontaminace mykobakteriemi na jatkách a ve zpracovatelských závodech

Zkřížená kontaminace masa a masných výrobků různými patogeny včetně mykobakterií při jejich zpracování je dnes v zemědělsky a průmyslově vyspělých státech považována za stejně nebo dokonce významnější riziko než přítomnost různých druhů mykobakterií v mase a v parenchymatózních orgánech. Ty bývají izolovány až od zvířat s pokročilejšími tuberkulózními procesy, které dnes nebývají tak často na jatkách při veterinárně hygienické prohlídce zjišťovány [58,59].

Foto 4

Tuberkulózní změny mízních uzlin hlavových prasete (foto I. Pavlík)



Mykobakterie vyskytující se v prostředí jatek a zpracovatelských závodů mohou nejenom kontaminovat maso, parenchymatózní orgány a masné výrobky, ale mohou také infikovat pracovníky, kteří s nimi přicházejí do styku. Nejvíce je známo o přenosu *M. bovis* na pracovníky na jatcích, na kterých se porážel skot s bovinní tuberkulózou. Analýzou pěti případů infekce *M. bovis* u pracovníků z jatek v Austrálii byla zjištěna infekce u čtyř z nich v plicích a u jednoho z nich v ledvinách [60]. Za zcela ojedinělé je možné považovat infekci jazyka vyvolanou *M. bovis* u jednoho pacienta konzumujícího pravděpodobně nedostatečně tepelně ošetřené infikované maso nebo mléko [61].

Ve vlastních provozech jatek a zpracovatelských závodů jsou z pohledu ekologie mykobakterií nejvýznamnější biofilmy, které se vytváří na různých površích těchto provozů včetně pracovních ploch (např. stoly a linky), ochranných oděvů pracovníků a pracovních nástrojů (např. pily a nože) [62]. Podmíněně patogenní mykobakterie obsažené v těchto biofilmech mohou zpětně kontaminovat jak maso a parenchymatózní orgány, tak i finální masné výrobky, jak bylo zjištěno i v ČR [63].

Závěrem ke změnám chování obyvatel v ČR při stravování a při záchraně nemocných zvířat

V oblasti změn stravování (především stoupající obliba konzumace syrového nebo nedostatečně tepelně upraveného masa a z něj pocházejících masných výrobků a konzumace syrového mléka a mléčných výrobků z něj pocházejících) je třeba mít na mysli následující rizika:

- i od na první pohled zdravého zvířete může pocházet infikovaný produkt mykobakteriemi,
- bezpečný produkt může být zkříženě kontaminován při výrobě, transportu, skladování anebo při prodeji,
- za rizikové je nutné považovat konzumaci potravin živočišného původu, které nejsou řádně tepelně ošetřeny,
- především při zahraničních exotických dovolených je vhodné mít tato rizika na paměti.

Infikovaná volně žijící divoká zvířata jsou *ante finem*, tedy v pokročilém stádiu infekce, většinou zesláblá a apatická. Tím se stávají častou kořistí divokých prasat a jiných predátorů. Se ztrátou plachosti se tato nemocná zvířata také přibližují k místům s dostatkem potravy, kterými jsou především zemědělské a hospodářské objekty, určitá místa na pastvinách, v oborách, na farmách a v zoologických zahradách. Proto je nutné:

- zabránit těmto podezřelě se chovajícím nemocným zvířatům v kontaktu se zdravými zvířaty chovanými v zajetí,
- je třeba dbát opatrnosti při jejich zachraňování (nejdříve je nutné je nechat vyšetřit na různé původce onemocnění včetně mykobakteriálních infekcí),
- především dětem bráníme se takto zesláblých zvířat dotýkat, nebo si s nimi dokonce hrát.

Poděkování

Finančně podporováno projektem IGA FRRMS MEN-DELU č. 12/2015.

Děkuji za cenné připomínky kolegům PhDr. Daně Hübelové, Ph.D. a MVDr. Petru Křížovi, Ph.D.

Literatura

1. Pavlík I, Bartl J, Parmova I, et al. Occurrence of bovine tuberculosis in animals and humans in the Czech Republic in the years 1969 to 1996. *Vet Med Czech.* 1998; 43(7):221–231.
2. Pavlík I. Status of bovine tuberculosis control in countries of Central Europe and countries of the former Soviet Union. In: Zoonotic Tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and Other Pathogenic Mycobacteria, s. 369–382, 3. vyd., Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB. (eds), Wiley-Blackwell, 2014, ISBN: 978-1-118-47429-7, 432 s.
3. Thoen CO, Steele JH, Kaneene JB. Zoonotic tuberculosis: *Mycobacterium bovis* and other pathogenic mycobacteria, 3. vyd., Wiley-Blackwell, 2014, ISBN: 978-1-118-47429-7, 432 s.
4. Pavlík I, Treka I, Parmova I, et al. Detection of bovine and human tuberculosis in cattle and other animals in six Central European countries during the years 2000–2004. *Vet Med Czech.* 2005;50(7):291–299.
5. Kazda J, Pavlík I, Falkinham J, Hruska K. The ecology of mycobacteria: impact on animal's and human's health. 1. vyd., Springer, 2009, 520 s. ISBN 978-1-4020-9412-5.
6. Pavlík I. Bovine tuberculosis in Russia and the former states of the Soviet Union. *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. In: Thoen CO, Steele JH, Gilsdor MJ (eds), s. 173–198, 2. vyd. Blackwell Publishing, 2006, ISBN-13: 978-0-8138-0919-9, 329 s.
7. Aranaz A, Cousins D, Mateos A, Dominguez L. Elevation of *Mycobacterium tuberculosis* subsp. *caprae* Aranaz et al. 1999 to species rank as *Mycobacterium caprae* comb. nov., sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2003;53:1785–1789.
8. Erler W, Martin G, Sachse K, et al. Molecular fingerprinting of *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* isolates from Central Europe. *J Clin Microbiol.* 2004;42(5): 2234–2238.
9. Prodinge W M, Brandstatter A, Naumann L, et al. Characterization of *Mycobacterium caprae* isolates from Europe by mycobacterial interspersed repetitive units genotyping. *J Clin Microbiol.* 2005;43(10):4984–4992.
10. Kipar A, Burthe SJ, Hetzel U, et al. *Mycobacterium microti* tuberculosis in its maintenance host, the field vole (*Microtus agrestis*): characterization of the disease and possible routes of transmission. *Vet Pathol.* 2014;51(5):903–914.
11. Kriz P, Kralik P, Slany M, et al. *Mycobacterium pinnipedii* in a captive Southern sea lion (*Otaria flavescens*): a case report. *Vet Med Czech.* 2011;56(6):307–313.
12. Kříž P, Pavlík I. Tuberkulóza ploutvonožců vyvolaná infekcí *Mycobacterium pinnipedii*. *Veterinářství.* 2011;61(3):158–166.
13. Alexander KA, Laver PN, Michel AL, et al. Novel *Mycobacterium tuberculosis* complex pathogen, *M. mungi*. *Emerg Infect Dis.* 2010;16(8):1296–1299.
14. Smith NH, Kremer K, Inwald J, et al. Ecotypes of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *J Theor Biol.* 2006;239:220–225.
15. van Ingen J, Rahim Z, Mulder A, et al. Characterization of *Mycobacterium orygis* as *M. tuberculosis* complex subspecies. *Emerg Infect Dis.* 2012;18(4):653–655.
16. Parsons SD, Drewe JA, Gey van Pittius NC, Warren RM, van Helden PD. Novel cause of tuberculosis in meerkats, *South Africa*. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(12): 2004–2007.
17. Ahsan MJ, Garg SK, Vashistha B, Sharma P. Tuberculosis vaccines: hopes and hurdles. *Infect Disord Drug Targets.* 2013;13(5):318–321.
18. Buddle BM, Parlange NA, Wedlock DN, Heiser A. Overview of vaccination trials for control of tuberculosis in cattle, wildlife and humans. *Transbound Emerg Dis.* 2013;60(Suppl 1):136–146.
19. Pavlík I, Bures F, Janovsky P, et al. The last outbreak of bovine tuberculosis in cattle in the Czech Republic in 1995 was caused by *Mycobacterium bovis* subspecies *caprae*. *Vet Med Czech.* 2002;47(9):251–263.
20. Pavlík I, Matlova L, Dvorska L, et al. Tuberculous lesions in pigs in the Czech Republic during 1990–1999: occurrence, causal factors and economic losses. *Vet Med Czech.* 2003;48(5):113–125.
21. Pavlík I, Matlova L, Dvorska L, Shitaye JE, Parmova I. Mycobacterial infections in cattle and pigs caused by *Mycobacterium avium* complex members and atypical mycobacteria in the Czech Republic during 2000–2004. *Vet Med Czech.* 2005; 50(7):281–290.
22. Shitaye JE, Parmova I, Matlova L, et al. Mycobacterial and *Rhodococcus equi* infections in pigs in the Czech Republic between the years 1996 and 2004: the causal factors and distribution of infections in the tissues. *Vet Med Czech.* 2006; 51(11):497–511.
23. Slana I, Kralik P, Kralova A, Pavlík I. On-farm spread of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in raw milk studied by IS900 and F57 competitive real time quantitative PCR and culture examination. *Int J Food Microbiol.* 2008; 128(12):250–257.
24. Slana I, Kaevska M, Kralik P, Horvathova A, Pavlík I. Distribution of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* and *M. a. hominissuis* in artificially infected pigs studied by culture and IS901 and IS1245 quantitative real time PCR. *Vet Microbiol.* 2010;144:437–443.
25. Pavlík, I. The experience of new European Union Member States concerning the control of bovine tuberculosis. *Vet Microbiol.* 2006;112:221–230.

26. Machackova M, Matlova L, Lamka J, et al. Wild boar (*Sus scrofa*) as a possible vector of mycobacterial infections: review of literature and critical analysis of data from Central Europe between 1983 to 2001. *Vet Med Czech*. 2003;48(3):51–65.
27. OIE. http://www.oie.int/wahis_2/public/wahid.php/Countryinformation/Animal-situation
28. Prodinge WM, Nagy G, Brandstätter A, et al. Molecular epidemiology of *Mycobacterium caprae* infections among cattle and wild animals in Hungary (1996 and 2004) by MIRU genotyping. In: Proc 26th An Congr Europ Soc Mycobacteriol., Istanbul, Turkey, 2005:55.
29. Lantos A, Niemann S, Mezösi L, et al. Pulmonary tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* subsp. *caprae* in captive Siberian tiger. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(11):1462–1464.
30. Pavlík I, Bartl J, Parmova I, et al. Occurrence of bovine tuberculosis in animals and humans in the Czech Republic in the years 1969 to 1996. *Vet Med Czech*. 1998;43(7):221–231.
31. Zorawski C, Lipiec M. Generalizovaná tuberkulóza u zubra evropského (polsky). *Med Wet*. 1997;53:90–92.
32. Pavlík I, Ayele WY, Parmova I, et al. Incidence of bovine tuberculosis in cattle in seven Central European countries during the years 1990–1999. *Vet Med Czech*. 2002;47(2–3):45–51.
33. Krajewska M, Lipiec M, Szulowski K. Bovine tuberculosis in bison (*Bison bonasus caucasicus*) located in Poland. *Borgis – Postępy Nauk Med*. 2011;10:842–845.
34. Lipiec M, Weiner M, Krajewska M. Bovine tuberculosis in wild animals in Poland. In: Eur Soc Mycobact (ESM). Bled, Slovinsko. 2010:172.
35. Krajewska M, Lipiec M, Zabost A, Augustynowicz-Kopec E, Szulowski K. Bovine tuberculosis in a wild boar (*Sus scrofa*) in Poland. *J Wildl Dis*. 2014;50(4):1001–1002.
36. Kita J, Anus K, Salwa A, et al. Bovine tuberculosis in European bison as possible zoonotic impact in Poland. In: Zoonosis. Lorenzo-Morales, J. (ed), In Tech, 2012, s. 101–110, ISBN 978-953-51-0479-7.
37. Glawischnig W, Allerberger F, Messner C, Schönbauer M, Prodinge WM. Tuberkulose-Endemie bei freilebendem Rotwild (*Cervus elaphus hippelaphus*) in den nördlichen Kalkalpen. *Vet Med Austria/Wiener Tierärztl Monatssch*. 2003;90:38–44.
38. Glawischnig W. Tuberkulose bei Wildtieren. *Jagd in Tirol*. 2009;07–08:12–13.
39. Fink M, Schleicher C, Gonano M, et al. Red deer as maintenance host for bovine tuberculosis, Alpine region. *Emerg Infect Dis*. 2015;21(3):464–467.
40. Beerli O, Blatter S, Boadella M, et al. Towards harmonised procedures in wildlife epidemiological investigations: a serosurvey of infection with *Mycobacterium bovis* and closely related agents in wild boar (*Sus scrofa*) in Switzerland. *Vet J*. 2015;203(1):131–133.
41. Richomme C, Boadella M, Courcoul A, et al. Exposure of wild boar to *Mycobacterium tuberculosis* complex in France since 2000 is consistent with the distribution of bovine tuberculosis outbreaks in cattle. *PLoS One*. 2013;8(10):e77842.
42. Muñoz-Mendoza M, Marreros N, Boadella M, et al. Wild boar tuberculosis in Iberian Atlantic Spain: a different picture from Mediterranean habitats. *BMC Vet Res*. 2013;8(9):176.
43. Kukielka E, Barasona JA, Cowie CE, et al. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev Vet Med*. 2013;112(3–4):213–221.
44. Cano-Manuel FJ, López-Olvera J, et al. Long-term monitoring of 10 selected pathogens in wild boar (*Sus scrofa*) in Sierra Nevada National Park, southern Spain. *Vet Microbiol*. 2014;174(1–2):148–154.
45. Gortazar C, Beltrán-Beck B, Garrido JM, et al. Oral re-vaccination of Eurasian wild boar with *Mycobacterium bovis* BCG yields a strong protective response against challenge with a field strain. *BMC Vet Res*. 2014;10:96.
46. Murphy D, Costello E, Aldwell FE, et al. Oral vaccination of badgers (*Meles meles*) against tuberculosis: comparison of the protection generated by BCG vaccine strains Pasteur and Danish. *Vet J*. 2014;200(3):362–367.
47. Hardstaff JL, Bulling MT, Marion G, Hutchings MR, White PC. Modelling the impact of vaccination on tuberculosis in badgers. *Epidemiol Infect*. 2013;141(7):1417–1427.
48. VanTiem JS. The public health risks of cervid production in the United States of America. *Rev Sci Tech*. 1997;16:564–570.
49. Weyer K, Fourie PB, Durrheim D, et al. *Mycobacterium bovis* as a zoonosis in the Kruger National Park, South Africa. *Int J Tub Lung Dis*. 1999;3:1113–1119.
50. Twomey DF, Higgins RJ, Worth DR, et al. Cutaneous TB caused by *Mycobacterium bovis* in a veterinary surgeon following exposure to a tuberculous alpaca (*Vicugna pacos*). *Vet Rec*. 2010;166(6):175–177.
51. Thoen CO, Steele JH (eds). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. Iowa State University Press, 1995, 1. vyd., 355 s.
52. Grange JM (ed). *Mycobacteria and human disease*. 2. vyd. Arnold, London, 1996; 230 s.
53. Thoen CO, Steele JH, Gilsdorf MJ (eds). *Mycobacterium bovis* infection in animals and humans. 2. vyd., Blackwell Publishing Professional, Ames, Iowa, 2006b, 317 s. ISBN-10: 0-8138-0919-3 (alk. paper).
54. Pavlík I, Ayele WY, Havelkova M, et al. *Mycobacterium bovis* in human population in four Central European countries during 1990–1999. *Vet Med Czech*. 2003;48(4):90–98.
55. Kozhemiakin NG, Sidorenko BV, Ivanov NE. *M. tuberculosis* resistance to thermal conditions adopted in the production of cooked sausages (rusky). *Voprosy Pitaniia*. 1967;26:61–64.
56. Iannuzzi L. On the resistance of pathogenic tubercular mycobacteria in sausages (italsky). *Acta Med Vet Naples*. 1968;14:255–261.
57. Savov D. Resistance of tuberculosis mycobacteria in raw-dried and raw-fumigated sausages (bulharsky). *Vete Med Nauki*. 1975;12:39–43.
58. Hancox M. Bovine tuberculosis: milk and meat safety. *Lancet*. 2002;359:706–707.
59. Gutierrez-Garcia JM. Meat as a vector of transmission of bovine tuberculosis to humans in Spain: a historical perspective. *Vet Heritage*. 2006;29:25–27.
60. Robinson P, Morris D, Antic R. *Mycobacterium bovis* as an occupational hazard in abattoir workers. *Aust NZ J Med*. 1988;18:701–703.
61. Pande TK, Hiran S, Rao VV, Pani S, Vishwanathan KA. Primary lingual tuberculosis caused by *M. bovis* infection. *Oral Surg, Oral Med, Oral Path, Oral Rad Endodont*. 1995;80:172–174.
62. Norton JH, Duffield BJ, Coward AJ, Hielscher RW, Nicholls RF. A necropsy technique for cattle to eliminate contamination of lymph nodes by mycobacteria. *Aust Vet J*. 1984;61:75–76.
63. Shitaye JE, Horvathova A, Bartosova L, et al. Distribution of non-tuberculosis mycobacteria in the environmental samples from slaughterhouse and in raw and processed meats. *Czech J Food Sci*. 2009;27(3):194–202.

Pokyny pro autory

Profil časopisu:

Klinická mikrobiologie a infekční lékařství je periodikum, zabývající se klinickou a laboratorní problematikou infekčního procesu v celé šíři, jak ve vlastních základních, tak i hraničních lékařských, případně, pokud je třeba, i v nelékařských oborech. Přednost se dává informacím s praktickým významem.

Zásady vztahu mezi autory a redakcí:

Redakce přijímá příspěvky v češtině nebo ve slovenštině, které odpovídají odbornému profilu časopisu. Kromě dopisů redakci, diskuzí, zpráv a společenské rubriky jsou všechny přijaté příspěvky podrobeny nezávislé recenzii, přičemž se zachovává oboustranná anonymita. O výsledcích recenzního řízení je autor zpraven dopisem redakce současně s názorem redakce na konečnou úpravu článku. Redakce si vyhrazuje právo provádět drobné stylistické úpravy textu a upravovat pravopis podle progresivní verze. Redakce ve vlastní režii doplní překlad názvu a souhrnu příspěvku do angličtiny, pokud autor tyto podklady nedodá v potřebné kvalitě sám.

Před definitivním odevzdáním do tisku bude autorovi (hlavnímu autorovi) zaslán provizorní výtisk práce k autorské korektuře. Při autorské korektuře nelze bez předchozí dohody s redakcí provádět změny textu v rozsahu větším než 5 řádků. Užívejte obvyklých korektorských značek. Korekturu odešlete neprodleně zpět, nedostane-li ji redakce do 5 pracovních dnů od odeslání, bude to považováno za souhlas autora s textem (je možné použít i faxu nebo e-mailu s naskenovanou přílohou).

Uveřejněná práce se stává majetkem časopisu a přetisknout její část, přesahující rozsah abstraktu nebo použít obrázky v jiné publikaci lze jen se souhlasem vydavatele. Rukopis se archivuje v redakci; autorům se vrací jen, byl-li odmítnut nebo na zvláštní vyžádání.

Zasílání rukopisů:

Všechny rukopisy zasílejte výhradně na dále uvedenou adresu redakce, a to zásadně ve dvojnásobné formě:

- jeden kompletní výtisk s veškerou obrazovou dokumentací, opatřený titulní stranou s podpisem hlavního autora,
- text rukopisu v elektronické podobě (na disketě, CD) včetně titulní strany (viz dále, samozřejmě bez autentického podpisu) spolu s tabulkami, grafy a schémata, pokud byly vyrobeny pomocí počítačového programu. Tabulky, grafy, obrázky a schémata připojte jako samostatné soubory mimo textový soubor. Velmi tím usnadníte konečné zpracování.

Titulní strana obsahuje:

- Název práce, který musí být stručný a výstižný, musí odpovídat skutečnému obsahu sdělení a bez použití zkratk.
- Typ sdělení (viz níže).
- Jména autora a spoluautorů ve zkrácené podobě bez titulů (J. Xyz, B. Yxz, ...), s odkazy na názvy jejich pracovišť.
- V samostatném odstavci celá jména autorů a spoluautorů včetně titulů a vědeckých hodností. Názvy pracovišť, na něž se u jmen odkazuje.
- U prvního (hlavního) autora bude uvedena úplná kontaktní adresa pro další styk s redakcí včetně e-mailové adresy.
- U prvního (hlavního) autora uveďte rovněž telefonní, případně faxové spojení, rodné číslo a číslo konta (tyto údaje nebudou zveřejňovány, slouží pro další komunikaci mezi hlavním autorem a redakcí a pro vyplacení honoráře).
- Prohlášení, že zasláný text je určen pro otištění v časopise Klinická mikrobiologie a Infekční lékařství a nebyl ani nebude jinde publikován a klauzuli, že spoluautoři souhlasí s textem zasláného sdělení a s uveřejněním v tomto časopise.
- U původních a přehledných prací a u krátkých sdělení připojí autor prohlášení (a to i v negativním případě) o sponzorování či střetu zájmů; je-li práce sponzorována (grantem, jinou organizací, výrobcem apod.) nebo dochází-li ke střetu zájmů (např. autor je přímo či nepřímo

zajímavý na výsledcích výroby či prodeje, je majitelem popisovaného patentu apod.), musí být tato skutečnost v závěru sdělení uvedena.

- U klinických studií připojí autor čestné prohlášení, že studie byla před zahájením schválena místně příslušnou etickou komisí. Prováděly-li se pokusy na zvířatech, vyžaduje se prohlášení, že byly dodrženy ústavní nebo národní předpisy a směrnice pro chov a experimentální užití zvířat.
- Pod prohlášením (body g, h, i), opatřeným datem, je třeba vlastnoručně podpis hlavního autora.
- Redakce netrvá na „imprimatur“ přednosti pracoviště autora/autorů.

Typy sdělení:

Každý příspěvek musí být samotnými autory označen jako jedna z následujících variant; podle tohoto zařazení bude v redakci posuzován, v nejasných případech bude konečně zařazení provedeno po dohodě redakce s autorem. Má-li předkládaná práce atypické charakteristiky, je vhodné kontaktovat předem redakci (redakce@trios.cz)

1. Původní práce (Original article)

Práce obsahuje výsledky vlastního laboratorního, klinického nebo epidemiologického výzkumu. Obvyklý rozsah 8–16 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 2–10; literárních odkazů 10–20. Souhrn (Summary) v rozsahu 10–20 řádků musí být strukturovaný, tj. dělený na oddíly: Cíl práce, popř. východisko (Background/ Objective[s]) – Materiál a metody (Material and Methods) – Výsledky (Results) – Závěr (Conclusions). Ze souhrnu musí vyplývat, jakou výchozí otázku si autor položil, k jakým výsledkům došel a jaký je praktický výstup jeho sdělení. K souhrnu jsou připojena klíčová slova v počtu 3–10. Vlastní text se standardně rozděluje na oddíly (uniform requirements): Úvod – Materiál a metody – Výsledky – Diskuse – Závěr. Práce je posuzována dvěma nezávislými recenzenty.

2. Přehledná práce (Review)

Tato sdělení podávají přehled současných znalostí o určité problematice. Zpravidla neobsahují vlastní výsledky, mohou však být doplněny krátkou kazuistikou. Jestliže obsahují vlastní názory či komentář (vítáno), musí být tyto názory jasně odděleny od objektivního výkladu. Obvyklý rozsah 10–20 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 2–10; literárních odkazů 20–50, přičemž alespoň 50 % z nich není starší než 3 roky. Souhrn v rozsahu 10–20 řádků musí být výstižný a obsahovat nejdůležitější myšlenky textu. Připojuje se 3–10 klíčových slov. Práce je posuzována dvěma nezávislými recenzenty.

3. Krátké sdělení (Short communication)

Může se jednat o kazuistiku či jiné zajímavé pozorování z klinické či laboratorní praxe, výsledky pilotní studie, krátký souhrn poznatků o málo známém problému a podobně. Obvyklý rozsah 3–6 normostran; souhrnný počet tabulek, grafů a obrázků 1–4; literárních odkazů 3–10. Souhrn i v tomto případě musí být výstižný v rozsahu 5–10 řádků. Vlastní text obsahuje úvodní část, vlastní pozorování, diskuzi a závěr. Prochází recenzním řízením.

4. Dopis redakci (Letter-to-the-editor)

Subjektivní názor čtenáře na určitý odborný problém, komentář či polemika k dříve otištěnému sdělení a podobně. Rozsah 1–5 normostran, včetně eventuálních tabulek, grafů, obrázků a literárních odkazů. Žádný souhrn. Text neprochází recenzním řízením, redakce nemusí sdílet stanovisko autora.

5. Zpráva (Report)

Zpráva z kongresu, ze zahraničního pobytu apod. Redakce přijímá odborně zajímavá sdělení. U zprávy z kongresu jde zpravidla o jedno podrobně zpracované a komentované téma. Naopak není žádoucí uvádět vý-

čet přednášek či událostí a o každé z nich se zmínit jednou větou. Rozsah je 1–5 normostran. Žádný souhrn. Text neprochází recenzním řízením.

6. Recenze knihy (Book review)

Recenze knihy nebo skript vydaných v ČR nebo SR, které pojednávají o problematice klinické mikrobiologie nebo infekčních nemocí. Kritické pojetí je žádoucí. Rozsah 1–2 normostrany.

7. Oznámení (Announcement)

Informace o události, jednání či rozhodnutí, které jsou významné pro čtenářskou odbornou komunitu a/nebo mají nadčasový charakter. V případech hodných zřetele může být použit i jiný typ sdělení.

8. Doporučený postup (Guidelines)

Doporučený diagnostický a léčebný postup popisuje, jak postupovat při diagnostice, léčbě a ošetřování nemocného s konkrétní chorobou. Standard navíc obsahuje exaktně definované podmínky a k postupu jsou připojena měřitelná kritéria a indikátory kvality a efektivity. Otiskuje se ve znění, jak byl vydán garantující odbornou společností.

9. Životní jubileum a nekrolog (Biography, obituary)

Biografický článek ke kulatému jubileu nebo úmrtí významné osobnosti.

Formální náležitosti příspěvků:

Rozsah rukopisu je určen typem sdělení (viz výše). Při úpravě na normostrany se text formátuje tak, aby na stranu formátu A4 vycházelo přibližně 60 úhozů na řádek a 30 řádek na stránku. Stránky je třeba číslovat.

Každý graf, schéma, tabulka, vzorec či obrázek musí být připojen na zvláštním listě, na rubu s uvedením prvního autora a názvu práce. V textu je třeba označit místa, kam mají být příslušné tabulky, grafy či obrázky umístěny. Každá příloha (tabulka, graf, schéma) má být srozumitelná sama o sobě, bez čtení textu. Jsou-li v ní uvedeny zkratky, které se běžně nepoužívají, musí být připojeny vysvětlivky. Redakce si vyhrazuje právo odmítnout rozsáhlé nepřehledné tabulky, stejně jako tabulky v počtu, nepřiměřeném k rozsahu a obsahu textu.

Výsledky vyšetření v číselné podobě uvádějte v jednotkách SI normy, pouze hodnoty pulzu, teploty a krevního tlaku je možné uvádět v konvenčních jednotkách.

K počítačové tvorbě textu, tabulek a grafů lze použít kterýkoliv běžný textový a tabulkový editor; používejte přitom běžných typů písma a před odesláním zkontrolujte vytisknutím zkušební stránky, souhlasí-li písmo na obrazovce s interpretací písma tiskárnou. Pokud by byl autor nucen příspěvek vytvořit v méně běžném či neobvyklém počítačovém programu (např. na bázi MacOs či Unix), doporučuje se to předem s redakcí konzultovat. U grafů je vhodné dodat redakci i výchozí údaje ve formě tabulky; umožní to znovu vytvořit graf způsobem vyhovujícím technologii přípravy časopisu pro tisk. V technicky složitých či nejasných případech konzultujte grafické studio (Mgr. P. Fučík, pfck@bohem-net.cz).

Je-li k rukopisu připojena obrazová dokumentace, je nevhodnější použít originální fotografie, pérovky nebo diapositivy (uveďte vždy jméno autora snímku, obrázku apod.). Připomínáme, že s výjimkou obálky se veškeré ilustrace tisknou černobíle (ve stupních šedi), pro lepší výsledek jsou však s výhodou jako vstupní informace zpracovávány barevné podklady. Fotografie i další ilustrace lze dodat i v elektronické podobě. Před jejich zasláním však doporučujeme konzultovat s grafickým studiem, připravujícím časopis pro tisk (viz výše) zejména charakter zpracovávaných podkladů, způsob přípravy dat, rozměry ilustrace, barevný prostor, rozlišení, formát dat, velikost souboru, metodu ev. komprimace a způsob zaslání. Zásadně nevhodná forma pro obrazovou i jinou dokumentaci jsou prezentace ve formátu MS PowerPoint nebo z podobných programů.

Zařadí-li autor do rukopisu jakoukoliv dokumentaci nebo významnou partii textu, převzatou z jiné publikace, musí být pramen výslovně uveden

a předložen písemný souhlas autora a vydavatele původního pramene. Je výhradně záležitostí autora opatřit si potřebný souhlas a autor za to nese právní odpovědnost. Nejasnosti v tomto ohledu mohou být důvodem k odmítnutí práce.

Použije-li autor v textu zkratky, musí být příslušné výrazy poprvé použity v plném znění a následovány zkratkou uvedenou v závorce. Obsahuje-li text zkratek více, je alternativní možnost připojit jako zvláštní přílohu seznam použitých zkratek.

Názvy mikroorganismů se píše kurzívou, podle platného taxonomického zařazení. Poprvé uváděný název mikroorganismu musí být uveden v nezkrácené podobě (*Staphylococcus aureus*), při jeho opakování se použije zkrácená forma (*S. aureus*).

Názvy léků se uvádějí v generické formě; pouze v případě, chtějí-li autoři z jakéhokoliv důvodu zdůraznit, že šlo o konkrétní přípravek (např. při popisu nežádoucích účinků), uvede se kromě generického názvu též firemní označení a jméno výrobce.

Sdělení (platí pro klinické i laboratorní práce, pro psaný text, tabulky i obrazovou část) nesmí porušit anonymitu pacienta. Neuvádějte proto v textu jména ani iniciály nemocných, nemocniční a protokolová čísla apod.

Literární odkazy

Mají být číslovány v pořadí, v němž byly uvedeny poprvé v textu. Odkazy se udávají pomocí arabských číslic v hranaté závorce. Citace obsahuje a) příjmení a zkratky jmen prvních pěti autorů (je-li autorů šest a více, uvádí se jen první tři a zkratka „et al.“), b) plný název a případně podnázev práce v jazyku originálu, c) standardním způsobem zkrácený název časopisu, rok, svazek a stránkový rozsah. Inicialy prvních jmen autorů a zkratky názvu časopisu se píše bez teček, za znaky oddělovacími rok, ročník a stránky se nedělá mezera. Při úpravě citací jednotlivých typů dokumentů se řídte následujícími příklady:

Standardní článek v časopisu: Dlouhý P, Herold I, Kolář M, et al. Postavení linezolidu v léčbě rezistentních grampozitivních infekcí. *Klin Mikrobiol Inf Lék.* 2006;12(1):4–9.

Článek v supplementu časopisu: Křemen st J, Stříbrná J, Pavlíková A, et al. Metody molekulární biologie v dermatovenerologické diagnostice. *Prakt Lék.* 2005;85(Suppl 1):40–2.

Monografie (kniha): Wilson SJ. *Blood cultures.* 3rd ed. New York: Churchill Livingstone; 1992.

Kapitola v knize: Modr Z. *Základy farmakokinetiky antibiotik.* In: Vacek V, Hejzlar M (eds). *Chemoterapie infekčních nemocí v klinické praxi.* 1. vyd. Praha: Avicenum; 1988. s. 42–52.

Článek ve sborníku: Leib SL, Leppert D, Clements J, Lindberg RLP, Pfister LA, Täuber MG. Combined inhibition of tumor necrosis alpha converting enzyme and matrix metalloproteinases by BB1101 attenuates disease, mortality and brain damage in experimental bacterial meningitis (Paper 2044). *Abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy; 1999 September 26–29; San Francisco, USA.* Washington, DC: American Society for Microbiology; 1999.

CD-ROM (1 CD ze sady): Mildvan D. (editor). *AIDS (Vol. 1).* In: Mandell GL (editor-in-chief). *Atlas of Infectious Diseases on CD-ROM [CD-ROM].* London: Electronic Press Ltd.; 1996.

Článek z internetu: Scott LA, Stone MS. Viral exanthems. *Dermatol Online J.* 2003 Nov [cited 2004 Jan 10];9(3):4. Available from: <http://dermatology.cdlib.org/93/reviews/viral/scott.html>.

Příspěvky zasílejte na adresu:

Redakce časopisu KMIL, TRIOS, s. r. o.,
Zakouřilova 142, 149 00 Praha 4-Chodov
E-mail: redakce@trios.cz
Telefon: 267 912 030, fax: 267 915 563