



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA**  
**Ústav experimentální biologie**  
**Oddělení mikrobiologie a molekulární**  
**biotechnologie**

---



**Enteropatogenní *Yersinia* spp. –  
detekce, charakterizace a zdroje  
pro člověka**

Bakalářská práce

**Petra Parůžková**

**Vedoucí práce:**  
**MVDr. Alena Lorencová, Ph.D.**

**Brno 2014**

## Bibliografický záznam

<b>Autor:</b>	Petra Parůžková Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita Ústav experimentální biologie
<b>Název práce:</b>	Enteropatogenní <i>Yersinia</i> spp. – detekce, charakterizace a zdroje pro člověka
<b>Studijní program:</b>	Experimentální biologie
<b>Studijní obor:</b>	Speciální biologie směr Mikrobiologie a molekulární biotechnologie
<b>Vedoucí práce:</b>	MVDr. Alena Lorencová, Ph.D.
<b>Akademický rok:</b>	2013/2014
<b>Počet stran:</b>	62
<b>Klíčová slova:</b>	<i>Yersinia enterocolitica</i> ; <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> ; yersinióza; detekce; zdroje;

## Bibliographic Entry

**Author** Petra Parůžková  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** Enteropathogenic *Yersinia* spp. – detection, characterization and resources for human

**Degree programme:** Experimental Biology

**Field of Study:** Special Biology  
specialization Microbiology and Molecular Biotechnology

**Supervisor:** MVDr. Alena Lorencová, Ph.D.

**Academic Year:** 2013/2014

**Number of Pages:** 62

**Keywords:** *Yersinia enterocolitica*; *Yersinia pseudotuberculosis*; yersiniosis; detection; resources;

## **Abstrakt**

*Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* jsou významné zoonotické patogeny způsobující onemocnění u člověka i zvířat. Humánní yersinióza byla v roce 2011 čtvrtou nejčastěji hlášenou zoonózou v EU, přesto legislativa nepožaduje sledování těchto patogenů u zvířat ani v potravinách. Tato bakalářská práce shrnuje na základě literární rešerše dostupné informace o rodu *Yersinia*. Zaměřena je na enteropatogenní druhy, jejich charakterizaci, zdroje a způsoby detekce.

## **Abstract**

*Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are significant zoonotic pathogens causing diseases in both humans and animals. Despite the fact that human yersiniosis was the fourth most frequently reported zoonotic disease in the European Union in 2011, existing legislation does not require monitoring of these pathogens either in animals or in foodstuffs. This bachelor thesis presents available information on the genus *Yersinia* on the basis of a literature review. It focuses on the enteropathogenic species, their characterization, sources and detection methods.



**Vysoká škola:** Masarykova univerzita

**Ústav:** Ústav experimentální biologie

**Fakulta:** přírodovědecká

**Akademický rok:** 2013/2014



## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

**Bakalářský studijní program:** Experimentální biologie

**Studijní obor:** Speciální biologie, zaměření Mikrobiologie a molekulární biotechnologie

**Student(ka):** Petra Parůžková

Vedoucí bakalářské práce Vám ve smyslu zákona vlády ČR č. 111/1998 Sb., o státních závěrečných zkouškách a státních rigorózních zkouškách, určuje tuto bakalářskou práci:

**Název tématu:** Enteropatogenní *Yersinia* spp. – detekce, charakterizace a zdroje pro člověka

**Název tématu anglicky:** Enteropathogenic *Yersinia* spp. – detection, characterization and resources for human

**Vedoucí bakalářské práce:** MVDr. Alena Lorencová, Ph.D.

**Odborný konzultant:**

### Zásady pro vypracování

**Anotace:**

Yersinióza byla v roce 2011 čtvrtou nejčastěji hlášenou zoonózou v EU, přesto její sledování u zvířat ani v potravinách není legislativně požadováno. Nejčastějším původcem onemocnění člověka je *Y. enterocolitica*, v menší míře *Y. pseudotuberculosis*. Ne všechny kmeny *Y. enterocolitica* jsou patogenní, pro správnou interpretaci detekce je důležitá biotypizace, případně serotypizace izolátů. Za hlavní rezervoár jsou považována prasata, u kterých je tato bakterie přítomná zejména v mandlích a v obsahu střevním. Detekce v potravinách je poměrně náročná, dostupné metody ne vždy zachytí všechny pro člověka patogenní kmeny. Metody detekce pomocí PCR jsou citlivější, ale pozitivní výsledky je nutno potvrdit kultivačně s následnou charakterizací izolátů. Zdrojem onemocnění pro člověka jsou hlavně kontaminované potraviny (syrové vepřové maso, mléko, zelenina, ryby).

Náplní práce bude zpracování dostupných informací o *Yersinia* spp. se zaměřením na kmeny patogenní pro člověka, zdroje, způsoby detekce a charakterizace izolátů, včetně seznámení s laboratorním postupem detekce yersinií v reálných vzorcích.

Po formální stránce bude práce upravena dle Instrukcí pro vypracování bakalářské práce.

### Časový harmonogram řešení (postup):

1. Seznámení s tématem, započítí studia literatury – říjen 2013
2. Návrh obsahu chystané práce, společná diskuze – listopad 2013
3. Postupné naplňování obsahu kapitol, průběžné konzultace, doplňování literatury
4. Seznámení s laboratorním postupem detekce *Yersinia* spp. (kultivační techniky, charakteristika růstu na doporučených médiích, biochemické testy, metody detekce pomocí PCR), seznámení s postupem vyšetření reálných vzorků, obrazová dokumentace – leden-březen 2014
5. Sepsání práce, společné konzultace, doplnění obrázků a tabulek a odevzdání práce do 16.5. 2014

**Rozsah bakalářské práce:** 30 stran

**Rozsah grafických příloh:** min. 10 obrázků a tabulek

**Seznam odborné literatury:**

European Food Safety Authority; Technical specifications for harmonised national surveys of *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs on request of EFSA. EFSA Journal 2009; 7(11):1374. [23 pp.].  
doi:10.2903/j.efsa.2009.1374.

Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. The EFSA Journal (2007) 595, 1-30.

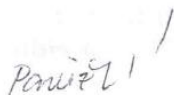
Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis.  
Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK.  
J Pathog. 2011;2011:182051. doi: 10.4061/2011/182051.

*Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* Detection in Foods.  
Fukushima H, Shimizu S, Inatsu Y.  
J Pathog. 2011;2011:735308. doi: 10.4061/2011/735308.

**Datum zadání bakalářské práce:** 2.10. 2013

**Termín odevzdání bakalářské práce:** do 16.5. 2014

V Brně dne: 10.10. 2013



podpis studenta



podpis vedoucího bakalářské práce



prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel ústavu

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat vedoucí bakalářské práce MVDr. Aleně Lorencové, Ph.D. za odbornou pomoc, cenné připomínky a čas, který mi při vytváření práce věnovala.

Práce byla vypracována na pracovišti Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, v.v.i. v Brně.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracovala samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

Brno 15. května 2014

.....  
Petra Parůžková

# OBSAH

<b>1. ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>2. CÍL PRÁCE</b> .....	<b>12</b>
<b>3. TAXONOMIE A CHARAKTERISTIKA</b> .....	<b>13</b>
3.1. TAXONOMIE RODU <i>YERSINIA</i> .....	13
3.2. CHARAKTERISTIKA RODU <i>YERSINIA</i> .....	13
3.2.1. MORFOLOGIE BUŇKY .....	13
3.2.2. METABOLISMUS .....	14
3.2.3. KULTIVACE A MORFOLOGIE KOLONIÍ .....	14
<b>4. ENTEROPATOGENNÍ YERSINIA SPP.</b> .....	<b>16</b>
4.1. <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> .....	16
4.1.1. CHARAKTERISTIKA DRUHU .....	16
4.1.2. BIOTYPIZACE A SÉROTYPIZACE .....	16
4.1.3. EKOLOGIE .....	18
4.2. <i>YERSINIA PSEUDOTUBERCULOSIS</i> .....	18
4.2.1. CHARAKTERISTIKA DRUHU .....	18
4.2.2. GENOTYPIZACE A SÉROTYPIZACE .....	18
4.2.3. EKOLOGIE .....	19
<b>5. PATOGENITA A VIRULENCE</b> .....	<b>20</b>
5.1. PATOGENITA YERSINIÍ .....	20
5.2. FAKTORY VIRULENCE .....	21
5.2.1. CHROMOZOMÁLNĚ KÓDOVANÉ FAKTORY VIRULENCE .....	21
5.2.2. FAKTORY VIRULENCE KÓDOVANÉ PLAZMIDEM PYV .....	23
5.3. HUMÁNNÍ YERSINIÓZA .....	24
5.3.1. INFEKCE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> .....	24
5.3.2. INFEKCE <i>Y. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> .....	26



<b>6. ANTIMIKROBIÁLNÍ TERAPIE A REZISTENCE</b>	
<b>ENTEROPATOGENNÍCH YERSINIÍ</b> .....	<b>27</b>
<b>7. EPIDEMIOLOGIE ENTEROPATOGENNÍCH YERSINIÍ</b> .....	<b>30</b>
7.1. INCIDENCE YERSINIÓZ .....	30
7.2. EPIDEMIE YERSINIÓZ .....	34
<b>8. ZDROJE ENTEROPATOGENNÍCH YERSINIÍ</b> .....	<b>35</b>
8.1. VÝSKYT YERSINIÍ U ZVÍŘAT .....	35
8.1.1. PREVALENCE U PRASAT .....	35
8.2. YERSINIE V POTRAVINÁCH .....	36
8.2.1. MASO A MASNÉ VÝROBKY .....	36
8.2.2. OSTATNÍ POTRAVINY .....	37
8.3. YERSINIE V PROSTŘEDÍ .....	38
8.4. MONITORING V EVROPĚ .....	38
<b>9. IZOLACE A DETEKCE ENTEROPATOGENNÍCH</b>	
<b>YERSINIÍ</b> .....	<b>41</b>
9.1. KONVENČNÍ KULTIVAČNÍ METODY .....	41
9.1.1. IZOLACE .....	41
9.1.2. VYOČKOVÁNÍ A IDENTIFIKACE CHARAKTERISTICKÝCH KOLONIÍ .....	42
9.1.3. KONFIRMACE .....	44
9.1.3.1. PŘEDBĚŽNÉ TESTY .....	45
9.1.3.2. BIOCHEMICKÉ A BIOTYPIZAČNÍ TESTY .....	45
9.1.3.3. SÉROTYPIZACE .....	47
9.2. MOLEKULÁRNĚ DIAGNOSTICKÉ METODY .....	47
9.2.1. MOLEKULÁRNÍ METODY DETEKCE <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> .....	47
9.2.1.1. METODY HYBRIDIZACE .....	47
9.2.1.2. PCR .....	48

9.2.2.	MOLEKULÁRNÍ METODY DETEKCE <i>Y. PSEUDOTUBERCULOSIS</i> .....	51
9.3.	OSTATNÍ METODY .....	52
<b>10.</b>	<b>ZÁVĚR</b> .....	<b>53</b>
<b>11.</b>	<b>SEZNAM LITERATURY</b> .....	<b>54</b>

# 1. Úvod

Alimentární nákazy z potravin rostlinného i živočišného původu jsou i přes veškeré úsilí o snížení jejich počtu stále aktuálním tématem, a proto je těmto onemocněním a jejich zdrojům věnována celosvětová pozornost. Důvodem, proč nedochází k poklesu, není nedostatečná účinnost opatření, ale spíše jejich potlačení jinými faktory, mezi které lze počítat vlastnosti samotných patogenů i změny ve stravovacích návycích populace nebo narůstající podíl imunologicky oslabených jedinců.

Yersinióza je gastrointestinální onemocnění u lidí, které patří k nejčastěji hlášeným zoonózám v Evropské unii. Původcem yersiniózy je bakterie *Y. enterocolitica*, méně často také *Y. pseudotuberculosis*. Onemocnění je obvykle charakterizováno akutní infekcí začínající ve střevech a rozšiřující se dále do mezenteriálních lymfatických uzlin. U imunokompromitovaných pacientů ale může dojít až k sepsi nebo chronickému onemocnění.

Enteropatogenní yersinie disponují mnoha virulenčními faktory, které se uplatňují v patogenezi onemocnění. Umožňují bakterii kolonizaci hostitelských buněk a potlačují imunitní odpověď napadeného organismu. Doposud nebyly objasněny funkce všech potenciálních virulenčních faktorů a jejich role v patogenezi je stále předmětem výzkumu.

Hlavním rezervoárem *Y. enterocolitica* jsou prasata a k nákaze dochází nejčastěji orální cestou prostřednictvím kontaminované potravy. Spektrum potravin, které mohou být zdrojem enteropatogenních yersinií je široké. Kromě vepřového masa a výrobků z něj to může být jehněčí, hovězí, ryby, mléčné výrobky nebo zelenina, která bývá nejčastějším zdrojem *Y. pseudotuberculosis*.

Detekce yersinií probíhá pomocí klasických kultivačních metod. Stále častěji se také využívají metody molekulární biologie, které umožňují mnohem rychlejší a přesnější detekci a identifikaci yersinií z klinických vzorků i ze vzorků potravin a prostředí.

## 2. Cíl práce

Cílem práce je literární rešerše na téma „Enteropatogenní *Yersinia* spp. – detekce, charakterizace a zdroje pro člověka“. V úvodních kapitolách této práce bude popsána taxonomie a základní charakteristika rodu *Yersinia*. Podrobněji budou rozebrány dva enteropatogenní druhy - *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*. Kromě jejich charakteristiky, včetně faktorů virulence a antibiotické rezistence izolátů, bude popsána patogeneze onemocnění a nejčastější zdroje nákazy pro člověka. Práce přiblíží epidemiologickou situaci posledních let v Evropě a budou popsány způsoby detekce enteropatogenních yersinií.

## 3. Taxonomie a charakteristika

### 3.1. Taxonomie rodu *Yersinia*

Rod *Yersinia* navrhnul van Loghem v roce 1944 v rámci přeřazení *Y. pestis* a *Y. pseudotuberculosis* z rodu *Pasteurella* z důvodu odlišných fenotypových a genotypových charakteristik (Euzéby 2014). Rod byl pojmenován podle francouzského vědce a mikrobiologa A. J. E. Yersina, který v roce 1894 v Hong Kongu společně s Shibasaburo Kitasatou poprvé izoloval a identifikoval *Y. pestis* (dříve „*Pasteurella pestis*“) jako původce dýmějového moru (Fàbrega a Vila 2012).

Rod *Yersinia* patří do čeledi *Enterobacteriaceae*. Bylo zjištěno, že tDNA (transférová deoxyribonukleotidová kyselina) je u *Escherichia coli* a *Y. pestis* shodná z 63%. Fyziologické charakteristiky *Yersinia* spp. a stejně tak obsah mastných kyselin jsou podobné jako u ostatních rodů čeledi *Enterobacteriaceae* (Bottone a kol. 2005).

doména: *Bacteria*

kmen: *Proteobacteria*

třída: *Gammaproteobacteria*

řád: *Enterobacteriales*

čeleď: *Enterobacteriaceae*

rod: *Yersinia*

V současné době je v rámci rodu *Yersinia* validně popsáno 18 druhů a 3 poddruhy. Kromě patogenních druhů *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica*, to jsou *Y. aldovae*, *Y. aleksiciae*, *Y. bercovieri*, *Y. entomophaga*, *Y. frederiksenii*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. massiliensis*, *Y. mollaretii*, *Y. nurmii*, *Y. pekkanenii*, *Y. philomiragia*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri* a *Y. similis*, které lze považovat za nepatogenní nebo podmíněně patogenní organismy. Typovým druhem je *Y. pestis* (Fàbrega a Vila 2012, Euzéby 2014).

### 3.2. Charakteristika rodu *Yersinia*

#### 3.2.1. Morfologie buňky

Yersinie jsou gramnegativní velmi krátké tyčky až kokotyčky. Jsou uspořádány jednotlivě, ve dvojicích, ve shlucích a mohou tvořit i krátké řetězky. Pro některé druhy (např. *Y. pestis*) je typické polární barvení (Greenwood a kol. 1999). Jejich velikost se pohybuje v rozmezí  $0,5-0,8 \times 1-3 \mu\text{m}$ , jsou nespořadující a netvoří pouzdra.

Yersinie jsou pohyblivé při teplotě do  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  díky peritrichálním bičíkům. Při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  bakterie bičiky ztrácejí a stávají se nepohyblivými. Výjimkou je *Y. pestis*, která je vždy nepohyblivá (Fàbrega a Vila 2012).

### **3.2.2. Metabolismus**

Yersinie se svým metabolismem příliš neliší od ostatních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Jsou to fakultativní anaerobové s respiratorním i fermentativním typem metabolismu. Okyselují glukózu, většina druhů hydrolyzuje močovinu, dekarboxyluje ornitin a redukuje nitráty. Biochemické vlastnosti jsou často teplotně závislé a jsou lépe vyjádřené při teplotě  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ . Zástupci rodu *Yersinia* nejsou hemolytičtí ani proteolytičtí s výjimkou *Y. ruckeri* s enzymem želatinázou a některých kmenů *Y. pestis* s koagulázovou aktivitou. Teplotní optimum je pro yersinie  $28-29 \text{ }^\circ\text{C}$ , ale jsou schopny růstu v rozmezí  $0-45 \text{ }^\circ\text{C}$ . Fenotypové vlastnosti jsou nejvíce charakteristické při teplotě  $28-29 \text{ }^\circ\text{C}$  a při teplotě  $35-37 \text{ }^\circ\text{C}$  (Bottone a kol. 2005).

### **3.2.3. Kultivace a morfologie kolonií**

Kultivační náročnost yersinií je obdobná jako u ostatních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Rostou na většině běžných mikrobiologických půd a v širokém teplotním rozmezí od  $0$  až po  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Právě schopnost růstu při chladničkové teplotě je považována za důležitý diagnostický znak. Selektivita kultivačních médií může být zvýšena také přidáním některých antibiotik. Příkladem je půda CIN s přídavkem cefsulodinu, Irgasanu a novobiocinu, která se používá pro detekci *Y. enterocolitica* (Votava 2003).

Na živném agaru při teplotě  $25-37 \text{ }^\circ\text{C}$  vytváří yersinie dobře viditelné kolonie o průměru  $1,0-1,5 \text{ mm}$  po 24 hodinové kultivaci a  $2-3 \text{ mm}$  po 48 hodinách. Kolonie jsou průsvitné, hladké a kulaté s nepravidelným okrajem. Při delší kultivaci se střed kolonie vyvyšuje, okraje jsou pravidelné a tvarem tak připomíná čínský klobouk. Vzhled kolonií *Y. pestis* se od ostatních odlišuje. Po 24 hodinové kultivaci vytváří drobné kolonie, které jsou velmi špatně viditelné pouhým okem. Po 48 hodinách dosahují kolonie průměru

1,0-1,5 mm, jsou hladké, neprůhledné, s nepravidelnými okraji a máslovitým vzhledem (Bottone a kol. 2005).

## 4. Enteropatogenní *Yersinia* spp.

### 4.1. *Yersinia enterocolitica*

#### 4.1.1. Charakteristika druhu

*Y. enterocolitica* byla poprvé popsána jako „*Bacterium enterocoliticum*“ v roce 1939 (Schleifstein a Coleman 1939). Do rodu *Yersinia* byla přeřazena v roce 1964 na základě výsledků sekvenování genu pro 16S rRNA (ribosomální ribonukleotidová kyselina; Frederiksen 1964). *Y. enterocolitica* má dva poddruhy – *Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* a *Y. enterocolitica* subsp. *palaearctica* (Neubauer a kol. 2000).

*Y. enterocolitica* je fakultativně anaerobní, psychrotrofní bakterie, která je schopna růstu v teplotním rozmezí 0-42 °C, s optimem mezi 28-29 °C. Je značně odolná vůči nízkým teplotám a je schopna dlouhodobě přežít ve zmražených potravinách. Oproti tomu teploty nad 60 °C ji spolehlivě devitalizují. Růst bakterie je také podmíněn hodnotou pH (neroste při pH menším než 4,2 a vyšším než 9). *Y. enterocolitica* je slabě halotolerantní a je schopná růstu v prostředí s obsahem do 5 % NaCl (Fernandes 2009). Charakteristická je pro ni hydrolýza močoviny (Votava 2003), ze sacharidů fermentuje glukózu, sacharózu, celobiózu, kromě toho dekarboxyluje ornitin a produkuje acetoin. Těmito vlastnostmi je *Y. enterocolitica* odlišitelná od blízce příbuzných druhů (Bottone 1997).

#### 4.1.2. Biotypizace a sérotypizace

Kmeny *Y. enterocolitica* tvoří svými biochemickými a antigenními vlastnostmi heterogenní skupinu bakterií. Kmeny jsou tradičně děleny do šesti biotypů - 1A, 1B, 2, 3, 4 a 5 (Tabulka 1). Toto členění navrhl poprvé B. Niléhn a je založeno na základě výsledků několika biochemických reakcí, např. produkce indolu nebo oxidace laktózy. Biotypizační schéma bylo později mírně upraveno a zjednodušeno do dnešní podoby (Wauters a kol. 1987).

Kmeny biotypů 1B a 2 - 5 jsou patogenní a souvisejí s onemocněním lidí i zvířat. Mohou nést plazmid virulence pYV a několik chromozomálně kódovaných faktorů virulence (Fàbrega a Vila 2012). Kmeny, které patří k biotypu 1A, plazmid pYV nemají a jsou obecně považovány za nepatogenní. Některé studie ovšem uvádějí, že tyto kmeny



mohou vystupovat jako oportunní patogeny a vyvolávat gastrointestinální onemocnění (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2006).

*Y. enterocolitica* subsp. *enterocolitica* je tvořena biotypem 1B, který je vysoce patogenní a je také označován jako severoamerický, *Y. enterocolitica* subsp. *paleoartica* zahrnuje biotypy 1A, 2, 3, 4 a 5, tyto byly izolovány celosvětově (Neubauer a kol. 2000).

*Y. enterocolitica* a příbuzné druhy se dělí sérologicky na základě lipopolysacharidových O somatických antigenů. V současné době rozeznáváme více než 57 sérotypů, ne všechny však způsobují onemocnění člověka a zvířat. Patogenní kmeny *Y. enterocolitica* nejčastěji patří k sérotypům O:3; O:5,27; O:8 a O:9. Většina evropských kmenů spojovaných s infekcemi u lidí je sérotypu O:3 (biotyp 4) a O:9 (biotyp 2), ve Spojených státech amerických je nejčastějším sérotypem O:8 (biotyp 1B; EFSA (European Food Safety Authority) 2007, Fàbrega a Vila 2012).

**Tabulka 1.** Potencionální patogenita biotypů a vybraných sérotypů *Y. enterocolitica* (upraveno podle: EFSA 2007).

BIOTYP	SÉROTYP	VIRULENCE	VÝSKYT V EVROPSKÉ UNII	FAKTORY PATOGENITY	
				pYV	HPI
<b>1B</b>	O:8; O:21; O:13; O:7 atd.	HP	≈0	ano	ano
<b>2</b>	O:9; O:5,27	P	++/+++	ano	ne
<b>3</b>	O:1,2,3; O:3; O:5,27;	P	+	ano	ne
<b>4</b>	O:3	P	++++	ano	ne
<b>5</b>	O:3; O:2,3	P	≈0	ano	ne
<b>1A</b>	O:8; O:5; O:13; O:7 atd.	NP	++++	ne	ne

HPI high pathogenicity island; pYV plasmid for *Yersinia* virulence; HP high pathogenicity; P pathogenicity; NP non pathogenicity

### 4.1.3. Ekologie

*Y. enterocolitica* je bakterie široce rozšířená v přírodě. Její výskyt je spojen jak s intestinálním traktem řady savců, ptáků a studenokrevných živočichů, tak i s terestrickými a vodními nikami. Hlavním rezervoárem kmenů patogenních pro člověka jsou prasata (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2006).

## 4.2. *Yersinia pseudotuberculosis*

### 4.2.1. Charakteristika druhu

*Y. pseudotuberculosis* je nejbližší příbuzná s *Y. pestis*. Zatímco *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* se od sebe vývojově oddělily před 41 až 186 milióny lety, *Y. pestis* se odlišila od *Y. pseudotuberculosis* teprve před 1500 až 20 000 lety (Bi a kol. 2012). Na základě DNA hybridizace bylo zjištěno, že kmeny *Y. pseudotuberculosis* a *Y. pestis* jsou si navzájem podobné z více než 90 % a měly by být tedy považovány za dva samostatné poddruhy jednoho druhu. Vzhledem k tomu, že byla jako první pojmenována *Y. pseudotuberculosis*, bylo doporučeno pojmenování poddruhů jako *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pseudotuberculosis* a *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pestis* (Bercovier a kol. 1980). V současnosti je poddruh *Y. pseudotuberculosis* subsp. *pestis* uveden v *Nomina rejicienda*, protože by mohlo snadno dojít k záměně obou bakterií a mohlo by tak být ohroženo lidské zdraví. Používají se proto původní názvy *Y. pestis* a *Y. pseudotuberculosis* (Euzéby 2014).

*Y. pseudotuberculosis* se svým vztahem ke kyslíku a teplotním rozmezím růstu neliší od výše popsané *Y. enterocolitica*. Toleruje hodnoty pH od 5 do 9,6 s optimem 7,2-7,4 a je schopna růst na médiu s obsahem NaCl do 3,5 %. Z cukrů fermentuje např. glukózu, melibiózu, rhamnózu, xylózu, hydrolyzuje eskulin, má pozitivní test na ureázu a negativní ornitin dekarboxylázu. Na základě těchto i dalších biochemických testů ji můžeme odlišit od ostatních zástupců rodu *Yersinia* (Bottone a kol. 2005).

### 4.2.2. Genotypizace a sérotypizace

Kmeny *Y. pseudotuberculosis* jsou na rozdíl od kmenů *Y. enterocolitica* více homogenní a všechny kmeny jsou potencionálně patogenní (Fredriksson-Ahomaa 2012).

Kmeny *Y. pseudotuberculosis* se dělí do šesti genetických skupin 1-6. Antigenní systém *Y. pseudotuberculosis* se skládá z patnácti hlavních termostabilních sérotypů (O1-O15), deseti subtypů a pěti termolabilních bičíkových H antigenů. Sérotypy O1-O5 jsou téměř vždy patogenní a jejich izoláty pochází zejména z Evropy a ze zemí Dálného východu. Zbývajících deset sérotypů bylo izolováno z prostředí i ze zvířat, ale nikdy z humánních klinických vzorků (Ch'ng a kol. 2011). Některé sérotypy se dále dělí na subtypy. V současnosti jsou známe subtypy O1a, O1b, O1c, O2a, O2b, O2c, O4a, O4b, O5a a O5b (Fredriksson-Ahomaa 2012).

Sérotypy i subtypy jsou variabilní z hlediska geografické distribuce i z hlediska stupně patogenity, který souvisí s velikostí a přítomností ostrova patogenity (HPI). Kompletní a neporušený ostrov vysoké patogenity obsahují pouze kmeny sérotypu O1. U sérotypu O3 je HPI zkrácený a u všech ostatních doposud zkoumaných kmenů *Y. pseudotuberculosis* zcela chybí (Bottone a kol. 2005, Galindo a kol. 2011).

Genetická skupina 3 (typ systémového patogenu Dálného východu)/sérotypy 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 8, 10 a 15 jsou humánní patogeny rozšířené především v Japonsku, Číně a Koreji. Genetická skupina 2 (typ gastroenterického patogenu Evropy)/sérotypy 1a a 1b a genetická skupina 5/sérotyp O:3 jsou humánními patogeny v Západní Evropě (Fukushima a kol. 2011).

#### **4.2.3. Ekologie**

*Y. pseudotuberculosis* je celosvětově rozšířený mikroorganismus. Byla zjištěna v půdě i v mezenteriálních lymfatických uzlinách, slezině nebo v játrech u mnoha živočišných druhů (zejména u hlodavců a ptáků) včetně člověka. Volně žijící zvířata jsou většinou asymptomatickými nosiči a považujeme je za hlavní rezervoár bakterií. Například v Japonsku jsou za jeden ze zdrojů onemocnění člověka považováni psi a kočky (Bottone a kol. 2005).

## 5. Patogenita a virulence

### 5.1. Patogenita yersinií

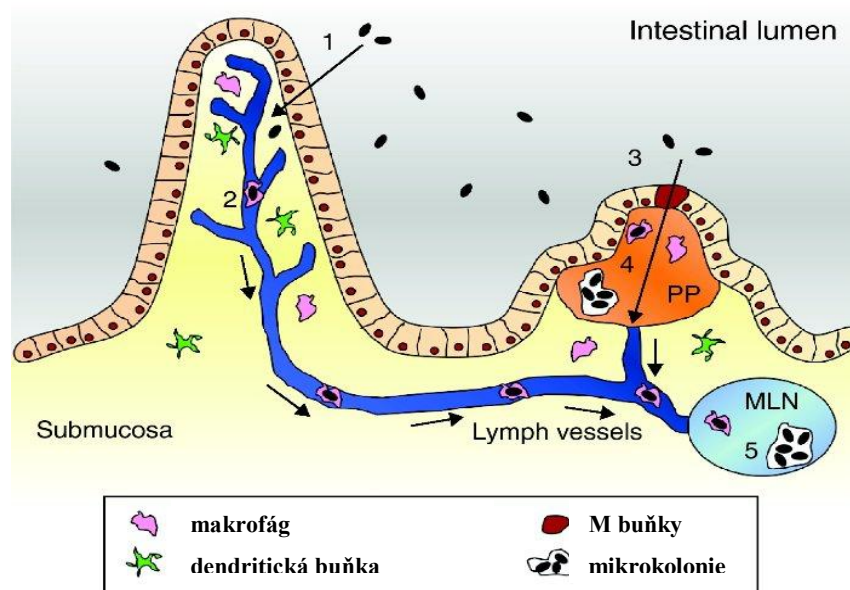
Na rozdíl od *Y. pseudotuberculosis* nejsou všechny kmeny *Y. enterocolitica* považovány za potenciální patogeny. Posouzení patogenity je důležité, neboť většina izolátů z prostředí, potravin a od asymptomatických nositelů není patogenních a nemají tedy žádný klinický význam (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

*Y. enterocolitica* je významný zoonotický patogen, který může způsobovat yersiniózu u zvířat i u lidí (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2006). Do těla se dostává prostřednictvím kontaminované potravy, vody nebo i přímo prostřednictvím krevní transfúze (Stenhouse a Milner 1982, Bottone 1997). Po pozření kolonizuje *Y. enterocolitica* střevní trakt, zejména distální část tenkého střeva (terminální ileum) a proximální část střeva tlustého. V souvislosti s tím se i většina patologických účinků a následně klinických příznaků projevuje v této oblasti (Bottone 1997). Kromě člověka postihuje onemocnění také evropskou populaci zajíců a byla taktéž zjištěna u činčil, zajíců sněžných, ondatery a kanárků (Langford 1972).

*Y. pseudotuberculosis* je zodpovědná za epizootické nákazy mnoha živočišných druhů, hlavně hlodavců, zajíců, jelenů, hospodářských zvířat a divokých i domestikovaných ptáků. U člověka je onemocnění způsobené *Y. pseudotuberculosis* vzácné, většina případů humánní yersiniózy je připisována enteropatogenním kmenům *Y. enterocolitica*. Přenos bakterií probíhá fekálně-orální cestou (Fredriksson-Ahomaa 2012, Wunderink a kol. 2014).

Virulentní yersinie překonávají střevní lumen a adherují ke sliznici tenkého střeva (Obrázek 1). Bylo zjištěno, že bakterie se přednostně vážou k M buňkám Peyerových plátů a jejich prostřednictvím pronikají přes střevní epitel do lamina propria. V této první fázi infekce využívají bakterie proteiny YadA, Ail a invasin, který reaguje s  $\beta$ 1-integrinovými receptory na lumenální straně M buněk, což vede k internalizaci bakterií. Ve folikulech Peyerových plátů se bakterie pomnožují a následně se mohou šířit i do dalších lymfatických tkání, např. do mezenterálních lymfatických uzlin, kde způsobují lymfadenitidu (Grützkau a kol. 1990, Pepe a Miller 1993, Grassl a kol. 2003). Poměrně časté je také šíření prostřednictvím makrofágů krevním řečištěm do jater a sleziny.

V Peyerových plátech, mezenteriálních lymfatických cévách, játrech či slezině dochází k extracelulární replikaci bakterií a k formování mikroabscesů (Trülzsch a kol. 2007).



**Obrázek 1.** Model patogeneze onemocnění způsobeného *Y. enterocolitica*.

(1) Buňky yersinií přecházejí přes střevní epitel do submukózy. (2) Bakterie jsou pohlceny makrofágy přítomnými v submukóze a jejich prostřednictvím vstupují do lymfatických cév a mezenteriálních lymfatických uzlin (MLN). (3) Bakterie mohou procházet také přes M buňky Peyerových plátů (PP). (4) V Peyerových plátech se yersinie začínají replikovat a tvoří mikrokolonie. (5) Bakterie mohou z Peyerových plátů vstupovat opět do mezenteriálních lymfatických uzlin (upraveno podle Fàbrega a Vila 2012).

## 5.2. Faktory virulence

Enteropatogenní yersinie produkují celou řadu faktorů virulence, kódovaných geny chromozomálními nebo plazmidovými, které zprostředkovávají bakteriální adhezi, invazi a kolonizaci hostitelských buněk. Kromě toho umožňují bakteriální růst, přežívání uvnitř makrofágů, devitalizaci makrofágů a neutrofilů a sérovou rezistenci (Galindo a kol. 2011, Cupáková a Necidová 2013).

### 5.2.1. Chromozomálně kódované faktory virulence

Mezi chromozomálně kódované faktory virulence patří např. invasin, Ail protein, enterotoxin a siderofory (Fàbrega a Vila 2012).

## **Invasin**

Invasin je nefimbriální adhesin, který je důležitý zejména v první fázi infekce. Jedná se o vysoce afinitní ligand pro  $\beta$ 1-integriny a je zodpovědný za translokaci bakterií přes M buňky Peyerových plátů (Grassl a kol. 2003). Je chromozomálně kódovaný genem *inv*, který je přítomen u invazivních i neinvazivních izolátů, ale ne vždy je exprimován (Fàbrega a Vila 2012).

## **Ail**

Ail protein (attachment-invasion locus) je spojený s virulencí yersinií. Původně byl tento protein identifikován pouze u patogenních zástupců *Yersinia* spp. (Miller a Falkow 1988), pozdější výzkumy prokázaly přítomnost *ail* genu i u druhů, které jsou považovány za nepatogenní (Cheyne a kol. 2010). Podílí se opět na procesu adheze a invaze a umožňuje yersiniím přežít mimo hostitelskou buňku (Fàbrega a Vila 2012).

## **Yst**

*Y. enterocolitica* na rozdíl od *Y. pseudotuberculosis* produkuje také termostabilní enterotoxin, označovaný jako Yst. Přítomnost toxinu by mohla vysvětlovat, proč jsou gastroenteritidy způsobené *Y. enterocolitica* mnohem závažnější než v případě *Y. pseudotuberculosis*. Role enterotoxinu v etiologii průjmových onemocnění je ale zatím stále nejasná, vyskytuje se u izolátů z klinických vzorků i z prostředí (Bliska a kol. 2006, Fàbrega a Vila 2012). Enteropatogenní kmeny *Y. enterocolitica* produkují enterotoxin označovaný jako YstA, který může přispívat k patogenezi průjmu při akutní yersinióze, YstB je enterotoxin produkovaný zejména kmeny *Y. enterocolitica* biotyp 1A, běžně považovanými za nepatogenní. Singh a Viridi (2004) však ve své studii prokázali, že gen *ystB* je u těchto kmenů často přítomný a jeho exprese může být indukována působením vhodného pH v prostředí ilea. To naznačuje, že toxin YstB je důležitým faktorem virulence, který je pravděpodobně odpovědný za virulenci a patogenitu kmenů *Y. enterocolitica* biotyp 1A.

## **Ybt**

Yersiniabactin patří mezi heterocyklické siderofory a je přítomný u patogenních yersinií a také u některých kmenů enteropatogenní *Escherichia coli*. Siderofory jsou chemicky různorodou skupinou nízkomolekulárních sekundárních metabolitů, využívané bakteriemi k získávání a vazbě železitých iontů z prostředí nebo z hostitelské

buňky (Fernández a kol. 2004). Yersiniabactin tedy usnadňuje vychytávání železa, které je nezbytné pro množení bakterií a navíc brání imunitním efektorovým buňkám produkovat reaktivní formy kyslíku s baktericidním účinkem (Paauw a kol. 2009).

### **HPI**

High Pathogenicity Island (HPI), neboli ostrov vysoké patogenity je součástí chromozómu u vysoce patogenních druhů *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* biotyp 1B. Geny umístěné v tomto místě chromozómu kódují proteiny, které se účastní biosyntézy, transportu a regulace sideroforu yersiniabactinu. Patří mezi ně např. geny *psn*, *irp1*, *irp2*, *ybtP* a *ybtQ* (Galindo a kol. 2011).

### **Myf operon**

Na chromozómu lokalizovaný operon *myf* nese geny označené jako *myfA*, *myfB* a *myfC*, které kódují proteiny tvořící fibrilární strukturu velmi podobnou fimbriím CS3 enterotoxigenní *E. coli* (ETEC). *MyfA* tvoří hlavní podjednotku této fibrilární struktury, vedlejší podjednotka je tvořena putativním chaperonem *MyfB* a membránovým „usher“ proteinem *MyfC*. U *Y. pseudotuberculosis* je homologem *myf* operonu lokus *psa*, jemuž je připisována role v termo-indukovatelné vazbě a hemaglutinaci. Nicméně *myf* operon *Y. enterocolitica* nezprostředkovává hemaglutinaci a jeho další úloha při patogenezí je prozatím nejasná (Fàbrega a Vila 2012).

### **5.2.2. Faktory virulence kódované plazmidem pYV**

Patogenita u yersinií je nejčastěji spojená s plazmidem virulence pYV (plasmid for *Yersinia* virulence) o velikosti 70-75 kb, který nesou patogenní druhy *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica*. Plazmid pYV je nezbytný pro rozmnožení bakterie v lymfatické tkáni a nepatogenní kmeny jej postrádají. Jeho přítomnost je nestálá, ke ztrátě plazmidu může dojít např. při laboratorním pasážování kmene (Fredriksson-Ahomaa 2012).

Plazmid pYV kóduje sekreci proteinů nazývaných souhrnně Yops (*Yersinia* outside proteins) a produkci dvou proteinů vnější membrány, tzv. *YadA* a *YlpA*. Jsou zde také lokalizovány geny, které se často využívají pro detekci enteropatogenních yersinií pomocí molekulárně-biologických metod (*rfaC* a *virF*).

## Yops

Geny *yop*, lokalizované na plazmidu pYV, kódují nejméně 14 proteinů, které byly původně popsány jako *Yersinia* outer membrane proteins (Yops), tedy proteiny vnější membrány (Portnoy a kol. 1981). V současnosti jsou považovány za vylučované proteiny, díky nimž yersinie odolávají nespecifické imunitní odpovědi hostitele (Cornelis 1998). Yops proteiny chrání yersinie před makrofágy zničením jejich fagocytárních a signalizačních schopností a nakonec indukci apoptózy. Pomocí sekrečního systému typu III se dostávají tyto proteiny do cytosolu hostitelské buňky. Translokátorové Yops destabilizují buněčnou membránu hostitele a působí jako chaperony pro efektorové Yops. Tyto poté blokují schopnost hostitelské buňky reagovat na infekci a podporují tak intracelulární přežívání bakterií (Cornelis 2006).

Expresi genů *yop* je závislá na teplotě a koncentraci vápenatých iontů. Při teplotě 37 °C v prostředí zbaveném  $\text{Ca}^{2+}$  iontů dochází k zastavení růstu yersinií, maximální expresi genů *yop*, a tedy k sekreci proteinů Yops (Cornelis 1998).

## YadA a YlpA

YadA (*Yersinia* adhesion A protein) je trimerní autotransportní protein vnější membrány, který zprostředkovává bakteriální adhezi a pronikání do hostitelských buněk a současně umožňuje bakterii odolávat imunitní odpovědi hostitele. YlpA (*Yersinia* lipoprotein A) je lipoprotein kódovaný plazmidem, který nese operon určující rezistenci k arzeniu pomocí specifické aniontové pumpy.

Kromě výše zmíněných genů je na plazmidu pYV lokalizován také gen *rfbC*, který je využíván při identifikaci patogenních kmenů *Y. enterocolitica* a gen *virF* (*lcrF* u *Y. pseudotuberculosis*) využitelný pro průkaz přítomnosti pYV plazmidu pomocí molekulárně-biologických metod (Thisted Lambertz a Danielsson-Tham 2005).

## 5.3. Humánní yersinióza

### 5.3.1. Infekce *Y. enterocolitica*

*Y. enterocolitica* je hlavním původcem onemocnění zvaného yersinióza, pro které je typický fekálně-orální přenos (El-Maraghi a Mair 1979). K infekci dochází nejčastěji



prostřednictvím kontaminované potravy a vody. Humánní infekce způsobené *Y. enterocolitica* se obecně spojují s konzumací syrového nebo nedostatečně tepelně opracovaného vepřového masa. Blízké příbuzná *Y. pseudotuberculosis* také způsobuje yersiniózu, ale tyto infekce jsou méně časté. Yersinióza je celosvětově rozšířená, často se vyskytuje i v evropských zemích (Bottone 1999).

*Y. enterocolitica* je především gastrointestinální patogen, který u rizikových skupin pacientů může způsobovat i extraintestinální infekce. Onemocnění se vyskytuje u všech věkových skupin, ale klinické příznaky jsou mnohem častěji pozorovány u dětí a dospívajících osob, s asymptomatickým průběhem infekce se setkáváme spíše u dospělých jedinců (Bottone 1999).

Nejčastějšími projevy infekce jsou enteritida, enterokolitida, akutní mezenterální lymfadenitida a terminální ileitida imitující apendicitidu. Klinická manifestace onemocnění je závislá na věku a fyzické kondici pacienta, zdravotním stavu a v neposlední řadě také na biosérotypu *Y. enterocolitica*. Infekční dávka je obvykle vysoká:  $10^7$  -  $10^9$  bakterií a nástup onemocnění je obvykle 24-48 hodin po požití kontaminované potravy (Drummond a kol. 2012). U kojenců a dětí je typický vodnatý průjem, který může být i krvavý, doprovázený zvracením a horečkou. Onemocnění u nich trvá v průměru 3-28 dní. U dospělých se příznaky projevují po dobu 1-2 týdnů a jedná se nejčastěji o horečku, průjemy a bolesti břicha lokalizované v pravém dolním kvadrantu (Lee a kol. 1990, Bottone 1997, 1999).

K sepsi může dojít u imunokompromitovaných pacientů, jedinců přijímajících velké dávky přípravků obsahujících železo a u těch, kteří trpí některým z predispozičních onemocnění. U zdravých jedinců je sepse poměrně vzácná. Klinický obraz septikémie může zahrnovat tvorbu abscesů v játrech a slezině, faryngitidu, pneumonii, septickou artritidu, meningitidu, empyému a osteomyelitidu a může přecházet až v endokarditidu. Někdy se mohou objevit i dlouhodobější následky způsobené yersiniózou, a to reaktivní artritidy hlavně u pacientů s pozitivní rizikovou alelou HLA-B27 (Human Leukocyte Antigen; Bottone 1997, 1999).

Rozsah patologických změn v trávicím traktu závisí do značné míry také na sérotypu *Y. enterocolitica*. Za nejvíce patogenní je považován biotyp 1B, sérotyp O:8, vyskytující se především v USA. Onemocnění způsobené tímto biosérotypem má nejzávažnější následky včetně rozsáhle ulcerace tenkého střeva a možné smrti pacienta. Yersinióza je

však v evropských zemích nejčastěji vyvolána sérotypy O:3 a O:9 (biotyp 4 respektive 2), které nezpůsobují tak závažné klinické příznaky (Fàbrega a Vila 2012).

U zdravých jedinců onemocnění většinou spontánně odezní, u imunitně oslabených pacientů však může úmrtnost dosahovat až 50 %, a to především v důsledku systémového rozšíření bakterií (Cover a Aber 1989).

### **5.3.2. Infekce *Y. pseudotuberculosis***

*Y. pseudotuberculosis* je významný původce onemocnění zvířat a u člověka se vyskytuje spíše vzácně. Je stejně jako *Y. enterocolitica* rozšířená v zemích s chladnějším podnebím a hlavními rezervoáry jsou zvířata a prostředí. Humánní infekce způsobené *Y. pseudotuberculosis* jsou spojeny s konzumací syrové zeleniny a kontaminované vody. Významný je sezónní výskyt onemocnění, incidence yersiniózy stoupá v chladnějších měsících roku (Ch'ng a kol. 2011, Fredriksson-Ahomaa 2012).

*Y. pseudotuberculosis* je intracelulární parazit a podobně jako *Y. pestis* napadá lymfatický systém (Bottone a kol. 2005). Inkubační doba onemocnění je 3-7 dní. Klinickými projevy infekce jsou obvykle mezenteriální lymfadenitidy s tvorbou abscesů a průjmy, ale může docházet také k sekundárním komplikacím, např. k perforaci, invaginaci nebo nekróze střevní tkáně, ulceraci terminálního ilea a přilehlé části tlustého střeva, trombóze mezenteriálních cév, septicémií a ve vzácných případech až k akutnímu selhání ledvin. U pacientů s yersiniózou způsobenou *Y. pseudotuberculosis* byly zaznamenány i případy gastrointestinálního krvácení. Jako výsledek imunologické reakce se mohou i několik týdnů po odeznění onemocnění objevit další komplikace, např. reaktivní artritida nebo erythema nodosum a yersinióza může mít spojitost i s Kawasakiho nemocí (Galindo a kol. 2011, Wunderink a kol. 2014). Infekce způsobená *Y. pseudotuberculosis* může být zaměněna s apendicitidou, terminální ileitidou, nádorovými lézemi či s Crohnovou chorobou (Galindo a kol. 2011).

Podobně jako u *Y. enterocolitica* onemocnění nejčastěji odezní bez vážnějších komplikací, ale pokud ve vzácných případech dojde k sepsi, úmrtnost může dosahovat až 75 %. Predispozičními faktory pro závažné případy yersiniózy jsou diabetes mellitus, jaterní cirhóza a hemochromatóza (Wunderink a kol. 2014).

## 6. Antimikrobiální terapie a rezistence enteropatogenních yersinií

Velká část gastrointestinálních onemocnění způsobených enteropatogenními kmeny yersinií probíhá bez závažných komplikací. U imunokompetentních osob obvykle infekce nevyžaduje antibiotickou terapii. Doporučena je jen podpůrná péče se správnou výživou a hydratací. Antibiotika jsou používána při léčbě enterokolitid u imunokompromitovaných pacientů a v případě septikémie nebo invazivní formy onemocnění, kdy může mortalita dosahovat až 50 % (Fàbrega a Vila 2012).

U zástupců *Yersinia* spp. je *in vitro* pozorována citlivost na tetracyklin, chloramfenikol, aminoglykosidy (amikacin, streptomycin, gentamycin, kanamycin, neomycin), sulfonamidy (samostatně, nebo v kombinaci s trimethoprimem), aztreonam a fluorochinolony. *Y. pseudotuberculosis* je citlivá také na většinu  $\beta$ -laktamových antibiotik, ale k penicilinu je její citlivost nižší. U *Y. pseudotuberculosis* i *Y. enterocolitica* byla zjištěna rezistence k ampicilinu a streptomycinu. Kromě toho jsou yersinie rezistentní k erytromycinu a novobiocinu (Bottone a kol. 2005, Fàbrega a Vila 2012).

*Y. enterocolitica* je rezistentní na penicilin a cefalosporiny 1. generace, k cefalosporinům 3. generace je citlivost zachována (Fàbrega a Vila 2012). Charakteristická odolnost vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům je dána přítomností dvou chromozomálně kódovaných genů, *blaA* a *blaB*, kódujících konstitutivně exprimovanou beta-laktamázu třídy A (působí na ampicilin, carbenicilin, penicilin a cefalosporiny) a indukovatelnou beta-laktamázu třídy C, působící pouze na cefalosporiny a penicilin. Hydrolyza  $\beta$ -laktamových antibiotik pomocí beta-laktamáz patří mezi nejčastější mechanismy rezistence u klinicky významných gramnegativních bakterií (Bush a kol. 1995). Rozdílná exprese a aktivita těchto dvou enzymů určuje úroveň a spektrum rezistence. Stupeň rezistence závisí také na teplotě, biotypu a sérotypu *Y. enterocolitica*. Např. oba enzymy, BlaA i BlaB, jsou produkovány převážně u izolátů patřících k sérotypům O:3 a O:9, u sérotypu O:5,27 je to pouze enzym BlaB, oba enzymy jsou také přítomny u kmenů z prostředí patřících k biotypu 1A (Bottone 1997, 1999).

Účinná jsou novější  $\beta$ -laktamová antibiotika (např. ceftriaxon a ceftizoxim) společně s fluorochinolony, které mají velmi dobrou účinnost *in vitro*, dobře pronikají do tkání a mají i dostatečnou intracelulární aktivitu (Scribner a kol. 1982). Použití těchto antibiotik

vedlo k významnému snížení úmrtnosti z důvodu sepse a celkově ke zkrácení doby léčeni. Fluorochinolony jsou úspěšně využívány také při léčbě dalších komplikací infekce, jako jsou jaterní abscesy a perikarditidy. Byly však zaznamenány i případy nedostatečného účinku nebo selhání těchto léčiv (Crowe a kol. 1996).

Lék první volby u dospělých pacientů není doposud určen. Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučuje pro antimikrobiální terapii cefalosporiny 3. generace a fluorochinolony např. ciprofloxacin, Dobrou alternativou v léčbě může být také tetracyklin. U dětí je lékem volby trimethoprim/sulfamethoxazol (neboli cotrimoxazol; Leino 2005, Fábrega a Vila 2012).

Několik studií prokázalo, že antibiotická léčba nemění průběh nebo délku trvání enteritidy u dětí mladších šesti let. U starších dětí může být antibiotická terapie prevencí některých sekundárních komplikací infekcí, např. ileitidy, pseudoapendicitidy, nebo mezenteriální adenitidy (Bottone 1999).

V posledních letech proběhla řada studií zaměřených mimo jiné právě na antibiotickou rezistenci enteropatogenních yersinií. Fredriksson-Ahomaa a kol. (2007) testovali celkem 77 *ail*-pozitivních izolátů *Y. enterocolitica* získaných ze 72 vzorků prasečích tonzil. U těchto patogenních izolátů *Y. enterocolitica* byla prokázána rezistence nebo snížená citlivost celkem k osmi antimikrobiálním agens, přičemž všechny izoláty byly rezistentní nejméně k jednomu z nich, nejčastěji k ampicilinu a erytromycinu. Překvapivě bylo všech šest izolátů biosérotypu 2/O:5,27 citlivých na ampicilin a naopak rezistentní nebo méně citlivých k amoxicilinu/kyselině klavunolové.

V jiné studii byla zjištěna citlivost 57 ze 74 *ail*-pozitivních kmenů *Y. enterocolitica* 4/O:3 k 14 ze 16 testovaných antibiotik. Kmeny byly rezistentní pouze k ampicilinu a erytromycinu. Ojedinele byla rezistence zaznamenána k amoxicilinu/kyselině klavunolové (5 %), streptomycinu (9 %), sulfamethoxazolu (9 %) a tetracyklinu (1 % kmenů). Pouze u dvou kmenů se projevila rezistence ke čtyřem antimikrobiálním látkám současně: ampicilinu, amoxicilinu/klavunolové kyselině, erytromycinu a sulfamethoxazolu. Podle této studie nebyl v letech 2000 až 2004 zaznamenán nárůst rezistence u prasat ve výkrmu a nebyla zjištěna žádná spojitost mezi přítomností nebo absencí plazmidu virulence a profilem rezistence (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2010).

Baumgartner a kol. (2007) testovali antibiotickou rezistenci k 16 antibiotikům a dvěma antibiotickým stimulatorům růstu (carbadox a olaquinox) u 386 izolátů *Y. enterocolitica* získaných od pacientů s příznaky gastrointestinálního onemocnění, z výkalů prasat a z vepřového masa z tržní sítě. K dříve používaným antibiotickým stimulatorům byly všechny testované kmeny citlivé, vysoká úroveň rezistence byla naopak pozorována k ampicilinu, cefalothinu a amoxicilinu/klavunolové kyselině. Bylo detekováno šest multirezistentních kmenů, které pocházely z klinických vzorků a výkalů prasat. U izolátů z vepřového masa byla citlivost k většině testovaných antibiotik zachována (Baumgartner a kol. 2007).

Funk a kol. (2000) zjistili, že 99 % aii-pozitivních izolátů *Y. enterocolitica* z ústní dutiny prasat bylo rezistentních k sulfonamidům (sulfadimetoxin a sulfathiazol) a 50 % k oxytetracyklinu. Jedním z důvodů může být dřívější užívání těchto antibiotik jako stimulatoru růstu u prasat.

Potraviny jsou jedním ze zdrojů rezistentních bakterií pro člověka a je tedy třeba bránit dalšímu rozvoji antimikrobiální rezistence (EFSA 2008). Jedním z významných opatření v tomto směru byl zákaz používání antibiotických stimulatorů růstu u hospodářských zvířat v EU od roku 2006 (Nařízení č. 1831/2003).

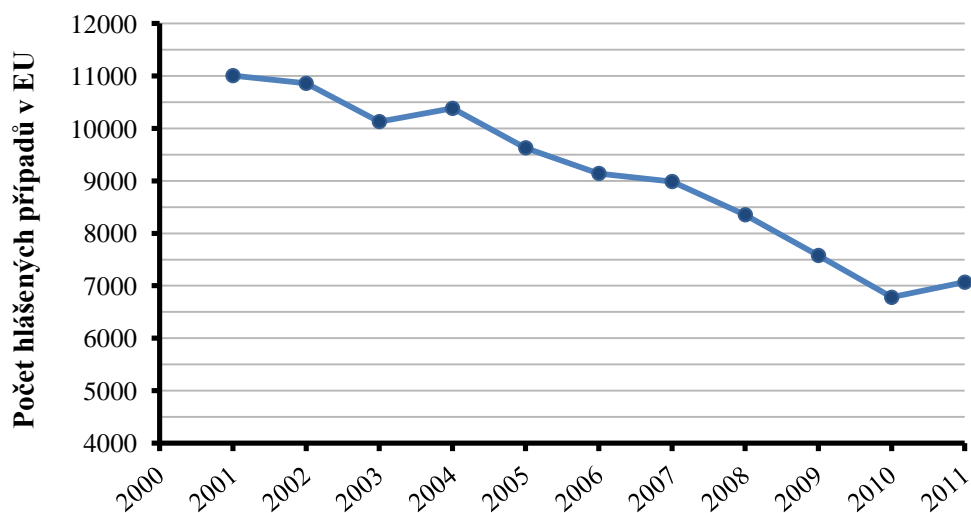
## 7. Epidemiologie enteropatogenních *Yersinia* spp.

### 7.1. Incidence yersinióz

*Y. enterocolitica* je celosvětově rozšířený gastrointestinální patogen, který bývá izolován od pacientů z mnoha zemí po celém světě. Bakterie se vyskytuje zejména v oblastech s chladnějším klimatem, jako je Kanada, západní pobřeží Jižní Ameriky, Evropa, Austrálie, Nový Zéland nebo Jihoafrická republika (Drummond a kol. 2012).

Yersinióza je po salmonelóze a kampylobakteriíze třetím nejčastějším bakteriálním onemocněním z potravin a čtvrtou nejčastější zoonózou v mnoha evropských zemích (EFSA 2013). V posledních letech dochází v rámci EU k poklesu počtu hlášených případů onemocnění. V roce 2001 bylo zaznamenáno celkem 11 007 případů yersinióz ve 20 členských státech EU, v roce 2011 to bylo 7 068 případů (Graf 1).

**Graf 1.** Počet hlášených případů yersinióz v EU v letech 2001-2011 (zdroj: EFSA 2006, 2010, 2013).



Oproti roku 2010, kdy bylo hlášeno 6 780 případů onemocnění, byl v roce 2011 zaznamenán vzestup o 3,5 %. Jedná se o první mírný nárůst případů od roku 2006. I přesto došlo v období 2007-2011 v rámci EU ke statisticky významnému poklesu počtu yersinióz. Incidence onemocnění dosáhla v roce 2011 v EU hodnoty 1,63 případů na 100 000 obyvatel, zatímco v roce 2007 to bylo ještě 2,8/100 000. Tento klesající trend se ovšem netýká všech členských států. Ke statisticky významnému poklesu v počtu hlášených případů došlo v tomto období v šesti zemích EU: Dánsku, Německu, Litvě,

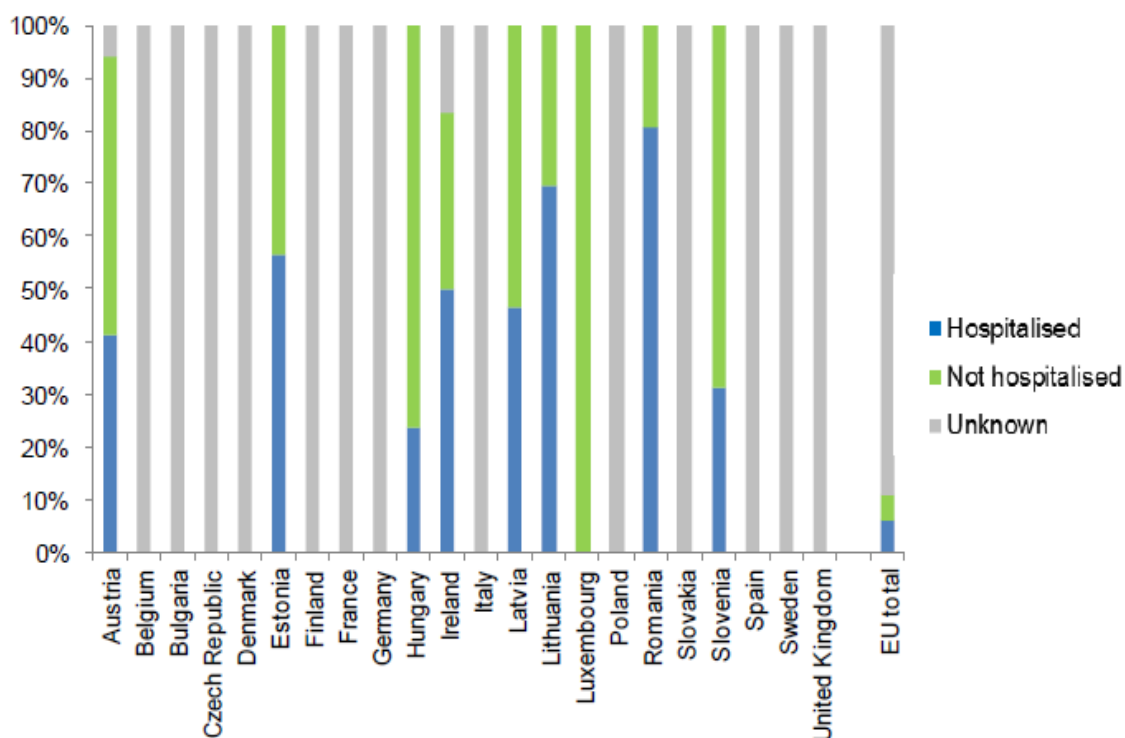
Slovinsku, Španělsku a Švédsku, zatímco zvyšující trend byl zaznamenán v Rumunsku, Maďarsku a na Slovensku (Tabulka 2). Nejvyšší incidence onemocnění je již dlouhodobě hlášená ve Finsku a Litvě, kde bylo v roce 2011 hlášeno 10,31 respektive 11,40 případů/100 000 obyvatel. Nejnižší nemocnost měla ve stejném roce Velká Británie (0,09/100 000), Itálie (0,02/100 000) nebo Irsko (0,13/100 000; EFSA 2013).

**Tabulka 2.** Hlášené případy humánní yersiniózy v letech 2007-2011 v rámci EU (upraveno podle: EFSA 2013).

Země	2011			2010	2009	2008	2007
	Počet případů	Potvrzené případy	Potvrzené případy/100 000	Potvrzené případy			
Belgie	214	214	1,95	84	140	93	142
Bulharsko	4	4	0,05	5	8	10	8
Česká rep.	460	460	4,37	447	463	557	576
Dánsko	225	225	4,05	193	238	331	274
Estonsko	69	69	5,15	58	54	42	76
Finsko	554	554	10,31	522	633	608	480
Francie	294	294	0,45	238	208	213	0
Irsko	6	6	0,13	3	3	3	6
Itálie	15	15	0,02	15	11	-	-
Kypr	0	0	0	0	0	0	0
Litva	370	370	11,40	428	483	536	569
Lotyšsko	28	28	1,26	23	45	50	41
Lucembursko	33	33	6,45	39	36	17	22
Maďarsko	93	93	0,93	87	51	40	55
Malta	0	0	0	1	0	0	0
Německo	3397	3381	4,14	3346	3731	4352	4987
Nizozemí	-	-	-	-	-	-	-
Polsko	258	250	0,65	205	288	214	182
Portugalsko	-	-	-	-	-	-	-
Rakousko	142	119	1,42	84	140	93	142
Rumunsko	47	47	0,22	27	5	9	0
Řecko	-	-	-	-	-	-	-
Slovensko	170	166	3,05	166	167	68	71
Slovinsko	16	16	0,78	16	27	31	32
Španělsko	264	264	2,29	325	291	315	381
Švédsko	350	350	3,72	281	397	546	567
Velká Británie	59	59	0,09	55	61	48	86
<b>EU celkem</b>	<b>7068</b>	<b>7017</b>	<b>1,63</b>	<b>6780</b>	<b>7578</b>	<b>8356</b>	<b>8803</b>
Island	-	-	-	-	-	-	-
Norsko	60	60	1,22	52	60	50	71

Podle informací, které jsou k dispozici z některých členských států EU, bylo v roce 2011 55,2 % pacientů, tedy více než polovina s potvrzenou yersiniózou, hospitalizováno. Informace o hospitalizaci však podalo jen devět členských zemí, což

představuje pouze 11 % ze všech potvrzených případů onemocnění v tomto roce ze všech zemí EU (Obrázek 2). Největší podíl hospitalizovaných pacientů byl v Rumunsku (80,9 %) a následovala Litva (69,7 %), která měla také nejvíce hospitalizovaných pacientů s yersiniózou celkem: 258 pacientů, což představuje 60 % všech hospitalizovaných v EU (EFSA 2013).



**Obrázek 2.** Podíl hospitalizovaných pacientů v roce 2011 v EU z potvrzených případů humánní yersiniózy (převzato: EFSA 2013).

Druhově v Evropě jasně převládá *Y. enterocolitica*, která byla v roce 2011 původcem onemocnění v 98,4 % potvrzených případů. *Y. pseudotuberculosis* způsobuje humánní onemocnění zřídka a byla izolována od 0,9 % pacientů. Zbývajících 0,7 % yersinióz bylo způsobeno jinými druhy rodu *Yersinia* (EFSA 2013).

Většina patogenních *Y. enterocolitica* v Evropě náleží k biosérotypům 4/O:3 a 2/O:9 (EFSA 2007). První případ nákazy biosérotypem 1B/O:8, který způsobuje nejzávažnější formu onemocnění a je typický pro Severní Ameriku, byl zaznamenán v roce 2003 v Německu. Kmen byl izolován od čtyřletého chlapce, který byl přijat do nemocnice s typickými příznaky bolesti břicha, horečky a průjmu. Incidence biosérotypu 1B/O:8 ve Spojených státech amerických klesá a v Evropě je tento biosérotyp izolován jen vzácně.

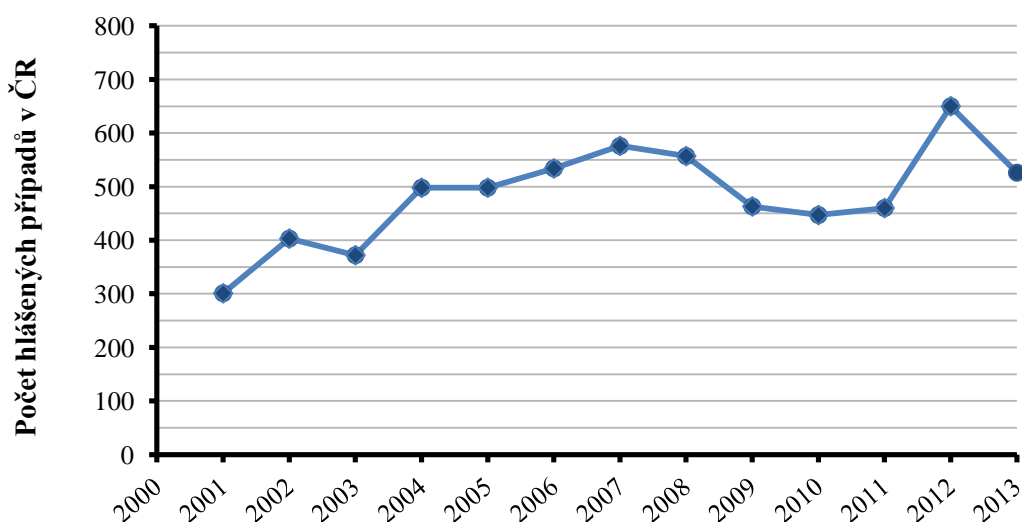


Nicméně nárůst výskytu tohoto biosérotypu je od roku 2003 sledován v Polsku (Drummond a kol. 2012).

V roce 2010 nebylo v celé EU zaznamenáno žádné úmrtí způsobené enteropatogenními yersiniemi (EFSA 2012). V roce 2011 byla úmrtnost v EU 0,02 % (jedno úmrtí na 4918 potvrzených případů). Tento počet ale nemusí být přesný, neboť často tyto informace nejsou monitorovány (EFSA 2013).

V České republice došlo oproti celkové situaci v EU v posledních letech k mírnému nárůstu počtu onemocnění (Cupáková a Necidová 2013). V porovnání s ostatními evropskými zeměmi patří ČR dlouhodobě ke skupině zemí s vyšší incidencí onemocnění (EFSA 2013). V roce 2011 zde bylo nahlášeno 460 případů yersiniózy, incidence byla 4,37/100 000 obyvatel, tedy pátá nejvyšší v EU za Finskem, Litvou, Lucemburskem a Estonskem. V roce 2012 bylo na našem území hlášeno 650 případů (6,2/100 000), tedy vůbec nejvíce v historii ČR. V loňském roce došlo k mírnému snížení počtu hlášených onemocnění na 526 (Graf 2). Počty případů v následujících letech ukážou, zdali bude tento klesající trend pokračovat a ČR se tak připojí k většině ostatních členských zemí EU.

**Graf 2.** Počet hlášených případů yersiniózy v ČR v letech 2001-2013 ( zdroj: Beneš Č., SZÚ, osobní sdělení).



## 7.2. Epidemie yersinióz

Epidemie yersinióz jsou vzácné v Evropě i jinde. Většinou se yersinióza vyskytuje sporadicky a větší ohniska jsou hlášena jen zřídka.

V roce 2010 bylo hlášeno 11 ohnisek nákazy yersiniózou v šesti zemích EU (Německo, Litva, Rakousko, Estonsko, Francie a Finsko), kdy onemocnělo celkem 84 osob. Při epidemii ve Finsku, způsobené *Y. enterocolitica* 2/O:9, onemocnělo 42 osob a pravděpodobným vehikulem byla zelenina (ECDC 2012).

V roce 2011 nahlásilo sedm členských zemí EU 17 lokálních epidemií se 71 nemocnými pacienty. Mimo EU proběhla jedna epidemie, způsobená *Y. enterocolitica* sérotypem O:9, také v Norsku. Onemocnělo 21 osob, čtyři pacienti museli být hospitalizováni, ale nedošlo k žádnému úmrtí. Epidemiologické studie prokázaly, že v tomto případě byly zdrojem nákazy hotové salátové výrobky (EFSA 2013).

Norsko bylo i dříve místem epidemického výskytu humánní yersiniózy. Při jedné z nich v únoru 2006 onemocnělo 11 osob sérotypem O:9 *Y. enterocolitica* po konzumaci tlačenky. U jednoho pacienta se následně vyvinula reaktivní artritida, čtyři pacienti byli hospitalizováni a dva zemřeli. V obou případech úmrtí, se jednalo o starší pacienty ve špatném zdravotním stavu (Grahek-Ogden a kol. 2007).

V roce 2012 proběhla doposud jediná hlášená epidemie humánní yersiniózy v České republice. Onemocnělo při ní 62 osob (děti i zaměstnanci) z Dětské psychiatrické léčebny Opařany, přičemž laboratorně bylo potvrzeno 23 případů a nedošlo k žádnému úmrtí. Vehikulem při této epidemii byla masová pomazánka, která byla připravena na mlýnku používaném na mletí syrového masa. Mlýnek byl o den dříve použit ke zpracování syrového vepřového masa a porušení správné výrobní praxe při přípravě stravy zapříčinilo vznik epidemie yersiniózy (Cupáková a Necidová 2013, SZÚ 2013).

## 8. Zdroje enteropatogenních yersinií

### 8.1. Výskyt yersinií u zvířat

Zvířata jsou považována za hlavní rezervoár *Y. enterocolitica*, za potenciální rezervoár *Y. pseudotuberculosis* a tím za zdroj humánních infekcí (Bottone 1997). Nicméně většina kmenů izolovaných od zvířat se liší jak biochemicky, tak i sérotypem od kmenů izolovaných od pacientů s yersiniózou (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2006).

Patogenní kmeny *Y. enterocolitica* jsou nejčastěji izolovány z jatečných prasat, a to především z jejich tonzil a ze vzorků výkalů (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003). V Evropě jsou prasata často asymptomatickými nosiči patogenních kmenů *Y. enterocolitica* biotyp 4 (sérotyp O:3), méně často pak biotyp 2 (sérotyp O:9 a O:5,27; EFSA 2007). Kromě prasat, která jsou primárním zdrojem patogenních kmenů, mohou být zdrojem yersinií také ovce, kozy, psi, volně žijící hlodavci či zajíci (Fàbrega a Vila 2012).

*Y. pseudotuberculosis* byla izolována z celé řady živočišných druhů, od hospodářských a domácích zvířat až po zvířata žijící volně nebo v zajetí. Hlavním rezervoárem jsou ale hlodavci, zajíci a volně žijící ptáci (von Altrock a kol. 2011). Většinou jsou zvířata asymptomatickými nosiči, avšak mohou onemocnět a ve stresových podmínkách, jako je hladovění nebo chlad, vylučovat bakterie. Ohniska nákazy *Y. pseudotuberculosis* se také pravidelně vyskytují u zvířat (především u opic) chovaných v zoologických zahradách v EU (EFSA 2007).

#### 8.1.1. Prevalence u prasat

Zdroj *Y. enterocolitica* a způsob nákazy u prasat není zcela jasný. Bakterie většinou není detekována u selat, ale až u starších prasat ve výkrmu. Tyto skutečnosti naznačují, že významným zdrojem infekce jsou výkaly a prostředí, ve kterém se prasata pohybují (Fukushima a kol. 1983). Infekce většinou probíhá bez jakýchkoliv symptomů nebo zjevných makroskopických lézí a veterinární prohlídka před nebo po porážce nemusí odhalit přítomnost enteropatogenních yersinií (Borch a kol. 1996).

Prevalence enteropatogenních yersinií u prasat je předmětem studií v mnoha evropských zemích. Nejčastěji jsou yersinie detekovány z tonzil, které poskytují mnohem spolehlivější informace o výskytu *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*

než vzorky výkalů (Drummond a kol. 2012). Podle některých údajů je 35-70 % chovů prasat infikováno patogenními kmeny *Y. enterocolitica* (Cupáková a Necidová 2013).

V roce 2006 proběhla studie zaměřená na detekci *ail*-pozitivních kmenů *Y. enterocolitica* na jatkách ve Švýcarsku. Celkem bylo metodami real-time PCR a klasickou kultivací vyšetřeno 212 vzorků prasečích tonzil z 16 farem, z nichž 148 bylo *Y. enterocolitica* pozitivních. Nejčastěji stanovený biosérotyp byl 4/O:3 (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2007). Biosérotyp 4/O:3 byl také jediným patogenním biosérotypem izolovaným z prasečích tonzil při podobných studiích ve Finsku (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2000) nebo v Bavorsku (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2001).

V letech 2005-2007 byly odebrány tonzily od 829 prasat pocházejících z Belgie (201), Itálie (428) a Španělska (200) ke studiu prevalence enteropatogenních yersinií u jatečných prasat (Martínez a kol. 2011). Ve Španělsku byla pozorována významně vyšší prevalence (93 %) než v Itálii (32 %) či Belgii (44 %). Patogenní kmeny *Y. enterocolitica* byly izolovány od prasat pocházejících ze všech testovaných farem v Itálii (22) i ve Španělsku (14). Pouze na dvou z deseti farem v Belgii nebyla přítomnost *Y. enterocolitica* u prasat prokázána. Převládá opět biosérotyp 4/O:3, přičemž v Belgii a Itálii se vyskytly i biosérotypy 3/O:9 a 2/O:5. Prevalence výskytu *inv*-pozitivní *Y. pseudotuberculosis* byla při této studii 2 % (Belgie), 1 % (Itálie) a 0 % (Španělsko), přičemž v Belgii a Itálii byla promořenost farem 80 %, respektive 14 %.

## **8.2. Yersinie v potravinách**

Kontaminované potraviny jsou hlavním zdrojem infekce enteropatogenními yersiniemi a to přesto, že patogenní izoláty jsou v potravinách detekovány jen zřídka. Díky asociaci mezi *Y. enterocolitica* (především biosérotypu 4/O:3) a jejímu výskytu u prasat jsou nejvýznamnějším zdrojem infekce vepřové maso a výrobky z něj (EFSA 2012).

### **8.2.1. Maso a masné výrobky**

Ke kontaminaci masa může dojít už během porážky zvířat (Borch a kol. 1996). Technika porážky a hygienické podmínky mohou značně ovlivnit míru kontaminace. Yersinie jsou u prasat kromě střevního obsahu přítomné v dutině ústní, zejména v mandlích a podčelistních mízních uzlinách. Kromě fekálního znečištění může tedy ke kontaminaci masa a orgánů dojít při manipulaci s hlavou prasete, např. při odřezávání

jazyka či odstraňování mandlí. Jazyk a vnitřní orgány (srdce a játra) jsou proto kontaminovány častěji než ostatní svalovina. K další kontaminaci yersiniemi může docházet při bourání, zpracování masa a díky psychrofilnímu charakteru bakterií také při skladování masa, kdy se yersinie mohou i množit (EFSA 2007).

Yersinie nepřežívají pasteraci ani běžnou tepelnou úpravu pokrmů. Rizikové jsou nedostatečně tepelně opracované výrobky z vepřového masa, především z masa hlavy a jazyka (Fernandes 2009). V ČR mají svou tradici a jsou velmi oblíbené domácí zabíjačky. Tyto produkty mohou být významným vehikulem yersinií a jejich zdrojem pro člověka (Cupáková a Necidová 2013). Tlačenky a podobné produkty byly také několikrát zdrojem menších epidemií yersinióz i v dalších zemích Evropy. Např. v roce 2006 v Norsku, kdy onemocnělo 11 osob, byla pravděpodobným vehikulem tradiční vánoční tlačenka (EFSA 2007).

Kromě vepřového mohou být zdrojem infekce také další druhy masa, např. hovězí, jehněčí, kozí, kuřecí nebo ryby. Stupeň prevalence *Y. enterocolitica* v mase jiných živočišných druhů lze považovat za velmi nízký. Nicméně při manipulaci a zpracování výrobků např. v řeznictvích může dojít ke křížové kontaminaci. Ze syrového masa jsou běžně izolovány nepatogenní kmeny, z patogenních pak nejčastěji sérotypy O:3, O:9, O:2 nebo O:5,27 (EFSA 2007).

### **8.2.2. Ostatní potraviny**

Výskyt yersinióz bývá spojován také s konzumací mléka, mléčných výrobků a rostlinných produktů. Z nepasterovaného mléka byl v mnoha zemích (Irsko, Irán, Velká Británie nebo Francie) izolován biotyp 1A *Y. enterocolitica* (Drummond a kol. 2012). Ke kontaminaci vody, syrového mléka nebo zeleniny obecně dochází v důsledku přímého nebo nepřímého fekálního znečištění, což je usnadněno schopností *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* dlouhodobě přežít v prostředí (EFSA 2007).

V letech 2002-2003 proběhla v Turecku studie, při níž bylo vyšetřeno 200 vzorků syrového mléka a sýrů. Pozitivních na přítomnost yersinií bylo 69 vzorků (35 %). Z 55 pozitivních vzorků mléka byla ve 25 vzorcích detekována přítomnost *Y. enterocolitica*, u sýrů to bylo v pěti případech ze 14 pozitivních vzorků. Všechny izoláty *Y. enterocolitica* byly avirulentní a patřily k biotypu 1A. Ke kontaminaci došlo zřejmě během manipulace s produkty a přispěla k ní také špatná kvalita vody a použití kontaminovaného mléka při výrobě sýrů (Yucel a Ulusoy 2006). Také ve Velké Británii

byly izolovány z pasterovaného i nepasterovaného mléka kmeny *Y. enterocolitica* patřící k biotypu 1A. Předpokládá se, že ke kontaminaci pasterovaného mléka došlo v tomto případě malým množstvím syrového mléka, které nedokázal odhalit fosfatázový test (Greenwood a kol. 1990). Byly zaznamenány také případy kontaminace mléka pYV-pozitivními kmeny *Y. enterocolitica* (Drummond a kol. 2012).

### 8.3. Yersinie v prostředí

Také voda může být zdrojem nákazy *Y. enterocolitica*. Ke kontaminaci vody ve studních, řekách a jezerech může dojít fekálním znečištěním pocházejícím od domácích nebo volně žijících zvířat, nebo únikem ze septiků v okolí vodních zdrojů. Nicméně většina izolátů *Y. enterocolitica* opět náleží k převážně nepatogennímu biotypu 1A (EFSA 2007).

Také *Y. pseudotuberculosis* je široce rozšířená v prostředí a bývá izolována z vodních zdrojů, a to i ve vysokých nadmořských výškách. Výkaly znečištěná pramenitá voda byla spojována s nákazami, které proběhly v Japonsku a Koreji (EFSA 2007).

### 8.4. Monitoring v Evropě

Ve většině zemí EU neexistuje povinnost hlásit výskyt *Y. enterocolitica* u zvířat. V současnosti poskytuje hlášení o výskytu enteropatogenních yersinií u zvířat pouze sedm členských států EU (Belgie, Irsko, Litva, Lotyšsko, Nizozemí, Slovinsko a Španělsko) a Švýcarsko. Z tohoto důvodu jsou zoonotická epidemiologická data nekompletní (Tabulka 3; EFSA 2013).

V roce 2010 předložily údaje o přítomnosti yersinií u prasat čtyři členské země EU: Itálie, Lotyšsko, Německo a Španělsko. Z Lotyšska a Itálie nebyl hlášen žádný případ výskytu enteropatogenních yersinií u prasat. V Německu bylo zjištěno 2,7 % pozitivních stád a ve Španělsku bylo pozitivních 39,0 % vyšetřených skupin prasat na jatkách. Všechny izoláty *Y. enterocolitica* ze Španělska byly sérotypu O:3, v Německu byl detekován také sérotypy O:9 (EFSA 2012).

V roce 2011 nahlásily pozitivní nálezy yersinií (*Y. enterocolitica*) u prasat tři členské a jeden nečlenský stát EU. Z celkem 213 izolátů *Y. enterocolitica* byl u 114

z nich nahlášen také sérotyp: 111 izolátů patřilo k sérotypu O:3 (biotyp nebyl určen), dva k biosérotypu 3/O:3 a jeden k 2/O:9 (EFSA 2013). Nálezy *Y. enterocolitica* byly hlášeny také u divokých prasat, skotu, méně často u ovcí a koz. Ovce a kozy byly naopak třemi zeměmi hlášeny jako zdroj *Y. pseudotuberculosis*. Nálezy yersinií byly potvrzeny také u dalších živočišných druhů, včetně zajíců, králíků, koček, psů a lichokopytníků.

Hlášení záchytu yersinií v potravinách poskytuje v současnosti deset členských států EU: Belgie, Estonsko, Itálie, Lotyšsko, Německo, Nizozemsko, Rakousko, Slovensko, Slovinsko a Španělsko (Tabulka 3; EFSA 2013). Vyšetření prokazující přítomnost enteropatogenních yersinií ve vzorcích potravin se provádějí velmi zřídka a děje se tak většinou pouze v rámci studií specializovaných právě na výskyt *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*.

V roce 2010 testovalo vepřové maso a výrobky z něj sedm členských zemí EU. Bylo zjištěno, že 4,2 % a 4,1 % vepřového masa a výrobků bylo pozitivně testováno na *Yersinia* spp., respektive *Y. enterocolitica*. Hovězí maso a výrobky z něj byly testovány na přítomnost yersinií ve třech zemích EU. U žádného ze vzorků nebyla prokázána přítomnost bakterie. Dvě země poskytly data o výskytu yersinií v mléce a mléčných výrobcích. V Německu bylo z vyšetřovaných vzorků syrového kravského mléka 6,7 % vzorků pozitivních (EFSA 2012).

V roce 2011 podalo informace o výskytu yersinií v potravinách devět členských zemí EU (EFSA 2013). Testovány byly vzorky masa, mléka, sýrů a dalších mléčných výrobků, zeleniny a dalších druhů potravin. Vepřové maso a výrobky z něho byly označeny za nejvýznamnější zdroj infekcí *Y. enterocolitica* u lidí. Z 1146 vzorků vepřového masa bylo 30 pozitivních na přítomnost yersinií, a z toho ve 28 vzorcích byla detekována *Y. enterocolitica* (nejčastěji biosérotypu 4/O:3). Pozitivní nálezy byly hlášeny také z hovězího, skopového, kozího, koňského nebo bizoního masa a také z mléka, zeleniny a ryb.

V roce 2010 a 2011 nebyla v zemích EU hlášena přítomnost *Y. pseudotuberculosis* v žádném testovaném vzorku potravin (EFSA 2012 a 2013).

V ČR je situace podobná jako ve většině zemí EU. Sledování *Y. enterocolitica* ani *Y. pseudotuberculosis* v potravinách není požadováno žádným legislativním předpisem a např. v roce 2012 byly na přítomnost těchto bakterií vyšetřeny pouze dva vzorky.

Jednalo se v obou případech o hovězí výsekové maso, v jednom vzorku byla přítomnost *Y. enterocolitica* potvrzena (Cupáková a Necidová 2013).

**Tabulka 3.** Hlášení výskytu yersinií u lidí, zvířat a v potravinách v roce 2010 (upraveno podle: EFSA 2012).

Země	Hlášení humánních yersinióz	Hlášení yersinií u zvířat	Hlášení yersinií v potravinách
<b>Belgie</b>	<1999	1998	2004
<b>Bulharsko</b>	ano	-	-
<b>Česká rep.</b>	ano	ne	-
<b>Dánsko</b>	1979	ne	-
<b>Estonsko</b>	1982	ne	2000
<b>Finsko</b>	1995	ne	ne
<b>Francie</b>	ano	-	-
<b>Irsko</b>	2004	1992	-
<b>Itálie</b>	1990	ne	1962
<b>Kypr</b>	2005	-	-
<b>Litva</b>	1985	>30 let	-
<b>Lotyšsko</b>	1988	ano	ano
<b>Lucembursko</b>	ano	ne	ne
<b>Maďarsko</b>	1998	ne	-
<b>Malta</b>	ano	-	-
<b>Německo</b>	ano	-	ano
<b>Nizozemí</b>	-	ano	ano
<b>Polsko</b>	2004	-	ne
<b>Portugalsko</b>	-	ne	-
<b>Rakousko</b>	1947	ne	1975
<b>Rumunsko</b>	ano	ne	-
<b>Řecko</b>	-	-	-
<b>Slovensko</b>	ano	ne	2000
<b>Slovinsko</b>	1977	ne	2003
<b>Španělsko</b>	1989	1994	1994
<b>Švédsko</b>	1996	ne	ne
<b>Velká Británie</b>	ne	ne	ne
<b>Island</b>	-	-	-
<b>Lichtenštejnsko</b>	ano	-	-
<b>Norsko</b>	1992	ne	ne
<b>Švýcarsko</b>	ano	1966	-



## 9. Izolace a detekce enteropatogenních yersinií

Na rozdíl od vzorků stolice nebo orgánových abscesů klinicky nemocných pacientů, ve kterých jsou enteropatogenní yersinie dominantními bakteriemi, je jejich detekce ve vzorcích od asymptomatických nositelů, z prostředí nebo potravin poměrně složitá. Přestože je popsáno několik kultivačních postupů, včetně několika standardizovaných referenčních metod pro izolaci *Y. enterocolitica*, ani jedna z těchto procedur se nejeví jako optimální pro všechny patogenní kmeny. Pro izolaci *Y. pseudotuberculosis* z jiných než klinických vzorků nejsou prozatím k dispozici žádné standardizované referenční metody (Fredriksson-Ahomaa 2012).

### 9.1. Konvenční kultivační metody

#### 9.1.1. Izolace

Izolace enteropatogenních yersinií z tkání zvířat, potravin a prostředí je náročná kvůli nízkému počtu přítomných bakterií a naopak velkému množství ostatní bakteriální mikroflóry. Ke zvýšení pravděpodobnosti izolace yersinií ze vzorku je potřeba ještě před samotnou izolací na selektivních agarových médiích pomnožení těchto bakterií v tekutých kulturách. Použití více druhů tekutých i pevných médií zvyšuje pravděpodobnost zachytu *Yersinia* spp. ze vzorků potravin (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

Pomnožení yersinií může probíhat dvěma způsoby:

#### A. Chladové pomnožení

Chladové pomnožení využívá psychrotrofní vlastnosti rodu *Yersinia* a schopnost růstu při chladničkové teplotě (4 °C), která naopak zpomaluje růst jiných přítomných bakterií včetně ostatních zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Pro chladové pomnožení vzorků je nejčastěji používán fosfátový roztok s NaCl (PBS) nebo půda s peptonem, sorbitolem a žlučovými solemi (PSB; Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003, EFSA 2007). Metoda je vhodná pro zachycení širokého spektra zástupců rodu *Yersinia*. Hlavní nevýhodou je pomnožení i nepatogenních kmenů rodu *Yersinia* a dalších psychrotrofních bakterií a také dlouhá inkubační doba, která je obvykle 2-4 týdny. Přidáním hydroxidu draselného (KOH) do bujónu je možné dosáhnout redukce

nežádoucí mikroflóry, a tím snadnějšího výběru kolonií *Yersinia* spp. při následné kultivaci na pevných médiích (Fredriksson-Ahomaa 2012).

### **B. Pomnožení v selektivních bujónech**

Alternativou k pomnožení bakterií v chladu je selektivní pomnožení v médiích s obsahem antimikrobiálních látek, např. v modifikovaném Rappaportově bujónu (MRB) s obsahem chloridu hořečnatého, malachitové zeleně a carbanicillinu, ve kterém se vzorek inkubuje při 25 °C dva až čtyři dny (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003). Od základu pro MRB je odvozen i další často používaný selektivní pomnožovací bujón, který je doplněn o Irgasan (triclosan), tikarcilin a chlorečnan draselný (ITC médium). Obě tato média jsou vhodná pro izolaci kmenů patřících k biosérotypu 4/O:3, které jsou nejčastějšími původci yersinióz v Evropě. ITC médium není naopak vhodné pro záchyt kmenů biosérotypu 2/O:9 (druhý nejčastější původce onemocnění v Evropě; Wauters a kol. 1988, EFSA 2007, ČSN ISO 10273).

Pro *Y. pseudotuberculosis* prozatím neexistuje žádné vysoce-selektivní pomnožovací médium. FDA (Food and Drug Administration) popsala metodu pro izolaci *Y. pseudotuberculosis* ze vzorků potravin, vody a prostředí, která zahrnuje pomnožení v chladu v neselektivním peptonovém bujónu s manitolem (PMP) po dobu 1-3 týdnů s následným vyočkováním na CIN agar a MacConkey agar s a bez přídavku KOH (FDA 2007).

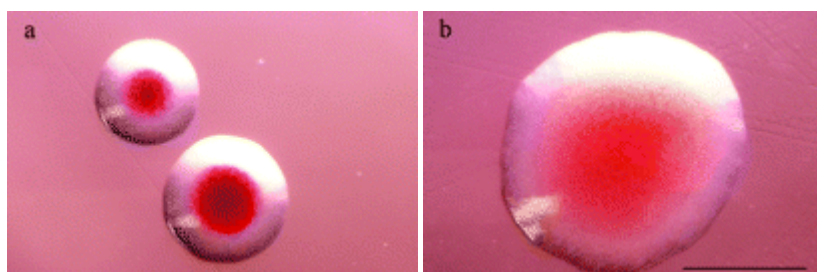
#### **9.1.2. Vyočkování a identifikace charakteristických kolonií**

Kultury získané pomnožením v tekutých médiích se následně vyočkují na selektivní agarová média. Z tradičních médií je široce využíván MacConkey agar vhodný pro kultivaci zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*. Nejčastěji se pro detekci yersinií z klinických vzorků a vzorků z potravin používá agar s cefsulodinem, Irgasanem a novobiocinem (CIN) a *Salmonella/Shigella* agar s desoxycholátem sodným a chloridem vápenatým (SSDC; ČSN EN ISO 10273, Fredriksson-Ahomaa 2012). Obě tato média jsou komerčně dostupná.

CIN agar je nejvhodnější médium pro kultivaci klinických vzorků a je vysoce selektivní zejména pro vzorky stolice. Přesto vzhled kolonií *Yersinia* spp. nemusí být vždy charakteristický a odlišení mikroorganismů, jako jsou *Citrobacter*, *Providencia*,

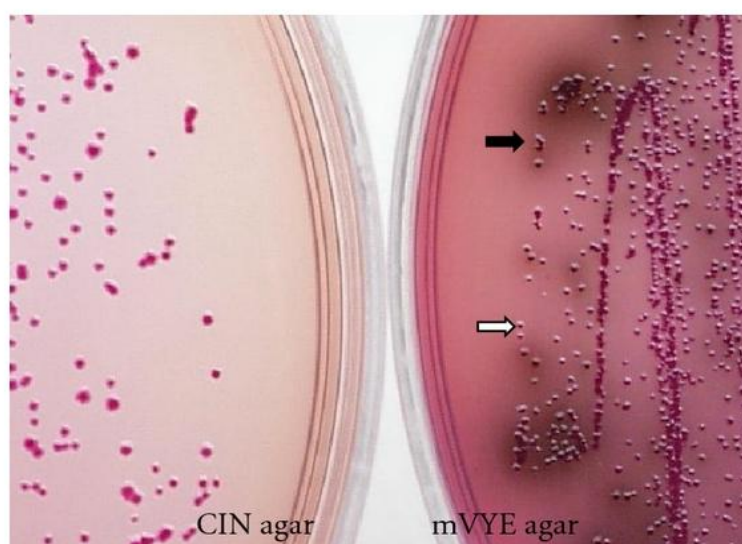
*Serratia*, *Enterobacter*, *Morganella* a *Stenotrophomonas* je obtížné (Fredriksson-Ahoma 2012).

Kolonie *Y. enterocolitica* jsou na CIN agaru malé (<1mm), hladké, charakteristické svým tmavě červeným centrem a průhledným okrajem (Obrázek 3; Obrázek 4). Při prohlížení v šikmo dopadajícím světle nemění duhové barvy a jsou jemně zrnité (ČSN EN ISO 10273). Zbarvení kolonií je dáno přítomností mannitolu v médiu, který yersinie fermentují. Dochází tak ke snížení pH, což se projeví změnou zbarvení pH indikátoru neutrální červeně (součást média) ze žluté na červenou. Fermentace probíhá ve středu kolonie, vzniká tak červeně zbarvené centrum tzv. „býčí oko“. *Y. pseudotuberculosis* tvoří na CIN agaru červeno-růžové kolonie (Obrázek 5; Fukushima a kol. 2011).



**Obrázek 3.** Rozdíl mezi koloniemi *Y. enterocolitica* na CIN agaru.

(a) Biotyp 4 patogenní sérotyp O:3. (b) Nepatogenní biotyp 1A (upraveno podle: Hallanvuoto a kol. 2006).



**Obrázek 4.** Růst *Y. enterocolitica* na CIN a mVYE agaru.

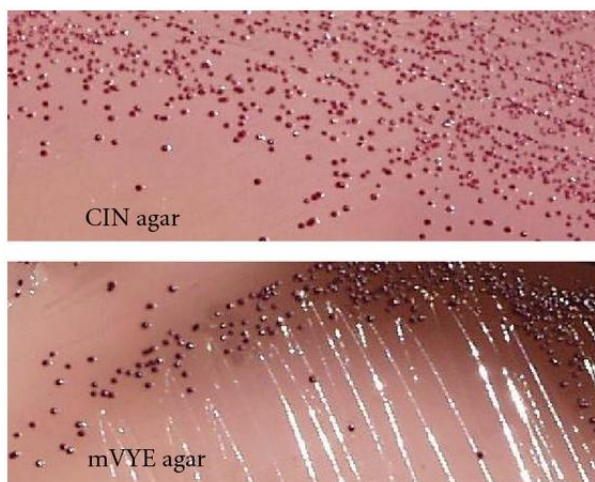
Patogenní *Y. enterocolitica* biosérotyp 3/O:3 varianta VP- (negativní Voges Proskauer test; bílá šipka) tvoří červené kolonie a jde snadno odlišit od většiny nepatogenních yersinií (černá šipka)

a jiných gramnegativních bakterií, které mají tmavě červené kolonie s tmavou obvodovou zónou v důsledku fermentace mannitolu a hydrolýzy eskulinu (převzato: Fukushima a kol. 2011).

Na SSDC agaru jsou kolonie *Y. enterocolitica* drobné, šedě zbarvené s nerozlišeným okrajem a při prohlížení v šikmo dopadajícím světle jsou jemně zrnité a nevytváří duhové barvy (ČSN EN ISO 10273).

K rozlišení virulentních a avirulentních izolátů se využívá CIN agar s eskulinem a železitým citrátem, tzv. modifikovaný virulentní *Yersinia enterocolitica* agar (mVYE agar). Patogenní *Y. enterocolitica*, která vytváří na tomto médiu červené kolonie, je dobře odlišitelná od nepatogenních yersinií a dalších gramnegativních bakterií, které tvoří kolonie tmavě červené s tmavou okrajovou zónou, která vzniká jako důsledek hydrolýzy eskulinu a fermentace mannitolu (Obrázek 4). Od nepatogenních yersinií lze na tomto médiu odlišit i *Y. pseudotuberculosis*, která díky hydrolýze eskulinu vytváří tmavě růžové kolonie (Obrázek 5; Fukushima a kol. 2011).

Půdy se inkubují při 30 °C a prohlížejí se po 24 h, případně po 48 h, zda jsou přítomné charakteristické kolonie (ČSN EN ISO 10273).



**Obrázek 5.** Růst *Y. pseudotuberculosis* na CIN a mVYE agaru (převzato: Fukushima a kol. 2011).

### 9.1.3. Konfirmace

Z každé z misek se selektivní půdou se odebere pět kolonií, které jsou považovány za charakteristické nebo suspektní a tyto se rozočkují na živné agarové médium a inkubují se při 30 °C po dobu 24 h. Ke konfirmaci a testům patogenity je nutné použít pouze

čisté kultury - v případě smíšené kultury se opět subkultivuje každý typ kolonie (ČSN EN ISO 10273).

#### **9.1.3.1. Předběžné testy**

Pro odlišení bakterií rodu *Yersinia* od příbuzných rodů, které mají na selektivních agarech podobný vzhled a pro rozpoznání druhů *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis*, se využívají následující testy: průkaz ureázy, průkaz indolu, pohyblivost při 25 a 37 °C, produkce H<sub>2</sub>S, fermentace glukózy, laktózy a sacharózy produkce plynu při fermentaci glukózy, dekarboxylace lysinu, oxidázový test a hydrolýza eskulinu (ČSN EN ISO 10273, EFSA 2007, Fukushima a kol. 2011).

Podle cílového organismu jsou vybrány suspektní kolonie pro další testy. V případě *Y. enterocolitica* se pokračuje v identifikaci kolonií, které mají pozitivní ureázu, fermentují glukózu, mají negativní tvorbu plynu při fermentaci glukózy, negativní fermentaci laktózy, negativní oxidázu, pozitivní nebo negativní průkaz indolu a negativní produkci H<sub>2</sub>S. Pokud je cílovou bakterií *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* biotyp 3 varianta s negativním průkazem acetoinu (VP-) nebo sérotyp O:3 nefermentující sacharózu, jsou dále testovány kolonie glukóza pozitivní a sacharóza a laktóza negativní. Důležitou charakteristikou je také to, že patogenní kmeny *Y. enterocolitica* nehydrolyzují eskulin, kdežto nepatogenní kmeny a kmeny *Y. pseudotuberculosis* jej hydrolyzují (Fukushima a kol. 2011).

#### **9.1.3.2. Biochemické a biotypizační testy**

Pro lepší odlišení enteropatogenních yersinií od ostatních zástupců *Yersinia* spp., k biotypizaci *Y. enterocolitica* a k rozlišení genetických skupin *Y. pseudotuberculosis* se využívají tyto biochemické testy: produkce indolu, Voges-Proskauer, hydrolýza citrátu, fermentace ramnózy, trehalózy, xylózy, sacharózy, redukce nitrátu a aktivita lipázy (Fukushima a kol. 2011).

Biotypizace *Y. enterocolitica* je důležitá pro odlišení patogenních a nepatogenních kmenů a kromě některých výše zmíněných testů se pro jejich rozlišení využívá hlavně hydrolýza eskulinu, tvorba kyseliny ze salicinu a průkaz pyrazinamidázy (Tabulka 4; Wauters a kol. 1987, EFSA 2007).

**Tabulka 4.** Biotypizace *Y.enterocolitica* (upraveno podle: Wauers a kol. 1987).

TEST	BIOTYP					
	1A	1B	2	3	4	5
LIPÁZA	+	+	-	-	-	-
HYDROLÝZA						
ESKULINU/SALICIN	+/-	-	-	-	-	-
VOGES-PROSKAUER	+	+	+	+	+	(+)
β-D-GLUKOSIDÁZA	+	-	-	-	-	-
PYRAZINAMIDÁZA	-	-	-	-	-	-
PRODUKCE INDOLU	+	+	(+)	-	-	-
XYLÓZA	+	+	+	+	-	-
TREHALÓZA	+	+	+	+	+	-
REDUKCE NITRÁTŮ	+	+	+	+	+	-

Pyrazinamidázový test je v současnosti chromozomální fenotypové kritérium pro odlišení potencionálně patogenních kmenů. Kmeny se inokulují na půdu pro průkaz pyrazinamidázy a inkubace probíhá při 30 °C po dobu 48 h (ČSN EN ISO 10273). Výsledek je pro patogenní kmeny *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* negativní, nepatogenní kmeny *Yersinia* spp. mají test pozitivní - po přidání 1 ml roztoku síranu železnato-amonného vznikne růžovo-hnědé zbarvení média (Fukushima a kol. 2011).

Bylo popsáno také několik fenotypových charakteristik patogenních kmenů asociovaných s přítomností pYV plazmidu: závislost růstu na vápníku při 37 °C, absorpce kongo-červeně a krystalové violeti a autoaglutinace při 37 °C (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003, ČSN EN ISO 10273).

K průkazu absorpce kongo-červeně se suspenze s bakteriálními buňkami vyočkuje na agar s kongo-červení a inkubuje se po dobu 24 h při 37 °C. Převaha drobných červených kolonií indikuje pozitivní reakci, pokud jsou přítomny bezbarvé kolonie, je to dáno ztrátou plazmidu pYV. Pro důkaz absorpce krystalové violeti se používá stejné medium s vyrostlou kulturou, které se převrství asi 8 ml krystalové violeti a nechá se stát 2 minuty. Pro následné pozorování je vhodné použít mikroskop (zvětšení 40x). U pozitivních izolátů je vidět intenzivně fialové zbarvení kolonií (Johnson 1998).

Při autoaglutinačním testu jsou kmeny inkubovány v tryptickém sojovém bujónu (TSB) při teplotách 25 a 37 °C 24 h. U zkumavky inkubované při nižší teplotě je patrné zakalení způsobené růstem buněk. Při vyšší teplotě dochází v kulturách kmenů *Y. enterocolitica*, které nesou pYV plazmid a u kultur *Y. pseudotuberculosis* k aglutinaci (shlukování) buněk podél stěn a na dně zkumavky a supernatant zůstává čirý. Kmeny, které ztratily tento plazmid, např. z důvodu pasážování, vykazují negativní reakci (Johnson 1998).

### **9.1.3.3. Sérotypizace**

Sérotypizace za účelem rozpoznání patogenních kmenů se provádí metodou sklíčkové aglutinace za použití komerčních antisér (např. Danke Seiken) pro nejčastěji se vyskytující sérotypy O:3, O:5, O:27, O:8 a O:9 u *Y. enterocolitica* a pro sérotypy O:1, O:2, O:3, O:4, O:5 a O:6 u *Y. pseudotuberculosis* (EFSA 2007, Fukushima a kol. 2011). V závislosti na geografické distribuci sérotypů je tato metoda obzvláště důležitá v Evropě a v Japonsku k detekci sérotypů O:3 a O:9. Naproti tomu k detekci sérotypu O:8, který dominuje v případech humánních yersinióz v USA, se tato metoda používá minimálně (Fàbrega a Vila 2012).

## **9.2. Molekulárně diagnostické metody**

Konvenční kultivační metody mají řadu nevýhod. Je to především nízká citlivost, dlouhá inkubační doba až čtyři týdny, nedostatečná identifikace jednotlivých druhů i poměrně obtížné rozlišení patogenních a nepatogenních kmenů. Z těchto důvodů se při stanovení a typizaci *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* využívají stále častěji molekulárně-biologické metody (Fredriksson-Ahomaa a kol. 2006).

### **9.2.1. Molekulární metody detekce *Y. enterocolitica***

#### **9.2.1.1. Metody hybridizace**

Při DNA-DNA hybridizaci jsou patogenní kmeny *Y. enterocolitica* detekovány pomocí genových značených sond zaměřených na pYV plazmid nebo na chromozomální sekvence DNA související s virulencí yersinií. Nejčastěji se používají sondy na bázi nukleotidových sekvencí plazmidových genů *virF* a *YadA*, nebo chromozomálních genů *ail*, *inv* a *yst* (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

Výhodou této metody je, že nevyžaduje izolaci čisté kultury a umožňuje tak rychlou detekci všech patogenních bioserotypů ze vzorku. Nicméně přítomnost velkého množství jiných bakterií snižuje účinnost metody, neboť cílové buňky yersinií nerostou dostatečně rychle v přítomnosti konkurenčních mikroorganismů (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003). I přesto byla touto metodou zjištěna vyšší prevalence patogenních kmenů *Y. enterocolitica* ve výrobcích z vepřového masa (60 %), než při použití klasické kultivace (18 %; Nesbakken a kol. 1991).

### 9.2.1.2. PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je nejpoužívanější molekulárně-biologickou metodou pro detekci patogenních *Y. enterocolitica* v přirozeně kontaminovaných vzorcích i pro identifikaci patogenních izolátů (EFSA 2007). Pomocí PCR jsou patogenní kmeny *Y. enterocolitica* detekovány ve vzorku rychle, s vysokou specificitou a citlivostí (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

#### *Cílové geny*

Pro detekci pYV pozitivních kmenů *Y. enterocolitica* z klinických vzorků, vzorků z potravin a prostředí byla vyvinuta řada PCR metod (Tabulka 5). Mnoho z nich využívá primery zaměřené na geny *virF* nebo *yadA*, které jsou lokalizované na plazmidu pYV. Vzhledem k možné ztrátě tohoto plazmidu v průběhu pasážování a skladování kultur byly pro vzorky z prostředí a potravin vyvinuty také metody založené na detekci chromozomálních genů virulence. Nejčastěji je využíván gen *ail* lokalizovaný na chromozomu patogenních kmenů *Y. enterocolitica*, některé postupy využívají také detekci genů *inv* (používá se i pro *Y. pseudotuberculosis*) a *yst*. K detekci *Y. enterocolitica* sérotypu O:3 ze vzorků stolice navrhnul Weynants a kol. (1996) metodu PCR založenou na detekci genu *rfbC*. Pro záchyt zástupců *Yersinia* spp. z krve je využívána specifická oblast (*Yersinia*-specific region) na genu pro 16S rRNA (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

Některé PCR metody umožňují detekci více než jednoho genu, jsou to tzv. multiplex PCR. Kombinují se především plazmidové a chromozomální geny, aby bylo možné detekovat i kmeny, které jsou pYV negativní, ale jsou virulentní. Nejpoužívanější je kombinace genů *virF* a *ail*. K detekci *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* z potravin a vody je vhodná metoda multiplex PCR, která využívá směs primerů pro



geny *inv*, *ail* a *virF*. Kombinace genů *yst*, *virF* a *ail* se používá při detekci patogenních kmenů yersinií ve vzorcích stolice (Nakajima a kol. 1992, Harnett a kol. 1996).

### ***Příprava vzorku***

Ačkoliv je technika PCR vysoce účinná, pokud jde o čisté mikrobiální kultury, při aplikaci přímo na vzorky její citlivost klesá. Hlavním důvodem je komplexní složení těchto matric (stolice, krev, vzorky potravin nebo půdy), které může inhibovat reakci (Lantz a kol. 1994). Jako inhibitory působí např. proteinázy, které ničí strukturu DNA polymerázy, žlučové soli ve stolici či hem ve vzorcích krve. Proto jsou doporučené pro různé typy vzorků různé způsoby přípravy. Separace kmenů *Y. enterocolitica* z přírodních vzorků je prováděna pomocí ředění, filtrace, centrifugace nebo adsorpce. Většina postupů pro přípravu vzorků využívá pomnožení bakterií před samotnou PCR, což vede ke zvýšení citlivosti reakce, naředění přítomných inhibičních látek a mrtvých cílových buněk, a tím ke zvýšení pravděpodobnosti záchytu živých bakterií. Často se používají selektivní pomnožovací média, díky nimž dochází zároveň i k potlačení růstu ostatní mikrobiální flóry přítomné ve vzorku (Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

### ***Extrakce DNA***

DNA se extrahuje z bakteriálních buněk dvěma způsoby: lýzou buněčné stěny a uvolněním DNA, nebo mnohem náročnější metodou purifikace DNA (Tabulka 5).

K rozrušení buněčné stěny u prvního způsobu extrakce se běžně využívá vysokých teplot (cca 95 °C), čímž dojde k inaktivaci tepelně labilních inhibitorů PCR. Samotné teplo není ale při studiu *Y. enterocolitica* dostačující a pro zvýšení účinnosti extrakce se přidává proteináza K, která degraduje proteiny buněčné stěny, polypeptidy ve vzorku i proteinové inhibitory PCR a zabraňuje kontaminaci vzorku termostabilní DNAázou (Maas a Dahlhoff 1994).

Purifikace DNA bývá prováděna klasicky fenol-chloroformovou extrakcí a vysrážením etanolem. Tato metoda je ovšem pracná a časově náročná a není vhodná pro velké množství vzorků. Pro snadnou a rychlou izolaci DNA z různých typů vzorků je k dispozici množství komerčních kitů vhodných pro běžnou laboratorní diagnostiku (Harnett a kol. 1996, Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

### ***Detekce PCR produktů***

Nejčastěji se k detekci PCR produktů používá metoda elektroforézy na agarosovém gelu. Touto metodou ovšem není možné zjistit, zdali produkt PCR obsahuje očekávanou cílovou sekvenci. Kromě toho se k obarvení agarosového gelu používá mutagenní ethidium bromid, jehož rutinní používání v laboratořích pro sledování potravin je rizikové. Proto je v současnosti nejvíce používaná real-time PCR založená na systémech „TaqMan“ a „SYBR Green“. Pro real-time PCR bývají použity chromozomálně kódované geny *ail* a *yst*, plazmidový *yadA* gen a *Yersinia*-specifická oblast na genu pro 16S rRNA (Tabulka 5; Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003, Fukushima a kol. 2011).

### ***Falešně negativní a falešně pozitivní výsledky***

PCR metody mají také několik nevýhod. Je to především nízká reprodukovatelnost v důsledku falešně negativních výsledků při studiu přirozeně kontaminovaných vzorků. Příčinou může být přítomnost inhibičních faktorů v těchto vzorcích, chyba při pipetování nebo chyba v Master Mixu. Jako inhibitor PCR působí např. již malé množství  $MgCl_2$ , který je obsažen v pomnožovacích médiích (ITC, MRB bujón). Falešně negativním výsledkům je možné zabránit použitím interních pozitivních kontrol (Thisted Lambertz a kol. 1998, EFSA 2007).

I zmiňovaná vysoká citlivost PCR metod může být zároveň nevýhodnou. Často vede k falešně pozitivním výsledkům, které jsou způsobené odumřelými buňkami přítomnými ve vysokém počtu ( $10^3$  bakterií/g), nebo částečně homologními sekvencemi u nepatogenních yersinií popř. jiných bakteriálních druhů. K odhalení falešně pozitivních výsledků slouží interní negativní kontrola (EFSA 2007).

**Tabulka 5.** Příklady PCR metod (upraveno podle: Fredriksson-Ahomaa a Korkeala 2003).

<b>VZOREK</b>	<b>OBLAST GENU</b>	<b>PŘÍPRAVA VZORKU</b>	<b>SYSTÉM DETEKCE</b>	<b>REFERENCE</b>
krev	<i>virF</i> , <i>ail</i>	pomnožení + proteináza K	Single PCR, agarosový gel	Feng a kol. 1992
stolice	<i>yst</i>	purifikace DNA	Single PCR, agarosový gel	Ibrahim a kol. 1992
potraviny, voda	<i>yadA</i>	pomnožení + IMS <sup>a</sup> + proteináza K	Nested PCR, agarosový gel/kolorimetrická	Kapperud a kol. 1993

			detekce	
stolice, tonzily	<i>inv</i>	pomnožení + IMS <sup>a</sup> + proteináza K/purifikace DNA	Single PCR, agarosový gel/kolorimetrická detekce	Rasmussen a kol. 1995
stolice	<i>virF, ail, yst</i>	purifikace DNA	Multiplex PCR, agarosový gel	Harnett a kol. 1996
voda	<i>ail</i>	pomnožení + purifikace DNA	Seminested PCR, polyakrylamidový gel	Sandery a kol. 1996
tonzily	<i>virF, ail</i>	pomnožení + NaOH úprava	Nested PCR, agarosový gel	Thisted Lambertz a kol. 1996
stolice	<i>virF, ail, inv, rfbC</i>	purifikace DNA	Multiplex PCR, agarosový gel	Weynants a kol. 1996
potraviny	<i>virF, ail</i>	purifikace DNA	Multiplex PCR, agarosový gel	Nilsson a kol. 1998
tkáň, stolice	<b>16S rRNA</b>	purifikace DNA	Seminested PCR, kolorimetrická detekce	Trebesius a kol. 1998
voda, odpadní voda	<i>yadA</i>	pomnožení + proteináza K	Nested PCR, agarosový gel	Waage a kol. 1999
stolice, potraviny	<i>ail</i>	pomnožení + purifikace DNA	Single PCR, TaqMan	Jourdan a kol. 2000
potraviny	<i>yst</i>	pomnožení + purifikace DNA	Single PCR, TaqMan	Vishnubhatla a kol. 2000
krev	<b>16S rRNA</b>	purifikace DNA	Single PCR, TaqMan	Sen 2000
stolice	<i>yopT</i>	pomnožení + purifikace DNA	Single PCR, agarosový gel	Arnold a kol. 2001

<sup>a</sup> IMS, imunomagnetická separace

### 9.2.2. Molekulární metody detekce *Y. pseudotuberculosis*

Pro detekci *Y. pseudotuberculosis* z přirozeně kontaminovaných vzorků byly doposud popsány dvě metody PCR. Obě tyto metody využívají primery pro

chromozomální gen *inv* a gen *virF*, který je lokalizovaný na plazmidu pYV a mohou být použity i pro vzorky z potravin a vody (EFSA 2007).

Pro izolaci *Y. pseudotuberculosis* z čisté kultury byla vyvinuta metoda hybridizace kolonií, která využívá oligonukleotidové sondy pro geny *inv* a *virF* (EFSA 2007).

### 9.3. Ostatní metody

V současné době se pro identifikaci *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* využívá také metoda MALDI-TOF hmotnostní spektrometrie, která se ukázala být spolehlivou, rychlou a levnou metodou pro identifikaci a subtypizaci bakterií na základě jejich specifických proteinových profilů (Fàbrega a Vila 2012).

Další užitečnou technikou je imunomagnetická separace (IMS), která využívá malé, uniformní, paramagnetické částice potažené protilátkami specifickými pro bakteriální povrchové antigeny. Použití IMS je efektivní při izolaci *Y. enterocolitica* O:3 a O:8 z kultury, ale vhodnost použití metody při izolaci této bakterie z přirozeně kontaminovaných potravin prozatím nebyla dostatečně zdokumentována (Lucero Estrada a kol. 2012).

Pro sérologickou detekci *Y. enterocolitica* u zvířat se běžně používá také metoda ELISA. Ke screeningu ve stádech prasat se ukázala být vhodná nepřímá ELISA na bázi purifikovaných LPS (lipopolysacharidů) patogenní *Y. enterocolitica* (biotyp 4 sérotyp O:3; EFSA 2007). V diagnostice onemocnění u lidí se využívá přímá ELISA pro detekci a kvantifikaci specifických protilátek IgG / IgM / IgA proti *Y. enterocolitica* v séru a plasmě.

## 10. Závěr

Přestože v posledních deseti letech došlo k významnému poklesu počtu hlášení humánních yersinióz v EU, patří *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis* stále mezi významné zoonotické patogeny. Epidemie yersiniózy jsou vzácné, onemocnění se vyskytuje po celém světě spíše sporadicky. Za hlavní etiologické agens je považována *Y. enterocolitica*, i když prevalence onemocnění způsobených *Y. pseudotuberculosis* je pravděpodobně díky nedostatečnému dohledu a rozdílné izolační strategii podhodnocena. Onemocnění představuje riziko především pro malé děti a imunologicky oslabené pacienty, kde může být významnou příčinou nemoci a úmrtnosti.

Ne všechny kmeny *Y. enterocolitica* jsou patogenní, nepatogenní kmeny se běžně vyskytují v prostředí i v potravinách, a pro správnou interpretaci detekce je tedy nutná biotypizace a sérotypizace izolátů.

Prevence výskytu této bakterie dnes spočívá především v dodržování správné výrobní praxe a hygienických pravidel na jatkách i v provozech na zpracování masa. Fekální kontaminace může být značně snížena např. utěsněním konečníku prasete pomocí plastového sáčku. Samozřejmě by měla být také adekvátní sanitace ve všech fázích manipulace se surovinou a produkty a řádné tepelné opracování.

Schopnost enteropatogenních yersinií množit se při chladničkových teplotách společně s jejich významnou asociací s vepřovým průmyslem naznačují, že jsou v budoucnosti nezbytná jednotná kontrolní opatření, která by vedla k včasnému odhalení kontaminovaného masa a masných výrobků.

Jinak je tomu u mléka, vody nebo čerstvých potravin, kde je prevalence enteropatogenních yersinií nízká, ojedinělá a kolísavá. Cílené monitorování by v těchto případech bylo nejen nepraktické, ale i neúčinné, a proto se nedoporučuje.

Izolace enteropatogenních yersinií z prostředí a vzorků potravin je časově náročná a není vhodná k odhadu prevalence. Souběžně s kultivačními metodami je tedy pro screening *Y. enterocolitica* a *Y. pseudotuberculosis* vhodné použít PCR nebo jiné moderní metody a v budoucnosti je třeba věnovat úsilí k vyvinutí dokonalejší a standardizované metody izolace těchto patogenů.

## 11. Seznam literatury

- Arnold T., Hensel A., Hagen R., Aleksic S., Neubauer H., Scholz H. C.** (2001) A highly specific one-step PCR assay for the rapid discrimination of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* from pathogenic *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia pestis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 285-289
- Baumgartner A., Küffer M., Suter D., Jemmi T., Rohner P.** (2007) Antimicrobial resistance of *Yersinia enterocolitica* strains from human patients, pigs and retail pork in Switzerland. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 110-114
- Bercovier H., Mollaret H. H., Alonso J. M., Brault J., Fanning G. R., Steigerwalt A. G., Brenner D. J.** (1980) Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Curr. Microbiol.* 4: 225-229
- Bi Y., Wang X., Han Y., Guo Z., Yang R.** (2012) *Yersinia pestis* Versus *Yersinia pseudotuberculosis*: Effects on Host Macrophages. *Scand. J. Immunol.* 76: 541-551
- Bliska J. B., Ryndak M. B., Grabenstein J. P.** (2006) Type III Secretion Systems in *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. In: Chan R. V. L., Sherman P. M., Bourke B., Bacterial Genomes and Infectious Diseases, 213-226, Humana Press, Totowa, New Jersey
- Borch E., Nesbakken T., Christensen H.** (1996) Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 30: 9-25
- Bottone E. J.** (1997) *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* 10: 257-276
- Bottone E. J.** (1999) *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.* 1: 323-333
- Bottone E. J., Bercovier H., Mollaret H. H.** (2005) Genus XLI. *Yersinia*. In: Brenner D. J., Krieg N. R., Staley J. T. Bergey's manual of systematic bacteriology. 2: 838-848, Springer; Berlin, New York, Heidelberg
- Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A.** (1995) A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrob. Agents Ch.* 39: 1211-1233
- Cheyne B. M., Van Dyke M. I., Anderson W. B., Huck P. M.** (2010) The detection of *Yersinia enterocolitica* in surface water by quantitative PCR amplification of the *ail* and *yadA* genes. *J. Water. Health* 8: 487-499

**Ch'ng S. L., Octavia S., Xia Q., Duong A., Tanaka M. M., Fukushima H., Lan R.** (2011) Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 77: 768-775

**Cornelis G. R.** (1998) The *Yersinia* deadly kiss. *J. Bacteriol.* 180: 5495-5504

**Cornelis G. R.** (2006) The type III secretion injectisome. *Nature Rev. Microbiol.* 4: 811-825

**Cover T. L., Aber R. C.** (1989) *Yersinia enterocolitica*. *New Engl. J. Med.* 321: 16-24

**Crowe M., Ashford K., Ispahani P.** (1996) Clinical features and antibiotic treatment of septic arthritis and osteomyelitis due to *Yersinia enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* 45: 302-309

**Cupáková Š., Necidová L.** (2013) *Yersinia enterocolitica* – významný původce onemocnění z potravin. *Maso* 24: 45-48

**ČSN EN ISO 10273** (2004) Mikrobiologie potravin a krmiv – Horizontální metoda průkazu suspektních patogenních *Yersinia enterocolitica*. 33 p, Praha

**Drummond N., Murphy B. P., Ringwood T., Prentice M. B., Buckley J. F., Fanning S.** (2012) *Yersinia enterocolitica*: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. *Foodborne Pathog. Dis.* 9: 179-189

**EFSA** (2006) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2005, *The EFSA Journal* 94: 1-288

**EFSA** (2007) Scientific Opinion of the Panel on BIOHAZ on a request from EFSA on monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp. *The EFSA Journal* 595: 1-30

**EFSA** (2008) Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from the European Food Safety Authority on foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard. *The EFSA Journal* 765: 1-87

**EFSA** (2010) The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in the European Union in 2008, *The EFSA Journal* 1496: 1-410

**EFSA** (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *The EFSA Journal* 2597: 1-442

- EFSA** (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *The EFSA Journal* 3129: 1-250
- El-Maraghi N. R. H., Mair N. S.** (1979) The histopathology of enteric infection with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Am. J. Clin. Pathol.* 71: 631-639
- Fàbrega A., Vila J.** (2012) *Yersinia enterocolitica*: Pathogenesis, virulence and antimicrobial resistance. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 30: 24-32
- Feng P., Keasler S. P., Hill W. E.** (1992) Direct identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by polymerase chain reaction amplification. *Transfusion* 32: 850-854
- Fernandes R.** (2009) Microbiology handbook: Meat products. 258 p. Royal Society of Chemistry, UK
- Fernández L., Marquez I., Guijarro J. A.** (2004) Identification of specific *in vivo*-induced (*ivi*) genes in *Yersinia ruckeri* and analysis of ruckerbactin, a catecholate siderophore iron acquisition system. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 5199-5207
- Frederiksen W.** (1964) A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria (“*Bacterium enterocoliticum*” and “*Pasteurella X*”). *Scand. Congr. Pathol. Microbiol.* 14: 103-104
- Fredriksson-Ahomaa M.** (2012) Isolation of enteropathogenic *Yersinia* from non-human sources. In: *Advances in Yersinia Research*. 97-105, Springer, New York.
- Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H.** (2003) Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.* 16: 220-229
- Fredriksson-Ahomaa M., Björkroth J., Hielm S., Korkeala H.** (2000) Prevalence and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in pig tonsils from different slaughterhouses. *Food Microbiol.* 17: 93-101
- Fredriksson-Ahomaa M., Bucher M., Hank C., Stolle A., Korkeala H.** (2001) High Prevalence of *Yersinia enterocolitica* 4:O3 on Pig Offal in Southern Germany: A Slaughtering Technique Problem. *Syst. Appl. Microbiol.* 24: 457-463
- Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Korkeala H.** (2006) Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections. *FEMS Immunol. Med. Mic.* 47: 315-329
- Fredriksson-Ahomaa M., Stolle A., Stephan R.** (2007) Prevalence of pathogenic in pigs slaughtered *Yersinia enterocolitica* at a Swiss abattoir. *Int. J. Food Microbiol.* 119: 207-212



- Fredriksson-Ahomaa M., Meyer C., Bonke R., Stüber E., Wacheck S.** (2010) Characterization of *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 isolates from tonsils of Bavarian slaughter pigs. *Lett. Appl. Microbiol.* 50: 412-418
- Fukushima H., Nakamura R., Ito Y., Saito K., Tsubokura M., Otsuki K.** (1983) Ecological studies of *Yersinia enterocolitica* I. Dissemination of *Y. enterocolitica* in pigs. *Vet. Microbiol.* 8: 469-483
- Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y.** (2011) *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*: detection in foods. *J. Pathog.* 2011: 735308
- Funk J. A., Troutt H. F., Davis S. A., Fossler C. P.** (2000) *In vitro* susceptibility of *Yersinia enterocolitica* isolated from the oral cavity of swine. *J. Food Protect.* 63: 395-399
- Galindo C. L., Rosenzweig J. A., Kirtley M. L., Chopra A. K.** (2011) Pathogenesis of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in human yersiniosis. *J. Pathog.* 2011: 182051
- Grahek-Ogden D., Schimmer B., Cudjoe K. S., Nygard K., Kapperud G.** (2007) Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 754–756
- Grassl G. A., Bohn E., Muller Y., Buhler O. T., Autenrieth I. B.** (2003) Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.* 293: 41-54
- Greenwood D., Slack R. C. B., Peutherer J. F.** (1999) Lékařská mikrobiologie: přehled infekčních onemocnění: patogeneze, imunita, laboratorní diagnostika a epidemiologie. 686 p. Grada Publishing, Praha
- Greenwood M. H., Hooper W. L., Rodhouse J. C.** (1990) The source of *Yersinia* spp. in pasteurized milk: an investigation at a dairy. *Epidemiol. Infect.* 104: 351-360
- Grützkau A., Hanski C., Hahn H., Riecken E. O.** (1990) Involvement of M cells in the bacterial invasion of Peyer's patches: a common mechanism shared by *Yersinia enterocolitica* and other enteroinvasive bacteria. *Gut* 31: 1011-1015
- Hallanvuo S., Peltola J., Heiskanen T., Siitonen A.** (2006) Simplified phenotypic scheme evaluated by 16S rRNA sequencing for differentiation between *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like species. *J. clin. microbiol.* 44: 1077-1080

- Harnett N., Lin Y. P., Krishnan C.** (1996) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* using the multiplex polymerase reaction. *Epidemiol. Infect.* 117: 59-67
- Ibrahim A., Liesack W., Stackebrand E.** (1992) Polymerase chain reaction-gene probe detection system specific for pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 30: 1942-1947
- Johnson J. L.** (1998) Isolation and identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* from meat and poultry products. *USDA/FSIS Microbiology Laboratory Guidebook*, 1-28
- Jourdan A. D., Johnson S. C. J., Wesley I. V.** (2000) Development of a fluorogenic 5' nuclease PCR assay for detection of the *ail* gene of pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 3750-3755
- Kapperud G., Vardund T., Skjerve E., Hornes E., Michaelsen T. E.** (1993) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2938-2944
- Langford E. V.** (1972) *Pasteurella pseudotuberculosis* infections in western Canada. *Can. Vet. J.* 13: 85-87
- Lantz P. G., Hahn-Hägerdal B., Rådström P.** (1994) Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends. Food Sci. Tech.* 5: 384-389
- Lee L. A., Gerber A. R., Lonsway M. S., Smith J. D., Carter G. P., Pohr N. D., Parrish C. M., Sikes R. K., Finton R. J., Tauxe R. V.** (1990) *Yersinia enterocolitica* O3: infections in infants and children, associated with the household preparation of chitterlings. *New Engl. J. Med.* 322: 984-987
- Leino R.** (2005) Yersiniosis. In: Kunnamo I., Evidence-Based Medicine Guidelines, 5-6, John Wiley & Sons, Chichester, UK
- Lucero Estrada C. S. M., Velázquez L. D. C., Favier G. I., Di Genaro M. S., Escudero M. E.** (2012) Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR. *Food Microbiol.* 30: 157-163
- Maas M., Dahlhoff K.** (1994) Comparison of sample preparation methods for detection of *Chlamydia pneumoniae* in bronchoalveolar lavage fluid by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2616-2619

**Martínez P. O., Fredriksson-Ahomaa M., Pallotti A., Rosmini R., Houf K., Korkeala H.** (2011) Variation in the prevalence of enteropathogenic *Yersinia* in slaughter pigs from Belgium, Italy, and Spain. *Foodborne Pathog. Dis.* 8: 445-450

**Miller V. L., Falkow S.** (1988) Evidence for two genetic loci in *Yersinia enterocolitica* that can promote invasion of epithelial cells. *Infect. Immun.* 56: 1242-1248

**Nakajima H., Inoue M., Mori T., Itoh K. I., Arakawa E., Watanabe H.** (1992) Detection and identification of *Yersinia pseudotuberculosis* and pathogenic *Yersinia enterocolitica* by an improved polymerase chain reaction method. *J. Clin. Microbiol.* 30: 2484-2486

Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat

**Nesbakken T., Kapperud G., Dommarsnes K., Skurnik M., Hornes E.** (1991) Comparative study of a DNA hybridisation method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 389-394

**Neubauer H., Hensel A., Aleksic S., Mayer H.** (2000) Identification of *Yersinia enterocolitica* within the genus *Yersinia*. *Syst. Appl. Microbiol.* 23: 58-62

**Nilsson A., Lambertz S. T., Stålhandske P., Norberg P., Danielsson-Tham M. L.** (1998) Detection of *Yersinia enterocolitica* in food by PCR amplification. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 140-141

**Paauw A., Leverstein-van Hall M. A., van Kessel K. P. M., Verhoef J., Fluit A. C.** (2009) Yersiniabactin reduces the respiratory oxidative stress response of innate immune cells. *PLoS One* 4: e8240

**Pepe J. C., Miller V. L.** (1993) *Yersinia enterocolitica* invasin: a primary role in the initiation of infection. *P. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6473-6477

**Portnoy D. A., Moseley S. L., Falkow S.** (1981) Characterisation of plasmids and plasmid-associated determinants of *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Infect. Immun.* 31: 775-782

**Rasmussen H. N., Rasmussen O. F., Christensen H., Olsen J. E.** (1995) Detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in faecal samples and tonsil swabs from pigs using IMS and PCR. *J. Appl. Bacteriol.* 78: 563-568

- Sandery M., Stinear T., Kaucner C.** (1996) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water by PCR. *J. Appl. Bacteriol.* 80: 327-332
- Schleifstein J. I., Coleman M. B.** (1939) An unidentified microorganism resembling *B. ligniere* and *Past. Pseudotuberculosis*, and pathogenic for man. *New York State J. Med.* 39: 1749-1753
- Scribner R. K., Marks M. I., Weber A., Pai C. H.** (1982) *Yersinia enterocolitica*: comparative in vitro activities of seven new  $\beta$ -lactamase antibiotics. *Antimicrob. Agents Ch.* 22: 140-141
- Sen K.** (2000) Rapid identification of *Yersinia enterocolitica* in blood by the 5' nuclease PCR assay. *J. Clin. Microbiol.* 38: 1953-1958
- Singh I., Viridi J. S.** (2004) Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* 53: 1065-1068
- Stenhouse M. A. E., Milner L. V.** (1982) *Yersinia enterocolitica*: a hazard in blood transfusion. *Transfusion* 22: 396-398
- Thisted Lambertz S., Danielsson-Tham M. L.** (2005) Identification and characterization of pathogenic *Yersinia enterocolitica* isolates by PCR and pulsed-field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3674-3681
- Thisted Lambertz S., Ballagi-Pordány A., Nilsson A., Nordberg P., Danielsson-Tham M. L.** (1996) A comparison between a PCR method and a conventional culture method for detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 81: 303-308
- Thisted Lambertz S., Ballagi-Pordány A., Lindqvist R.** (1998) A mimic as internal standard to monitor PCR analysis of foodborne pathogens. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 9-11
- Trebesius K., Harmsen D., Rakin A., Schmelz J., Heesemann J.** (1998) Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labeled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *J. Clin. Microbiol.* 36: 2557-2564
- Trülzsch K., Oellerich M. F., Heesemann J.** (2007) Invasion and dissemination of *Yersinia enterocolitica* in the mouse infection model. In: Perry R. D., Fetherston J. D., *The Genus Yersinia*. 279-285, Springer, New York

**Vishnubhatla A., Fung D. Y. C., Oberst R. D., Hays M. P., Nagaraja T. G., Flood S. J. A.** (2000) Rapid 5' nuclease (TaqMan) assay for detection of virulent strains of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 4131-4135

**von Altrock A., Roesler U., Waldmann K. H.** (2011) Herd factors associated with the serological *Yersinia* prevalence in fattening pig herds. *Foodborne Path. Dis.* 8: 1249-1255

**Votava M.** (2003) Lékařská mikrobiologie speciální. 512p. Neptun, Brno

**Waage A. S., Vardund T., Lund V., Kapperud G.** (1999) Detection of low numbers of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in environmental water and sewage samples by nested polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.* 87: 814-821

**Wauters G., Kandolo K., Janssens M.** (1987) Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* 9: 14-21

**Wauters G., Goossens V., Janssens M., Vandepitte J.** (1988) New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 851-854

**Weynants V., Jadot V., Denoel P., Tibor A., Letesson J. J.** (1996) Detection of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 by a PCR method. *J. Clin. Microbiol.* 34: 1224-1227

**Wunderink H. F., Oostvogel P. M., Frénay I. H. M. E., Notermans D. W., Fruth A., Kuijper E. J.** (2014) Difficulties in diagnosing terminal ileitis due to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Eur. J. Clin. Microbiol.* 33: 197-200

**Yucel N., Ulusoy H. A.** (2006) Turkey survey of hygiene indicator bacteria and *Yersinia enterocolitica* in raw milk and cheese samples. *Food Control* 17: 383-388

#### **INTERNETOVÉ ZDROJE:**

**ECDC** (2012) Surveillance report: Annual epidemiological report Reporting on 2010 surveillance data and 2011 epidemic intelligence data. Dostupné z <http://www.ecdc.europa.eu/>, zobrazeno 20. 3. 2014

**Euzéby J. P.** (2014) List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. Dostupné z <http://www.bacterio.net/yersinia.html/>, zobrazeno 15. 1. 2014

**FDA** (2007) Bacteriological analytical manual. *Yersinia enterocolitica*. Dostupné z <http://www.fda.gov/>, zobrazeno 12. 3. 2014

**SZÚ** (2013) Výskyt infekčních onemocnění přenášených potravinami a vodou v ČR – rok 2012 a trendy nemocnosti. Dostupné z: <http://www.szu.cz/>, zobrazeno 2. 4. 2014