

FAKULTA VETERINÁRNÍ HYGIENY A EKOLOGIE
Ústav hygieny a technologie mléka

VIRY A BAKTERIOFÁGY
V POTRAVINÁCH

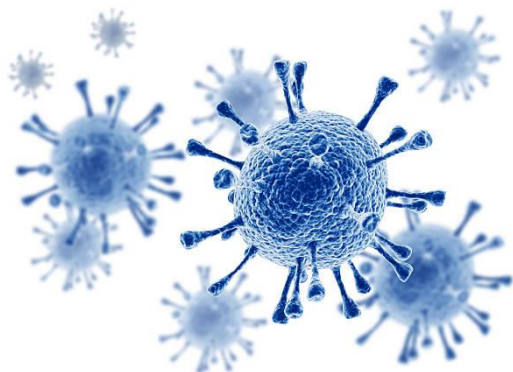
Iveta Vaňková
Veronika Čurečková
MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.

OBSAH

1.	VIRY	3
1.1.	Základní charakteristika virů.....	4
1.2.	Morfologie a struktura virů	4
1.2.1.	Genom viru	5
1.2.2.	Kapsida – proteinový plášť viru.....	5
1.2.2.1.	<i>Neobalené viry</i>	6
1.2.2.2.	<i>Obalené viry</i>	6
1.3.	Replikace (množení) virů.....	7
1.4.	Infekce buňky	8
1.5.	Šíření virové infekce.....	8
2.	BAKTERIOFÁGY	9
2.1.	Základní charakteristika bakteriofágů.....	9
2.2.	Morfologie a struktura bakteriofágů	9
2.3.	Životní cyklus bakteriofágů	10
2.4.	Významné vlastnosti a využití bakteriofágů.....	10
3.	VIRY – PŮVODCI ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ.....	12
3.1.	Viry v potravinách	12
3.2.	DNA viry	12
3.2.1.	Adenoviry	12
3.3.	RNA viry	13
3.3.1.	Virus hepatitidy A	13
3.3.2.	Virus hepatitidy E	14
3.3.3.	Sapovirus (Sapporo-like virus)	15
3.3.4.	Norovirus (Norwalk-like virus)	15
3.3.5.	Rotavirus	16
3.3.6.	Astrovirus	17
3.3.7.	Enterovirus	17
3.3.8.	Ostatní viry s potenciálem „food-borne“	18
3.3.8.1.	<i>Parvovirus</i>	18
3.3.8.2.	<i>Coronavirus</i>	18
3.3.8.3.	<i>Virus klíšťové encefalitidy</i>	18
3.3.8.4.	<i>Torovirus</i>	19
4.	STANOVENÍ VIRŮ V POTRAVINÁCH	20
4.1.	Konvenční metody detekce virů v potravinách.....	20
4.1.1.	Polymerázová řetězová reakce.....	20
4.1.2.	NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification)	21
4.2.	Další molekulárně-biologické metody	22
4.2.1.	TMA (Transcription-Mediated Amplification).....	22
4.2.2.	SDA (Strand Displacement Amplification)	22
4.2.3.	LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification).....	23
4.2.4.	Ligázová řetězová reakce.....	24
5.	PŘÍPADOVÉ STUDIE.....	25
5.1.	Úvod.....	25
5.2.	Případové studie	27
5.2.1.	Případová studie 1	27
5.2.2.	Případová studie 2	27

5.2.3. Případová studie 3	28
5.2.4. Případová studie 4	28
5.2.5. Případová studie 5	29
5.2.6. Případová studie 6	29
5.2.7. Případová studie 7	30
Použitá literatura	31

1. VIRY



Obrázek 1: Virus (zdroj: URL 1)

Viry představují vysoce heterogenní skupinu mikroorganismů v mnoha vlastnostech odlišnou od bakterií. Jsou to sktriktně intracelulární a potenciálně patogenní mikroorganismy, které obsahují vždy pouze jeden typ nukleové kyseliny. Nejsou schopny růstu ani binárního dělení a jejich replikace probíhá na úrovni genetického materiálu. Nevlastní funkční organely a jsou zcela závislé na hostitelské buňce, její energii a syntéze makromolekul. ICTV (*International Committee on Taxonomy of Viruses*) definuje virus jako elementární biosystém, který vykazuje některé vlastnosti živých systémů, jako je

přítomnost genomu a schopnost adaptace na změněné prostředí. Přesto ale viry nejsou schopny zabezpečit své energetické nároky bez živé hostitelské buňky a mimo ni nejsou funkčně aktivní. Virus se stává částí živého systému pouze po integraci svého genomu do hostitelské buňky a virová replikace je možná pouze v **metabolicky aktivní buňce**.

Viry (nadříše *Subcelulata* – nebuněční) mají mezi organismy zvláštní a velmi diskutované postavení. Tyto nebuněčné organismy, stojící na rozhraní mezi živou a neživou přírodou, můžeme definovat jako diskrétní jednotku živé hmoty, která obsahuje genetickou informaci (DNA nebo RNA), obalové struktury a je schopna evoluce. Studium virů se zabývá virologie, jež bývá často stavěna mimo mikrobiologii, která obvykle studuje pouze **bakteriofágy** (viry bakterií) a **mykoviry** (viry nižších hub).

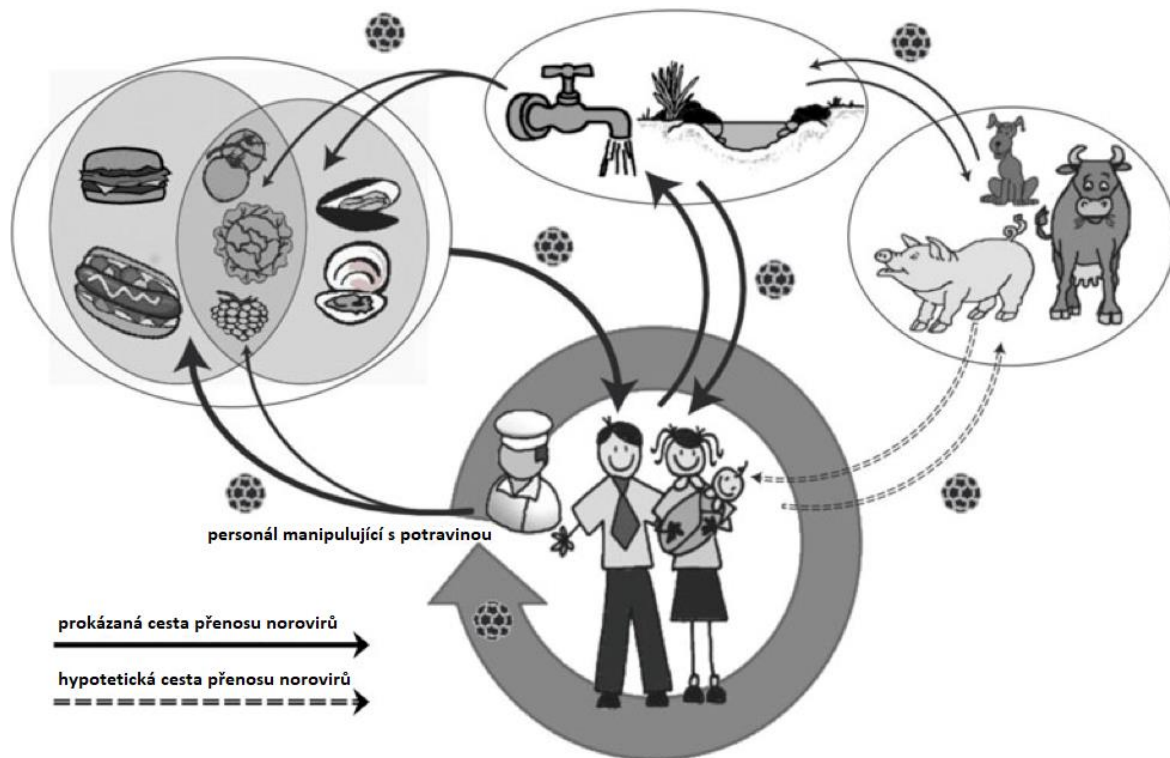
Kontaminace vody a potravin viry představuje významnou hrozbu pro lidské zdraví. Případy výskytu virových nákaz prostřednictvím konzumace potravin se stále zvyšují, a to díky zvyšující se populaci, nedostatku čisté vody a změnám ve stravovacích návycích.

Ohrožení lidského zdraví toxiny, houbami, parazity a bakteriálními agens jsou nám již dobře známa, a to zejména proto, že jimi způsobená onemocnění už delší dobu známe, a byly již vyvinuty vhodné metody detekce, vyšetřování a sledování jejich přítomnosti. Naopak metody detekce virů v rizikových potravinách se začaly rozvíjet teprve v nedávné době a zatím je jejich spektrum velmi omezené.

Jedním z důvodů může být skutečnost, že i nízká úroveň kontaminace potravin viry může způsobit infekci u vnímavého hostitele, přičemž nízký počet virů v potravine je obtížně detekovatelný metodami běžně používanými v klinické praxi.

Dalším problémem je, že některé z tzv. „food-borne“ virů (*angl. food-borne* – onemocnění vyvolané konzumací kontaminovaných potravin nebo vody) buď nerostou na buněčných kulturách (např. norovirus) nebo špatně rostou na primárních izolátech = čistý virový vzorek, který byl získán z infikovaného jedince/potraviny (např. virus hepatitidy A).

Z tohoto pohledu jsou za nejrizikovější potraviny považovány zejména mořské plody, čerstvé produkty a další produkty určené k přímé spotřebě (*angl. ready-to-eat*). Tyto produkty častěji přispívají k přenosům virů, protože jsou konzumovány tepelně neupravené, čímž je odstraněn jeden z bezpečnostních faktorů zabraňující šíření nákaz, a to vaření. Tyto potraviny také často přicházejí do kontaktu s potenciálně kontaminovanou vodou či ledem, rukama pracovníků a povrchy výrobního zařízení.



Obrázek 2: Cesty přenosu norovirů (zdroj: URL 2, upraveno)

1.1. Základní charakteristika virů

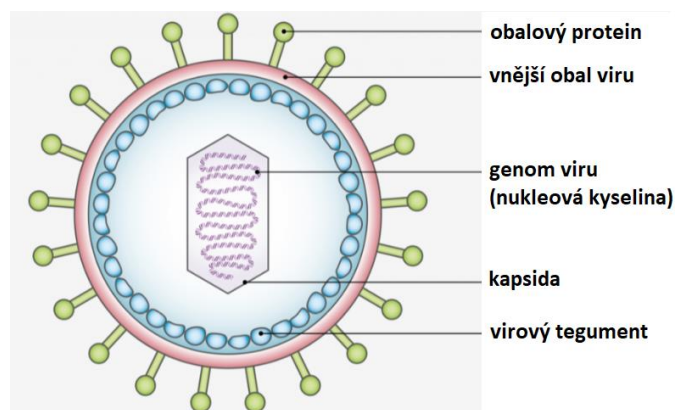
Viry jsou submikroskopické, nebuněčné, striktně intracelulární organismy, které obsahují pouze jeden typ nukleové kyseliny (DNA nebo RNA) a jsou schopny replikace pouze v živých buňkách. Neliší se od ostatních mikroorganismů jen svou velikostí, která se pohybuje v rozmezí několika nm, ale především svou biologickou povahou. Neobsahují žádné funkční orgány, a tak jsou zcela závislé na hostitelské buňce a její energii. Viry, které se nachází mimo hostitelskou buňku, jsou metabolicky inertní. Během této fáze jsou přenášeny do dalšího hostitele. Uvnitř hostitelské buňky se viry stávají metabolicky aktivními (replikační fáze), virový genom využívá hostitelskou buňku ke svojí replikaci, transkripci virové mRNA, translaci a syntéze virových proteinů nezbytných k tvorbě nových virionů.

Existují dvě teorie, které objasňují původ virů. Podle první teorie jsou viry degenerované bakterie, které ztratily většinu buněčných funkcí. Druhá teorie se přiklání k tomu, že se jedná o uniklé eukaryotické geny, tj. nukleové kyseliny, které se naučily přežít mimo prostředí buňky.

1.2. Morfologie a struktura virů

Viry se řadí do různých čeledí a navzájem se odlišují svou velikostí i morfologií. Většina má typické rozměry od 20 – 300 nm. Tvar viru může být sférický, ale i vláknitý. Pro hodnocení morfologie virů je nezastupitelná metoda elektronové mikroskopie, v poslední době se využívá rentgenová krystalografie a počítačová analýza.

Virová částice je označována jako **virion**. Nejdůležitější složkou virionu je nukleová kyselina. Ta obsahuje genetickou informaci nezbytnou pro realizaci reprodukce viru a označujeme ji jako **genom viru**. Genom viru je chráněn několika obaly.



Obrázek 3: Stavba virionu obaleného viru (zdroj: URL 3)

1.2.1. Genom viru

Podle typu genomu rozlišujeme **DNA** a **RNA viry**. Pouze u virů se setkáváme s uchováváním genetické informace v podobě molekuly RNA. Genom může být buď cirkulární či lineární, může být tvořen dvěma komplementárními řetězci (dsDNA, dsRNA *double-stranded DNA, RNA*) nebo jediným vláknem (ssRNA, ssDNA – *single-stranded RNA, DNA*).

U RNA virů je velmi důležité rozlišovat polaritu genomu. RNA s pozitivní polaritou (+)ssRNA má povahu mRNA a proto může být přímo překládána na ribozomech do příslušných polypeptidů. Nukleová kyselina s pozitivní polaritou extrahovaná z virionu je sama o sobě infekční. Při jejím experimentálním vpravení do buňky může iniciovat kompletní replikační cyklus s tvorbou nových virových partikulí. (-)ssRNA viry, tj. RNA viry s negativní polaritou mají opačnou polaritu než příslušná mRNA a proto musí být jejich RNA nejdříve přepsána do informační podoby mRNA virovou RNA transkriptázou.

Velikost genomu se u ssDNA či ssRNA virů udává počtem bází (b), u virů s dvouřetězcovým genomem počtem párů bází (bp), nebo v jejich násobcích (1000 bází = 1kb).

1.2.2. Kapsida – proteinový plášť viru

Jedná se o proteinový obal virové nukleové kyseliny tvořený jedním nebo několika druhy proteinů, které se k sobě řadí a vytváří kolem genomu proteinový plášť – **kapsidu**. Ta má velmi důležitou úlohu v architektuře virů – určuje symetrii virové částice. Je tvořena z opakujících se strukturálních jednotek, které označujeme jako **kapsomery**. Kapsomery jsou tvořeny jednou nebo několika bílkovinnými molekulami. Pro každou čedič virů je počet kapsomer tvořících kapsidu charakteristický. Virové kapsidy se vyznačují symetrickým uspořádáním. Kapsida, která obsahuje genom, se označuje jako **nukleokapsida**. U živočišných virů rozlišujeme symetrii helikální, ikozahedrání a komplexní.

Symetrie helikální (helikoidální)

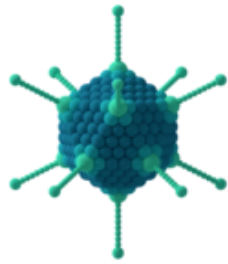
Kapsidy jsou tvořeny jednotlivými polypeptidy (protomerami), řadí se za sebou a jako šroubovice sledují longitudinálně vlákno genomu. S tímto typem kapsidy se můžeme setkat u řady RNA virů, například u virů čeledi *Orthomyxoviridae* a *Paramyxoviridae*.

Symetrie ikozahedrání (kubická)

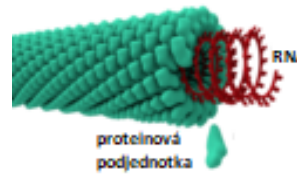
Tvoří ji pravidelný dvacetistěn se třemi osami symetrie, který vzniká autoagregací kapsomer dvojího druhu. Pentony tvoří 12 vrcholů dvacetistěnu a hexony tvoří jeho stěny, přičemž pentony jsou tvořeny pěti, hexony šesti do kruhu spojenými molekulami peptidů.

Komplexní symetrie

Pokud uspořádání kapsomer neumožňuje zařazení do ikozahedrání nebo helikální symetrie, označujeme toto uspořádání jako symetrii komplexní (např. čedič *Poxviridae* – viry neštovic).



Obrázek 4: Ikozahedrální kapsida – adenovirus
(zdroj: URL 4)



Obrázek 5: Helikální kapsida
(zdroj: URL 5, upraveno)

1.2.2.1. Neobalené viry

U řady virů reprezentuje nukleokapsida kompletní virion. Takový virus můžeme označit jako neobalený. Neobalené viry jsou rezistentní k éteru a tukovým rozpouštědlům a relativně odolné vůči vlivům vnějšího prostředí. K infekci neobalenými viry může dojít přímým kontaktem se zdrojem nákazy (infikovaný člověk nebo zvíře), ale také prostřednictvím kontaminovaných předmětů, vodou nebo potravou.

Neobalené viry nejsou inaktivovány kyselým pH, snadno pronikají z nosohltanu do zažívacího traktu a následně jsou vylučovány stolicí. Ve vnějším prostředí přetrvávají dlouho, především v odpadních a povrchových vodách. Nejčastěji se jedná o adenoviry, enteroviry nebo virus hepatitidy A.

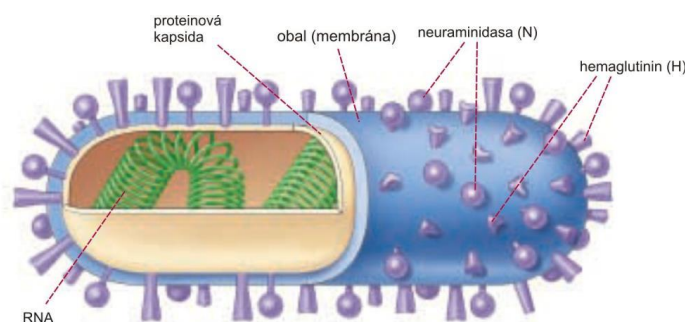
1.2.2.2. Obalené viry

Obalené viry mají kromě kapsidy lipoproteinový obal. Ten je tvořen lipidovou dvojvrstvou hostitelského původu, kterou se kapsida obalí při prostupu skrz membránu hostitelské buňky, když opouští oblast svého vzniku pučením. Jedná se vlastně o modifikovanou cytoplazmatickou membránu hostitelské buňky.

Obalené viry jsou labilnější a citlivější vůči fyzikálním a chemickým vlivům než viry neobalené. Kyselá pH žaludku je inaktivuje a proto běžně nepronikají do dolní části zažívacího traktu. K infekci dochází přímým kontaktem se zdrojem nákazy, nejčastěji kapénkovou infekcí. U labilnějších druhů virů potom pouze přímým kontaktem sliznice se sliznicí (sexuálně přenosné infekce).

Podle toho, kde vznikají novotvořené nukleokapsidy, získávají viry lipidový obal buď:

- pučením skrz jadernou membránu (čeleď *Herpesviridae*),
- pučením z cisteren při prostupu endoplazmatickým retikulem (čeleď *Coronaviridae*),
- pučením na cytoplazmatické membráně (čeleď *Orthomyxoviridae* či *Paramyxoviridae*).



Obrázek 6: Stavba viru chřipky (zdroj: URL 6)

1.3. Replikace (množení) virů

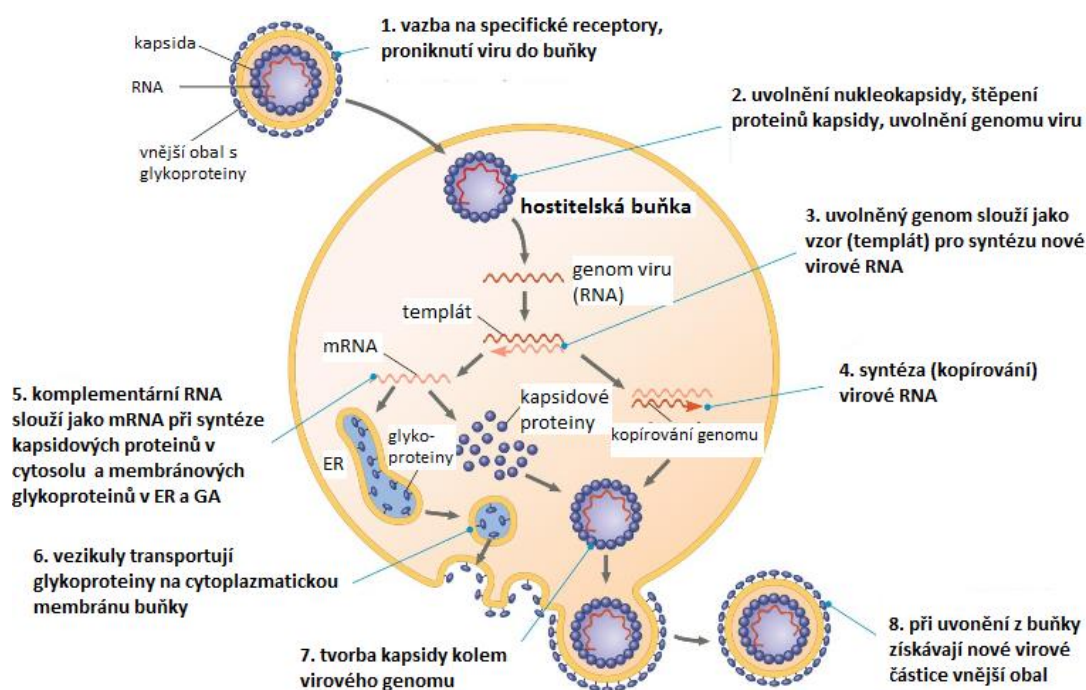
Viry se množí pouze v živých buňkách. Růstový neboli reprodukční cyklus viru zahajují pochody spojené se vstupem virové nukleové kyseliny do vhodného místa v buňce. Pak následuje syntéza jednotlivých virových složek. Cyklus končí dozráváním nových virionů.

Setká-li se virion s buňkou, nejprve se nespecificky absorbuje na její povrch. Jde-li o buňku vnímavou, tedy jsou-li na jejím povrchu přítomny zvláštní struktury – receptory, mění se absorpce v pevné, specifické přilnutí. Někdy dochází ke splynutí virového obalu s povrchem buňky. Povrchová buněčná membrána s přilnutým virionem se záhy vchlípí dovnitř a buňka tak virion pohltí. Do vzniklé fagocytární vakuoly se vyprázdňují enzymy z nejbližšího buněčného lysozomu. Tyto enzymy doslova svlékají z virionu jeho povrchové struktury a obnaží tak virovou nukleovou kyselinu. Uvolněná nukleová kyselina si podřídí buněčný metabolismus a donutí buňku, aby místo svých bílkovin a nukleových kyselin tvořila bílkoviny a nukleové kyseliny virové. Syntéza těchto látek je řízená virovými enzymy, odehrává se na buněčných ribozomech na úkor energetického a látkového metabolismu buňky.

Nově syntetizované virové bílkoviny se podle druhu viru hromadí v cytoplazmě nebo v jádře buňky a podle zákonů symetrie se skládají v nové kapsidy. Do vznikajících kapsid se včleňuje nově vytvořená virová nukleová kyselina. Přitom se tvoří i řada virionů nedokonale sestavených (inkompletních). Virový obal vzniká tak, že nukleokapsidy prostupují buněčnými membránami, pozměňují je a nakonec se jimi obalí. Pod elektronovým mikroskopem to vypadá, jakoby dozrávající viriony přes buněčné membrány doslova pučely. Na závěr cyklu zralé virové částice postupně opouštějí buňku.

Délka růstového cyklu závisí na druhu viru. Výtěžek cyklu, tj. počet nově vzniklých infekčních virionů, může činit stovky až tisíce. Celkový počet nových virionů, včetně neinfekčních (neúplných), bývá mnohokrát vyšší.

Vlivem prostředí vznikají v genomu viru mutace, výsledné mutanty mohou mít změněné vlastnosti nebo dochází ke změnám jejich virulence.



Obrázek 7: Replikace RNA virů (Reece et al., 2014; upraveno)

1.4. Infekce buňky

O infekci buňky virem hovoříme až tehdy, začne-li v buňce působit volná virová nukleová kyselina. Skončí-li reprodukční cyklus vznikem nových infekčních virionů, jde o tzv. **produktivní infekci** buňky. Pokud reprodukční cyklus neproběhne až do konce, nazýváme takovou infekci jako **abortivní**. Při abortivní infekci vznikají inkompletní, neinfekční viriony nebo se v buňce hromadí jen virové antigeny.

Někdy zůstávají buňky infikovány stále a předávají virus potomstvu. Tvoří-li se přitom infekční viriony, jde o infekci **perzistentní**. Včlení-li se virová nukleová kyselina do buněčného genomu a zároveň s ním se dělí, nové viriony se netvoří. Takovou infekci buňky nazýváme **latentní**. Latentní infekce se může příležitostně aktivovat a reprodukční cyklus může pokračovat až do vzniku nových virionů.

Důsledkem virové infekce buňky tedy může být:

- smrt buňky vlivem jejího rozsáhlého poškození,
- perzistentně nebo latentně infikovaná buňka,
- uzdravení buňky.

1.5. Šíření virové infekce

Nejdůležitějšími vstupními branami virů do lidského těla jsou sliznice dýchacích cest, sliznice zažívacího traktu a kůže s podkožím.

K infekci organismu skrz gastrointestinální trakt dochází při konzumaci kontaminovaných potravin. Po příjmu potravy se viry dostávají přímo do žaludku nebo nejprve infikují nosohltan a následně potom i další části zažívacího ústrojí (žaludek, střeva). Jícen je jen zřídka infikován pro jeho tuhý vrstevnatý epitel a rychlou pasáž potravy. Intestinální trakt je chráněn hlenem, který může obsahovat specifické protilátky.

Peristaltický pohyb střevního obsahu umožňuje přítomným virionům kontakt s vnímavými buňkami. Z dalších protektivních mechanismů, schopných inaktivovat viry v zažívacím systému, je nutno jmenovat kyselé prostředí v žaludku, žluč a dále proteolytické enzymy v tenkém střevě. Přesto existují viry způsobující střevní infekce – např. čeled' *Coronaviridae*. Ke vzácnějším vstupním branám virové infekce patří ostatní sliznice a placenta.

Viriony, které opustily infikovanou buňku, pronikají do buněk bezprostředně sousedících a také jsou pasivně unášeny tělními tekutinami na vzdálenější místa. Šířením viru do sousedních buněk se zvětšují jak ložiska infekce ve vstupní bráně, tak ložiska vzniklá na ostatních místech organismu.

Po pomnožení ve vstupní bráně se virus může šířit lymfatickými cestami do regionálních mízních uzlin. Z uzlin se viriony vyplavují do krve, kde se jejich přítomnost označuje jako **virémie**. Během virémie se virus rozsévá do celého těla, množí se ve vnitřních orgánech a z nich se opět uvolňuje do oběhu. Dojde-li po napadení některého orgánu k typickým příznakům nemoci, označujeme ho jako **cílový orgán**.

Důležitými cílovými orgány jsou centrální nervová soustava, kůže, velké žlázy a svaly. U většiny virových infekcí však přirozená obranyschopnost organismu zabrzdí šíření viru dříve, než se pomnoží v cílovém orgánu. Z tohoto důvodu většina viróz probíhá bez specifických příznaků.

Viry se vylučují z postižených sliznic dýchacího a střevního traktu, z některých druhů vyrážek na kůži, dále močí, trusem a krví. Ze způsobu vylučování vyplývá způsob přenosu viru na nového hostitele.

2. BAKTERIOFÁGY

Zkráceně fágy, jsou viry schopné infikovat jen buňky určitých bakterií. Můžeme je najít na všech místech osídlených jejich bakteriálními hostiteli, jako například v půdě nebo ve střevech živočichů. Jedním z nejvýznamnějších nalezišť fágů a dalších virů je mořská voda, ve které bylo nalezeno až 9×10^8 virionů na mililitr a až 70 % mořských bakterií jimi může být infikováno. Fágy byly dlouho považovány za neživé objekty, protože nemají vlastní metabolismus, nereagují na změny okolí a pro svoje rozmnožování využívají bakterie, ale v současnosti jsou oficiálně označovány jako tzv. živé nebuněčné entity.

2.1. Základní charakteristika bakteriofágů

Typická stavba fágů zahrnuje bílkovinnou kapsidu a v ní uzavřený genetický materiál. Na kapsidu krčkem navazuje bičík s bičíkovou pochvou, bazální destičkou a vlákny bičíku, která slouží k přichycení na povrch bakterie. Genetický materiál bakteriofágů je tvořen DNA nebo RNA. Nukleová kyselina může být jednořetězcová i dvouřetězcová, kružnicová i lineární, dlouhá 5 000 až 500 000 nukleotidů.

2.2. Morfologie a struktura bakteriofágů

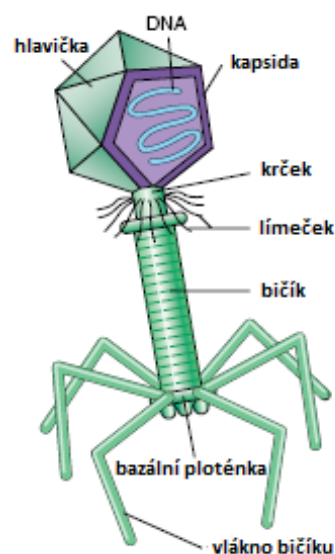
Znamé bakteriofágy jsou morfologicky velmi rozmanité, jejich symetrie je ikozahedrání nebo helikální (případně obě). U největších a nejsložitějších bakteriofágů (např. bakteriofágy *Escherichia coli* T2, T4 a T6) vykazuje hlavička symetrii ikozahedrání a bičík helikální.

Průměr hlavičky různých bakteriofágů se pohybuje v rozmezí 15 – 100 nm, délka bičíků je různá (od sotva patrného, po asi 200 nm), průměr bičíku je 10 nm. Z velkých fágů má např. fág T4 hlavičku o průměru asi 65 nm a délce 95 nm. Hlavička má tvar dvou polovičně příčně rozdělených ikozahedrů spojených nízkým šestibokým hranolem. Bičík, dlouhý také 95 nm, je pevný, ale jeho povrchová pochva je kontraktilní. Na konci bičíku je připojena šestiboká bazální ploténka s ostny a bičíkovými vlákny. Osou bičíku prochází dutá dřev. Liché bakteriofágy téže řady (T1, T3) mají dlouhé a ohebné bičíky, bez kontraktilní složky. Bičík bakteriofága nikdy neslouží k pohybu.

Malé ikozahedrání bakteriofágy se dále rozdělují do dvou typů podle toho, zda mají nebo nemají velké, hroty opatřené kapsomery ve všech dvanácti rozích svého ikozahedru. Tyčinkové bakteriofágy obsahují buď jednořetězcovou DNA nebo RNA. Nejmenší bakteriofágy s jednořetězcovou RNA jsou kulovitého tvaru; jen o něco větší bakteriofágy s jednořetězcovou DNA jsou buď dvanáctistěnné nebo vláknité.

Dosavadní pokusy o zavedení morfologické klasifikace rozlišují 5 základních typů bakteriofágů:

- virion složený z ikozahedrání hlavičky a stažitelného (kontraktilního) bičíku
- virion složený z ikozahedrání hlavičky s nestažitelným bičíkem
- virion ikozahedrání bez bičíku
- virion tyčinkovitý až vláknitý
- virion kulovitý



Obrázek 8: Bakteriofág T4
(Raven and Johnson, 1999; upraveno)

2.3. Životní cyklus bakteriofágů

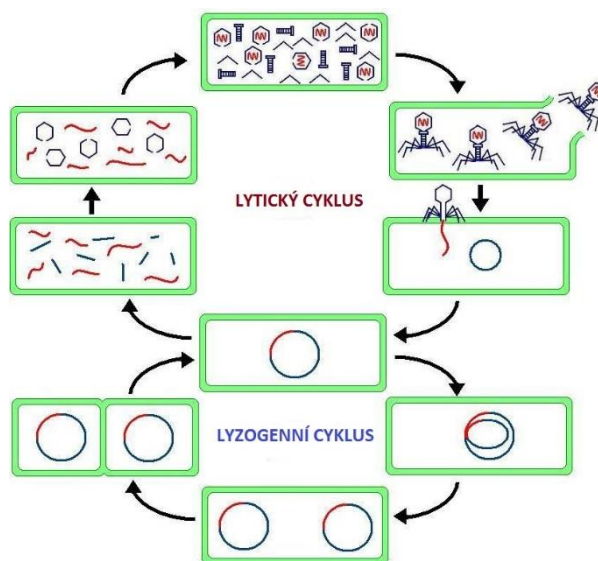
Podle průběhu životního cyklu lze bakteriofágy rozdělit do dvou skupin a to na **fágy virulentní** s lytickým životním cyklem a **fágy temperované** s lyzogenním životním cyklem.

Virulentní fágy s lytickým životním cyklem

Tyto bakteriofágy způsobují lýzu hostitelské bakteriální buňky. Jejich životní cyklus začíná adsorpcí virionu na povrch vnímavé buňky (u grampozitivních bakterií fágy nasedají obvykle na teichoové kyseliny), následuje penetrace nukleové kyseliny fága do cytoplazmy buňky a její replikace s využitím DNA polymerázy hostitele. V dalším kroku vzniká raná fágová mRNA a jsou syntetizovány proteiny kontrolující jejich syntézu a následně se syntetizují také tzv. pozdní bílkoviny fága. Po nasyntetizování potřebných složek jsou kompletovány nové virové částice (viriony), které se uvolní do vnějšího prostředí (pomocí endolysinů dochází k lýze bakteriální buňky). Uvolněné viriony mohou následně infikovat další citlivé buňky.

Temperované fágy s lyzogenním cyklem

Tyto fágy se rekombinací začleňují do genomu hostitele, jejich nukleová kyselina se replikuje a přenáší na potomstvo spolu s genomem bakteriální buňky. Takto začleněný fág se nazývá **profág**. Působením některých vnějších faktorů (např. UV záření, mutageny, stresové faktory) se profág může opět uvolnit a vyčlenit z nukleové kyseliny bakteriální buňky a temperovaný fág se stane fágem virulentním. Při chybném vyčlenění se může spolu s genetickou informací fága vyčlenit i část genomu hostitelské bakterie, která se tak stane součástí nové virové částice a může být šířena dál. Tento proces se nazývá transdukce a např. u druhu *Staphylococcus aureus* je nejčastějším způsobem horizontálního přenosu genů.



Obrázek 9: Životní cyklus bakteriofágů (zdroj: URL 7, upraveno)

2.4. Významné vlastnosti a využití bakteriofágů

Bakteriofágy jsou schopné lyzovat napadené bakterie, mohou proto sloužit jako účinná antibakteriální léčiva. Hlavní problém je však v tom, že každý druh bakteriofága napadá jen konkrétní druh bakterie a ve velké většině případů dokonce pouze některé kmeny tohoto druhu. Aby byla léčba bakteriofágy účinná, musí se nejprve přesně určit konkrétní bakteriální druh a kmen, který způsobil infekci, a pak podat pacientovi přesně vybrané bakteriofágy. Léčba pomocí bakteriofágů je tedy časově náročnější než např. použití širokospektrálních

antibiotik. Ovšem vzhledem k narůstající rezistenci bakterií k antibiotikům, má využití bakteriofágů velký potenciál.

Kromě užitečných vlastností, které mají bakteriofágy jako ničitelé bakterií, však mohou také negativně ovlivňovat průběh bakteriálních infekcí zvířat a člověka. Po infekci bakteriální buňky mohou totiž přejít do latentního, lyzogenního stavu, kdy se bakteriofág (resp. už pouze jeho nukleová kyselina – profág) začlení do genetické informace buňky. Fágy v lyzogenním stavu jsou součástí bakteriální DNA a spolu s ní jsou také replikovány při buněčném dělení (viz kapitola 2.3). V genomu některých bakteriofágů se vyskytují geny kódující tvorbu toxinů, které tzv. lyzogenizovaná bakterie (bakterie s profágem) má možnost produkovat. Takto se i z relativně neškodné bakterie může stát vysoce patogenní původce onemocnění.

Proces, kdy bakterie díky profágu získá nové vlastnosti, se nazývá lyzogenní konverze. Ta může být pozitivní, což je případ zisku genu kódujícího tvorbu toxinu, ale i negativní, kdy profág svým začleněním do některého z genů bakterie přerušuje jeho sekvenci, a tím gen inaktivuje. Např. některé patogenní kmeny Escherichia coli, (např. enterohemoragické kmeny E. coli) jsou s největší pravděpodobností infikované bakteriofágem, jehož genetická informace způsobuje jejich patogenitu.

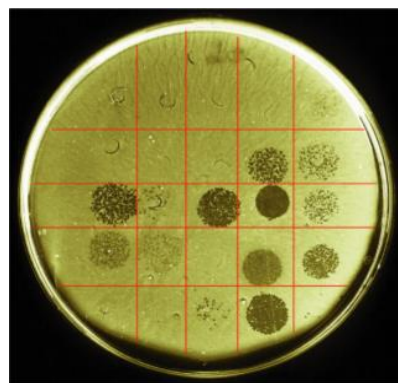
Bakteriofágy lze úspěšně využít i pro typizaci bakterií, tzv. **fagotypizaci**. Fagotypizace je založena na rozlišování antigeně i biochemicky shodných bakteriálních kmenů pomocí standardních specifických bakteriofágů. Jedná se o fenotypovou typizační metodu, která slouží k průkazu genetické příbuznosti izolátů zachycených při epidemiích – odlišení epidemiologicky nesouvisejících izolátů. Sleduje se rozdílná citlivost bakteriálních kmenů k fágové infekci.

Fágy jsou aplikovány ve formě kapek na živný agar inokulovaný přes noc pomnoženou kulturou testovaného bakteriálního kmene. K provedení je potřeba použít také kontrolní kmeny se známými reakcemi. Pozitivní reakce se projeví tvorbou plaků (= lyzované buňky) viditelných jako tečkovité projasnění svrchní vrstvy agaru s narostlou bakteriální kulturou. Pro každého fága je hodnocen stupeň lýze bakteriální buňky, kterou vyvolává. Soubor výsledků se poté nazývá fagotyp.

Fagotypizace se používá při diferenciaci významných patogenů, např. *Salmonella* Typhi, *Salmonella* Paratyphi, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* či mykobakterií.

Postup fagotypizace:

- 1) testovaná bakteriální kultura se pomnoží v živném médiu (37 °C, 1-2 hodiny)
- 2) předsušené agarové plotny se přelijí pomnoženou kulturou
- 3) přebytečná suspenze se odsaje, na médium se aplikují specifické fágy
- 4) inkubace probíhá přes noc při 37 °C
- 5) odečtou se lytické reakce (plaky), výsledek se vyhodnotí pomocí příslušného schématu



Obrázek 10: Lytické reakce (zdroj: URL 8)

3. VIRY – PŮVODCI ALIMENTÁRNÍCH ONEMOCNĚNÍ

3.1. Viry v potravinách

Existuje mnoho virů, které mohou být přenášeny nejen z člověka na člověka, ale i ze zvířat na člověka a tedy i potravinami živočišného původu. ***Viry se množí jen v živých buňkách, jejich rozmnožování v potravinách je proto vyloučeno.*** Na druhou stranu potraviny a voda mohou být významnými přenašeči těch virů, které jsou schopny zachovat si svoji životaschopnost delší čas mimo živou buňku. Vhodné pro přenos virů je především mléko. Různé druhy virů se mohou vyskytovat v čerstvém či opracovaném mase, vejcích, rybách apod.

Pro přenos a šíření patogenních virů je důležité, jakým způsobem byla potrava kontaminována. Pokud je potrava živočišného původu získávána ze zvířat infikovaných viry, může být kontaminována už primárně, intravitální cestou. Při ***primární kontaminaci*** je virus přítomný přímo v buňkách svaloviny nebo v mezibuněčných prostorech. Četnější jsou však sekundární kontaminace, a to především cestou fekálního znečištění. U ***sekundární kontaminace*** se jedná o volné viry, které se dostaly do potravin infikovanou vodou, kontaminovanými rukama pracovníků nebo infikovanými hlodavci.

Stabilita virů v potravinách je ovlivněna řadou faktorů, k nimž patří zejména složení potravy, koncentrace virů a teplota skladování. Většina virů je odolná vůči nízkým teplotám, svou infekčnost si zachovávají při chladírenských teplotách (4 °C) po dobu několika týdnů a při teplotách mrazírenských (-18 °C) i několika měsíců. Naopak, většina virů je citlivá k nízkým hodnotám pH, vysušení či vyšším teplotám. Nejúčinnějším prostředkem proti virům, mimo zabránění sekundární kontaminace potravin živočišného původu, je dostatečná tepelná úprava potravin. Bílkoviny a tuky v potravinách však odolnost virů vůči vyšším teplotám zvyšují. Obecně je řada virů inaktivována již při teplotě 60 – 80 °C, některé však odolávají i teplotám nad 100 °C.

Viry přijaté do organismu potravinami jsou v žaludku vystaveny účinku kyselého prostředí žaludečních šťáv (smísením žaludečních trávicích šťáv s dalšími trávicími šťávami tenkého střeva a s potravinou se jejich pH upraví na přibližně 2,0). V závislosti na odolnosti viru a kyselosti žaludečního obsahu určité viry přežijí, jiné ne. Zvláště rezistentní jsou bezobalové (nahé) viry jako picornaviry, reoviry, adenoviry a parvoviry, které nemají vůči žluči citlivý vnější obal.

Mezi prokázané alimentární infekce způsobené viry patří zejména virová hepatitida (žloutenka) typu A, poliomyelitida (dětská obrna) a klíšťová encefalitida. Se zpřesněním virologických laboratorních metod bylo potvrzeno, že potraviny mohou sloužit jako vehikulum pro přenos i dalších virů – např. rotavirů, adenovirů, coronavirů či Norwalk virů.

3.2. DNA viry

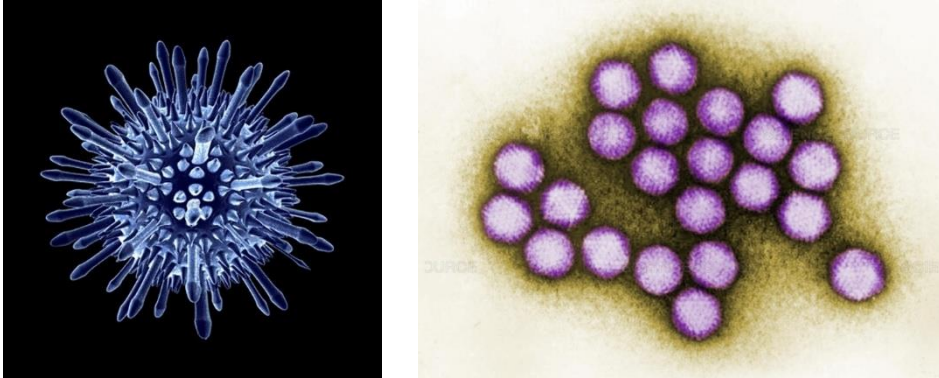
3.2.1. Adenoviry

Jedná se o viry, patřící do čeledi *Adenoviridae*, které jsou rozděleny do dvou rodů – *Mastadenovirus* a *Aviadenovirus*. Rod *Mastadenovirus* zahrnuje vedle různých zvířecích druhů také adenoviry, které infikují výhradně člověka.

Adenoviry jsou neobalené viry, hexagonálního tvaru s ikozáhedralní symetrií, velikost se pohybuje mezi 80 – 100 nm. Viriony jsou složeny z 252 kapsomer. Jejich genom je složen z jedné lineární dvouřetězcové molekuly DNA (dsDNA). Jako většina neobalených virů jsou adenoviry rezistentní vůči fyzikálním a chemickým vlivům. Vzdorují účinku éteru a tukových rozpouštědel a pH v rozmezí 5 – 9. Jsou velmi pomalu inaktivovány teplem. Při teplotě 20 °C a nižší, vydrží v prostředí po řadu týdnů.

Přenos

Infekce se šíří alimentárně, kapénkovou infekcí, pohlavním stykem a stykem s kontaminovanými předměty nebo vodou. V průběhu infekce jsou adenoviry vylučovány stolicí a dostávají se do odpadních a povrchových vod, kde velmi dlouho přetrvávají. Místem primárního pomnožení jsou nejčastěji epitelální buňky spojivek, nosohltanu a střev. Infekce proniká do hlubších vrstev sliznice, do tonsil a do lymfatických uzlin. Množení viru vede k destrukci buněk a zánětu. Při oslabené obranyschopnosti někdy vzniká virémie, která může vést k lokalizaci infekce v různých orgánech, zejména v CNS nebo ledvinách. Po překonané nákaze mohou adenoviry v organismu přetrvávat v lymfoidních tkáních nebo ledvinách bez zjevných příznaků. Adenoviry lze prokázat ve 30 – 40 % chirurgicky odstraněných mandlí.



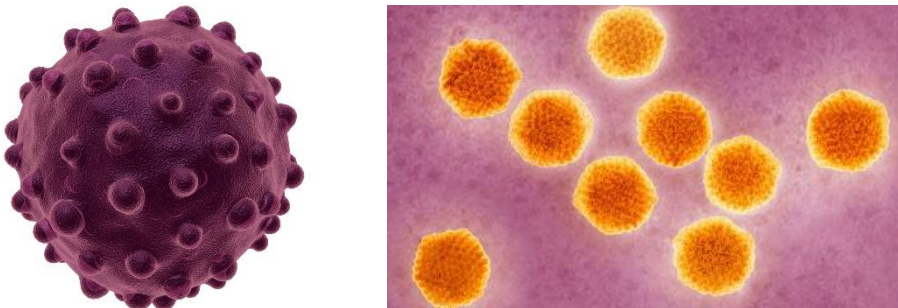
Obrázek 11: Adenovirus (zdroj: URL 9 a URL 10)

Onemocnění adenoviry

Po infikování adenoviry se nemoc projeví do 2 – 14 dnů. Adenoviry nejčastěji způsobují infekce dýchacích cest, záněty očí, infekce trávicího a urogenitálního traktu. Infekce trávicího traktu se projevuje průjmy, zvracením, nauzeou, vysokou horečkou, bolestí hlavy a křečemi v břiše. Jedná se tedy o gastroenteritidu vyskytující se především u dětí.

3.3. RNA viry**3.3.1. Virus hepatitidy A**

Virus hepatitidy A (dále HAV) se řadí do čeledi *Picornaviridae*. V mnohém se podobá enterovirům, ale liší se například biologickými vlastnostmi – vykazuje výrazný tropismus k jaterním buňkám, je mimořádně termostabilní a pomalu se replikuje bez cytopatického účinku na hostitelskou buňku. Z těchto důvodů je HAV řazen do samostatného rodu *Hepatovirus*.



Obrázek 12: Virus hepatitidy A (zdroj: URL 11 a URL 12)

HAV je odolný k tukovým rozpouštědlům a detergentům a je mimořádně rezistentní ke kyselému pH a účinkům tepla. Aktivní vydrží při pH 1,0 a snáší teplotu až 60 °C (za přítomnosti hořčičných iontů vydrží aktivní i při teplotě 70 °C po dobu 10min). Spolehlivě je inaktivován oxidačními činidly, např. chlorovými preparáty nebo kyselinou peroctovou.

Přenos

Nákaza se šíří oro-fekálně. Nejčastěji dochází k nákaze kontaminovanou vodou nebo potravou. Šíření také usnadňují špatné hygienické podmínky. V průběhu inkubace, která trvá od 15 do 45 dnů, je virus prokazatelný ve stolici a 14 dnů před nástupem klinických příznaků také v krvi. Vylučování viru stolicí je maximální ke konci inkubační doby a trvá ještě krátce po vyvrcholení klinických příznaků.

Onemocnění

Infekce HAV probíhá často skrytě, zejména u dětí. Virus se nejprve replikuje v zažívacím traktu a prostřednictvím primární virémie proniká k jaterním buňkám. Zde se pomalu množí v cytoplazmě buněk jaterního parenchymu. Dochází k degeneraci infikovaných buněk a difuzní zánětlivé infiltraci jater s hyperplazií Kupfferových buněk. Virus je vylučován žlučí do střeva. Při zjevném onemocnění je ke konci inkubační doby pozorována únava, zvýšená teplota nebo horečka, nechutenství, nauzea a zvracení. Játra jsou zduřelá. Podle rozsahu a míry poškození hepatocytů a dezintegrace žlučových kanálků pozorujeme typické symptomy hepatitidy. Zvýšené hladiny žlučových barviv v krvi mají za následek ikterus (žloutenku) různého stupně. Moč je tmavá, stolice světlejší. Nekomplikovaná hepatitida A trvá 3 týdny až měsíc a zpravidla končí uzdravením. Imunita po prodělaném onemocnění je pravděpodobně trvalá. HAV nevyvolává chronické perzistentní infekce. Průběh s úplným selháním jater vedoucím ke smrti je u infekcí HAV zcela výjimečný. Z pohledu HAV se jako nejrizikovější plodiny jeví jahody, maliny, rajčata a listová zelenina.

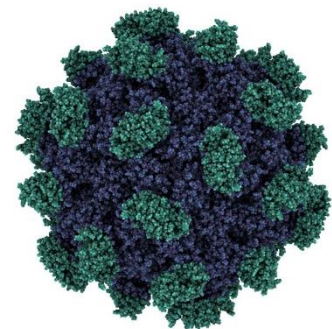
V letech 2006 – 2015 se počet hlášených onemocnění virovou hepatitidou A pohyboval v České republice průměrně ve stovkách případů ročně. Výjimku tvořil rok 2008 a 2009, kdy počet nemocných stoupl až na 1 650 osob, v důsledku epidemie v Praze a Středočeském kraji.

3.3.2. Virus hepatitidy E

Virus hepatitidy E (HEV) patří do čeledi *Hepeviridae*, rod *Hepevirus*. Jedná se o neobalený (+)ssRNA virus, velikost se pohybuje v rozmezí 27 – 34 nm. HEV je ve srovnání s ostatními viry hepatitidy relativně labilní vůči zevnímu prostředí. Nesnáší prostředí s vysokou koncentrací soli a podléhá zamražení.

Vyskytuje se ve 4 genotypech:

- genotyp 1a-1e, 2a-2b – výhradně lidský
- genotyp 3a-3j, 4a-4g – zvířecí (prase domácí, vysoká zvěř, divoké prase, měkkýši, hlodavci), může infikovat i člověka (zoonóza)



Obrázek 13: Virus hepatitidy E (zdroj: URL 13)

Přenos

Genotyp 1 a 2 se přenáší fekálně-orální cestou, nejčastěji se jedná o kontaminovanou vodu. Přenos u genotypu 3 a 4 je zpravidla nedostatečně tepelně upravenými masnými výrobky (domácí zabíjačky), krví, krevními deriváty, transplantovanými orgány, ale i kontaminovanou vodou při epidemiích. Zdrojem infekce je nemocný jedinec, který vylučuje viriony stolicí. Přímý mezilidský přenos je méně častý. Inkubační doba HEV je 15 – 60 dní.

Onemocnění

Virus hepatitidy E způsobuje virovou hepatitidu (žloutenku) typu E. Jedná se o virové infekční onemocnění jater. Onemocnění probíhá akutní formou a nepřechází do chronického stadia. Běžnější je jeho výskyt v rozvojových zemích, avšak i do České republiky je ročně zavlečeno několik desítek až stovek případů. Onemocnění má podobný průběh jako ostatní hepatitidy. U dětí často probíhá lehce či bez příznaků. V prodromálním stádiu se vyskytují bolesti svalů, kloubů, zažívací obtíže, zvýšení teploty. Následuje vlastní onemocnění s ikterem kůže, sklér, bolestí břicha, někdy zvracením a nadýmáním. Pacienti mají tmavou moč a světlou stolicí. Průběh infekce je ale oproti HAV těžší a delší. Onemocnění někdy trvá i několik měsíců. Častěji dochází k fulminantnímu průběhu se selháním jater. Vysoce závažné je onemocnění HEV u těhotných žen, kdy letalita je až 20 %.

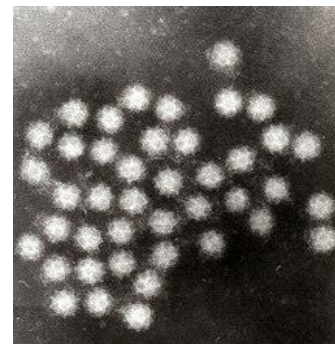
Za posledních 10 let bylo nahlášeno více než 21 000 případů výskytu onemocnění hepatitidou typu E u lidí. V EU jsou hlavními zdroji onemocnění hepatitidou typu E domácí prasata. Prase divoké může také virus přenášet, ale jejich maso není konzumováno tak často, jak maso prasete domácího.

3.3.3. Sapovirus (Sapporo-like virus)

Viry rodu *Sapovirus* řadíme do čeledi *Caliciviridae*. Jedná se o neobalené RNA viry, rezistentní k fyzikálním a chemickým vlivům. Kapsida je kubické symetrie s typickými kalíškovitými prohlubeninami na vrcholech 32 kapsomer. Velikost virových částic se pohybuje mezi 27 – 40 nm. Genom je tvořen lineární RNA a má pozitivní polaritu.

Kmeny sapovirů dělíme do 5 genoskupin:

- GI, GII, GIV, GV – infikují člověka
- GIII – infikují prasata



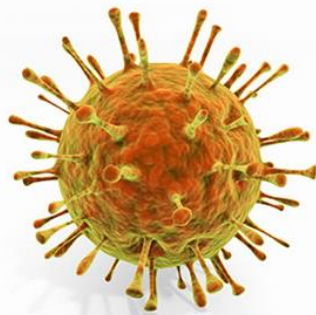
Obrázek 14: Sapovirus
(zdroj: URL 14)

Přenos a onemocnění

Sapoviry vyvolávají u lidí průjemová onemocnění, patří tedy mezi původce gastroenteritid. Infekce sapoviry jsou častější u malých dětí než u dospělých. Uvádí se, že téměř všechny děti prožijí tuto infekci během prvních pěti let života. Viry pronikají do organismu alimentární cestou. Vylučovány jsou stolicí a jsou přítomny i ve zvracích nemocných osob. Místem množení viru je proximální část tenkého střeva, kde dochází k destrukci klků a mikrokloků. Onemocnění je charakterizováno náhlým začátkem. Nauzeu, zvracení a průjem provází horečka, bolesti svalů a zánět hrdla.

3.3.4. Norovirus (Norwalk-like virus)

Noroviry (rod *Norovirus*) řadíme také do čeledi *Caliciviridae*. Dělí se do 5 genoskupin – GGI, GGII, GGIII, GGIV, GGV, z nichž skupiny I, II a IV jsou původci humánních infekcí.



Obrázek 15: Norovirus
(zdroj: URL 15)

Norovirové infekce postihují především starší děti a dospělé. Jsou nejčastějšími nebakteriálními původci epidemií v kolektivních zařízeních pro děti a seniory. Vyvolávají gastroenteritidu. Vysoké epidemiologické riziko těchto infekcí je způsobeno několika faktory. Pro vyvolání infekce postačuje velmi nízká infekční dávka, již 10 – 100 virionů je schopno vyvolat onemocnění.

Ve stolici nemocného člověka je vylučováno obrovské množství infekčních virových částic (10^{9-11} /ml stolice). Virus je přítomen i ve zvracích, stolicí je virus vylučován zpravidla po dobu 2 – 15 dní.

Přenos

K nakažení dochází fekálně-orální cestou. Jelikož stačí velmi nízká infekční dávka, je možné se nakazit i prostřednictvím infekčního aerosolu vzniklého např. při zvracení nebo defekaci s následným spláchnutím WC. Nákaza se může šířit prostřednictvím potravin, pitné i užitkové vody, která je kontaminovaná fekáliemi. Virus je ve vnějším prostředí poměrně odolný, ve vodě si zachovává infekčnost až 14 dní, na hladkých neporézních površích při nízkých teplotách a dostatečné vlhkosti zůstává infekční až 10 dní. Přítomnost norovirů byla prokázána v odpadních vodách, v povrchové, pitné, bazénové i mořské vodě. Typickým vehikulem nákazy jsou mořští měkkýši chovaní v kontaminované vodě, neboť v jejich těle dochází ke koncentraci virů. Virus je inaktivován chlorovými dezinfekčními přípravky do 30 minut, avšak může si zachovat infekčnost v potravinách po nedostatečné tepelné úpravě.

Onemocnění

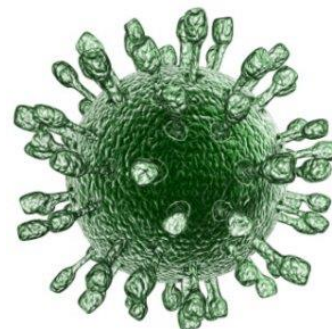
Inkubační doba onemocnění je 18 – 72 hodin, jako první příznak se objevují bolestivé křeče v břiše. Následuje zvracení, které dominuje zejména v prvních dnech nemoci, dále průjem, zvýšená teplota, bolesti břicha, celková slabost a schvácenost. Stolica je řídká až vodnatá, bez přítomnosti krve či hlenu. Příznaky odeznívají při nekomplikovaném průběhu spontánně během 3 – 7 dní. Největším rizikem, zejména u starých osob nebo malých dětí, je dehydratace. Infekce může probíhat i asymptomaticky. Prodělané onemocnění nezanechává dlouhodobou imunitu, jsou proto možné i opakované nákazy. Norovirovou infekci během života prodělá většina populace.

3.3.5. Rotavirus

Rotaviry patří do čeledi *Reoviridae*. Genom tvoří dsRNA a svým průměrem (70 nm) jsou to poměrně velké viry. Na snímku z elektronového mikroskopu mají nezaměnitelnou podobu kola (*latinsky „rota“*), s nábojem a paprsky. Množí se také na buněčných kulturách.

Rotaviry mají podobně jako virus chřipky genom segmentovaný na 11 segmentů, z nichž každý kóduje jeden protein viru. Rozdíly v pořadí segmentů 4 a 7 jsou podstatou řady genotypů. Asi 75 % rotavirových nákaz působí genotyp G1P8. Protein, kódovaný segmentem 6, je jako skupinově specifický užít v komerčních testech k průkazu rotavirů.

Rotaviry se člení do sedmi seroskupin (A-G), které lze odlišit serologicky. Skupiny A, B a C se nalézají u lidí, skupiny D až G jsou původci onemocnění různých zvířat (prase, ovce, kráva, potkan, slepice aj.) Skupina A je nejčastějším původcem onemocnění dětí na celém světě. Předpokládá se, že skupiny B a C jsou rotaviry přenášené ze zvířat na lidi. Při současné infekci různými serotypy rotavirů mohou přeskupením vznikat nové typy, mající genové sekvence poskládané z různých serotypů.



Obrázek 16: Rotavirus
(zdroj: URL 16)

Přenos a onemocnění

Rotaviry jsou vysoce infekční a přežívají na kontaminované kůži rukou, na předmětech nebo na uložené zelenině. I když nejčastěji onemocní děti, jsou po přenosu potravinami nebo vodou známá také hromadná onemocnění osob každého věku. Rotavirové infekce jsou celosvětově hlavní příčinou gastroenteritid, spojených zvláště u dětí do dvou let věku, se závažnou nemocností a úmrtností. Odhadem dochází každý rok na světě k 140 milionům rotavirových infekcí. Téměř všechny děti do čtyř let věku již prožily rotavirovou infekci. Následkem velké dehydratace a ztráty elektrolytů má až milion těchto případů, především v rozvojových zemích, smrtelný průběh.

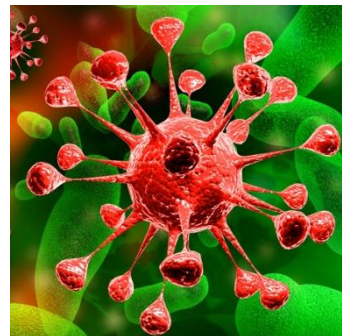
Infekce probíhá jako u jiných virových gastroenteritid a vyskytuje se během celého roku, ale se zřetelným vyvrcholením v zimních měsících. Po 1 – 3 dnech inkubace se objeví asi tří denní

zvracení, provázené ve 2. – 6. dni nemoci vodnatými stolicemi s příměsí hlenu. Nakažlivost trvá po dobu vylučování viru ve stolici, zpravidla 8 dnů. Někdy lze rotaviry detekovat ve stolici již den před vznikem průjmů. Po překonání rotavirové infekce vznikne dlouhodobá imunita, ale během života se mohou objevit lehké reinfekce. U starších osob může následkem klesající imunity vzniknout i těžce probíhající reinfekce.

Vysoká nemocnost a častá hospitalizace vedly v USA k vývoji rotavirové vakcíny. Ta byla licencována v roce 1998 v USA a o rok později v Evropské unii, ale již v říjnu 1999 byla pro vysoký výskyt nežádoucích reakcí stažena z trhu.

3.3.6. Astrovirus

Astroviry patří do čeledi *Astroviridae*. Jedná se o malé, neobalené viry, jejichž tvar připomíná pěti až šesticípé hvězdičky. Jako ostatní viry vyvolávající gastroenteritidu jsou astroviry poměrně odolné vůči vlivům zevního prostředí. Jsou acidostabilní (pH 3) a přežijí několikaminutové působení teploty 60 °C. Rozlišujeme 8 humánních sérotypů astrovirů, přičemž sérotyp 1 se najde na celém světě a vyvolává 58 až 92 % všech astrovirových infekcí. Ostatní serotypy se vyskytují pouze v určitých oblastech, serotypy 6 – 8 jsou velmi vzácné.



Obrázek 17: Astrovirus
(zdroj: URL 17)

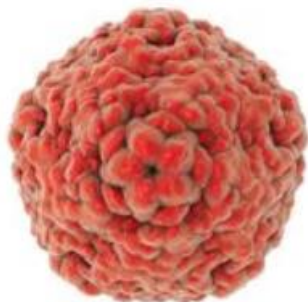
Přenos a onemocnění

Viry se přenáší prostřednictvím potravin a vody, které jsou kontaminované fekáliemi. Inkubační doba astrovirové infekce je 3 – 4 dny, onemocnění trvá v průměru 2 – 3 dny. Typickým klinickým příznakem je vodnatý průjem, doprovázený vždy horečkou. U imunosuprimovaných jedinců může onemocnění trvat až 6 týdnů, vylučování viru stolicí trvá déle. Průběh infekce je lehčí než u rotavirových infekcí. V České republice je výskyt astrovirových infekcí poměrně nízký, nejčastěji se vyskytuje u dětí do 2 let.

3.3.7. Enterovirus

Enteroviry jsou 28 – 30 nm velké, neobalené viry s ikozahedrání symetrií nukleokapsidy. Genom obsahuje ssRNA s pozitivní polaritou o velikosti 7,2 – 8,4 kb. Jsou řazeny do skupiny velkých virů čeledi *Picornaviridae*. Do rodu *Enterovirus* řadíme 8 druhů – bovinní enterovirus, lidský enterovirus A, B, C, D, poliovirus a prasečí enterovirus A a B.

Mnoho enterovirů je dobře kultivovatelných, jsou rezistentní vůči účinku vyšších teplot, kyselému pH a působení chemikálií. Enteroviry, zahrnující virus coxsackie A a B a echoviry byly izolovány z odpadních vod, kanalizací, mořské a čerstvé vody a měkkýšů.



Obrázek 18: Enterovirus
(zdroj: URL 18)

Přenos a onemocnění

Enteroviry způsobují celou řadu onemocnění, včetně virových meningitid a poliomyelitid (dětská obrna). K šíření dochází především fekálně-orální cestou nebo přímým kontaktem se sekrety infikovaných osob. Enteroviry se množí zejména v gastrointestinálním traktu, ale mohou se množit i v jiných tkáních jako nervové či svalové (poliovirus). Inkubační doba se pohybuje mezi 3 až 7 dny, k šíření viru dochází během 3 – 10 dnů od manifestace klinických příznaků.

Enterovirová infekce bývá častější v létě a počátkem podzimu, řada infekcí probíhá asymptomaticky. Jen u zhruba 0,001 % populace se objeví septická nebo virová meningitis. V ojedinělých případech se může rozvinout myokarditis nebo encefalitis. První zmínky

o poliomyelitidě spojené s konzumací kontaminovaných potravin (syrového mléka) pochází z roku 1914. Byly zaznamenány také případy infekce po konzumaci mléka pasterovaného.

3.3.8. Ostatní viry s potenciálem „food-borne“

3.3.8.1. Parvovirus

Parvoviry patří k nejmenším známým virům, které infikují eukaryotické buňky. Neobalená kapsida s průměrem 18 – 26 nm je tvořena 60 kapsomerami. Jsou to viry ze skupiny ssDNA virů s negativní polaritou. Parvoviry se množí v buněčném jádře zejména v rychle se množících buňkách (kostní dřev, střevo nebo embryonální tkáň). Mají cytopatický účinek na hostitelskou buňku a jsou poměrně odolné k fyzikálním i chemickým vlivům. Jsou také rezistentní k éteru a stabilní v rozmezí pH 3 – 10. Při teplotě 50 °C přežijí až 30 sekund.

Výskyt parvovirových infekcí jako alimentárních onemocnění (gastroenteritid) je limitován, ale byl zaznamenán zejména v souvislosti s konzumací měkkýšů a kontaminovaného drůbežního masa.

3.3.8.2. Coronavirus

Coronaviry (čeleď *Coronaviridae*) řadíme mezi tzv. enterické viry. Mají lipidový obal, ze kterého ční paličkovitě zakončené výběžky dvojího typu. Genom tvoří lineární ssRNA s pozitivní polaritou o velikosti 30 kb. Množení virů probíhá převážně v cytoplasmě buněk. Coronaviry jsou citlivé k éteru a tukovým rozpouštědlům i k různým fyzikálním a chemickým vlivům. Druhy, které se vyskytují ve střevech lidí a zvířat, jsou rezistentní ke kyselému pH. Coronaviry nelze kultivovat *in vitro*.

Lidské coronaviry patří společně s rhinoviry mezi nejčastější původce tzv. nemocí z nachlazení. Vůči infekci lidskými coronaviry je vnímavý pouze člověk. Zatím jsou známy 3 druhy lidských koronavirů reprezentované prototypovými kmeny. Dva z nich byly izolovány jako původci zánětů horních cest dýchacích. Třetí představuje lidský střevní coronavirus a byl izolován ze stolice dítěte s akutní gastroenteritidou.

V roce 2012 byl potvrzen výskyt nového druhu koronaviru MERS (The Middle East Respiratory Syndrome), který se šíří z Arabského poloostrova a způsobuje symptomy podobné nákaze virem SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome). MERS ale navíc vede k rychlému selhání ledvin. Novým koronavirem se prokazatelně nakazilo 49 osob a 27 z nich nemoci podlehl. Nemocní byli hlášeni kromě Francie i z Německa a Velké Británie. Nejvíce nakažených bylo v Saúdské Arábii, další případy se objevily v Kataru, Jordánsku, Tunisku a Spojených arabských emirátech. V České republice zatím výskyt viru zaznamenán nebyl.

3.3.8.3. Virus klíšťové encefalitidy

Původcem klíšťové encefalitidy je RNA virus patřící do čeledě *Togaviridae*. Rezervoárem viru jsou drobní hlodavci, ptáci a klíšťata. Virus klíšťové encefalitidy je málo odolný vůči vyšším teplotám, pasterační ohřev (60 °C) ho spolehlivě zničí. Poměrně odolný je vůči změnám kyselosti v rozmezí hodnot pH 3 – 12. Při uskladnění másla při teplotě 4 °C si uchová virulenci po dobu 2 měsíců.

V ohnisku nákazy infikují klíšťata přímo člověka nebo zvířata – krávy, kozy, ovce. Při infekci zvířat virus po 2 – 6 dnech cirkulace v krvi přechází do mléka. Po konzumaci tepelně neošetřeného mléka se může nakazit i člověk (inkubační doba 7 – 14 dní). Onemocnění klíšťovou encefalitidou probíhá ve dvou fázích. Začíná jako mírné chřipkovité onemocnění, včetně ztráty chuti k jídlu a střevních problémů. Po 3 až 4 dnech tyto příznaky slábnou a dojde k tzv. asymptomatické fázi onemocnění, která může trvat až 20 dní. Druhá fáze onemocnění nastupuje náhle, s příznaky jako je vysoká horečka, přetrvávající bolesti hlavy, zvracení, citlivost na světlo, ztuhlá šíje, které jsou charakteristické pro postižení centrálního nervového systému. Jednou z vážných komplikací tohoto onemocnění je meningitida.

Virus klíšťové encefalidity spolehlivě zničí převaření mléka. Velké potravinářské podniky proto ovčí, kozí a kravské mléko pasterizují. Někteří menší producenti to ale odmítají, s tím, že sýry z tepelně ošetřeného mléka ztrácí chuť i prospěšné probiotické mikroorganismy.

Prevenčí vůči infikování virem klíšťové encefalidity orální cestou prostřednictvím potravin je nekonzumovat syrové mléko, ani výrobky z něj, pokud nebyly tepelně zpracovány. Výskyt klíšťové encefalidity u lidí po konzumaci mléka je v současnosti u nás málo pravděpodobný.



Obrázek 19: Virus klíšťové encefalidity
(zdroj: URL 19)

3.3.8.4. *Torovirus*

Toroviry (čeleď *Coronaviridae*) jsou 100 – 150 nm velké neobalené viry, jejichž genom tvoří ssRNA s pozitivní polaritou. Mají helikální symetrii nukleokapsidy, jejich replikace probíhá v cytoplasmě. Toroviry primárně napadají obratlovce, zejména prasata, dobytek, koně a lidi. Jejich role jako původce gastroenteritid lidí je zatím neznámá. K přenosu dochází zřejmě oro-fekální cestou.

4. STANOVENÍ VIRŮ V POTRAVINÁCH

4.1. Konvenční metody detekce virů v potravinách

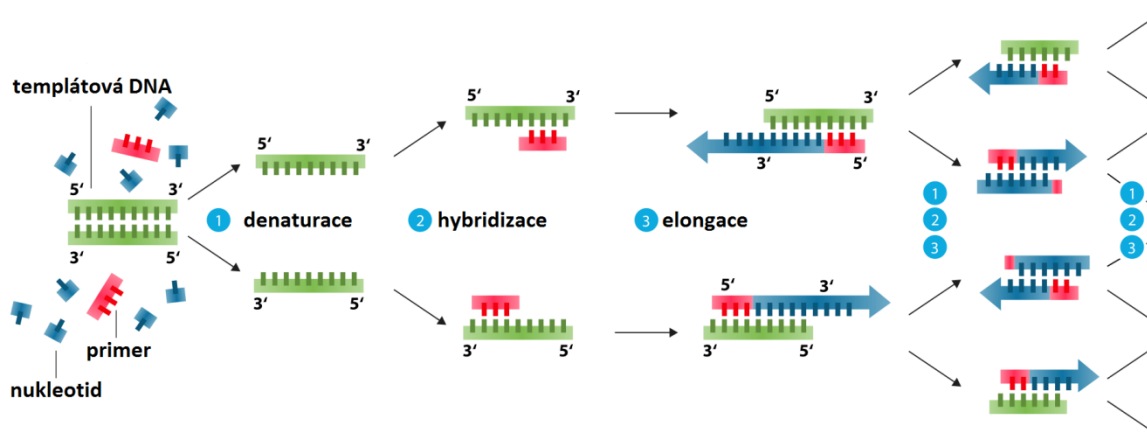
Viry jsou obvykle nalézány v potravinách v nízkých koncentracích a nemohou být detekovány přímo. Proto byly zejména v posledních 30-ti letech rozvíjeny metody, které by umožnily detekci takto malého množství z tkání a ostatních potravin a surovin. Některé z nich byly později modifikovány, aby se zvýšila záchytnost a zároveň snížil výskyt cytotoxických agens a inhibitorů v extraktech. Prvním krokem zahrnutým v těchto postupech je většinou extrakce virionů (virových částic) homogenizací tkání v pufovacím roztoku s následnou centrifugací pro odstranění tekutin. Eluovaný virus pak může být zkoncentrován např. kyselým srážením či vyvločkováním. Volba vhodné detekční metody závisí na její účinnosti, schopnosti přežít viru, jednoduchosti a rychlosti metody, finálním objemu, absenci či přítomnosti interagujících látek a schopnosti eliminace inhibitorů dané reakce. Mezi dnes již nejběžnější a nejčastěji používané metody detekce virů patří zejména polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace jako např. real-time nebo multiplex PCR.

4.1.1. Polymerázová řetězová reakce

PCR neboli polymerázová řetězová reakce (*angl. Polymerase Chain Reaction*) je rychlá, účinná a dnes již dostupná metoda amplifikace neboli zmnožení určitého úseku DNA. Tento úsek (tzv. templát) je mnohonásobně kopírován pomocí specifického enzymu – DNA polymerázy. Syntéza je řízena primery, což jsou krátké úseky DNA (oligonukleotidy), jež nasedají na templát, konkrétně na začátek a konec amplifikovaného fragmentu, a zabraňují opětovnému vzniku dvojšroubovice. Výsledkem celé reakce je mnohonásobně namnožený specifický úsek DNA. K vyhodnocení výsledků se obvykle používá gelová elektroforéza.

PCR reakce se skládá z 3 opakujících se kroků:

1. **Denaturace** – probíhá obvykle při teplotě 95 °C, kdy dochází k rozvolnění vodíkových vazeb mezi bázemi komplementárních nukleotidů, tedy přechodu dvouřetězcové (ds) DNA na dvě jednořetězcové (ss) DNA.
2. **Hybridizace** – probíhá při teplotách v rozmezí 50 – 60 °C, kdy dochází k nasedání primerů na specifická místa templátu a tím k ohraničení cílové sekvence, tedy úseku, jež chceme amplifikovat.
3. **Elongace** – při teplotě 72 °C dochází díky DNA polymeráze k prodlužování nového vlákna DNA, které je syntetizováno z nukleotidů přítomných v reakční směsi.



Obrázek 20: Princip polymerázové řetězové reakce (zdroj: URL 20, upraveno)

Více o PCR a jejích modifikacích viz skripta Mikrobiologie potravin – Praktická cvičení I. nebo Mikrobiologické laboratorní metody.

4.2. Další molekulárně-biologické metody

4.2.1. TMA (Transcription-Mediated Amplification)

Metoda TMA neboli amplifikace zprostředkovaná transkripcí slouží k amplifikaci jednořetězcové nukleové kyseliny (DNA i RNA). Pro reakci využívá dva enzymy – RNA polymerázu a reverzní transkriptázu, aby rychle zmnožily cílovou RNA/DNA, což umožňuje současnou detekci více patogeních mikroorganismů v jedné zkumavce. Technologie TMA se používá v molekulární biologii, forenzních oborech a medicíně pro rychlou identifikaci a diagnostiku patogenních mikroorganismů, a to včetně virů.

Principem techniky je amplifikace cílové sekvence RNA pomocí *reverzní transkriptázy* a *DNA dependentní RNA-polymerázy*. Cyklus probíhá za konstantní teploty ve dvou fázích. V první se syntetizuje DNA komplementární k cílové molekule RNA a ve druhé se syntetizovaná dsDNA transkribuje. V tomto systému se používá dvou primerů. První tzv. *promotor-primer*, nese na 5' konci promotorovou sekvenci pro T7 RNA-polymerázu a na 3' konci sekvenci, která se váže na cílovou sekvenci RNA a je prodlužována reverzní transkriptázou. Druhý primer je komplementární k sekvenci na 3' konci nově syntetizovaného řetězce cDNA. Cílová molekula RNA slouží v první fázi jako templát, který se přepisuje reverzní transkriptázou za vzniku hybridní molekuly RNA-cDNA. Po degradaci RNA řetězce (RNAsou H) katalyzuje reversní transkriptáza polymeraci druhého řetězce cDNA. Ve druhé fázi je dvouřetězová DNA templátem pro syntézu řady molekul RNA, katalyzovaných T7 RNA-polymerázou. Tyto řetězce RNA jsou matricí pro reverzní transkriptázu a dochází k opakování cyklu. Celá reakce začíná rozrušením vnitřní sekundární struktury RNA při 95 °C, poté se přidají enzymy a reakce už probíhá izotermnicky při 42 °C. Reakce má velkou výtěžnost a produkt se prokazuje vhodnou sondou na základě chemiluminiscence. Tato technika je vhodná k rychlé diagnostice mikrobiálních infekcí.

Oproti jiným amplifikačním metodám má metoda TMA několik výhod:

- jedná se o izotermickou reakci, na místo termocykleru je použita vodní lázeň nebo tepelný blok
- produkuje RNA amplikon spíše než DNA
- může být amplifikováno více cílové DNA/RNA
- žádné převody, žádné promývání, čímž se snižuje riziko kontaminace
- produkuje 100 – 1000 kopií během cyklu, to vede k 10-ti miliardovým nárůstům kopií během přibližně 15 – 30-ti minut.

4.2.2. SDA (Strand Displacement Amplification)

Amplifikace DNA vytěsňováním řetězce je metoda, založena na schopnosti DNA polymerázy, bez 3' a 5' exonukleázové aktivity, iniciovat syntézu DNA v místě jednořetězcového zlomu uvnitř cílové molekuly a vytěsnit řetězec se zlomem během syntézy řetězce nového. Byla popsána již na začátku devadesátých let s použitím multifunkčních primerů, přičemž oba měli cílovou sekvenci pro hybridizaci požadovaného řetězce DNA a restriční místem pro endonukleázy.

Reakce je izotermická, simultánní a může se provádět v širokém rozmezí teplot (37 – 70 °C), proto není při jejím průběhu nutné střídání teplot. Společně s TMA se využívá zejména pro detekci enterovirů.

Základem metody je schopnost DNA polymeráz zahájit syntézu DNA podle jednořetězcového štěpu a nahradit tak úsek DNA vyštěpnutý restričním enzymem. Restriční endonukleázy vymezují specifickou cílovou sekvenci (tzv. target). Za normálních podmínek tyto restriční endonukleázy štěpí oba řetězce, což není pro SDA vhodné. Při syntéze DNA je proto použit některý z nukleotidů α -thio-substituovaný (např. deoxyadenosin-5'- α -thio-trifosfát, dGTP,

dCTP a dTTP). Jeden z řetězců syntetizované DNA potom obsahuje modifikované nukleotidy. Restriční endonukleáza v takto modifikovaném rozpoznávacím místě štěpí pouze jeden řetězec a vytvoří místně specifický jednořetězcový zlom.

Pro SDA se používá dvojice primerů s dvěma funkčními oblastmi:

- oblast směrem k 3' konci obsahuje 15 až 20 bp dlouhou sekvenci komplementární k cílové molekule DNA,
- oblast směrem k 5' konci obsahuje rozpoznávací sekvenci pro restriční endonukleázu.

Reakce zahrnuje následující kroky:

- denaturaci cílové molekuly dsDNA
- připojení SDA primerů
- syntézu α -thiolovaných řetězců pomocí DNA polymerázy
- štěpení jednoho řetězce restriční endonukleázou
- reakci s DNA polymerázou (s deficientní 3' a 5' exonukleázovou aktivitou)
- nový cyklus s vytěsněnými řetězci obou polarit.

4.2.3. LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification)

LAMP, česky izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou, je technika sloužící k detekci patogenní DNA nebo RNA. Pomocí této techniky je možné určit přítomnost patogenů, jako jsou viry, bakterie nebo houby v rostlinných pletivech nebo v živočišných tkáních. LAMP je technika, která je prováděna v jediné mikrozkušavce. Technika má před sebou pravděpodobně slibnou budoucnost jako tzv. low cost metoda, tedy velmi levná detekční metoda. Primárně tato metoda pracuje s DNA, ale může být kombinována i s reverzní transkripcí, a tak mohou být detekovány i RNA patogeny. Momentálně je metoda využívána poměrně hojně v klinické praxi, kde již existují optimalizované a plně funkční komerční kity.

Jak již bylo zmíněno výše, jedná se o izotermální amplifikaci, kdy amplifikace nukleových kyselin probíhá za konstantní teploty. Teplota pro metodu LAMP bývá přibližně 60 – 65 °C. Pro průběh reakce je nutné mít připravenou reakční směs, která obsahuje nukleovou kyselinu (templát), 6 až 8 primerů a speciální polymerázu, která je izolována z bakterie *Bacillus stearothermophilus* a vyznačuje se tzv. dislokázovou aktivitou, tj. dokáže oddělovat kódující vlákno DNA a nahrazovat ho řetězcem, který sama syntetizuje. Dále reakční mix obsahuje pufr, MgCl₂, dNTPs, popř. barvivo, které je schopno interkalovat do vznikající dsDNA. Je možno také přidat např. betain, což je kvartérní amoniová sůl, která může být v reakčním roztoku použita z důvodu velkého počtu GC párů v templátové DNA. Amplifikace probíhá kontinuálně, a to při stálé teplotě kolem 63 °C.

Podstatnou složkou jsou zejména speciálně navržené páry primerů pro cílenou amplifikaci požadované části DNA a specifické polymerázy. Zároveň je však možné i použití speciálně navržených loop-primerů, které mohou rychlost amplifikace značně zvýšit. Trvání takové amplifikace může být několikanásobně nižší než u trvání klasické PCR.

Velkou výhodou je rovněž fakt, že není nutné nákladné vybavení pro amplifikaci nebo detekci produktu. Existuje možnost provádět amplifikaci mimo laboratoř, současně vzniká více produktu než u PCR. Někteří vědci věří, že izotermální amplifikace je v tomto ohledu elegantní nástroj, umožňující urychlit detekci virů, bakterií nebo hub oproti klasické PCR.

Detekce produktu LAMP

Koncentrace vzniklého produktu se pohybují v rozmezí 400 – 800 µg/ml, což umožňuje jeho snažší detekci různými metodami. První metodou je gelová elektroforéza v agarózovém gelu.

Jedná se o levný způsob detekce, avšak nevýhodou je její relativně vysoká časová náročnost, probíhá až po skončení LAMP a výsledný produkt nelze kvantifikovat.

V průběhu LAMP vzniká sraženina magnézium-pyrofosfátu, která může být detekována turbidimetrem nebo spektrofotometrem, a to po skončení LAMP. Alternativu představuje centrifugace, po níž se sraženina pyrofosfátu usadí na dně reakční nádoby a může být snáze detekována pouhým okem, což je do značné míry dosti subjektivní způsob detekce.

Dalším způsobem detekce je použití DNA barviv a pozorování fluorescence reakčního roztoku. Jedná se o rychlý způsob, který může být za použití vhodného DNA barviva proveden i bez použití fluorimetru, a to pouhým okem.

Posledním způsobem detekce je tzv. ABC-LAMP (*angl. Alternately Binding Quenching Probe Competitive LAMP*). Produkt lze rychle kvantifikovat a kvalifikovat, tj. určit specifické sekvence produktu. K provedení je zapotřebí fluorimetr a speciálně navržené sondy, které se váží na specifické místo v produktu a snižují tak jeho fluorescenci.

4.2.4. Ligázová řetězová reakce

Ligázová řetězová reakce (LCR, *angl. Ligase Chain Reaction*) je metoda amplifikace DNA určená k detekci stopových množství DNA o známé sekvenci. Jedná se o dvoufázovou cyklickou reakci. V první fázi se za vysoké teploty (95 °C) cílové molekuly dsDNA rozvinou na jednořetězové. V druhé fázi (70 °C) se dvě sady (2×2) komplementárních oligonukleotidů naváží (hybridizují) k cílovým jednořetězovým molekulám a termostabilní ligasou jsou spolu spojeny. LCR je alternativní amplifikační technikou k polymerázové řetězové reakci. Detekce produktů LCR může být prováděna elektroforézou nebo ELISA testem.

5. PŘÍPADOVÉ STUDIE

5.1. Úvod

Mezi potraviny, podílející se na vypuknutí „food-borne“ onemocnění virového původu, patří zejména chlazené potraviny a tzv. fresh produkty (ovoce a zelenina), ale také měkkýši (mušle, škeble, atd). V minulých letech byla prokázána kontaminace „food-borne“ viry např. u jahod, malin či ústřic.

Ve Spojených státech bylo zaznamenáno až 76 milionů nemocných, 5 tisíc mrtvých a 325 tisíc hospitalizovaných. U nás není situace tak závažná, avšak nemoci z potravin bakteriálního či virového původu se u nás objevují stále. Výčet některých zaznamenaných případů u nás je uveden v následujícím textu.

Tabulka 1: Přehled virových epidemií z potravin zaznamenaných v posledních letech

Rok	Stát	Původce	Vehikulum
2015	Austrálie	virus hepatitidy A	mražené drobné ovoce z Číny
2013	Německo, Holandsko, Švédsko, Polsko	virus hepatitidy A	mražené bobulovité ovoce z Itálie
2013	Holandsko	norovirus	mražené maliny z Polska
2012/13	Skandinávie	virus hepatitidy A	mražené bobulovité ovoce
2012	Irsko	norovirus	ústřice
2010	Irsko	norovirus	ústřice z Holandska
2009	Dánsko	norovirus	mražené maliny ze Srbska a Belgie
2009	Finsko	norovirus	mražené maliny z Polska
2009	Švédsko (19 osob)	norovirus	mražené maliny ze Srbska
2006	Holandsko (45 osob)	norovirus	mražené maliny z Chile
2006	Finsko (cca 400 osob)	norovirus	zeleninový salát
2005	Dánsko (> 350 osob)	norovirus	mražené maliny z Polska
2005	Rusko (> 500 osob)	virus hepatitidy A	pivo (voda využitá k přípravě)

(zdroj: URL 21, upraveno)

Diagnostikou a sledováním virů v potravinách se v rámci České republiky zabývá např. Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně (oddělení Bezpečnosti potravin a krmiv). Aktuální informace o kontaminaci jednotlivých potravin či např. o přítomnosti některých virů v potravinách zprostředkovává **Systém rychlého varování pro potraviny a krmiva** (angl. *Rapid Alert System for Food and Feed – RASFF*), v němž můžeme najít i seznam jednotlivých rizikových potravin, v nichž byly zjištěny dané viry, toxiny nebo jiná mikrobiální kontaminace.

Mezi další organizace, zabývající se kontrolou bezpečnosti potravin, patří **European Food Safety Authority (EFSA)**, jež vydává upozornění o již existujících i nových rizicích u potravin. Tato upozornění jsou zdrojem informací pro tvůrce evropských předpisů, pravidel a strategií, a tak pomáhají chránit spotřebitele před riziky v potravinovém řetězci. Činnost úřadu zahrnuje oblasti jako bezpečnost potravin a krmiv, výživa, zdraví a dobré životní podmínky zvířat, ochrana rostlin a zdraví rostlin. Úkolem úřadu EFSA je mimo jiné také shromažďovat vědecké údaje a poznatky, poskytovat nezávislé a aktuální vědecké informace k otázkám bezpečnosti potravin, informovat o svých poznatcích veřejnost, spolupracovat s jednotlivými zeměmi EU, mezinárodními organizacemi a jinými zainteresovanými stranami

a zajišťováním spolehlivých informací posilovat důvěryhodnost systému EU monitorujícího bezpečnost potravin.

V souvislosti s potravinami nesmíme zapomenout zmínit i další organizace jako Státní veterinární správu ČR (SVS), Státní zemědělskou a potravinářskou inspekci (SZPI) či Světovou zdravotnickou organizaci (WHO).

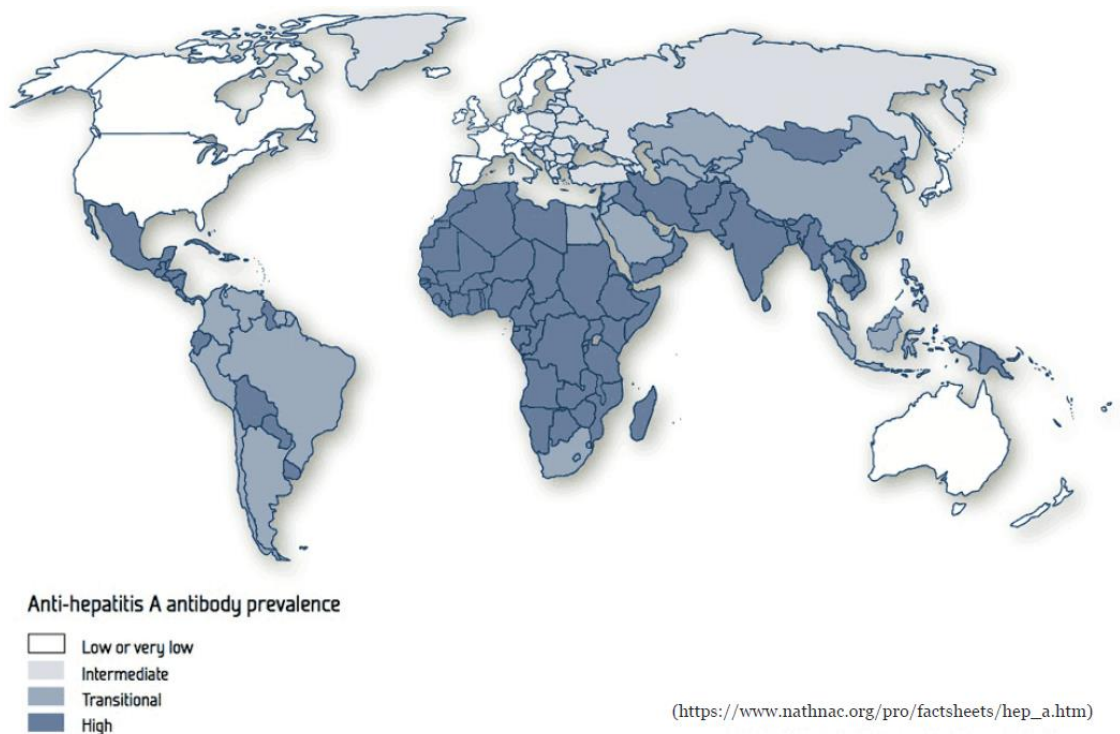
A proč je vlastně důležité sledovat mikrobiální kontaminaci?

V posledních letech byl pozorován celosvětově zvýšený výskyt alimentárních onemocnění (epidemie, jednotlivé případy, hospitalizace i smrt) v souvislosti s potravinami. Také se rozšiřuje distribuce potravin mezi jednotlivými státy EU, ale i mimo Evropu. Všeobecně přibývá spotřeba ovoce a zeleniny u všech věkových kategorií, ale také přibývá osob se sníženou imunitou.

Jak lze virové infekci předejít?

- Použití kvalitních a nekontaminovaných surovin.
- Dodržování správné hygienické praxe při zpracování surovin/potravin (sklizeň, balení, osobní hygiena pracovníků).
- Zabránění manipulace s potravinami infikovaným osobám.
- Použití prověřených zdrojů pitné vody (umývání ovoce a zeleniny).
- Dodržování čistoty v kuchyni.
- Vaření (teplota v jádře potraviny 100 °C/5 min).
- Důkladná veterinární prohlídka jatečných zvířat.

Mražení viry nelikviduje, chlazení prodlužuje jejich přežívání, okyselení, tepelné opracování při mírných teplotách vede pouze k malému snížení počtu virů!

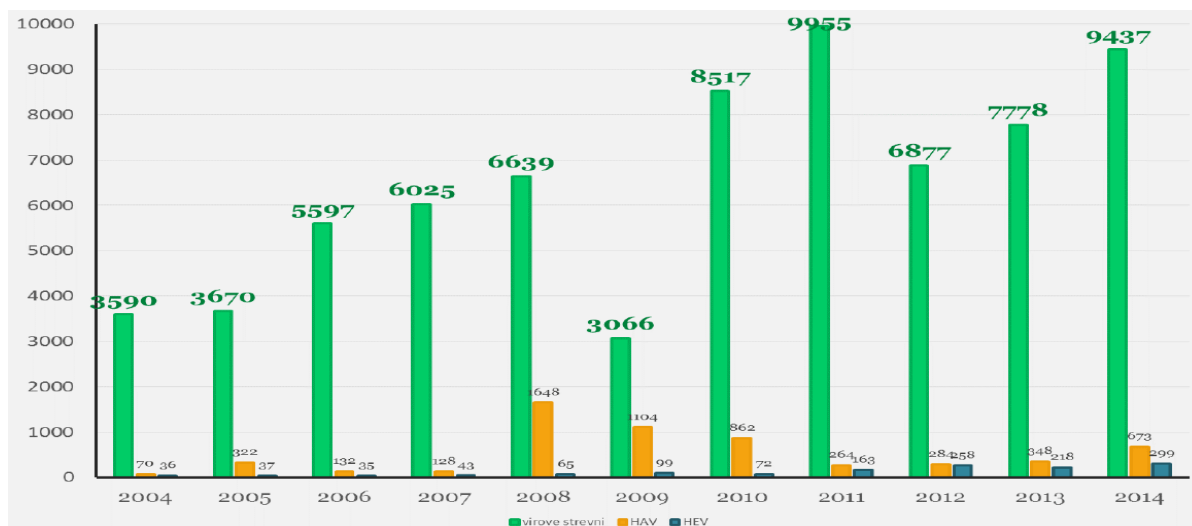


Obrázek 22: Rozšíření hepatitidy typu A v rámci celého světa (zdroj: URL 21)

5.2. Případové studie

5.2.1. Případová studie 1

V první polovině měsíce srpna 2016 proběhl na Jičínsku dětský tábor pro 29 dětí. Na tomto táboře byla i dospělá osoba, která těsně po ukončení tábora onemocněla hepatitidou typu A (HAV). Tato osoba se velice pravděpodobně nakazila v Jihomoravském kraji, kde má trvalé bydliště a kde v současné době probíhala epidemie HAV. Virus hepatitidy A je nakaženou osobou vylučován stolicí již 2 týdny před prvními příznaky, tato osoba byla tedy po celou dobu tábora infekční. Virus hepatitidy A se na táboře rozšířil, naštěstí onemocnělo pouze 6 dětí.



Obrázek 23: Výskyt hepatitidy typu A a E v České republice (zdroj: URL 21)

5.2.2. Případová studie 2

V lednu 2018 byl na Krajskou hygienickou stanici (KHS) Královéhradeckého kraje nahlášen hromadný výskyt zažívacích obtíží u účastníků lyžařského výcviku ze dvou základních škol, kteří byli ubytováni na horském hotelu v Peci pod Sněžkou. Průběh onemocnění byl velice rychlý, provázený zvracením, bolestmi břicha a zvýšenou teplotou. Z celkového počtu 87 osob se potíže objevily u 34 dětí a 3 dospělých. Školy z tohoto důvodu ukončily pobyt tentýž den, kdy situaci nahlásily.

KHS ihned provedla šetření na místě. V hotelu byla nastavena protiepidemická opatření – zvýšený úklid za použití dezinfekce s virucidním (viry likvidujícím) účinkem, důkladné provětrání objektu, pravidla manipulace s prádlem, dezinfekce prádla, provedení dezinfekce veškerých prostor, podlah, umýváren, WC, jídelny, pokojů, nábytku, veškerých dotykových ploch, dezinfekce veškerého nádobí a pomůcek po proběhlém turnusu, atd.

V následujícím týdnu obdržela KHS informace o výskytu zažívacích potíží u studentů gymnázia, kteří byli v tomto rekreačním zařízení v inkriminované době také na lyžařském kurzu. Celkový počet účastníků lyžařského kurzu byl 80 studentů a 8 osob doprovodu. Během kurzu mělo obtíže celkem 18 studentů. Opět byl průběh onemocnění velice rychlý, provázený zejména zvracením. Mimo lyžařský kurz bylo v zařízení ubytováno ještě dalších 28 osob, z nichž nikdo potíže neudával.

KHS během 2 týdnů v rámci svých šetření odebrala na hotelu řadu vzorků (voda, pokrmy, biologický materiál). Většina analýz byla z hlediska přítomnosti patogenních bakterií či virů negativní. Z biologického materiálu se však potvrdilo podezření na virovou infekci, konkrétně byly ve vzorcích zjištěny noroviry. V takových případech nemocný virus vylučuje stolicí

a v případě zvracení vzniká infekční aerosol. K nákaze druhé osoby tak může docházet i přímým vdechnutím tohoto aerosolu, zejména však požitím virů. Zásadní je proto osobní hygiena zejména po použití WC a před jídlem. Noroviry jsou schopny přežít určitou dobu i na předmětech a površích. Charakteristická je u nich zejména opravdu vysoká nakažlivost při přenosu z člověka na člověka.

V rámci svých šetření KHS postupně získala další informace i z období před nahlášením prvního případu. Ukázalo se, že zdravotní obtíže daného charakteru měla v tomto hotelu řada dalších osob i předtím. KHS provedla také další šetření týkající se průběhu zotavovacích akcí konaných také v okolních ubytovacích zařízeních. Průběh akcí v těchto zařízeních byl po stránce zdravotní klidný.

5.2.3. Případová studie 3

V červnu 2014 byly v Liberci hospitalizovány dvě učitelky z Doks. Obě pacientky uvedly, že konzumovaly syrové kozí mléko. Krajská hygienická stanice Libereckého kraje požádala o součinnost při došetřování krajskou veterinární správu. Bylo zjištěno, že kozí mléko koupily od soukromé chovatelky. Chov byl sice registrován, ale neměl souhlas Krajské veterinární správy pro Liberecký kraj pro prodej syrového mlékárensky neošetřeného mléka přímo spotřebiteli.

Krajská veterinární správa vydala okamžitý zákaz uvádění mléka do oběhu a zákaz přesunu koz. Veterinární inspektoři odebrali vzorky k vyšetření, virus klíšťové encefalitidy byl v mléce prokázán, a proto byla vydána mimořádná veterinární opatření, v rámci kterých bylo nařízeno, že pozitivní zvířata mohou být poražena v hospodářství a maso musí být důkladně tepelně opračováno (minimálně 70 °C po dobu 10 minut) a smí být zpracováno pouze v domácnosti chovatele. Mléko od pozitivních zvířat může chovatel použít pro vlastní spotřebu jen po tepelném ošetření (minimálně 72 °C po dobu 15 sekund). Současně bylo zahájeno správní řízení o pokutě pro porušení § 27 odst. 1 písmeno e) veterinárního zákona.

Požívání syrového, tepelně neošetřeného, zejména kozího mléka je riskantní, především s ohledem na riziko onemocnění klíšťovou encefalitidou. Jde o produkt prvovýroby, a proto podle veterinární legislativy musí být spotřebitel při nákupu na viditelném místě upozorněn „Syrové mléko, před použitím převařit“. Osoby, které jsou očkovány proti klíšťové encefalitidě, ohroženy nejsou.

5.2.4. Případová studie 4

Na Slovensku proběhla v roce 2016 lokální epidemie klíšťové encefalitidy v Košicích, kde bylo zaregistrováno 32 osob, u nichž se potvrdila nákaza klíšťovou encefalitidou po konzumaci ovčích sýrů. Většina nemocných byla hospitalizována (27 osob), u 5 osob proběhla léčba ambulantně. Dalších sedm případů hlásila Banská Bystrica, kde jako pravděpodobné ohnisko nákazy bylo vytipováno několik salaší. Počet případů nebyl definitivní, protože inkubační doba onemocnění je obvykle 7 – 14 dní (rozpětí 2 – 28 dní).

Hlavní veterinární lékař Slovenské republiky nařídil mimořádné nouzové opatření, vzhledem k vážnému nebezpečí pro zdraví lidí, které tato zoonóza představuje na základě § 6 odst. 5 písm. a) druhý bod a § 34 odst. 1 písm. b) zákona č. 39/2007 o veterinární starostlivosti ve znění pozdějších předpisů. Všem chovatelům ovcí a koz na pastvě, kteří dodávají na trh nepasterizované, tepelně neopracované, syrové ovčí a kozí mléko určené pro přímou lidskou spotřebu nebo ho zpracovávají nebo dodávají na výrobky vyrobené ze syrového ovčího nebo kozího mléka, jejichž výrobní proces nezahrnuje tepelné ošetření pasterizací, bylo nařízeno neuvádět na trh syrové ovčí nebo kozí mléko a výrobky z něho bez pasterizace podle Přílohy III, oddíl IX, kapitola II, bod II písm. a) nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES)

č. 853/2004, kterým se ustanovují zvláštní hygienické předpisy pro potraviny živočišného původu v platném znění, pokud se v úředně odebraném vzorku potvrdí laboratorním vyšetřením přítomnost RNA viru klíšťové encefalitidy.

Regionální veterinární a potravinové správy ve Slovenské republice bezodkladně vykonaly úřední odběr bazénových vzorků syrového ovčího a kozího mléka na důkaz přítomnosti viru klíšťové encefalitidy metodou PCR v chovech, kde byla produkce mléka určena na výrobu mléčných výrobků vyrobených z nepasterizovaného mléka. Vzorky byly vyšetřeny ve Veterinárním a potravinovém ústavu Dolný Kubín.

5.2.5. Případová studie 5

V roce 2012 byl roční chlapec odeslán k hospitalizaci na dětské oddělení Nemocnice Jihlava pro akutní gastroenteritidu s počáteční dehydratací. Chlapec ráno 3× zvracel a měl četné stolice. Odpoledne u chlapce došlo k promodrání kůže, zvýšení tepové frekvence a zrychlenému dýchání, periferní místa těla byla chladná. Chlapec byl přeložen na jednotku intenzivní péče. Po zaventilování se zklidnila tepová frekvence a následně došlo k mírnému ústupu cyanózy. Po několika minutách nastala náhle fibrilace komor. Dítě bylo resuscitováno, avšak po 20 minutách zemřelo.

Epidemiologické šetření prokázalo, že 3 dny před hospitalizací bylo dítě s rodiči v Maďarsku v termálních lázních a den před hospitalizací jedlo kuřecí maso. Proti rotavirům nebylo očkováno.

5.2.6. Případová studie 6

V tomto případě se jedná o zdravé batole, chlapce, ve věku 2,5 let. Chlapec nenavštěvoval kolektiv, měl dva starší sourozence. Jako první příznak onemocnění se u chlapce projevilo zvracení. Den poté přibyly další příznaky – nadýmání, subfebrilie, a následně v noci opakovaná průjemová vodnatá stolice, 1x za noc i zvracel a celkově za noc vypil asi 1 litr tekutin. Ráno měl chlapec teplotu 38,5 °C, byl mu podán Nurofen. U chlapce se začaly rozvíjet další příznaky – motorický neklid, apatie, ztráta vědomí, zástava dýchání. Rodiče okamžitě zavolali záchranku, ale bohužel se chlapce nepodařilo resuscitovat a zemřel.

Po epidemiologickém šetření bylo zjištěno, že postupně v rodině onemocněly všechny děti. Jako první onemocněla dcera, u které byly diagnostikovány rotaviry a chřipka typu B. Jako druhý onemocněl starší syn (suchý kašel, horečka, bolesti břicha). V jeho případě bylo vyšetření na rotaviry negativní, ale byla mu diagnostikována chřipka typu B. Nakonec onemocněl již zmíněný mladší syn.

Při soudní pitvě byla u chlapce stanovena příčina smrti – otok mozku při hypertonické dehydrataci po rotavirové gastroenteritidě. Ve stolici byla metodou ELISA prokázána přítomnost rotavirového antigenu.

Rotavirus je nejčastějším původcem akutních průjmů, způsobuje rotavirovou gastroenteritidu. Až 95 % dětí je infikováno rotaviry do věku 5-ti let, přičemž nejvyšší incidence je mezi 7. – 15. měsícem života. Virus se přenáší oro-fekálně, infekčním aerosolem, ale také kontaminovanými předměty. Velmi rychle se šíří v uzavřených kolektivech jako jsou mateřské školky. K infekci stačí velmi malá infekční dávka a inkubační doba je do 48 h. Vzhledem k tomu, že virus napadá především malé děti, hrozí riziko rychlé dehydratace. V letech 2002 – 2010 bylo v České republice prokázáno 8 úmrtí na rotavirovou infekci, jednalo se o 3 kojence a 5 seniorů.

5.2.7. Případová studie 7

V květnu a červnu 2015 proběhla epidemie akutní norovirové gastroenteritidy u obyvatel lokality Praha 6 – Dejvice a Bubeneč. Epidemii předcházely plánované opravy vodovodního řádu zásobujícího tuto oblast. Dle kvalifikovaného odhadu provedeného na základě dotazníkového výzkumu u 3 000 respondentů bydlících v této oblasti onemocnělo přibližně 10 304 osob (cca 32,2 %) z celkového počtu 32 000 obyvatel. Dle výsledků internetového dotazníkového šetření u 2 670 respondentů, tj. zaměstnanců a studentů vysokých škol a dalších velkých organizací umístěných v této oblasti, onemocnělo 10 848 osob (cca 33,9 %).

Na základě výše uvedeného lze předpokládat, že počet nemocných se pohyboval na hranici 10 000 až 11 000 osob. Pomocí elektronového mikroskopu se podařilo objasnit etiologická agens ze vzorků odebraných od 8 postižených osob (zvratky a stolice) a 4 vzorků vody odebraných ze sítě v zasažené oblasti Dejvic. Noroviry byly prokázány jak v biologickém materiálu, tak v pitné vodě. Klinický průběh onemocnění byl u většiny nemocných lehký, charakterizovaný převážně průjmem se zvracením, v ojedinělých případech zvýšenou teplotou. Hospitalizováno bylo 32 osob. Klinické obtíže přetrvávaly 1 až 3 dny, výjimečně déle. Nikdo v průběhu epidemického výskytu nezemřel.

POUŽITÁ LITERATURA

BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vyd. Praha: Marvil. 1996. 558 s. ISBN 80-238-0297-6.

BERÁNEK, M. *Molekulární genetiky pro bioanalytiku*. 1. vyd. Praha: Karolinum. 2016. 194 s. ISBN 978-80-246-3224-7.

BOHÁČOVÁ, R., UHROVÁ, H., VAVERKOVÁ, R. Úmrtí na rotavirovou gastroenteritidu. *Pediatric pro praxi*, 2011, roč. 12, č. 4, s. 265–266. [online]. 3.8.2011 [cit. 2018-10-17]. Dostupné z: <https://www.pediatricpropraxi.cz/pdfs/ped/2011/04/10.pdf>

BURCHILL, S.A., PEREBOLTE, L., JOHNSTON, C., TOP, B., SELBY, P. Comparison of the RNA-amplification based methods RT-PCR and NASBA for the detection of circulating tumour cells. *British Journal of Cancer*, 2002, vol. 86, no. 1, s. 102–109.

CELER, V. *Obecná virologie*. 1. vyd. Hradec Králové: Nucleus HK. 2010. 143 s. ISBN 978-80-87009-70-3.

DEIMAN, B., AARLE, P., SILLEKENS, P. Characteristics and applications of nucleic acid sequence-based amplification (NASBA). *Molecular Biotechnology*, 2002, vol. 20, no. 2, p. 163–179.

DVOŘÁKOVÁ, A. Onemocnění rotavirovou gastroenteritidou s úmrtím. *KHS kraje Vysočina*. [online]. 6.10.2012 [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: http://www.pmfhk.cz/WWW/HVD_2012/Dvorakova_Onemocneni_rotavirovou.pdf

GOYAL, S.M., CANNON, J.L. *Viruses in food*. 1st ed. Springer-Verlag US. 2006. 512 s. ISBN 978-1-4419-3962-3.

JÁGROVÁ, Z. Havárie vody v Praze. *DocPlayer* [online]. [cit. 2018-10-13]. Dostupné z: <http://docplayer.cz/15169461-Havarie-vody-v-praze-zdenka-jagrova-hygienicka-stanice-hl-mesta-prahy.html>

KHS Královehradeckého kraje. Hromadný výskyt zažívacích obtíží u účastníků lyžařského výcviku. [online]. 23.1.2018 [cit. 2018-06-17]. Dostupné z: http://www.khskk.cz/print.php?type=A&item_id=1695

KOŠŤÁLOVÁ, J. Klíšťová encefalitida na Slovensku. *Státní zdravotní ústav*. [online]. 6.6.2016 [cit. 2018-09-23]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/klistova-encefalitida-na-slovensku>

LANGABEER, S.E., GALE, R.E., HARVEY, R.C., COOK, R.W., MACKINNON, S., LINCH, D.C. Transcription-mediated amplification and hybridisation protection assay to determine BCR-ABL transcript levels in patients with chronic myeloid leukaemia, *Leukemia*, 2002, vol. 16, p. 393–399.

LEXOVÁ P., ČÁSTKOVÁ J., KYNČL J., NĚMEČEK V. Výskyt virových hepatitid v České republice – rok 2015 a trendy v posledních deseti letech. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2016, roč. 25, č. 6-7, s. 225–230.

NAVRÁTIL, M. *Základy virologie: obecná virologie*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci. 2011. 100 s. ISBN 978-80-244-2823-9.

PAVELKA, J., KRBKOVÁ, L., HOMOLA, L. Rotavirové gastroenteritidy – význam a možnosti prevence. *Pediatric pro praxi*, 2013, roč. 14, č. 1, s. 51–53. [online]. 2013 [cit. 2018-10-07]. Dostupné z: https://www.pediatricpropraxi.cz/artkey/ped-201301-0013_Rotavirove-gastroenteritidy-vyznam_a_moznosti_prevence.php

PAVLÍK, E. Molekulární biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku – Část 6. [online]. 1.2.2001 [cit. 2018-11-01]. Dostupné z:

<http://objednavky.roche-diagnostics.cz/download/1a/odborne/pcr6.pdf>

PLESNÍK, V. Virové infekce šířice se potravinami. [online]. 1.3.2003 [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <https://www.khsova.cz/Content/files/articles/plesnik/smd154.pdf>

PLESNÍK, V. Virová hepatitida typu E. [online]. 10.2004 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/docs/01_odborna_cinnost/files/smd205.pdf

PLESNÍK, V. Méně známé virové infekce lidí. [online]. 4.2007 [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: http://www.khsova.cz/docs/01_odborna_cinnost/files/sms036.pdf

PITRMUCOVÁ, P. a kol. Výskyt HAV na táboře v Nemojově. [online]. 2017 [cit. 2018-10-07]. Dostupné z: <https://www.khspce.cz/wp-content/uploads/prednasky/17-5-2016-03-Prezentace-VHA-Nemojov.pdf>

PRÍKAZSKÁ M., BENEŠ Č. Virová hepatitida E v České republice. *Zprávy CEM (SZÚ, Praha)*, 2015, roč. 24, č. 2, s. 63–68.

RAVEN, P.H., JOHNSON, R., *Biology*. 5th edition. W C B/McGraw-Hill. 1999. 1284 s. ISBN 978-0-6973-5353-5

REECE, J.B., URRY, L.A., CAIN, M.L., WASSERMAN, S.A., MINORSKY, P.V., JACKSON, R.B. *Campbell Biology*. 10th ed. Pearson Education. 2014. 1279 s. ISBN 978-0-321-77565-8

ROZSYPAL, S. a kol. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: Scientia. 2003. 824 s. ISBN 80-718-3268-5

SARRAZIN, C., TEUBER, G., KOKKA, R., RABENAU, H., ZEUZEM, S. Detection of residual hepatitis C virus RNA by transcription-mediated amplification in patients with complete virologic response according to polymerase chain reaction – based assays. *Hepatology*, 2000, vol. 32, no. 4, p. 818–823.

SVS ČR. Klíšťová encefalitida z mléka. *Internetový portál bezpečnosti potravin*. [online]. 24.6.2014 [cit. 2018-10-12]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/klistova-encefalitida-z-mleka.aspx>

VOTAVA, M. a kol. *Lékařská mikrobiologie, vyšetřovací metody*. 1. vyd. Brno: Neptun. 2010. 504 s. ISBN 978-80-86850-04-7.

WIEDMANN, M., WILSON, W.J., CZAJKA, J., BATT, A.L. Ligase chain reaction (LCR) – overview and applications. *Genome Research*, 1994, vol. 3, s. S51–S64.

URL 1: Virus. *iStock by Getty Images*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z:

<https://www.istockphoto.com/photos/virus?sort=mostpopular&mediatype=photography&phrase=virus>

URL 2: Worker hygiene and sanitation practices play a critical role in fresh produce safety. *Hand in scan*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <http://www.handinscan.com/worker-hygiene-and-sanitation-practices-play-a-critical-role-in-fresh-produce-safety/>

URL 3: Rozmanitost organismů. *Publi.cz*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z:

<https://publi.cz/books/294/04.html>

URL 4: Kapsida. *Wikipedie*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z:

https://cs.wikipedia.org/wiki/Kapsida#/media/File:Adenovirus_3D_schematic.png

- URL 5: Kapsida. *Wikipedie*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: https://cs.wikipedia.org/wiki/Kapsida#/media/File:Helical_capsid_with_RNA.png
- URL 6: Viry. Biologická membrána. *Docplayer.cz*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/33665459-Viry-biologicka-membrana.html>
- URL 7: The genetics of viruses. *A young naturalist*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <https://laurenschramm.com/2018/03/26/the-genetics-of-viruses/>
- URL 8: Laboratoř mikrobiologie II. Rod *Staphylococcus*. *Univerzita Pardubice*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://dokumenty.upce.cz/FCHT/kbbv-vk/specialni-mikrobiologie/rod-staphylococcus.pdf>
- URL 9: About Adenovirus. *Breathe Life*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://kaglife.org/about-adenoviruses/>
- URL 10: It Looks Like the Flu, But Isn't: What Is Adenovirus? *Live Science*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <https://www.livescience.com/61585-what-is-adenovirus.html>
- URL 11: Fact Sheet: Hepatitis A. *ThermoFisher Scientific*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/blog/food/fact-sheet-hepatitis-a/>
- URL 12: Hepatitis A virus infection. *Netdoctor*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://www.netdoctor.co.uk/conditions/infections/a5679/hepatitis-a-virus-infection>
- URL 13: Hepatitis E weit verbreitet. *Medmix*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <http://www.medmix.at/hepatitis-e-weit-verbreitet/>
- URL 14: Sapovirus. *Wikipedia*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Sapovirus>
- URL 15: Norovirus and food safety. *360training.com*. [online]. [cit. 23-10-2018]. Dostupné z: <https://www.360training.com/enterprise/blog/norovirus-food-safety/>
- URL 16: Immune markers that may predict rotavirus vaccine effectiveness. *Manufacturing Chemist*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: https://www.manufacturingchemist.com/news/article_page/Immune_markers_that_may_predict_rotavirus_vaccine_effectiveness/133065
- URL 17: Astroviridae. *Humansandviruses*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://humansandviruses.wordpress.com/2015/03/24/astroviridae/>
- URL 18: Enterovirus 71 structure. *News Medical Live Sciences*. [online]. [cit. 2018-10-24]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/life-sciences/Enterovirus-71-Structure.aspx>
- URL 19: Virus klíšťové encefalidity odhalil svůj přístupový kód. *Klíšťová encefalitida*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://www.klistova-encefalitida.cz/novinky/virus-klistove-encefalidity-odhalil-svuj-pristupovy-kod-152>
- URL 20: Polymerázová reťazová reakcia. *Wikipédia*. [online]. [cit. 23-10-2018]. Dostupné z: https://sk.wikipedia.org/wiki/Polymer%C3%A1zov%C3%A1_re%C5%A5azov%C3%A1_reakcia
- URL 21: Mikrobiologie viry v potravinách příklady z praxe. *Docplayer.cz*. [online]. [cit. 2018-10-23]. Dostupné z: <https://docplayer.cz/1324315-Mikrobiologie-viry-v-potravinach-priklady-z-praxe.html>
- URL 22: Viry. *Bezpečnost potravin*. [online]. [cit. 2018-06-23]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76739.aspx>

- URL 23: Bakteriofág. *Skripta ke cvičení z obecné mikrobiologie, cytologie a morfologie bakterií*. [online]. 2017 [cit. 2018-06-18]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/bakteriofag.html
- URL 24: Bakteriofág. *Wikipedie*. [online]. [cit. 2018-06-11]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Bakteriof%C3%A1g>
- URL 25: Virus hepatitidy A. *Bezpečnost potravin*. [online]. [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76736.aspx>
- URL 26: Žloutenka, infekční virová hepatitida. *Očkovací centrum, Avenier*. [online]. [cit. 2018-06-12]. Dostupné z: <https://www.ockovacentrum.cz/cz/zloutenka-typu-ab#zloutenka-typu-e>
- URL 27: Norovirové gastroenteritidy. *Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě*. [online]. 19.10.2015 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://zuova.cz/Home/Clanek/noroviry>
- URL 28: Norovirus. *Bezpečnost potravin*. [online]. [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76797.aspx>
- URL 29: Rotavirové infekce a očkování. *Zdravotnictví a medicína*. [online]. 7.4.2011 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/rotavirove-infekce-a-ockovani-459220>
- URL 30: Koronavirus. *Aktuálně. cz*. [online]. 31.5.2013 [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <https://www.aktualne.cz/wiki/veda-a-technika/koronavirus/r~i:wiki:3784/>
- URL 31: Virus klíšťové encefalitidy, *Bezpečnost potravin*. [online]. [cit. 2018-07-20]. Dostupné z: <http://www.bezpecnostpotravin.cz/az/termin/76737.aspx>
- URL 32: Klíšťová encefalitida. *Synlabianier, odborný magazín pro lékaře*. [online]. [cit. 2018-07-17]. Dostupné z: http://www.synlabianer.cz/clanky/klistova-encefalitida_5
- URL 33: Torovirus. *Science Direct*. [online]. 2014 [cit. 2018-07-17]. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/topics/neuroscience/torovirus>
- URL 34: Diagnostické metody detekce patogenních mikroorganismů. *Výzkumný a šlechtitelský ústav ovocnářský Holvousy s.r.o.* [online]. [cit. 2018-07-15]. Dostupné z: http://www.vsuo.cz/common/cms_files_pr/files_to_download/A9_Diagnosticke_metody_detekce_patogennich_organismu.pdf
- URL 35. Metoda SDA. *Slideplayer*. [online]. [cit. 2018-11-01]. Dostupné z: <https://slideplayer.cz/slide/4021255/>
- URL 36: Diagnostické amplifikační metody nevyužívající PCR. *IS MU*. [online]. [cit. 2018-11-01]. Dostupné z: <https://is.muni.cz/el/1431/jaro2008/Bi6400/um/Diagnostika3.ppt>

Autoři:	Iveta Vaňková Veronika Čurečková MVDr. Šárka Bursová, Ph.D.
Název:	Viry a bakteriofágy v potravinách
Ústav:	Ústav hygieny a technologie mléka
Počet stran:	34
Podpořeno:	Projektem Interní vzdělávací agentury VFU Brno č. 2018/FVHE/2340/53
Vydavatel:	Veterinární a farmaceutická univerzita Brno