

Univerzita Pardubice

Fakulta chemicko-technologická

Gramnegativní anaerobní bakterie

Aneta Glosová

Bakalářská práce

2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Aneta Glosová**
Osobní číslo: **C14202**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Klinická biologie a chemie**
Název tématu: **Gramnegativní anaerobní bakterie**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

1. Vypracujte rešerši na dané téma, nejprve se zaměřte na taxonomické dělení gramnegativních bakterií.
2. V druhé části se věnujte jednotlivým rodům anaerobních mikroorganismů, které se nejčastěji vyskytují v chronických ranách.
3. V poslední části se zaměřte na detekci a identifikaci anaerobních mikroorganismů.

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Podle pokynů vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Iveta Brožková, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce:

28. listopadu 2016

Termín odevzdání bakalářské práce:

7. července 2017



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Alexander Čegan, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2017

Prohlášení

Tuto práci jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 9/2012, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

Souhlasím s prezenčním zpřístupněním své práce v Univerzitní knihovně.

V Pardubicích dne 02.07.2018

Glosová Aneta

Poděkování

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ivetě Brožkové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a čas věnovaný při konzultacích. Dále bych ráda poděkovala Kláře Šepsové a Natálii Farbárové, které mi byly ochotné při jakémkoliv problému pomoci. V neposlední řadě chci poděkovat mým přátelům a rodině za podporu po celou dobu.

Anotace

Tato bakalářská práce se zabývá gramnegativními anaerobními mikroorganismy a jejich taxonomickým dělením. Zaměřuje se na mikroorganismy, které se nejčastěji vyskytují v chronických ranách. V další části se práce věnuje detekci a identifikaci těchto mikroorganismů.

Klíčová slova

gramnegativní bakterie, obligátní anaeroby, detekce, identifikace, taxonomie, chronické rány

Title

Gram-negative anaerobic bacteria

Annotation

This bachelor thesis deals with gram-negative anaerobic microorganisms and their taxonomic division. It focuses on microorganisms that are most commonly found in chronic wounds. The next part of this work deals with the detection and identification of these microorganisms.

Keywords

gram-negative bacteria, obligatory anaerobes, detection, identification, taxonomy, chronic wounds

Obsah

Úvod.....	13
1 Taxonomie bakterií.....	14
1.1 Pravidla pro charakterizaci nových MO.....	15
1.2 Klasifikace bakterií.....	16
1.3 Fylogenetický strom	17
2 G – anaerobní MO vyskytující se v chronických ranách	22
2.1 <i>Bacteroides</i>	23
2.2 <i>Porphyromonas</i>	25
2.3 <i>Prevotella</i>	26
2.4 <i>Fusobacterium</i>	27
2.5 <i>Bilophila</i>	28
2.6 <i>Veillonella</i>	29
2.7 <i>Mobiluncus</i>	30
2.8 <i>Leptotrichia</i>	31
3 Detekce a identifikace MO	33
3.1 Kultivace na půdách	34
3.1.1 Anaerobní agar	34
3.1.2 Žloutkový agar.....	34
3.1.3 Glukózový agar s kvasničným extraktem.....	35
3.1.4 Krevní agar s ovčí krví, kanamycinem a vancomycinem.....	35
3.1.5 Lombardův-Dowellův agar	36
3.1.6 Wilkins-Chalgrenův agar.....	36
3.1.7 Schaedlerovo anaerobní medium	37
3.1.8 Žluč-eskulínový agar	37

3.2	Biochemické testy	37
3.2.1	Tvorba katalázy	38
3.2.2	Hydrolyza eskulinu.....	38
3.2.3	Produkce ureázy	38
3.2.4	Redukce dusičnanů	38
3.2.5	Tvorba indolu	38
3.2.6	Tvorba H ₂ S	39
3.2.7	Hydrolyza želatiny.....	39
3.2.8	ONPG test.....	39
3.2.9	Test pohyblivosti	39
3.2.10	Testy na rezistenci vůči antibiotikům.....	39
3.3	Fingerprinty nukleových kyselin.....	40
3.4	Plynová chromatografie (GC)	40
3.5	Polymerázová řetězcová reakce.....	41
3.6	Denaturační gradientová gelová elektroforéza	41
3.7	Shotgun sekvenování.....	42
3.8	DNA-DNA hybridizace	43
3.9	16S rRNA sekvenování	43
3.10	MALDI-TOF MS	44
4	Závěr.....	48
5	Reference.....	49

Seznam obrázků

Obrázek 1: Hierarchie biologické klasifikace dle Carla Linneausa	17
Obrázek 2: Taxonomické zařazení vybraných rodů do jednotlivých taxonů	18
Obrázek 3: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů <i>Bacteroides</i> , <i>Porphyromonas</i> a <i>Prevotella</i>	19
Obrázek 4: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů <i>Fusobacterium</i> , <i>Bilophila</i> a <i>Veillonella</i>	20
Obrázek 5: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů <i>Mobiluncus</i> a <i>Leptotrichia</i>	21
Obrázek 6: <i>B. fragilis</i> A-na Brucella agarů, B-obarven dle Grama	24
Obrázek 7: <i>P. gingivalis</i> na krevním agaru	25
Obrázek 8: <i>Prevotella spp</i> , na krevním agaru	27
Obrázek 9: <i>F. nucleatum</i> obarven dle Grama	27
Obrázek 10: <i>Bilophila wadsworthia</i> na BBE agarů	29
Obrázek 11: <i>Veillonella</i> obarvena dle Grama	30
Obrázek 12: Kolonie <i>L. buccalis</i> na agaru	32
Obrázek 13: Schéma MALDI-IMS	46

Seznam zkratek a značek

BBE	žlučovo-eskulinový agar pro bakterie rodu <i>Bacteroides</i>
<i>B. fragilis</i>	<i>Bacteroides fragilis</i>
<i>B. thetaiotaomikron</i>	<i>Bacteroides thetaiotaomikron</i>
<i>Bi. wadsworthia</i>	<i>Bilophila wadsworthia</i>
CHG	chlorhexidinglukonát
DDBJ	Japonská databanka DNA
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza
EMBL/EBI	Evropský institut pro bioinformatiku
EYA	žloutkový agar
<i>F. canifelinum</i>	<i>Fusobacterium canifelinum</i>
<i>F. gonidiaformans</i>	<i>Fusobacterium gonidiaformans</i>
<i>F. necrogenes</i>	<i>Fusobacterium necrogenes</i>
<i>F. necrophorum</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i>
<i>F. mortiferum</i>	<i>Fusobacterium mortiferum</i>
<i>F. nucleatum</i>	<i>Fusobacterium nucleatum</i>
<i>F. poviforme</i>	<i>Fusobacterium poviforme</i>
<i>F. russii</i>	<i>Fusobacterium russii</i>
<i>F. ulcerans</i>	<i>Fusobacterium ulcerans</i>
<i>F. varium</i>	<i>Fusobacterium varium</i>
G-	gramnegativní

GC	plynová chromatografie
GLC	plynová rozdělovací chromatografie, plynná složka se rozděluje v kapalinové složce
HIV	virus lidské imunitní nedostatečnosti
<i>L. buccalis</i>	<i>Leptotrichia buccalis</i>
<i>L. goodfellowii</i>	<i>Leptotrichia goodfellowii</i>
<i>L. hofstadii</i>	<i>Leptotrichia hofstadii</i>
<i>L. hongkongensis</i>	<i>Leptotrichia hongkongensis</i>
<i>L. shahii</i>	<i>Leptotrichia shahii</i>
<i>L. trevisanii</i>	<i>Leptotrichia trevisanii</i>
<i>L. wadei</i>	<i>Leptotrichia wadei</i>
LKV	krvní agar s ovčí krví, kanamycinem a vankomycinem
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MO	mikroorganismus
MS	hmotnostní spektroskopie
NCBI	Národní centrum biotechnologických informací
ONPG	<i>o</i> -nitrofenyl- β -D-galaktopyranozid
<i>P. gingivalis</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
PCR	polymerázová řetězcová reakce
PYG	Glukózový agar s kvasničným extraktem
RA	revmatoidní artritida
rDNA	ribozomální deoxyribonukleová kyselina

rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
TSA	tryptonsojový agar
<i>V. atypica</i>	<i>Veillonella atypica</i>
<i>V. caviae</i>	<i>Veillonella caviae</i>
<i>V. criceti</i>	<i>Veillonella criceti</i>
<i>V. dispar</i>	<i>Veillonella dispar</i>
<i>V. ratti</i>	<i>Veillonella ratti</i> ,
<i>V. rodentium</i>	<i>Veillonella rodentium</i>
<i>V. parvula</i>	<i>Veillonella parvula</i>
VFA	těkavé mastné kyseliny

Úvod

Pro tuto bakalářskou práci bylo vybráno téma Gramnegativní anaerobní bakterie a klade si za úkol detailní popis taxonomie bakterií a zařazení jednotlivých, níže popsaných bakteriálních rodů do fylogenetické klasifikace poprvé zavedené Carlem Linneausem. První kapitola pojednává zejména o významnosti a pravidlech taxonomie, jelikož správná charakterizace, klasifikace a nomenklatura je klíčovým faktorem pro identifikaci nových členů jednotlivých taxonů. V další části je věnována pozornost jednotlivým zástupcům vyčleněné skupiny gramnegativních anaerobních mikroorganismů (MO) (*Bacteriodes*, *Porphyrromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Bilophila*, *Veillonella*, *Mobiluncus*, *Leptotrichia*) vyskytujících se v chronických ranách, včetně jejich nejvýznamnějších představitelů a pojednává také o nejruznějších nemocech a zdravotních komplikacích způsobených přítomností právě těchto mikroorganismů v dynamické mikroflóře zmíněných chronických ran.

Rychlost a spolehlivost určení mikroorganismů vyskytujících se v chronických ranách vedoucích k infekci a ztíženému hojení je velmi důležitá při závažných a život ohrožujících stavech. Rozmanité metody a techniky používané k detekci a identifikaci zaručují spolehlivé určení původce infekce.

Cílem této práce je přiblížit jednotlivé, nejčastěji se vyskytující gramnegativní anaerobní bakteriální druhy z oblasti chronických onemocnění a široké spektrum identifikačních metod používané v laboratořích a zdravotnických zařízeních. V dnešní době nachází uplatnění zejména moderní metody, kterými jsou MALDI-TOF MS a molekulárně biologické metody, zejména sekvenování (16S rRNA, DNA nebo RNA shotgun sekvenování). Své využití mají i klasické barvicí metody a jednoduché biochemické testy poskytující základní informace o fyziologických vlastnostech bakterií.

1 Taxonomie bakterií

Taxonomie se zabývá definováním a pojmenováním skupin biologických organizmů na základě sdílených charakteristik. Organismy jsou seskupeny do taxonů, a ty jsou zařazeny do taxonomické pozice, skupiny dané pozice mohou být shromážděny tak, aby tvořily superskupinu vyššího stupně, čímž vznikne taxonomická hierarchie. V moderním použití dělíme hlavní kategorie na říše, oddělení, třída, řád, čeleď, rod a druh. Švédský botanik Carl Linnaeus je považován za otce taxonomie, protože vyvinul systém ke kategorizaci organizmů a binomickou nomenklaturu pro pojmenování organizmů.

Druh patří mezi základní prvek mikrobiální taxonomie, jedná se o jasně ohraničenou skupinu MO, které jsou v příbuzném vztahu s vysokým stupněm homologie DNA a to nad 70 %. MO stejného druhu se vyznačují stejnými fenotypovými vlastnostmi, které je odlišují od ostatních skupin.

Všechny druhy jsou přiřazeny k rodu, který může být funkčně definován jako jeden nebo více druhů se stejnými obecnými fenotypovými vlastnostmi, které se současně společně shlukují na bázi 16S rRNA sekvence (Brenner, 2005).

Taxonomie se opírá o tři klíčové elementy, a to charakterizaci, klasifikaci a nomenklaturu. Všechny tyto tři prvky jsou vzájemně ovlivňovány. Tedy nomenklatura je závislá na klasifikaci, která zároveň podléhá charakterizaci skupiny organizmů. Zatímco nomenklatura je řízená bakteriologickým kódem, klasifikace a charakterizace prokaryot jsou oblasti, které nejsou formálně regulovány. Právě v těchto oblastech se za posledních padesát let uskutečnilo mnoho změn (Busse, 2010).

Charakterizace MO je klíčovým prvkem systematiky bakterií. Přestože se v posledních letech vyvinuly nové metody, ty „tradiční“ zůstávají stále klíčovými. V případě známého taxonu může být použita vybraná sada testů k určení, zda byl MO identifikován jako člen stávajícího oddělení. Nicméně v případě MO nebo souboru MO ukazujících se jako nové taxony, je vhodné tyto bakterie charakterizovat co nejlépe. Cílem této charakterizace je umístit je do hierarchického rámce stanoveného bakteriologickým kódem, a také poskytnout detailní popis taxonu (Brenner, 2005).

Jednotlivé nově identifikované MO by měly být přiděleny druhům (případně poddruhům), ale povaha „názvu druhu“ (binomická nebo v kombinaci) uvádí, že musí být

přiděleny také rodu. Rod může být buď již stávající, nebo nově vzniklý. Bakteriologický kód také doporučuje zmínit umístění rodu v čeledi, a toto může být rozšířeno na další hierarchické úrovně, jelikož se stanou definovanými. Obecně platí, že členové nového druhu patří do jedné monofylitické linie, která byla určena na základě sekvenování genu 16S rRNA. Pro rekonstrukci fylogenních MO byly vyvinuty různé nástroje a databáze, tak aby bylo dosaženo nejspolehlivější typologie (Rosselló-Móra, 2015).

1.1 Pravidla pro charakterizaci nových MO

Za účelem správné a řádné charakterizace nově objevených MO je nutné dodržet určité zásady. Popis a informace o nových zkoumaných MO by měly být co nejúplnější. Mělo by být zahrnuto místo izolace MO (geografické odkazy mohou také zahrnovat GPS souřadnice nebo zeměpisnou šířku a délku, je-li to možné), označení nového MO (včetně všech přístupových čísel pro shromažďování údajů o kultuře) a veškeré informace týkající se prostředí, z něhož byl MO izolován (například pH, obsah solí, teplota, chemické složení, prostředí, hloubka půdního profilu nebo vodního sloupce). Je třeba věnovat pozornost při použití nasbíraných dat k formulování závěru o ekologickém významu nového kmenu v životním prostředí bez dalších studií. Je nepřijatelné uvádět číslo sbírky kultury, pokud tento MO nebyl získán přímo ze jmenované sbírky. Tyto informace mohou být vyžadovány také ve sbírkách nebo databázích kultur, jako je například GenBank, DDBJ nebo EBI/EMBL je odpovědností autorů, aby se ujistili o konzistentnosti informací za účelem vyvarování se hromadění chyb. Současná politika společností GenBank, DDBJ a EBI/EMBL je nepřijímat nové taxonomické názvy, dokud se neobjeví v tisku (Busse, 2010).

Data uvedená v rukopisu mohou pocházet z mnoha různých zdrojů. Původní údaje by měly vycházet z výsledků shromážděných metodami popsány v textu, aby bylo možné opakovat experimentální práci popsanou v dokumentu. Použité metody by měly být uvedeny jasně, nebo by měl být uveden odkaz na jinou publikaci, ve které jsou tyto metody plně popsány. Při získávání údajů z literatury je třeba uvést jasné a jednoznačné odkazy na publikace, ve kterých byly údaje poprvé zveřejněny. Údaje mohou poskytnout kolegové, kteří nechtějí být spoluautory, ale souhlasili se zveřejněním výsledků nebo mohou být poskytnuty jako součást vědecké služby. V obou případech by měl být zdroj dat jasně a jednoznačně uveden, aby bylo zřejmé, že údaje nebyly shromážděny autory (Ventosa, 1982).

Je třeba mít na paměti, že v taxonomii prokaryot má klíčový význam zařazení typového MO. Ačkoli to není stanoveno bakteriologickým kódem (kód se zabývá otázkami nomenklatury, nikoliv záležitostmi taxonomie), selský rozum napovídá, že je vhodné zahrnout všechny typy kmenu MO relevantních pro studii. Tam, kde jsou zahrnuty členové odlišných rodů, a není možné vzít v úvahu všechny druhy tohoto rodu, je nesmírně důležité zahrnout typový druh rodu. Přirozeně musí být použit typový MO tohoto druhu. Je třeba zdůraznit, že typové druhy tohoto rodu jsou nejdůležitějším referenčním organizmem, se kterým musí být srovnáván nový druh, pokud je považován za člena stejného rodu. Druh umístěný v novém rodu musí být porovnán s druhem blízce příbuzného taxonu, který musí zahrnovat typový druh studovaného rodu. V případě srovnávání mezi čeleděmi musí být zahrnutý typový rod i typové MO typového druhu typového rodu. Je třeba mít na paměti dříve, než začne výzkum, že některé organizmy mohou být patogenní pro člověka, zvířata nebo rostliny, a ne všichni vědci mají přístup k zařízením nebo povolení k manipulaci s takovými organizmy (Busse, 2010).

1.2 Klasifikace bakterií

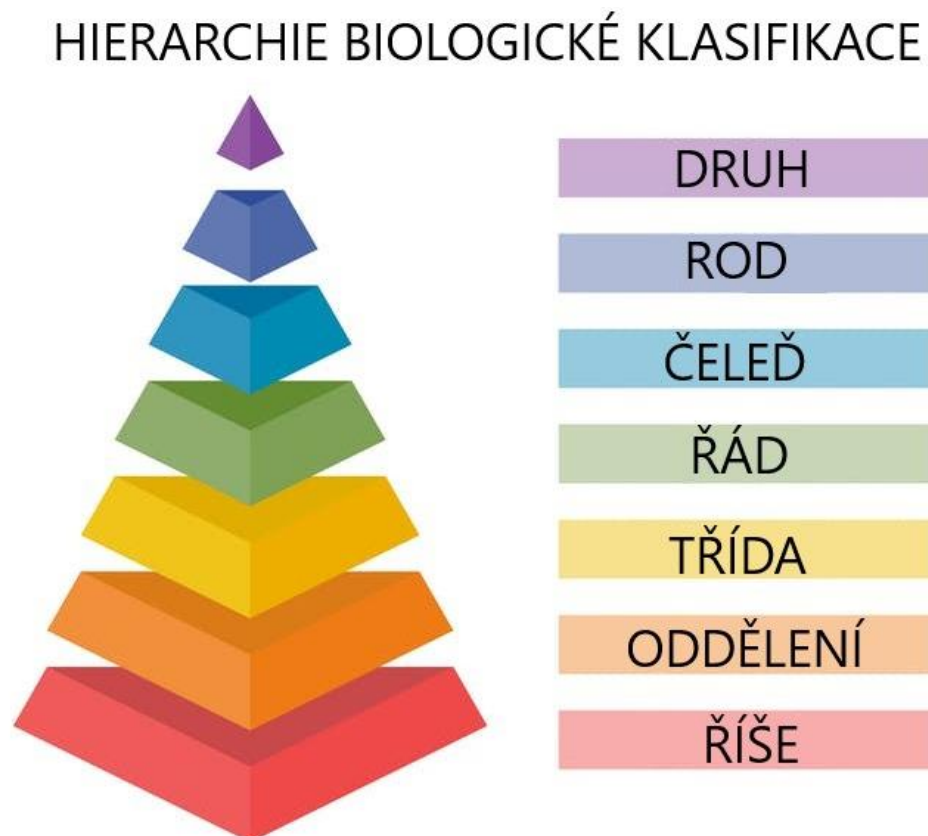
Konec 19. století byl počátkem bakteriální taxonomie a bakterie byly klasifikovány na základě fenotypových markerů. Numerická taxonomie zlepšila fenotypovou identifikaci, ale poskytla málo informací o fylogenetických vztazích prokaryot. Později byly pro uspokojivější klasifikaci používány chemotaxonomické a genotypové metody. Archea byly nejprve klasifikovány jako samostatná skupina prokaryot v roce 1977. Současná klasifikace Bacteria a Archea je založena na operačním modelu, tzv. polyfázickém přístupu skládajícím se z fenotypových, chemotaxonomických a genotypických dat, a také z fylogenetických informací. Dočasný status *Candidatus* byl vytvořen pro popis nekultivovaných prokaryotických buněk, pro které byl stanoven jejich fylogenetický vztah a jejich autenticita byla prokázána *in situ* vyšetřením (Schleifer, 2009).

Konečným cílem je dosáhnout teoreticky založeného klasifikačního systému na bázi fylogeneticky-evolučního pojetí. V současné době však existují dva protichůdné názory ohledně budoucí klasifikace Bacteria a Archea. Skupina molekulárních biologů předpokládá, že dosud nejasný efekt genového toku, zejména postranního genového přenosu, činí linie sestupu obtížnou, ne-li nemožnou k popsání. Avšak i tváří v tvář genomové fluidity se zdá, že typické genotypové a fenotypové charakteristiky taxonu jsou stále zachovány a jsou dostatečné pro spolehlivou klasifikaci a identifikaci Bacteria a Archea. Existuje mnoho dobře definovaných genotypových klastrů, které jsou shodné se známými druhy vymezenými

polyfázickými přístupy. Srovnávací sekvenční analýza určitých jadrových genů, včetně genů rRNA, může být užitečná pro charakterizaci vyšších taxonů, zatímco různé znakové geny mohou být vhodné jako fylogenetické markery pro vymezení nižších taxonů. I přesto zde může být ještě několik organismů, které uniknou spolehlivé klasifikaci (Schleifer, 2009).

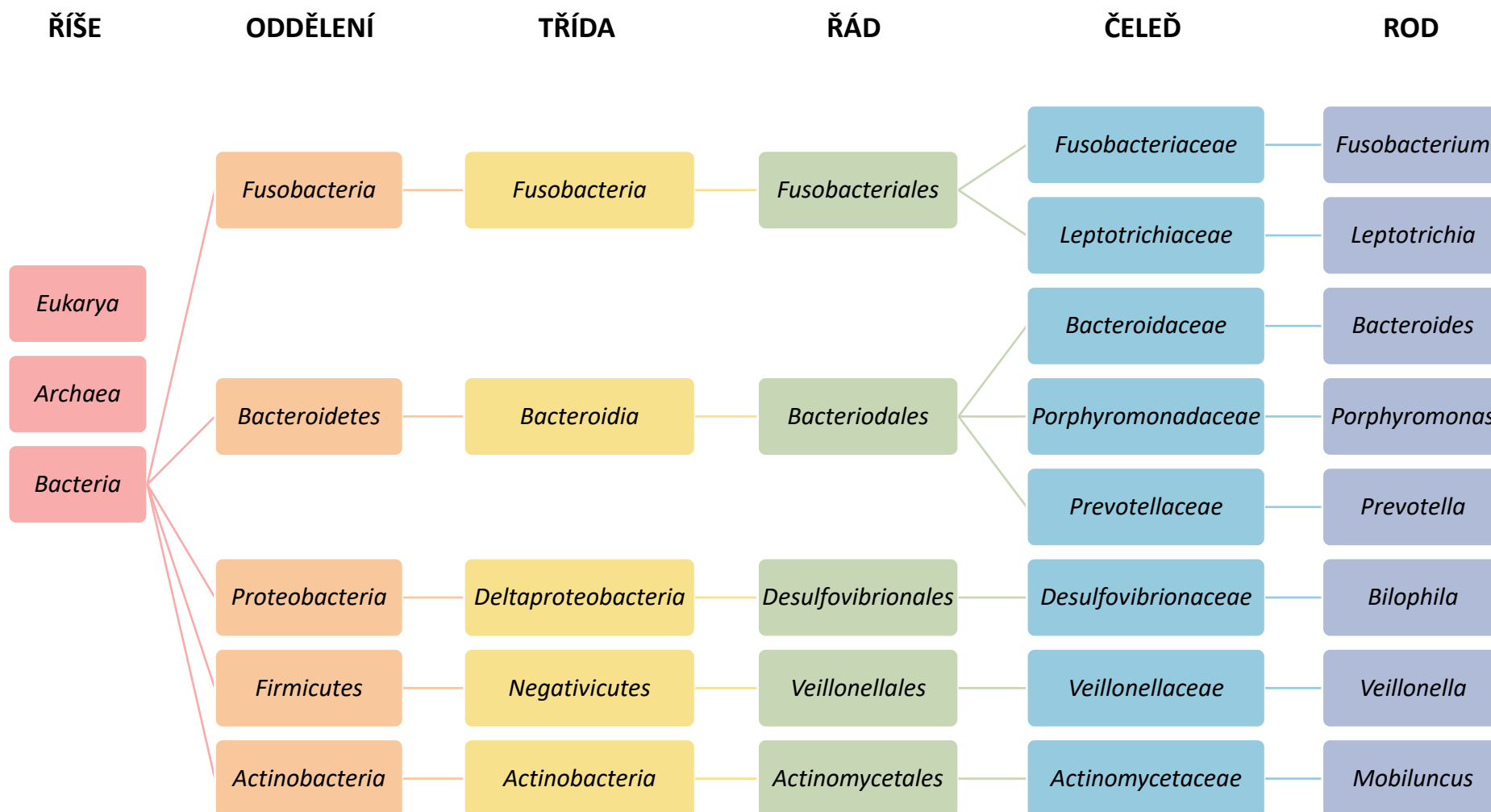
1.3 Fylogenetický strom

Fylogenetický strom nebo evoluční strom je rozvětvený diagram znázorňující evoluční vztahy mezi různými biologickými druhy nebo jinými entitami, jejich fylogenezí založenou na podobnostech a rozdílech v jejich fyzických nebo genetických charakteristikách. Všechn život na Zemi je součástí jediného fylogenetického stromu, což naznačuje společné předky. Taxonomie, jak ji známe dnes, byla poprvé popsána Carlem Linneusem v roce 1758 jako Systema Naturae („Systém přírody“). Hierarchie biologického uspořádání je zobrazena na **Obrázku 1**.

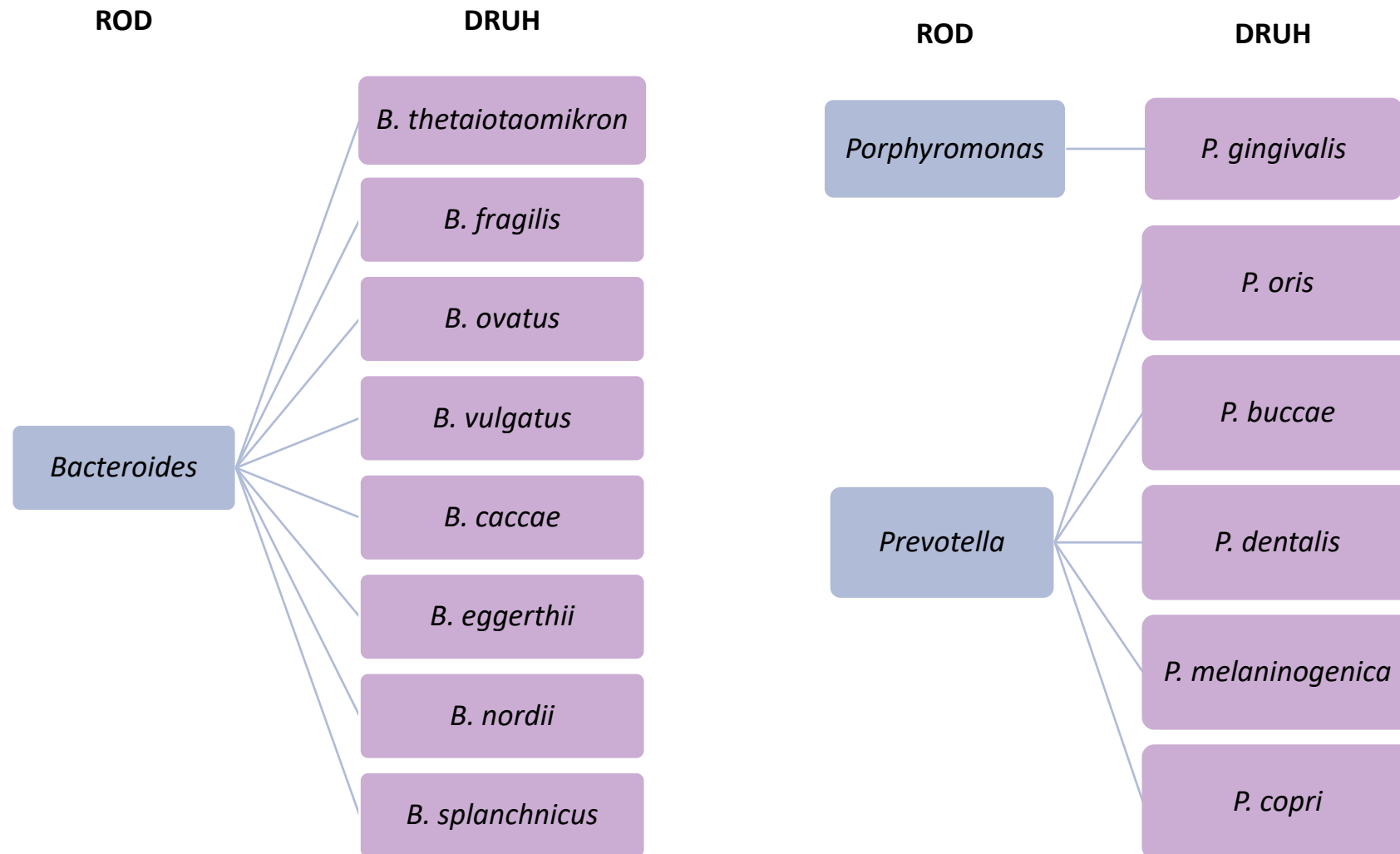


Obrázek 1: Hierarchie biologické klasifikace dle Carla Linneausa (převzato z theconversation.com)

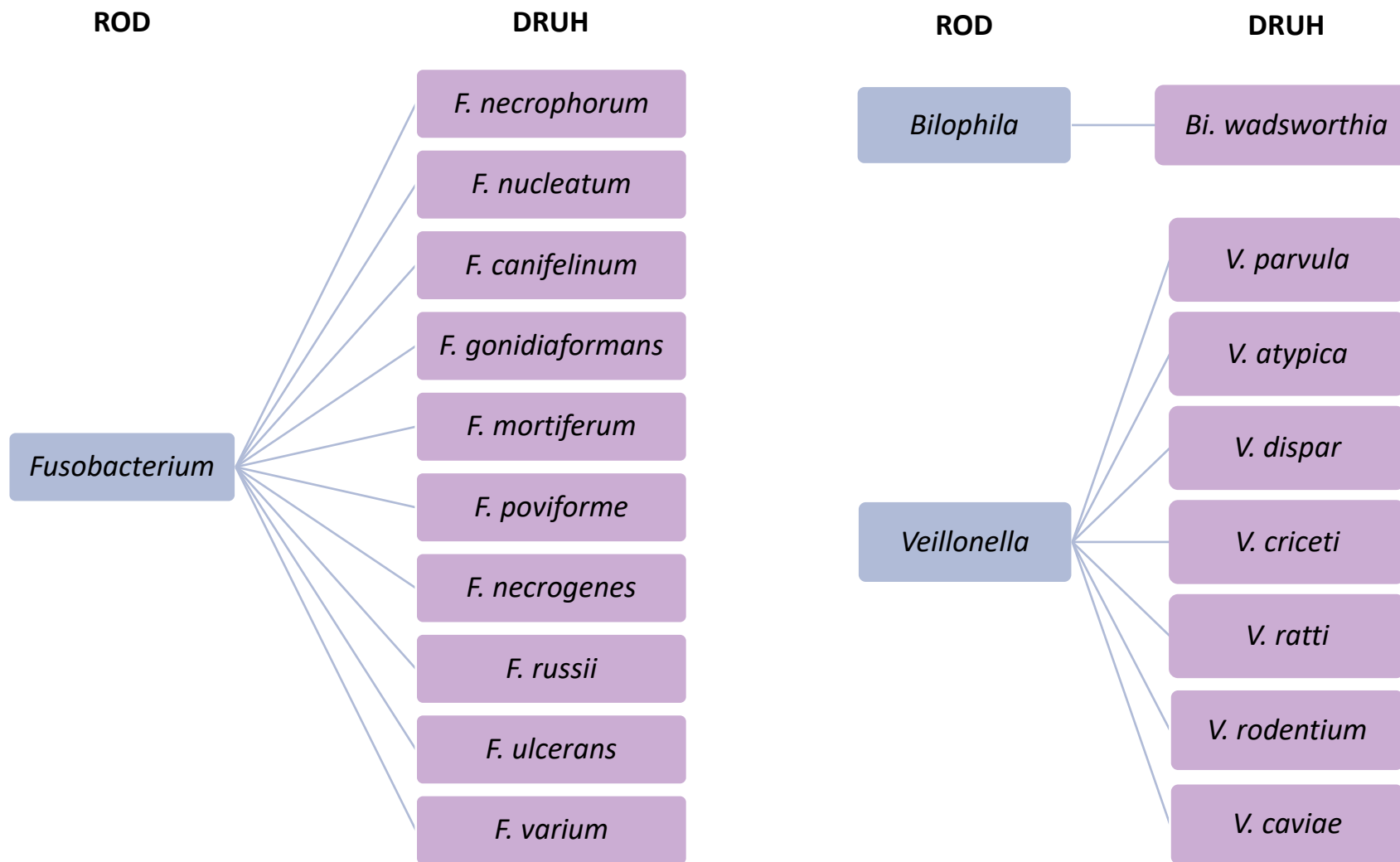
Jako grafická reprezentace taxonomického zařazení slouží fylogenetický strom. V této kapitole bude omezen pouze na gramnegativní anaeroby, které jsou předmětem této bakalářské práce. Následující stromy jsou zpracovány na základě dat z NCBI (NCBI, 2018).



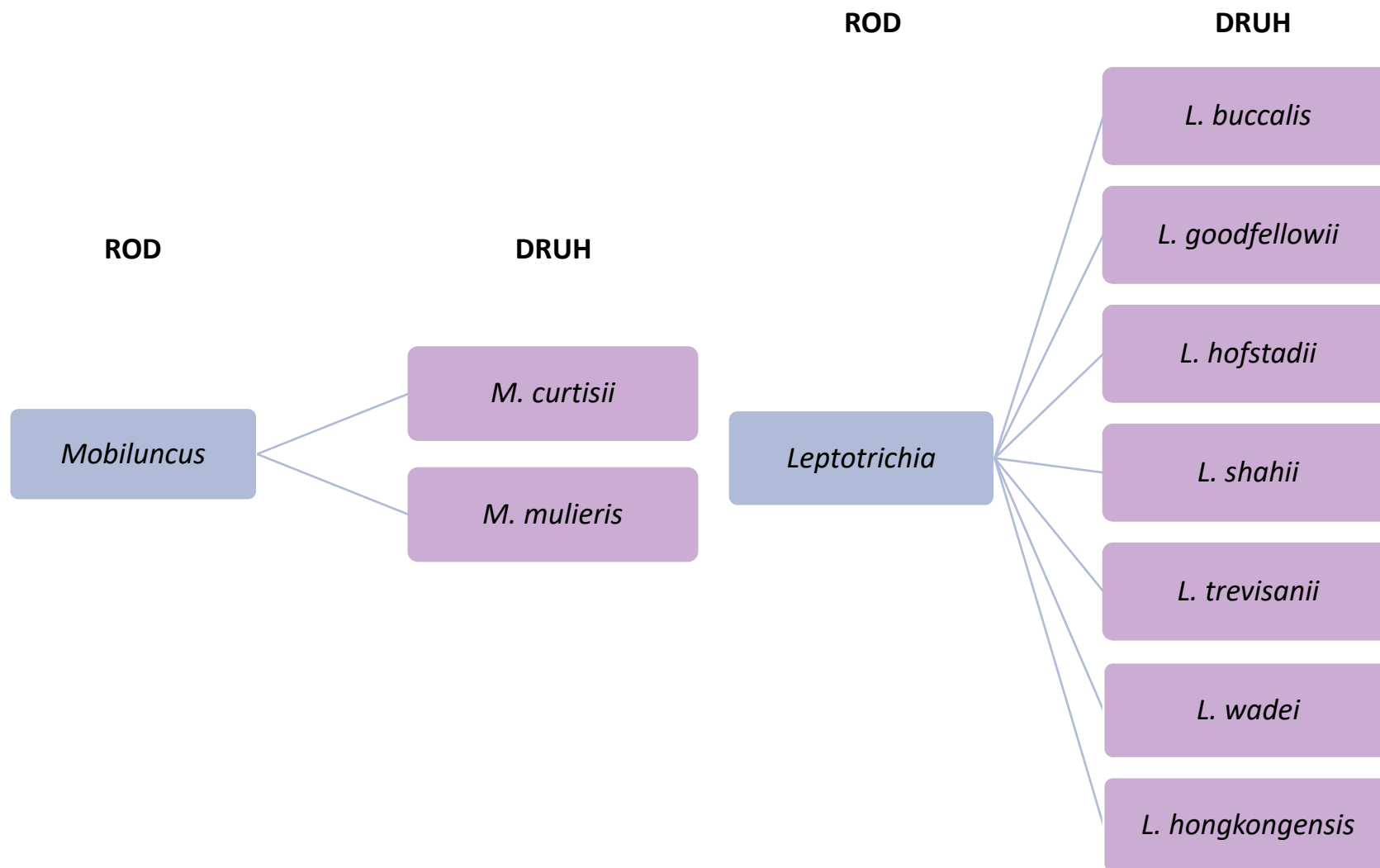
Obrázek 2: Taxonomické zařazení vybraných rodů do jednotlivých taxonů (NCBI, 2018)



Obrázek 3: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů *Bacteroides*, *Porphyromonas* a *Prevotella* (NCBI, 2018)



Obrázek 4: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů *Fusobacterium*, *Bilophila* a *Veillonella* (NCBI, 2018)



Obrázek 5: Taxonomické zařazení jednotlivých druhů z rodů *Mobiluncus* a *Leptotrichia* (NCBI, 2018)

2 G – anaerobní MO vyskytující se v chronických ranách

Anaerobní bakterie jsou jakékoliv mikroorganismy, které nevyžadují k svému růstu kyslík, jelikož je pro ně toxický. Z tohoto důvodu jsou tyto mikroby náročné na kultivaci a obtížně izolovatelné. Jejich kultivace vyžaduje správné metody sběru, přepravy a pěstování. Infekce způsobené anaerobními bakteriemi jsou běžné, a jejich výskyt je stále častější a zmíněné bakterie mohou způsobovat vážné až život ohrožující onemocnění (Brook, 2017).

Ve skutečnosti jsou anaerobní MO přirozenou složkou normální lidské flóry, kde mnoho anaerobních gramnegativních bakteriálních druhů nalezneme v ústech, horních cestách dýchacích, střevním a urogenitálním traktu (Falagas, 2000).

Chronické rány vznikají tam, kde dochází k narušení normálního procesu hojení. Rány, které nedosáhly pokroku za čtyři až osm týdnů jsou obecně pokládány za chronické. Venózní a arteriální bércové, tlakové a kožní vředy a diabetická noha jsou příklady chronických ran (Izadi, 2005). Nehojící rány způsobují obzvláště závažné zdravotní problémy, hlavně starším osobám (Harding, 2002). Patologické faktory, které brání procesu hojení, a zároveň přispívají k vývoji nehojících se ran, jsou rozděleny na lokální faktory, jako například vaskulární zásobenění či hypoxie, systémové a infekční faktory. Mezi infekční faktory řadíme také gramnegativní anaerobní mikroorganismy, které se v nehojících ranách vyskytují (Jaul, 2009). Nejčastěji vyskytující se bakterie jsou z rodu *Bacteriodes*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Bilophila*, *Veillonella*, *Mobiluncus* a *Leptotrichia*.

Obecně platí, že léčba infekcí způsobených anaerobními bakteriemi je založena na dvou zásadách, a to modifikaci prostředí ke zpomalení proliferace mikrobů a použití vhodných antimikrobiálních látek. Anaerobní bakterie způsobují významnou destrukci tkáně, čímž dochází ke vzniku abscesů, což je důležitým parametrem, který je třeba vzít v úvahu při rozhodování o správné léčbě. Modifikace místních stavů lze dosáhnout chirurgickým odstraněním, odvodněním a odstraněním obstrukce a dekompresí edematózní tkáně (Bartlett, 1982).

Nebylo dosaženo shody ohledně specifických antimikrobiálních látek, dávkování a trvání léčby anaerobních infekcí v různých lokalitách. Vzhledem k nedostatku schválených metod testování antimikrobiální citlivosti gramnegativních anaerobních MO je výběr antibiotik založen na znalosti patogenů, jejich citlivosti na antimikrobiální látky, farmakokinetických

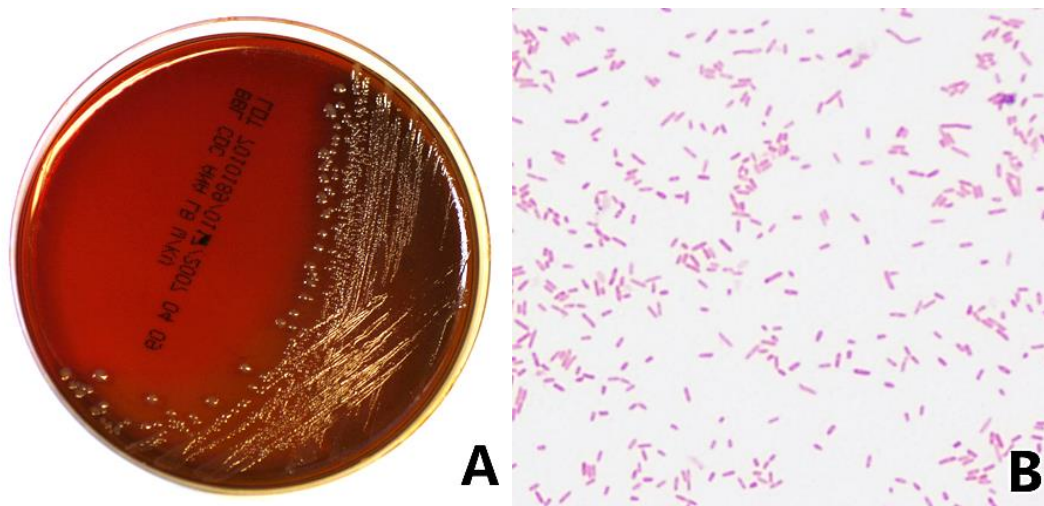
vlastnostech, včetně penetrace v určitých oblastech, toxicitě, dopadu na normální flóru a vynaložení potřebných nákladů.

Aby bylo dosaženo uspokojivých hladin léků v abscesech a ve špatně perfundovaných nebo nekrotických tkáních, doporučují se nejvyšší bezpečné dávky po delší dobu spolu se správnou chirurgickou léčbou. Obecně by měly být vybrány antibiotika s dobrými farmakokinetickými vlastnostmi v prostředí s nízkým pH a napětím kyslíku a se širokou účinností proti anaerobním bakteriím. Mezi takové látky patří klindamycin, karbapenemy, kombinace β -laktamů a metronidazol, který je preferovaným antibiotikem v případě bakteriémie způsobené druhy *Bacteroides*, *Prevotella* nebo *Porphyromonas* (Falagas, 2000) .

2.1 *Bacteroides*

Mikroorganizmy rodu *Bacteroides* patří do čeledě *Bacteroidaceae* (NCBI, 2018). Do rodu *Bacteroides* bylo původně zařazeno velké množství druhů. Rod byl rozdělen nejen na základě vlastností, ale hlavně díky analýze DNA. Rod *Bacteroides* zahrnuje striktně anaerobní gramnegativní (viz **Obrázek 6B**) nepohyblivé nesporulující bakterie, které produkují H₂S. Nejvýznamnějšími a nejčastěji izolovanými patogeny tohoto rodu jsou druhy *Bacteroides thetaiotaomikron* a *Bacteroides fragilis*. (Votava, 2003).

Dále do této skupiny patří *Bacteroides ovatus*, *B. vulgatus*, *Bacteroides spp.*, *Bacteroides caccae*, *Bacteroides eggerthii*, *Bacteroides nordii* a *Bacteroides splanchnicus*. Organismy jsou nehemolytické, rostou v šedivých koloniích, které mohou vytvářet viditelné koncentrické pásy (viz **Obrázek 6A**). Ze všech anaerobních bakterií je *Bacteroides* nejčastěji izolovaným patogenem z klinických vzorků, včetně krve. Všechny výše zmíněné druhy nalezneme na povrchu sliznic a dosahují velmi vysokých koncentrací v zubním plaku, gingiválních štěpech, v tlustém střevě a v pochvě (Falagas, 2000).



Obrázek 6: *B. fragilis* A-na Brucella agarů, B-obarven dle Grama při 37°C, 24-48h, 5-10% CO₂ (Partners Healthcare System, 2013)

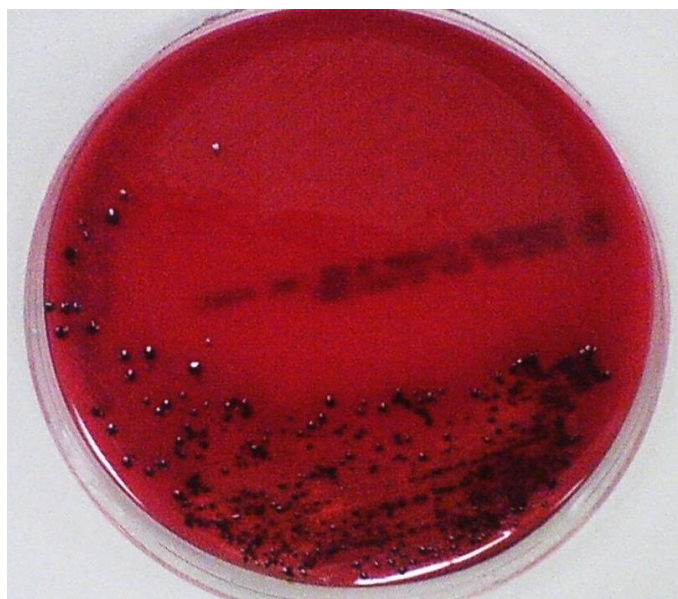
Bacteroides mohou způsobit mnoho onemocnění. Tyto bakterie jsou běžně izolovány od pacientů s intraabnormálními infekcemi (převážně *Bacteroides fragilis*), kožními vředy, paradentózou, endokarditidou, zánětlivými onemocněními pánve a hnisavými tromboflebitidami, některá onemocnění mohou být dokonce smrtelná (Falagas, 2000). Infekce se může vyskytnout jako důsledek traumatu, který mohl být zapříčiněn kousnutím od zvířete, popálením nebo říznutím (Kenneth J. Ryan, 2004). V podstatě všechny infekce vyvolané rodem *Bacteroides* jsou způsobené bakteriálními kmeny přítomnými v těle pacienta před zahájením patofyziologického procesu, který vede ke klinické infekci. V posledních letech bylo zaznamenáno snížení podílu případů bakteriemií způsobených anaerobními bakteriemi, včetně MO rodu *Bacteroides*, a to díky rozšířenému používání antimikrobiálních látek s dobrou anaerobní aktivitou, zlepšení chirurgické profylaxe. Avšak *Bacteroides fragilis* zůstává nejčastější příčinou anaerobní bakteriémie a má vysokou úmrtnost (Falagas, 2000).

U rodu *Bacteroides* je důležitým mechanismem antimikrobiální rezistence produkce β -laktamáz, díky které vykazují rezistenci vůči antibiotikům (Mikamo, 2011). Použitím inhibitorů β -laktamáz a β -laktamu bylo dosaženo překonání rezistence těchto MO (Kenneth J. Ryan, 2004). Odolnost proti antibiotikům je stále častěji pozorována u penicilinu, ampicilinu, cefalotinu, tetracyklinu, piperacilinu, chloramfenikolu, kanamycinu, kolistinu, rifampicinu, vankomycinu a aminoglykosidů (Toprak, 2005). Rezistence na tetracyklin v anaerobních bakteriích je způsobena zablokováním absorpce antibiotik. Antimikrobiální činidla účinná proti více než 99 % klinických izolátů rodu *Bacteroides* jsou chloramfenikol, klindamycin, metronidazol a karbapenemy, kde neenzymatická změna cílového místa je obvyklým

mechanismem rezistence anaerobních bakterií na klindamycin a velmi vzácná rezistence vůči metronidazolu je přisuzována snížení absorpce antibiotika a snížení nitroredukce sloučenin (Nagy, 2015).

2.2 *Porphyromonas*

Porphyromonas patří do čeledě *Porphyromonadaceae* (NCBI, 2018). Členové druhu *P. gingivalis* jsou nepohyblivé nesporulující striktně anaerobní kokobacily, patřící mezi MO neschopné metabolizovat sacharidy v nepřítomnosti kyslíku, které musí spoléhat na jiné zdroje uhlíku pro svou energii (Votava, 2003). Při pěstování na krevním agaru jsou kolonie zpočátku bílé, krémově zbarvené. Po čase (čtyři až osm dnů) tyto kolonie tmavnou od okraje směrem ke středu, jejich barva je tmavě červená až černá (viz **Obrázek 7**) a koreluje s koncentrací protohemu (komplexní červený organický pigment obsahující železo a další atomy, na které se váže kyslík).



Obrázek 7: *P. gingivalis* na krevním agaru při 37°C, 24-48h, 5-10% CO₂ (How, 2016)

Druhy produkují velký počet enzymů a bílkovin a jejich konečné produkty metabolismu jsou účinné proti širokému spektru hostitelských proteinů a poškozují obranyschopnost hostitele. Tyto posledně zmiňované sloučeniny zahrnují inhibitory proteáz, imunoglobuliny, bílkoviny obsahující železo, baktericidní proteiny, proteiny extracelulární matrice a proteiny úzce spojené s fagocytární funkcí, jako je fixace komplementu a koagulace (Potempa, 1995). Zatímco mnoho potenciálně jedinečných enzymů je buňkou asociováno nebo vylučováno, studie používající molekulární a imunologické postupy ukázaly, že většina enzymatické

aktivita je způsobena produkcí cysteinových proteáz. Metabolická schopnost *P.gingivalis* vylučovat tyto cysteinové proteázy v hostiteli poskytuje velké výhody pro jejich přežití a růst, včetně schopnosti používat proteiny hostitele pro svůj růst a metabolismus (Holt, 1999).

Některé druhy rodu *Porphyromonas* zahrnují infekce parodontu a kořenového kanálku, stejně jako jiných orofaryngeálních infekcí. Dále jsou bakterie tohoto rodu běžně izolovány od pacientů s infekcemi měkkých tkání, infekcemi souvisejícími s aspirací nebo mozkovými abscesy. Asi 20 % druhů *Porphyromonas* produkuje β -laktamázu, u které bylo prokázáno, že hraje hlavní roli v rezistenci na β -laktam u anaerobních gramnegativních bakterií (Falagas, 2000).

2.3 *Prevotella*

Rod *Prevotella* řadíme do čeledě *Prevotellaceae* (NCBI, 2018). Příbuzný rodu *Bacteroides*, *Prevotella*, jsou fermentující anaerobní gramnegativní bakterie (SHAH, 1990). Nejčastěji detekované druhy jsou *Prevotella oris*, *Prevotella buccae*, *Prevotella dentalis*, *Prevotella melaninogenica* a *Prevotella copri*. *Prevotella spp.* na krevním agaru je zobrazena na **Obrázku 8**. Bakterie rodu *Prevotella* jsou součástí orální, střevní a urogenitální flóry. Tyto bakterie mohou způsobit infekce dýchacích cest, zejména aspirační pneumonii, plicní absces, plicní empyém a chronické záněty středního ucha a sinusitidu (Votava, 2003). Bakterie byly izolovány z abscesů a popálenin v blízkosti úst, po kousnutí, při infekcích močových cest, z mozkových a parodontálních abscesů (Scher, 2013). Dále byly bakterie rodu *Prevotella* izolovány z klinických vzorků žen s infekcemi genitálního traktu, včetně zánětlivých onemocnění pánve, endometritid a infekcí ran, které vznikly jako komplikace při porodnických postupech nebo gynekologických operacích (Falagas, 2000).

Prevotella copri koreluje s nástupem revmatoidní artritidy (Scher, 2013). Revmatoidní artritida (RA) je vysoce rozšířené systémové autoimunitní onemocnění postihující hlavně klouby. RA může vést k chronické deformitě kloubů, postižení způsobujícího částečnou nebo celkovou imobilizaci, v nejhorším případě může vést až ke smrti. Navzdory nedávným pokrokům v porozumění patogenese zůstává etiologie RA nejasná (McInnes, 2011).

Přibližně polovina druhů *Prevotella* je pozitivních na tvorbu β -laktamázy, která je u anaerobních gramnegativních bakterií důležitá z hlediska rezistence na β -laktam (Falagas, 2000).



Obrázek 8: *Prevotella* spp., na krevním agaru při 37°C, 24-48h, 5-10% CO₂ (Gokale, 2010)

2.4 *Fusobacterium*

Bakterie rodu *Fusobacterium* jsou řazeny do čeledě *Fusobacteriaceae* (NCBI, 2018). Rod *Fusobacterium* zahrnuje druhy *F. necrophorum*, *F. nucleatum*, *F. canifelinum*, *F. gonidiaformans*, *F. mortiferum*, *F. poviforme*, *F. necrogenes*, *F. russii*, *F. ulcerans*, *F. varium*. Původně do této čeledi byly zařazeny druhy *Fallow Filipactor*, *Faecalibacterium prausnitzii* a *Eubacterium sulci*. Přirozeně se vyskytují v horních dýchacích cestách, gastrointestinálním a genitálním traktu. Pouze *F. canifelinum* se přirozeně nevyskytuje ve flóře gastrointestinálního traktu, přesto se mohou objevit infekce po kousnutí psem. *Fusobacterium* jsou anaerobní gramnegativní nesporulující bakterie. Tyto bacily se barví nepravidelně, mají protáhlý tvar buňky se zkosenými konci nebo můžou vykazovat známky pleomorfizmu (viz **Obrázek 9**) (Pathogen Regulation Directorate, 2010).



Obrázek 9: *F. nucleatum* obarven dle Grama (Miller, 2017)

Kyselina máselná je primárním produktem metabolismu rodu *Fusobacterium*. Nejčastěji bývá detekován druh *F. nucleatum*, který způsobuje například plicní abscesy, nekrotizující a aspirační pneumonie, jaterní abscesy, septické artritidy, chronické sinusitidy a jiné. Dělení *F. nucleatum* na poddruhy není důležité pro diagnostiku, avšak u *F. necrophorum* je tato bližší specifikace ve smyslu dělení na poddruhy opodstatněna. Dělí se na *F. necrophorum* a *F. funduliforme*. Tento druh může být původcem závažných onemocnění, zejména rozličných tkáňových lézí a jaterních abscesů (Votava, 2003).

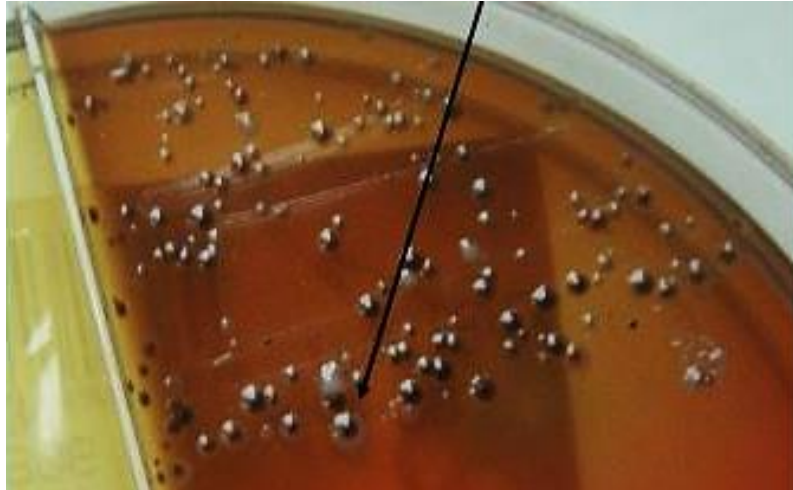
Léčba infekcí způsobených bakterií rodu *Fusobacterium* závisí na místě zánětu. Může být provedena chirurgická drenáž nebo léčba vhodnými antibiotiky. Metronidazol, piperacilin, tazobaktam, tikarcilin, klavulanát, amoxicilin, sulbaktam, ampicilin, sulbaktam, ertapenem, imipenem, meropenem, klindamycin a cefoxitin se terapeuticky používají k léčbě infekcí spojených s touto bakterií (Riordan, 2007). *Fusobacterium* může být rezistentní na penicilin a má rozšířené spektrum rezistence na erythromycin a další makrolidy (Nagy, 2015). Pokud je zjištěna infekce způsobená *F. nucleatum* nebo *F. necrophorum*, léčba by měla být zahájena okamžitě, protože tyto dva druhy jsou spojeny s úmrtím v důsledku těžkých případů Lemierrovy nemoci (Riordan, 2007).

Lemierův syndrom je život ohrožující septikemické (invaze a přetrvávání patogenních bakterií ve shlukách v krevním řečišti) onemocnění s metastatickými abscesy, sekundární septickou tromboflebitidou vnitřní jugulární (hrdelní) žíly. Nemoc obvykle postihuje dříve zdravé mladé dospělé, kteří nemají identifikován žádný rizikový faktor pro invazivní bakteriální infekci. Onemocnění bylo popsáno jako nezaměnitelné, pokud je přítomen celý rozsah symptomů a příznaků (Aliyu, 2004). Horečka, bolest a otok krku, plicní příznaky a artralgie představují klasické příznaky Lemierrova syndromu (Boothroyd, 2000).

2.5 *Bilophila*

Bilophila se řadí do čeledě *Desulfovibrionaceae* (NCBI, 2018). Přestože lidský gastrointestinální trakt obsahuje malé množství *Bilophila wadsworthia*, řadí se mezi třetí nejběžnější anaerobní bakterii získanou z klinického materiálu, od pacientů z perforovanou nebo gangrenózní apendicitidou. Od svého objevu v roce 1988 byla *Bi. wadsworthia* získána z klinických vzorků spojených s řadou infekcí, včetně sepse, jaterních abscesů, bakteriemií, empyému, perikarditidy, artritidy, cholecystitidy, Fournierovy gangrény, měkkých tkáňových abscesů, osteomyelitidy, apendicitidy, mozkových abscesů, nekrotizující fasciitidy nebo

dekubitu (Feng, 2017). Tento organismus je také přítomen v malém množství v normální střevní flóře (Falagas, 2000). Tato bakterie je gramnegativní, striktně anaerobní, náročná a neschopná rozkládat sacharidy na energii. Dvě klíčové vlastnosti jsou produkce H_2S a silná a rychlá pozitivní katalázová reakce (Feng, 2017). Tyto bakterie vyrůstají na agaru jako malé a průsvitné kolonie (viz **Obrázek 10**).

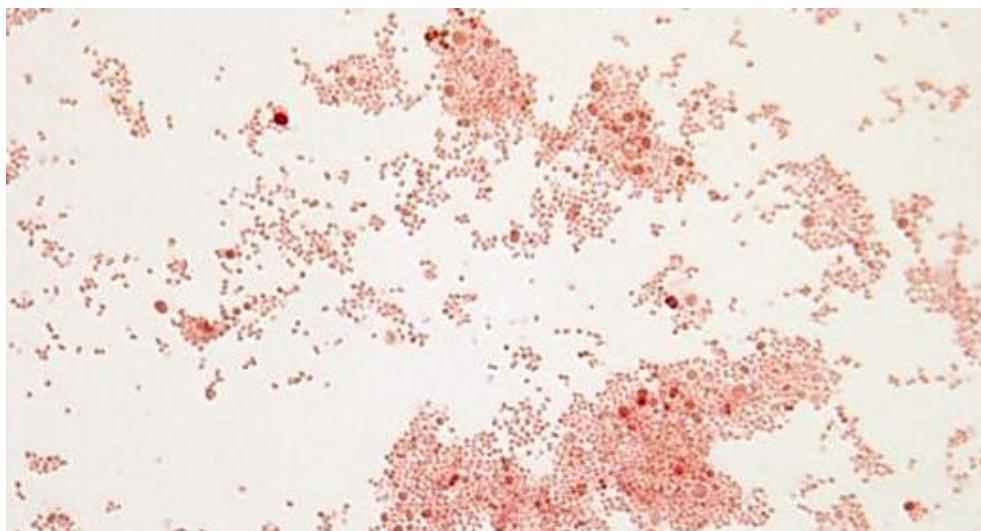


Obrázek 10: *Bilophila wadsworthia* na BBE agarů při 35°C, 18-24h, 5-10% (LabCE, 2017)

Většina druhů je pozitivní na ureázu a negativní na indol. Obecně netvoří β -laktamázy, pokud se pěstují na médiích obsahujících pyruvát, tak její produkci vykazuje více jak 85 % druhů. Fylogenetické studie rRNA ukazují, že *Bilophila* je homogenní druh, nejvíce příbuzný druhům *Desulfovibrio*. Byla pozorována jak adherence k lidským buňkám, tak k endotoxinu, a předběžná práce naznačuje, že elementární železo hraje roli u projevu proteinů vnější membrány. Druhy *Bilophila* jsou inhibovány *in vitro* většinou antibiotik (Baron, 1997).

2.6 *Veillonella*

Čeď, pod kterou spadá *Veillonella* se jmenuje *Veillonellaceae* (NCBI, 2018). Bakterie rodu *Veillonella* jsou striktně anaerobní nepohyblivé malé kulovité gramnegativní koky, které se objevují jako dvojice nebo tvoří krátké řetězky (viz **Obrázek 11**).



Obrázek 11: *Veillonella* obarvena dle Grama (LabCE, 2017)

Tyto bakterie jsou dále charakterizovány tím, že nejsou schopné fermentovat glukózu ani jiné sacharidy a neprodukují ani indol ani oxidázu. Na rozdíl od toho produkují H_2S a redukují dusičnany. Propionová a octová kyselina, CO_2 a H_2 jsou produkovány z laktátu během růstu bakterií. Kyseliny pyrohroznová, oxaloctová, jablečná, fumarová a jantarová jsou metabolizovány „resting cells“ (buňka, která není v procesu dělení aktivní), ale citronové, izocitronové a malonové kyseliny metabolizovány nejsou (Washio, 2014).

Do tohoto rodu patří *V. parvula*, *V. atypica*, *V. dispar*, *V. criceti*, *V. ratti*, *V. rodentium* a *V. caviae*. V současné době je identifikace *Veillonella* na úrovni rodu relativně přímočará, zatímco identifikace na úrovni druhů zůstává kvůli nedostatku konvenčních fenotypových a biochemických diskriminačních testů nejistá a nepřehledná. Proto molekulární metody založené na sekvencích 16S rDNA jsou stále více využívány k identifikaci. Tyto metody byly kritizovány kvůli nízké rozmanitosti sekvence u některých druhů. *V. atypica*, *V. dispar* a *V. parvula* se nachází hlavně v lidské flóře nebo v klinických vzorcích odebraných během infekčních procesů. Ostatní čtyři druhy byly nalezeny pouze u zvířat, s výjimkou jednoho izolátu, *V. ratti*, který byl izolován z lidského spermatu a identifikován po sekvenování 16S rDNA. Tři druhy vykazovaly citlivost na kanamycin, metronidazol, vankomycin a kolistin (Jumas-Bilak, 2004).

2.7 Mobiluncus

Čeď *Actinomycetaceae* zahrnuje bakterie rodu *Mobiluncus* (NCBI, 2018). Členové rodu jsou mikroorganizmy spojené s bakteriální vaginózou, syndromem dříve známým jako

„nespecifická vaginitida“. Tato infekce postrádá typické příznaky zánětu, přičemž v populaci vaginálních bakterií existuje radikální změna. Chybí přirozeně se vyskytující bakterie rodu *Lactobacillus*, které jsou nahrazeny anaerobními druhy včetně *Mobiluncus spp.* Bakteriální vaginóza je také spojena s endometritidou, salpingitidou, recidivujícími infekcemi močových cest, chorioamnionitidou a porodními a postnatálními komplikacemi. Navíc nitrosaminy produkované anaerobními bakteriemi jsou považovány za potenciální karcinogeny (Gatti, 2000). V malém množství byly identifikovány i v chronických ranách (Martin, 2010). *Mobiluncus spp.* jsou gramnegativní (nebo gramvariabilní) anaerobní, ve tvaru zakřivené čárky se zkosenými konci, které používají k pohybu. Rod *Mobiluncus* zahrnuje dva druhy: *Mobiluncus curtisii* a *Mobiluncus mulieris* (Gatti, 2000). Zástupci rodu *Mobiluncus* jsou citlivé na metronidazol a fermentují ribózu a xylózu. Jejich růst je na tekutých médiích značně horší a pomalejší než na pevných médiích (Meltzer, 2008).

2.8 *Leptotrichia*

Leptotrichia je jeden ze čtyř rodů v čeledi *Leptotrichiaceae* (NCBI, 2018). Popis *Leptotrichiaceae* je založen na fylogenetické analýze sekvencí 16S rRNA genu (Guerrero-Preston, 2016). Druhy *Leptotrichia* jsou anaerobní (ačkoli existují určité důkazy o aerotoleranci) gramnegativní (některé druhy jsou gramlabilní) tyčinky, které obývají ústní dutinu, střeva a urogenitální systém. Jsou nepohyblivé, fermentují sacharidy a produkují kyselinu mléčnou jako svůj hlavní konečný metabolický produkt. Některé druhy jsou náročné a vyžadují pro růst krev nebo sérum. *L. buccalis* (viz **Obrázek 12**) byl po staletí jediným známým druhem *Leptotrichia*, ale nyní byly formálně přijaty nové druhy, mezi něž patří *L. goodfellowii*, *L. hofstadii*, *L. shahii*, *L. trevisanii*, *L. wadei* a *L. hongkongensis* (Eribe, 2008).



Obrázek 12: Kolonie *L. buccalis* na krevním agaru při 37°C, 24-48h, 5-10% CO₂ (Cho, 2017)

Stejně jako u ostatních členů orální kompenzační mikroflóry jsou druhy *Leptotrichia* také spojeny s periodontálními chorobami a abscesy ústní dutiny a patří mezi typicky oportunní patogeny. Byla však také popsána izolace druhů *Leptotrichia* od pacientů s nekrotizující vředovou gingivitidou, Vincentovou anginou, bakteriální vaginózou, neutropenií, virem HIV, leukémií, infekční endokarditidou s normálně fungujícím imunitním systémem a s mnoha dalšími chorobami. Druhy *Leptotrichia* mohou způsobit bakteriémie (Eribe, 2017).

3 Detekce a identifikace MO

Identifikace bakterií je obecně založena na konvekčních fenotypových metodách zahrnujících kultivaci a růst modelových kolonií na specifických médiích a morfologické biochemické vlastnosti. Testy mohou být těžko interpretovány a vyžadují odborný personál. Dále se využívají molekulární metody pro mikrobiální identifikaci, jako je PCR, sekvenční nebo mikroskopické analýzy. Tyto metody však neposkytují kompletní řešení při rutinních bakteriálních identifikacích. Další možností je mikrobiální stanovení založené na druhově specifických spektrech peptidů a proteinů pomocí hmotnostní spektrometrie. V posledních letech je nejvíce využívanou metodou hmotnostní spektrometrie s detekcí matrixovou laserovou desorpční ionizací (MALDI-TOF MS), což je rychlá, přesná a snadno proveditelná metoda pro identifikaci mikroorganismů (Van Veen, 2010).

V mikrobiologické laboratoři hraje identifikace bakterií klíčovou roli při poskytování informací o infekcích. Hlavní patogeny nebo skupiny mikroorganismů, které musí mikrobiologická laboratoř rutinně detekovat a hlásit jsou pigmentované gramnegativní anaeroby (*Prevotella* a *Porphyromonas spp.*), nepigmentované gramnegativní anaeroby (primárně *Bacteroides*, *Prevotella* a *Fusobacterium spp.*) a další.

Zavedení mikroorganismů do dříve sterilního místa, jako je rána, se označuje jako infekce. Druhy, které jsou schopné přežít, se aktivně množí a kolonizují tak ránu. Kolonizace nemusí vždy vést k infekci. To, které z kolonizačních bakteriálních druhů se nakonec objeví jako skutečný původce infekce, závisí na jejich virulenci, relativních počtech a na selektivních faktorech, jako je prostředí v ráně a antibiotika. Bakteriální flóra otevřené rány je zřídka statická; obvykle se mění, objevují se nové organizmy v ranách a staré mizí. Tyto patogeny způsobují opožděné hojení a infekce (Bowler, 2001).

Odběr vzorků vyžaduje speciálně prováděné klinické techniky, tak aby byl vyhodnocen co nejlepší laboratorní nález. Z tohoto důvodu je nutné dodržovat určité zásady, mezi které patří použití sterilních nástrojů pro odběr, u anaerobů je nejlepší použít injekční stříkačku, tak aby kyslík neměl přístup ke vzorku, popřípadě ho okamžitě odstranit, protože především nesporulující anaeroby na vzduchu nepřežijí. Vzorku musí být odebráno dostatečné množství, jelikož malé množství nemusí zajistit přítomnost patogenů. Poté musí být vzorek co nejrychleji transportován do laboratoře. Pro anaeroby je nejsnadnější jehlu obsahující vzorek zabodnout

do gumové zátky. Všechny vzorky musí být označené štítkem s údaji (Borgan, 1983; Julák, 2003).

Bakteriální identifikace a veškeré typizační postupy (biochemické, fyziologické atd.) jsou taxonomickými klasifikacemi na úrovni druhu či poddruhu.

3.1 Kultivace na půdách

Anaerobní mikroorganismy potřebují zvláštní podmínky pro kultivaci, a proto existuje řada postupů pro snížení obsahu O₂ v médiích. Některé metody jsou jednoduché, ty jsou především vhodné pro méně citlivé organismy, jiné jsou složitější, ale právě ty jsou nezbytné pro růst přísných anaerobů.

3.1.1 Anaerobní agar

Tento agar je medium pro kultivaci anaerobních mikroorganismů bez potřeby anaerobní nádoby, jelikož používá speciálně navržené Brewerove misky s hermetickým uzávěrem. Jedná se o neselektivní médium. Anaerobní agary se doporučují pro pěstování anaerobních bakterií z klinických a neklinických vzorků. pH agaru je $7,2 \pm 0,2$ při 25 ° C. Obsahuje thioglykolát sodný a formaldehydsulfoxylát sodný, poskytující díky svým redukčním schopnostem adekvátní anaerobiózu indikovanou methylenovou modří přítomnou v médiu, která poskytuje modré zabarvení média. Trypton a dextróza poskytují základní živiny, a to konkrétně dusík, vitaminy, aminokyseliny (trypton) a uhlík (dextróza), zatímco chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu. Nejlepší výsledky jsou dosaženy za použití pórovitých desek (HiMedia Laboratories, 2018). Tento agar má nízký oxidačně-redukční potenciál. Anaerobní agar je modifikací původní Brewerovho agaru (HiMedia Laboratories, 2018).

3.1.2 Žloutkový agar

Žloutkový agar se značí zkratkou EYA z anglického egg yolk agar. EYA je obohacené, neselektivní a diferenciální médium doporučené pro použití při detekci produkce enzymů lecithinázy, lipázy a proteolytické aktivity některých obligátních anaerobů a při předpokládané identifikaci rodu *Fusobacterium* a *Prevotella spp.* EYA je médium doplněné suspenzí vaječného žloutku a obohaceno heminem a vitaminem K. Vaječný žloutek dodává lecitin a volné tuky, substráty potřebné k detekci lecithinázy a lipázy díky proteolytické aktivitě. Hemin

a vitamín K jsou součástí média, aby zvýšily růst striktních anaerobních mikroorganismů (Tille, 2017).

Mikroorganismy, které mají enzym lecithinázu, rozkládají lecitin na nerozpustný diglycerid a fosforylcholin. Nerozpustný diglycerid vytváří bílou neprůhlednou zónu, která se rozprostírá kolem kolonie. Lipáza hydrolyzuje volné tuky na glycerol a volné mastné kyseliny. Nerozpustné volné mastné kyseliny vedou k tvorbě lesku (jako u oleje ve vodě), které lze vidět, když je deska držena pod úhlem vůči světelnému zdroji. Ve srovnání s lecithinázou lipáza nedifunduje a produkuje reakci pouze na povrchu agarů v bezprostřední blízkosti kolonie. Proteolýza je zaznamenána vývojem čirých zón v prostředí kolem kolonie (Tille, 2017).

3.1.3 Glukózový agar s kvasničným extraktem

Peptonový kvasničný bujón s glukózovým extraktem (PYG) je obohacené, neselektivní médium určené ke kultivaci a biochemické identifikaci striktně anaerobních mikroorganismů a bakterií identifikovaných plynovo-kapalinovou chromatografií (GLC) využívající analýzy mastných kyselin s krátkými řetězci, které byly získané fermentací glukózy. PYG usnadňuje obnovení náročných mikroorganismů jako je *Prevotella*, *Porphyromonas* a *Bacteroides*. Médium může být použito pro uchování anaerobních izolátů nebo pro chromatografické analýzy metabolických produktů získaných fermentací glukózy (Tille, 2017).

PYG obsahuje kvasničný extrakt, který poskytuje dusíkaté sloučeniny a vitamin B potřebný pro růst; dále L-cystein, který je redukčním činidlem stimulující růst anaerobních mikroorganismů; glukózu, která je zdrojem energie a růstové faktory hemin a vitamin K, které jsou potřebné pro růst mnohých náročných anaerobů a k produkci pigmentu u některých druhů bakterií. Sodné, draselné, vápenaté a hořečnaté soli slouží jako stabilizátory pH, které pomáhají udržovat osmotickou rovnováhu a poskytují ionty využívané při transportu (Tille, 2017).

3.1.4 Krevní agar s ovčí krví, kanamycinem a vancomycinem

Tento agar je známý pod zkratkou LKV z anglického laked blood with kanamycin and vancomycin agar. LKV agar z ovčí krve s kanamycinem a vancomycinem se doporučuje pro selektivní izolaci a částečnou identifikaci obligátních anaerobních gramnegativních bacilů, jako je *Prevotella spp.* a *Bacteroides spp.*, a také pro organismy rezistentní na kanamycin. Brucellový agar je základem pro agar LKV. Dextróza, peptony, kvasničný extrakt, hemin, vitamin K a ovčí krev patří mezi živiny obsažené v tomto médiu. Glukóza slouží jako zdroj

energie; peptony poskytují dusíkaté sloučeniny a kvasničný extrakt dodává vitamin B. Chlorid sodný je začleněn do média, aby poskytoval základní elektrolyty. Přidá se disulfid sodný, redukční látka, která pomáhá udržovat nízké pH. Růstové faktory vyžadované některými anaerobními bakteriemi jsou poskytovány ovčí krví. Hemin a vitamín K zlepšují růst druhů *Bacteroides* a usnadňují regeneraci a dřívější tvorbu pigmentů *Prevotella spp.* Vankomycin inhibuje růst grampozitivních mikroorganismů a *Porphyromonas spp.* Kanamycin inhibuje většinu gramnegativních fakultativně anaerobních tyčinek, aerobních a anaerobních gramnegativních tyčinek s výjimkou *Prevotella* a *Bacteroides spp.* (Akhi, 2017)

3.1.5 Lombardův-Dowellův agar

Lombardův-Dowellův agar nebo LD agar slouží pro kultivaci a identifikaci náročných anaerobních bakterií. Agar se používá k hodnocení stupně růstu anaerobů a také k hodnocení indolu a produkce katalázy *Bacteroides* a *Fusobacterium*. Tento agar obsahuje kaseinový enzymatický hydrolyzát, hemin, vitamin K1, L-cystin a kvasničný extrakt. Toto médium obsahuje různé výživné látky, které mohou podporovat růst náročných anaerobních bakterií. Kaseinový enzymatický hydrolyzát a kvasničný extrakt poskytují nezbytné dusíkaté živiny, zatímco hemin a vitamin K1 dodávají další růstové faktory. L-cystin a L-tryptofan slouží jako zdroje aminokyselin. Síran sodný je antioxidantem. Chlorid sodný udržuje osmotickou rovnováhu média. Kataláza pozitivní reakce nemusí být zjevná 30 sekund až 1 minutu po aplikaci 3 % peroxidu vodíku (Votava, 2000).

3.1.6 Wilkins-Chalgrenův agar

Agar dle Wilkins-Chalgrena obsahuje extrakt z kvasnic, který dodává esenciální vitaminy, puriny a pyrimidiny pro zvýšení růstu *Prevotella melaninogenica* a pyruvát sodný pro podporu růstu *Peptostreptococcus anaerobius* a asacharolytických organismů, jako je *Veillonella spp.* Arginin se přidává ke zlepšení růstu *Eubacterium lentum*. Glukóza slouží jako zdroj energie. Hemin a vitamín K podporují růst organismů *Bacteroides fragilis* spolu s *Prevotella melaninogenica*. Chlorid sodný je izotonickým činidlem (Hardy Diagnostics, 1996a). Agar je citlivý na světlo, teplotu, vlhkost a mráz. Používá se také tekutá půda (bujón), která neobsahuje pouze agar jinak má stejné složení.

3.1.7 Schaedlerovo anaerobní medium

Ačkoli je thioglykolát široce používán v anaerobních médiích, kde snižuje redoxní potenciál, aby podpořil růst anaerobních organismů, ale na druhou stranu u některých anaerobů se projevil jako inhibitor. Základem je tryptonsojový bujon. Schaedlerův anaerobní bujon dále obsahuje cystein, proteozový pepton, glukózu, kvasničný extrakt a hemin. Tento bujon slouží ke kultivaci obligátních anaerobů (např. *Bacteroides*) a ke stanovení MIC která určuje citlivost vůči antimikrobiálním látkám. Také se využívá i stejnojmenná pevná půda, která má shodné složení akorát je obohacena o agar. (Votava, 2000).

3.1.8 Žluč-eskulínový agar

Pro žluč-eskulínový agar se používá zkratka BBE z anglického *Bacteroides bile esculin* agar. BBE agar je určen pro rychlou izolaci a identifikaci zejména *Bacteroides fragilis*, ale je využíván i pro *Bacteroides splanchnicus*, *Fusobacterium mortiferum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus sp.* Základní médium se skládá z TSA a je doplněn o 20% žluč (oxgall) stimulující růst *B. fragilis*, zatímco inhibuje ostatních anaeroby; eskulin a citrát amonno-železitý za účelem detekce hydrolýzy eskulinu; hemin slouží jako růstový faktor a umožňuje testování produkci katalázy, gentamycin, který inhibuje většinu fakultativních anaerobů. Původně byl za účelem inhibice růstu většiny fakultativních anaerobů používán kanamycin, ale později byl nahrazen gentamycinem. Ten se ukázal být jeho účinnou náhradou, jelikož neztrácí svou aktivitu při vyšších teplotách inkubace a může být začleněn do agaru BBE před autoklávováním (Tille, 2017).

Skupina *B. fragilis* hydrolyzuje eskulin za vzniku glukózy a eskuletinu. Tato sloučenina reaguje s ionty železa obsaženými v médiu a obarvuje médium kolem kolonií tmavě hnědou až černou barvou. Tudíž tolerance vůči žluči a hydrolýza eskulinu poskytují prostředky k předpokládané identifikaci skupiny *B. fragilis*. Je doporučeno provádět biochemické, imunologické, molekulární testy nebo hmotnostní spektrometrii z čisté kultury pro úplnou identifikaci bakterie (Tille, 2017).

3.2 Biochemické testy

K identifikaci anaerobních bakterií se využívají také jednoduché, rychlé a citlivé biochemické testy na hydrolýzu eskulinu, produkce ureázy, redukci dusičnanů, tvorbu indolu,

hydrolýzu želatiny a test pro měření hydrolýzy *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozidu (ONPG) beta-galaktozidázou. Tyto testy jsou doplňkové a slouží k přesnějšímu zařazení v taxonomii.

3.2.1 Tvorba katalázy

Některé bakterie produkují katalázu, která je odpovědná za rozklad peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Důkaz se provádí na živném agaru, který obsahuje H₂O₂. Přítomnost katalázy se projeví únikem plynu (Votava, 2010).

3.2.2 Hydrolýza eskulinu

Eskulin se hydrolýzou rozkládá na glukózu a eskuletin. Štěpení se projeví hnědým až černým zbarvením půdy, jelikož eskuletin reaguje s ionty železa (Qadri, 1980).

3.2.3 Produkce ureázy

Produkce ureázy je detekována barevnou změnou indikátoru, kterým je fenolová červeň. Sytě růžové až červené zbarvení značí pozitivní ureázu. Barevná změna se projeví díky zvýšení pH zapříčiněného rozkladem močoviny, při kterém vzniká amoniak a CO₂ (Dahlén, 2018).

3.2.4 Redukce dusičnanů

Bakterie mohou redukovat dusičnany na dusitany několika způsoby, mezi které patří asimilace, kdy kromě dusitanů vzniká amoniak; disimilace, kdy je akceptorem nitrát namísto kyslíku; a denitrifikace, kdy dochází k redukci na dusík. Redukce se provádí na tuhé půdě Grissovim činidlem, kde pozitivní výsledek značí červené zbarvení (Tille, 2017)

3.2.5 Tvorba indolu

Při metabolické činnosti některých bakterií dochází dekarboxylací peptidů k tvorbě indolu, který vzniká z tryptofanu, obsaženého v nadbytku v živném médiu, působením enzymu tryptofanázy, za současné nepřítomnosti glukózy, neboť glukóza produkci indolu inhibuje. Indol se detekuje pomocí *p*-dimethylaminobenzaldehydu za použití Ehrlichova, Böhmova nebo Kovacsova činidla. Pozitivní reakci nám značí zčervenání reagujících látek ve vrstvě nad médiem (Di Martino, 2003).

3.2.6 Tvorba H₂S

Sulfan je uvolňován některými bakteriemi, jejichž aminokyseliny obsahují síru. Důkaz H₂S lze provést několika způsoby. První možnost je použití papírku napuštěného octanem olovnatým. Další variantou je očkování na šikmý TSI agar nebo použití tekuté půdy s obsahem solí těžkých kovů (Pb, Bi, Fe). Za pozitivní výsledek lze považovat ve všech použitých metodách zčernání. Pokud nedochází k barevné změně, jedná se o negativní výsledek (Shatalin, 2011).

3.2.7 Hydrolýza želatiny

U testu na hydrolýzu želatiny pozorujeme proteolytickou aktivitu, kde se po naočkování bakterií do želatinového média po inkubaci sleduje ztekutění substrátu, což značí produkci proteáz a peptidáz, jelikož působením těchto enzymů ztrácí želatina svojí gelující schopnost (Tille, 2017).

3.2.8 ONPG test

ONPG test slouží k důkazu produkce β -galaktosidázy, prostřednictvím barevné změny *o*-nitrofenyl- β -D-galaktopyranozidu, který se při pozitivní reakci mění hydrolýzou na žlutý *o*-nitrofenol. Tento test značí opožděné štěpení laktózy (Votava, 2010).

3.2.9 Test pohyblivosti

Pohyblivost bakterii může být jednoduše určena po hlubokém vpichu do polotuhého živného agaru v U-trubici. V případě, že je kmen pohyblivý lze kolem vpichu pozorovat zakalení ve formě zón nebo výběžků. Nepohyblivé kmeny půdu nezakalí, tudíž zůstává čirá a kmen roste pouze na linii vpichu (Mitchell, 2006)

3.2.10 Testy na rezistenci vůči antibiotikům

Stanovení citlivosti bakteriálního kmene vůči antibiotikům se provádí pomocí antibiotických diagnostických disků. Agarová difúzní metoda nám určí, zda je kmen k antibiotiku citlivý nebo rezistentní. Na tuhé půdě v okolí diagnostických disků se pozoruje průměr inhibičních zón, který se srovnává s průměry minimálních inhibičních zón daných pro konkrétní antibiotikum. Pokud je průměr inhibičních zón menší, je MO vůči antibiotiku rezistentní. V případě, že jsou zóny větší, jsou bakterie na antibiotika citlivá. Mezi antibiotika,

kteřá se používají k testování citlivosti patří například kanamycin, vankomycin, sulfonamidy či kolistin (Votava, 2010).

3.3 Fingerpriny nukleových kyselin

Tato metoda poskytuje informace na úrovni poddruhů a druhů. Využívá se několik technik, mezi které patří například amplifikované fragmentové polymorfni PCR, makrorestrikční analýza po pulzní gelové elektroforéze, analýza náhodně amplifikované polymorfni DNA nebo repetitivni extrageni palindromická PCR. Velkou nevýhodou některých z těchto fingerprintových metod je, že výsledky jsou často obtížně srovnatelné, pokud byly získány v různých laboratořích kvůli nedostatku standardizace. Výjimkou je amplifikované fragmentové polymorfni PCR, protože tento přístup zajišťuje dostatečnou standardizaci. Fingerprintové metody DNA mají pro popis druhů omezený význam, ale při správném použití mohou být cenné pro identifikaci na úrovni druhů a poddruhů. Tyto typografické techniky jsou velmi užitečné k prokázání, zda jsou izoláty nového taxonu členy klonu (Busse, 2010).

3.4 Plynová chromatografie (GC)

Po dlouhá léta byla analýza mastných kyselin s krátkým řetězcem (těkavé mastné kyseliny, VFA) běžně používána při identifikaci anaerobních bakterií. V mnoha vědeckých dokumentech, mastné kyseliny s délkou devět až dvacet uhlíků charakterizují zejména rody a druhy nefermentujících gramnegativních bakterií (Jantzen, 1974).

Více než 300 mastných kyselin a příbuzných sloučenin bylo nalezeno u bakterií analyzovaných v MIDI Research a ve vývojové laboratoři. Nezměrná hodnota informací obsažených v těchto sloučeninách může být změřena nejen přítomností nebo nepřítomností každé kyseliny, ale spočívá zejména v kvantitě údajů. Systém Sherlock MIS je mikrobiální identifikační systém, který představuje rychlé, přesné a levné řešení pro identifikaci více než 1500 mikrobiálních druhů, mastných kyselin a PLFA pomocí analýzy GC-FAME a při jeho použití není zapotřebí žádné zkušenosti GC. Tento systém má schopnost rozlišovat mezi 2³⁰⁰ různými kombinacemi mastných kyselin a tento rozsáhlý počet vytváří skvělou „jmenovací“ sílu. Sherlock MIS používá k identifikaci mastné kyseliny o délce devět až dvacet uhlíků. Naměřené píky jsou automaticky pojmenovány a kvantifikovány systémem. Kyseliny s rozvětveným řetězcem převažují u grampozitivních bakterií, zatímco hydroxykyseliny s

krátkým řetězcem charakterizují lipopolysacharidy gramnegativních bakterií (MIDI Inc., 2018).

Je důležité poznamenat, že složení mastných kyselin v různých bakteriích závisí na kultivačních podmínkách, a to zejména na použitém kultivačním agaru a teplotě růstu (MIDI, 2001).

3.5 Polymerázová řetězcová reakce

Polymerázová řetězcová reakce (PCR) umožňuje rychlou a specifickou detekci širokého spektra bakteriálních druhů a stala se klíčovým postupem pro detekci mikroorganismů. Principem PCR je rychlá a snadná replikace nukleových kyselin při detekci bakterií v heterogenních vzorcích. Nejvíce se využívá k monitorování bakterií (například rody *Bacteriodes*, *Fusobacterium*) *in vitro* semikontinuálních kultivačních systémech na bázi lidského gastrointestinálního traktu. PCR, která se využívá pro specifikaci anaerobních bakterií, je založena na 16S rRNA genových sekvencích specifických pro určité anaerobní bakterie, které byly převážně vyvinuty v intestinálním traktu, kde získané výsledky jsou porovnávány s informacemi získanými z jiných technik analyzujících vzorky. Například rod *Fusobacterium* určovaný pomocí metody PCR vykazuje titry s vyššími hodnotami ve vzorcích (Radha, 2013).

3.6 Denaturační gradientová gelová elektroforéza

Molekulární přístup k analýze genetické rozmanitosti komplexních mikrobiálních populací představuje denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE) amplifikovaná polymerázovou řetězcovou reakcí. Tato technika je založena na separaci fragmentů genů kódujících 16S rRNA, které mají stejnou délku. DGGE se značně využívá ke studiu mikrobiální diverzity a sledování mikrobiální rozmanitosti biofilmů (Muyzer, 1993). Počet pásem pozorovaných v gelu může v mnoha případech poskytnout relativní míru počtu přítomných bakterií, kde každé z pásem viděné v gelu DGGE může představovat více druhů, a zároveň tentýž druh může být reprezentován ve více pásmech. Převládající druh každého pásma je poté naklonován do vektoru, kde je sekvenován a identifikován. Jednou z výhod použití DGGE pro srovnávací analýzu paralelních vzorků je nízká cena a rychlá vizuální interpretace (Dowd, 2008).

Bonin *et al.* ve své studii popsali degradaci skvalenu denitrifikačními anaerobními MO pomocí DGGE analýzy DNA fragmentů znásobených PCR. Jednotlivé MO byly identifikovány

po vyříznutí DGGE pásů a následným porovnáním jejich sekvencí se sekvencemi dostupnými v databáze GenBank. Většina identifikovaných MO byla z oddělení *Proteobacteria*, mezi kterými bylo izolováno a charakterizováno sedm nových denitrifikačních bakterií schopných používat skvalen jako jediný zdroj uhlíku (Bonin, 2002).

Kombinace PCR amplifikace 16S rRNA genů s analýzou denaturační gradientní gelové elektroforézy byla použita k odhalení kompozic a dynamiky bakteriálních komunit v čističce odpadních vod. Hlavní skupiny vzorků kalu DGGE byly dále sekvenovány a fylogenetická afinita ukázala, že většina získaných sekvencí byla spojena s bakteriemi *Actinobacteria*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria* (Hesham, 2011).

3.7 Shotgun sekvenování

Shotgun sekvenování patří mezi sekvenování celkové DNA získané z celé komunity, které má za následek získání celkového metagenomu mikrobů, nebo velké části genomů. Shotgun sekvenování má několik přístupů. První je založený na poskytování taxonomického profilování komunity na nižší taxonomické úrovni, než je cílené profilování taxonu. Gen 16S rRNA může být stejný nebo podobný pro vzdáleně příbuzné členy stejného druhu, aniž by ovlivňoval nižší taxonomické úrovně, a proto se pro kvantifikování druhů na úrovni celého genomu využívá shotgun sekvenování. Další možností je získání genetického doplňku mikrobiální komunity a následné odvození individuálního zařazení mezi organizmy v rámci komunity. Využívá se také funkčního profilování komunit založeném na předpokládané funkci genů, jako je přítomnost enzymu nebo početnost. Poslední možností je charakterizace nebakteriálních složek mikrobiomu, kde shotgun sekvenování je obzvlášť užitečné pro studium virových komunit. Jelikož viry neobsahují univerzální fylogenetický marker (16S rRNA), tak je pro získání rozmanitosti virových komunit tato metoda jediný možný způsob (Mitreva, 2017).

Nevýhodou této metody je vysoká nákladnost, hlavně díky vysoké lidské genomové „kontaminaci“. U vzorků s vysokou kontaminací lze hůře určit mikrobiální vlastnosti, a proto je potřebné hlubší pokrytí fylogenetického a funkčního profilování mikrobiální komunity.

Analýza shotgun sekvenováním probíhá srovnáním (mapováním) s referenčními genomy nebo funkčními databázemi a *de novo* sestavení genů pomocí výsledných sestav. Metoda pro určení mikrobiálních komunit je založena na databázi a používá dostupné sekvence, což je důležité pro úspěšné definování struktury nebo funkčnosti mikrobiální komunity, avšak plně tento přístup závisí na úplnosti referenčních genomů a funkčních databází (Niranjan, 2013).

3.8 DNA-DNA hybridizace

Celá genomová DNA-DNA hybridizace byla používána pro bakteriální genotypickou charakterizaci po dlouhá desetiletí, což zvyšuje kvalitu a množství informací užitečných pro identifikaci, která byla dříve omezena na fenotypové vlastnosti (Rosselló-Mora, 2001). DNA-DNA hybridizace byla jedním z prvních molekulárních výzkumů a dosud zůstává základním kamenem pro vymezení bakteriálních druhů (Stackebrandt, 2002). Tato standardní technika umožňuje porovnat a měřit genomové podobnosti mezi celkovým genomem dvou druhů za standardizovaných podmínek. Skupina druhů vykazujících více než 70 % podobnost mezi DNA-DNA se považuje za organizmy stejného druhu (Janda, 2007). Nicméně tato metoda nezávisí ve své schopnosti vyhodnotit skutečnou sekvenční podobnost mezi dvěma celými genomy a vhodným popisem bakteriálních druhů. Kromě toho jsou studie hybridizace DNA-DNA časově náročné; umožňují studium pouze několika bakteriálních kolonií a nejsou použitelné pro nekultivované organizmy, které představují většinu živých prokaryot. I přes nevýhody a omezení této metody je jedním z nejdůležitějších přístupů v oblasti ohraničení bakteriálních druhů. Vzhledem k významné úloze testu DNA-DNA hybridizace a obtížnosti provedení této techniky v rutinních laboratořích byly navrženy nové a alternativní metody (Pontes, 2007).

3.9 16S rRNA sekvenování

Několik vlastností genu 16S rRNA je důležitým nástrojem pro stanovení fylogenetických vztahů mezi bakteriemi, a proto je tento gen užitečným ukazatelem pro jejich klinickou detekci a identifikaci. Prvním důležitým rysem je, že gen 16S rRNA je přítomen ve všech bakteriích, tedy je univerzálním cílem pro identifikaci. Druhým podstatným znakem je to, že funkce tohoto genu zůstává konstantní po dlouhou dobu, takže změny sekvence pravděpodobně odrážejí náhodné změny, které by mohly změnit funkci molekuly (Patel, 2001). Gen 16S rRNA je dostatečně velký (přibližně 1500 bp), aby obsahoval statisticky významnou sekvenční informaci, ale důležitější je, že molekula je složena z přibližně 50 funkčních domén. Počet domén je důležitý, protože zavedení vybraných změn v jedné doméně nemá významný vliv na sekvence v jiných doménách. Vzhledem k tomu, že počet domén se zvyšuje, jsou vybrané změny fylogenetických vztahů méně ovlivňované. Díky těmto důležitým rysům se začalo používat 16S rRNA genové sekvenování pro studium bakteriální fylogeneze a taxonomie (Patel, 2001).

Identifikace založená na sekvenování se používá v klinické praxi. Laboratoře primárně identifikují izoláty, kterými jsou buď pomalu rostoucí bakterie, nebo bakterie, které jsou obtížně identifikovatelné pomocí běžných technik. V roce 1980 ve schválených seznamech bylo uznáno 1 791 platných druhů. Dnes se díky snadnému provádění studie sekvenování genu 16S rRNA počty rozpoznávaných taxonů zvýšily na čtyřikrát vyšší hodnoty, na rozdíl od těžších manipulačních studií zahrnujících vyšetřování DNA-DNA hybridizace (Janda, 2007).

Přestože bylo prokázáno, že údaje o sekvenci 16S rRNA genu jednotlivých druhů s nejbližším sousedem vykazujícím podobnost $< 97\%$, znamená to, že představují nový druh, význam podobnosti $> 97\%$ není tak jasný (Reller, 2007). Tato hodnota může představovat nový druh anebo alternativně naznačovat slučování v rámci dříve definovaného taxonu. Studie hybridizace DNA-DNA jsou tradičně vyžadovány, aby poskytly konečné odpovědi na tyto otázky v určení taxonomie. Zatímco data sekvence genu 16S rRNA mohou být použity pro mnoho účelů, pro hybridizace DNA neexistují definované „prahové hodnoty“ podobnosti, nad nimiž by existovala univerzální shoda o přesvědčivém zařazení do druhu (Janda, 2007).

Největší potenciál využití informací z 16S rRNA genového sekvenování je poskytnout identifikaci genů a druhů pro izoláty, které neodpovídají žádným známým biochemickým profilům a také pro druhy, které vytvářejí pouze „nízkou pravděpodobnost“ nebo „přijatelnou“ identifikaci podle komerčních systémů. Další možností je identifikace taxonů, které jsou zřídka spojeny s lidskými infekčními chorobami. Kumulativní výsledky z omezeného počtu studií doposud naznačují, že sekvenování genu 16S rRNA poskytuje identifikaci rodu ve většině případů ($> 90\%$), ale méně u druhů (65-83 %), izolátů, které zůstaly po testování neidentifikovány je pouze minimum (1-14 %) (Mignard, 2006).

3.10 MALDI-TOF MS

K identifikaci anaerobních bakterií lze využít desorpční metodu s destičkami s maticovou podporou a identifikací hmotnostní spektrometrie (MALDI-TOF MS) (Velloo, 2017). Zobrazování pomocí této metody nám poskytuje informace o distribuci bakterií společně s distribucí léků a metabolitů (Hamerly, 2015). Hlavní poznatek je, že identifikace získaná pomocí MALDI-TOF MS je nadřazena fenotypovým metodám týkajících se spolehlivosti identifikace. Ve srovnání s fenotypovými metodami je tato metoda vhodná pro svou vysokou propustnost, je mnohem rychlejší a levnější a můžeme ji považovat za alternativu pro běžné biochemické a molekulární identifikační systémy v mikrobiologické laboratoři, jelikož

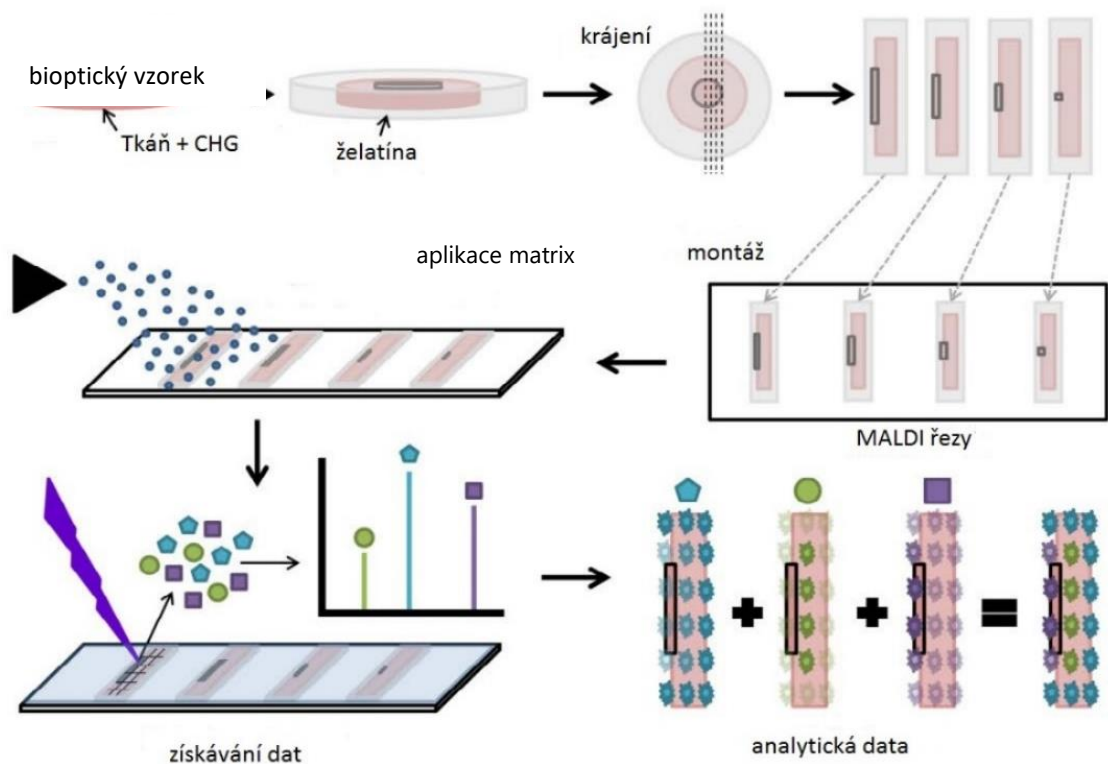
diferenční konvenční metody se opírají o biochemická kritéria a vyžadují další předběžné testování a zdlouhavé inkubační postupy, naopak metoda MALDI-TOF MS dokáže identifikovat bakterie a kvasinky během několika minut přímo z kolonií pěstovaných na kultivačních plotnách, a to ji činí metodicky jednoduchou a přístupnější metodou, vzhledem ke sníženým nákladům na spotřební materiál a ušetřeného času při diagnostice (Wieser, 2012). Vzhledem k tomu, že pro analýzu je potřebný pouze minutový vzorek (minute sample), je MALDI-TOF MS zvláště užitečný pro identifikaci náročných a špatně rostoucích druhů. Identifikace anaerobních bakterií je hodnotnější, pokud je databáze MALDI-TOF MS doplněna referenčními spektry druhů, které chybí v databázi nebo jsou nedostatečně zastoupeny (Velloo, 2017).

Spolehlivost a přesnost metody byla prokázána v řadě studií a různé systémy jsou již komerčně dostupné (Wieser, 2012). Pomocí MALDI-TOF MS bylo analyzováno velké množství klinicky významných anaerobních izolátů. Na izolovaných koloniích se bezprostředně po izolaci provádí ethanolové srážení, kterým se stabilizují a poté identifikují pomocí protokolu pro identifikaci mikroorganismů (Nagy, 2012). Rovněž jsou zkoumány nové aplikace systému kromě identifikace úrovně mikrobiálních druhů, to zahrnuje detekci patogenů z pozitivních krevních kultur, nebo přímo ze vzorků pacienta, jako je moč. Pokud jde o fenotypovou detekci, tak i zde dochází k vývoji MALDI-TOF MS, a to konkrétně při identifikaci určitých antibiotických rezistenčních mechanismů, například β -laktamáz a karbapenemáz (Wieser, 2012).

Hmotnostní spektrometrie je analytická technika používaná k analýze poměru hmotnosti k náboji různých sloučenin, kde nejrozšířenější metodou pro analýzu biomolekul je laserová desorpční/ionizační spektrometrie doby letu, MALDI-TOF MS, s matricovou podporou. Tato metoda je založena na ionizaci kokrytalizovaného vzorku pomocí krátkých laserových impulzů. Ionty se zrychlují a jejich doba letu se měří ve vakuové trubici. MALDI-TOF MS se úspěšně používá ve výzkumu k určení hmotnosti proteinů a peptidů. Tato technika přispěla prostřednictvím identifikace specifických biochemických markerů k diagnostice nádorů, revmatoidní artritidy, Alzheimerovy choroby a alergií (Marvin, 2003). Využití MALDI-TOF MS v identifikaci mikroorganismů umožnilo analýzu poměrně velkých biomolekul, včetně větších ribozomálních proteinů, kdy identifikace MO je méně ovlivňována kultivačními podmínkami, mezi které patří variabilita způsobena růstovými podmínkami a použitím různých médií, oproti metodám klasické hmotnostní spektrometrie. Díky těmto skutečnostem je

MALDI-TOF MS v posledních letech implementována v rutinních laboratořích a je používána jako zcela nový přístup k identifikaci bakterií a kvasinek (Wieser, 2012).

Při této technice se matrix aplikuje na tkáň. Při vystavení UV záření laseru se analyty ionizují a následně se měří na hmotnostním spektrometru. Tím, že laser projde tkání a měří počet iontů v každém bodě, může být vytvořen dvojrozměrný obraz založený na intenzitě iontů. Získané dvourozměrné obrazy rány nám pomůžou pochopit procesy hojení ran. Při kombinaci s laserovou desorpční ionizací s matricí asistovanou ionizací širokého spektra molekul je zobrazovací hmotnostní spektrometrie silným nástrojem biomedicínského výzkumu. Avšak se tato technika zatím nepoužívá k vyšetření bakteriální kolonizace ran nebo distribuce antimikrobiálních látek na tkáň. Za tímto účelem byla zkoumána distribuce a perzistence antimikrobiálního činidla chlorhexidinglukonátu (CHG) na modelové lidské tkáni. Byla rovněž řešena schopnost detekovat a lokalizovat *Staphylococcus aureus* na stejném modelu tkáně. Tato metodika je užitečná při vývoji obvazů na rány se zlepšenými antimikrobiálními vlastnostmi. Dále nám zajišťuje důkladnější analýzu koncentrace antimikrobiálních činidel nezbytných pro prevenci tvorby biofilmu a perzistenci (Hamerly, 2015).



Obrázek 13: Schéma MALDI-IMS (Hamerly, 2015)

Schéma metody analýzy vzorků tkáně pomocí hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí / ionizačním zobrazením (MALDI-IMS) s matricí asistovanou vazbu je znázorněna na **Obrázku 12**. Tkáňové vzorky obsahující bakterie, které byly ošetřeny CHG jsou potaženy želatinou pro kryosekci. Sekce jsou umístěny na speciálních sklíčkách mikroskopu MALDI a jsou potaženy oxidem (indium-titanium oxide). Posuvný komponent je potaženo v matrici pro analýzu MALDI a po sušení jsou do MALDI-MS umístěny sklíčka s tkáněmi. Laser poté rozloží celou tkáňovou sekci a generuje každé spektrum. Tyto spektra jsou pak analyzována tak, aby generovaly obraz iontů, kde intenzita barvy indikovala, kolik z tohoto konkrétního iontu je vidět na libovolném místě na tkáni (Hamerly, 2015)

4 Závěr

V této bakalářské práci byly popsány gramnegativní anaerobní bakterie vyskytující se v chronických ranách, jejich detekce, identifikace a v neposlední řadě i taxonomie. Infekce způsobené anaerobními MO jsou běžné, jejich výskyt je stále častější a infekce způsobené zmíněnými bakteriemi mohou způsobovat vážné až život ohrožující onemocnění. Z tohoto důvodu je důležitá jejich včasná detekce a identifikace pomocí širokého spektra metod.

První část práce pojednává o taxonomii jako takové a zařazení bakterií vybraných pro tuto práci do hierarchie biologické klasifikace. K vidění je rozsáhlý fylogenetický strom určující přesné zařazení vybraných bakterií do jednotlivých taxonů. V další části byly podrobně popsány gramnegativní anaerobní mikroorganismy vyskytující se v chronických ranách, jejich základní vlastnosti a nejvýznamnější představitelé včetně nemocí, které mohou způsobovat. Bylo vybráno a popsáno osm rodů bakterií, a to konkrétně *Bacteroides*, *Porphyromonas*, *Prevotella*, *Fusobacterium*, *Bilophila*, *Veillonella*, *Mobiluncus* a *Leptotrichia*. Zástupci z řad těchto rodů se přirozeně vyskytují v chronických ranách a jsou původci závažných zdravotních komplikací a onemocnění.

V poslední části této práce byly popsány jednotlivé kultivační, biochemické a instrumentální metody sloužící k jednoznačné a spolehlivé identifikaci mikroorganismů. V rámci kultivačních metod bylo popsáno složení a principy tuhých i tekutých půd používaných ke kultivaci jednotlivých mikroorganismů. Klasické biochemické testy vykazují schopnost rychlé a jednoduché identifikace fyziologických vlastností určovaných bakterií. Byl kladen důraz zejména na testy přímo se týkající vyčleněné skupiny gramnegativních anaerobů, jako jsou například testy na tvorbu katalázy, ureázy, indolu, H₂S a hydrolýzu eskulinu, želatiny atd. Instrumentální metody identifikace mikroorganismů patří k nejmodernějším technikám ve svém oboru a jsou široce využívány.

5 Reference

- AKHI, M.T, R. GHOTASLOU a M. YEKANI. Nim gene-independent metronidazole-resistant *Bacteroides fragilis* in surgical site infections. *GMS Hyg Infect Control* [online]. 2017, 17(1), -. DOI: 10.3205/dgkh000298.
- ALIYU, S., 2004. Real-time PCR investigation into the importance of *Fusobacterium necrophorum* as a cause of acute pharyngitis in general practice. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 53(10), 1029-1035. DOI: 10.1099/jmm.0.45648-0.
- BARON, Ellen, 1997. *Bilophila wadsworthia*: a Unique Gram-negative Anaerobic Rod. *Anaerobe* [online]. 3(2-3), 83-86. DOI: 10.1006/anae.1997.0075.
- BARTLETT, JohnG, 1982. ANTI-ANAEROBIC ANTIBACTERIAL AGENTS. *The Lancet* [online]. 320(8296), 478-481. DOI: 10.1016/S0140-6736(82)90503-7.
- BONIN, P. C., V. D. MICHOTEY, A. MOUZDAHIR a J. F. RONTANI. Anaerobic biodegradation of squalene: Using DGGE to monitor the isolation of denitrifying Bacteria taken from enrichment cultures. *FEMS Microbiology Ecology*. 2002, 42(1), 37-49. DOI: j.1574-6941.2002.tb00993.x.
- BOOTHROYD, Peter. a Xuân PHẠM, 2000. *Socioeconomic renovation in Viet Nam: the origin, evolution, and impact of doi moi*. 31. Singapore: Institute of Southeast Asian Studies.
- BORGAN, T., 1983. Diagnostic considerations and sample collection for anaerobic bacteria. *Scand J Gastroenterol Suppl.* [online]. 85, 5-14
- BOWLER, P., B. DUERDEN a D. ARMSTRONG, 2001. Wound Microbiology and Associated Approaches to Wound Management. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 14(2), 244-269. DOI: 10.1128/CMR.14.2.244-269.2001.
- BRENNER, Don, James STALEY a Noel KRIEG, 2005. Classification of Prokaryotic Organisms and the Concept of Bacterial Speciation. BRENNER, Don J., ed., Noel R. KRIEG, ed., James T. STALEY, ed. a George M. GARRITY, ed., Don BRENNER, Noel KRIEG, James STALEY, George GARRITY. *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology* [online]. 2. Boston, MA: Springer US, s. 27-32. DOI: 10.1007/0-387-28021-9_4. ISBN 978-0-387-24143-2.
- BROOK, Itzhak, 2017. Anaerobic Bacteria. *Infectious Diseases* [online]. 2. Elsevier, 1628-1644.e2. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00184-2. ISBN 9780702062858.
- BUSSE, H.-J., B. TINDALL, W. LUDWIG, R. ROSSELLÓ-MÓRA a P. KÄMPFER, 2010. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 60(1), 249-266. DOI: 10.1099/ijs.0.016949-0.
- DAHLÉN, G., H. HASSAN, S. BLOMQVIST a A. CARLÉN. Rapid urease test (RUT) for evaluation of urease activity in oral bacteria in vitro and in supragingival dental plaque ex vivo. *BMC Oral Health* [online]. 2018, 18(1), -. DOI: 10.1186/s12903-018-0541-3.

- DI MARTINO, P, R FURSY, L BRET, B SUNDARARAJU a R PHILLIPS, 2003. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Canadian Journal of Microbiology* [online]. 49(7), 443-449. DOI: 10.1139/w03-056.
- DOWD, Scot, Yan SUN, Patrick SECOR, Daniel RHOADS, Benjamin WOLCOTT, Garth JAMES a Randall WOLCOTT, 2008. Survey of bacterial diversity in chronic wounds using Pyrosequencing, DGGE, and full ribosome shotgun sequencing. *BMC Microbiology* [online]. 8(1), 43. DOI: 10.1186/1471-2180-8-43.
- ERIBE, Emenike a Ingar OLSEN, 2017. Leptotrichia species in human infections II. *Journal of Oral Microbiology* [online]. 9(1), 1368848-. DOI: 10.1080/20002297.2017.1368848.
- ERIBE, Emenike a Ingar OLSEN, 2008. Leptotrichia species in human infections. *Anaerobe* [online]. 14(3), 131-137. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2008.04.004.
- FALAGAS, Matthew a Elias SIAKAVELLAS, 2000. Bacteroides, Prevotella, and Porphyromonas species. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. 15(1), 1-9. DOI: 10.1016/S0924-8579(99)00164-8.
- FENG, Zhou, Wenmin LONG, Binhan HAO, Ding DING, Xiaoqing MA, Liping ZHAO a Xiaoyan PANG, 2017. A human stool-derived *Bilophila wadsworthia* strain caused systemic inflammation in specific-pathogen-free mice. *Gut Pathogens* [online]. 9(1), -. DOI: 10.1186/s13099-017-0208-7.
- GATTI, Marcello, 2000. Isolation of *Mobiluncus* Species from the Human Vagina. *Zentralblatt für Bakteriologie* [online]. 289(8), 869-878. DOI: 10.1016/S0934-8840(00)80017-1.
- GOKALE, Shilpa a Shashidhar SULIGAVI, 2010. Bacteriological Study of Chronic Maxillary Sinusitis with Special Reference to Anaerobes. In: *JAYPEE JOURNALS* [online]. India: Jaypee Brothers Medical Publishers (P) Ltd.
- GUERRERO-PRESTON, Rafael, Filipa GODOY-VITORINO, Anne JEDLICKA et al., 2016. 16S rRNA amplicon sequencing identifies microbiota associated with oral cancer, human papilloma virus infection and surgical treatment. *Oncotarget* [online]. 7(32), -. DOI: 10.18632/oncotarget.9710.
- HAMERLY, Timothy, Margaret BUTLER, Steve FISHER, Jonathan HILMER, Garth JAMES a Brian BOTHNER, 2015. Mass Spectrometry Imaging of Chlorhexidine and Bacteria in a Model Wound. *AIMS Medical Science*, [online]. 2(3), 150-161
- HARDING, K, G PATEL a H MORRIS, 2002. Healing chronic wounds. *British Medical Journal*. 324(7330), 160–163.
- HARDY DIAGNOSTICS, , 1996a. *WILKINS-CHALGREN MEDIA* [online]. Santa Maria, CA: Hardy Diagnostics. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/WilkinsChalgrenMedia.html
- HARDY DIAGNOSTICS, , 1996b. *BACTEROIDES BILE ESCULIN (BBE) AGAR* [online]. Santa Maria, CA: Hardy Diagnostics. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/BBEAgar.htm

- HARDY DIAGNOSTICS, , 1996a. *EGG YOLK AGAR (EYA), MODIFIED* [online]. Santa Maria, CA: HARDY DIAGNOSTICS. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AnaeroGRO-EggYolkAgarMod.html
- HARDY DIAGNOSTICS, , 1996b. *LKV (LAKED BLOOD WITH KANAMYCIN AND VANCOMYCIN) AGAR* [online]. Santa Maria, CA: HARDY DIAGNOSTICS. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AnaeroGRO-LKVAgar.html
- HARDY DIAGNOSTICS, , 1996c. *PEPTONE YEAST EXTRACT GLUCOSE BROTH* [online]. Santa Maria, CA: HARDY DIAGNOSTICS. Dostupné z: https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/content/hugo/AnaeroGRO-PYGBroth.html
- HESHAM, Abd El-Latif, Rong QI a Min YANG. Comparison of bacterial community structures in two systems of a sewage treatment plant using PCR-DGGE analysis. *Journal of Environmental Sciences*. 2011, 23(12), 2049-2054. DOI: 10.1016/S1001-0742(10)60647-X.
- HIMEDIA LABORATORIES, , 2018. *Anaerobic Agar* [online]. Mumbai, India: HiMedia Laboratories. Dostupné z: <http://himedialabs.com/TD/M228.pdf>
- HOLT, Stanley, Lakshmyya KESAVALU, Stephen WALKER a Caroline GENCO, 1999. Virulence factors of Porphyromonas gingivalis. *Periodontology 2000* [online]. 20(1), 168-238. DOI: 10.1111/j.1600-0757.1999.tb00162.x.
- HOW, Kah, Keang SONG a Kok CHAN, 2016. Porphyromonas gingivalis: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. *Frontiers in Microbiology* [online]. 7(-), -. DOI: 10.3389/fmicb.2016.00053.
- CHO, Eun, Kyung PARK, Mina YANG, Dong SONG, Hee HUH, Chang-Seok KI a Nam LEE, 2017. Laboratory Identification of Leptotrichia Species Isolated From Bacteremia Patients at a Single Institution. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. 37(3), 272-. DOI: 10.3343/alm.2017.37.3.272.
- IZADI, Kouros a Parham GANCHI, 2005. Chronic Wounds. *Clinics in Plastic Surgery*. 32(2), 209-222. DOI: 10.1016/j.cps.2004.11.011.
- JANDA, J. a S. ABBOTT, 2007. 16S rRNA Gene Sequencing for Bacterial Identification in the Diagnostic Laboratory: Pluses, Perils, and Pitfalls. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 45(9), 2761-2764. DOI: 10.1128/JCM.01228-07.
- JANTZEN, E., T. BERGAN a K. BØVRE, 1974. GAS CHROMATOGRAPHY OF BACTERIAL WHOLE CELL METHANOLYSATES. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology and Immunology* [online]. 82(6), 785-798. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1974.tb02376.x.
- JAUL, Efraim, 2009. Non-healing wounds: The geriatric approach. *Archives of Gerontology and Geriatrics* [online]. 49(2), 224-226. DOI: 10.1016/j.archger.2008.08.005.
- JULÁK, Jaroslav, 2003. *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 1. vyd. Praha: Karolinum. ISBN 80-246-0750-6.

- JUMAS-BILAK, E., 2004. *Veillonella montpellierensis* sp. nov., a novel, anaerobic, Gram-negative coccus isolated from human clinical samples. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 54(4), 1311-1316. DOI: 10.1099/ijs.0.02952-0.
- KENNETH J. RYAN, a ed., C. GEORGE RAY, 2004. *Sherris medical microbiology: an introduction to infectious diseases*. 4. New York: McGraw-Hill. ISBN 9780071212458.
- LABCE. *Bilophila* [online]. Georgia: LabCE, 2017. Dostupné z: https://www.labce.com/spg547366_bilophila_wadsworthia___presumptive_id.aspx
- LABCE. *Veillonella* [online]. Georgia: LabCE, 2017. Dostupné z: https://www.labce.com/spg547373_gram_stain_of_veillonella.aspx
- MARTIN, Jo, Jonathan ZENILMAN a Gerald LAZARUS, 2010. Molecular Microbiology: New Dimensions for Cutaneous Biology and Wound Healing. *Journal of Investigative Dermatology* [online]. 130(1), 38-48. DOI: 10.1038/jid.2009.221.
- MARVIN, Laure, Matthew ROBERTS a Laurent FAY, 2003. Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry in clinical chemistry. *Clinica Chimica Acta* [online]. 337(1-2), 11-21. DOI: 10.1016/j.cccn.2003.08.008.
- MCINNES, Iain a Georg SCHETT, 2011. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis. *New England Journal of Medicine* [online]. 365(23), 2205-2219. DOI: 10.1056/NEJMra1004965.
- MELTZER, Michelle C., Renee A. DESMOND a Jane R. SCHWEBKE. Association of *Mobiluncus curtisii* With Recurrence of Bacterial Vaginosis. *Sexually Transmitted Diseases* [online]. 2008, 35(6), 611-613. DOI: 10.1097/OLQ.0b013e318167b105.
- MIDI, , 2001. Identification of Bacteria by Gas Chromatography of Cellular Fatty Acids. *MIDI* [online]. Dostupné z: http://natasha.eng.usf.edu/gilbert/courses/Biotransport%20Phenomena/pdf/bacteria_gc_1.pdf
- MIDI INC. *Sherlock™ Microbial ID System: Bacteria and Yeast ID by Fatty Acid Analysis*. Newark, DE: MIDI, 2018.
- MIGNARD, S. a J.P. FLANDROIS, 2006. 16S rRNA sequencing in routine bacterial identification: A 30-month experiment. *Journal of Microbiological Methods* [online]. 67(3), 574-581. DOI: 10.1016/j.mimet.2006.05.009.
- MIKAMO, H, S ARAKAWA a H FUNADA, 2011. Chapter 1-4. Anaerobic infections (general): selection of appropriate anti-anaerobic agents—internal medicine. *Journal of Infection and Chemotherapy* [online]. 17(1), 31-34. DOI: 10.1007/s10156-010-0134-9
- MILLER, J. Michael. *Fusobacteria* [online]. Perth, 2017. Dostupné z: <http://taxondiversity.fieldofscience.com/2017/01/fusobacteria.html>
- MITCHELL, James G. a Kazuhiro KOGURE. Bacterial motility: links to the environment and a driving force for microbial physics. *FEMS Microbiology Ecology*. 2006, 55(1), 3-16. DOI: 10.1111/j.1574-6941.2005.00003.x.

MITREVA, Makedonka, 2017. The Microbiome in Infectious Diseases. *Infectious Diseases* [online]. 1. Elsevier, 68-74.e2. DOI: 10.1016/B978-0-7020-6285-8.00008-3. ISBN 9780702062858.

MUYZER, G. a E.C. WAAL, 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol* [online]. 59(3), 695-700

NAGY, E., S. BECKER, M. KOSTRZEWA, N. BARTA a E. URBAN, 2012. The value of MALDI-TOF MS for the identification of clinically relevant anaerobic bacteria in routine laboratories. *Journal of Medical Microbiology* [online]. 61(10), 1393-1400. DOI: 10.1099/jmm.0.043927-0.

NAGY, Elisabeth, Georg CONRADS a Eija KÖNÖNEN, 2015. Bacteroides , Porphyromonas , Prevotella , Fusobacterium , and Other Anaerobic Gram-Negative Rods*. PFALLER, Michael A., ed., Sandra S. RICHTER, ed., Guido FUNKE, ed., James H. JORGENSEN, ed., Marie Louise LANDRY, ed., Karen C. CARROLL, ed. a David W. WARNOCK, ed., Michael PFALLER, Sandra RICHTER, Guido FUNKE, James JORGENSEN, Marie LANDRY, Karen CARROLL, David WARNOCK. *Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition* [online]. Washington: American Society of Microbiology, s. 967-993. DOI: 10.1128/9781555817381.ch54. ISBN 9781555817374.

NCBI, , 2018. *National Center for Biotechnology Information* [online]. USA: NCBI. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy>

NIRANJAN, N. a M. POP, 2013. Sequence assembly demystified. *Nature Reviews Genetics* [online]. 14(1), 157-167.

PARTNERS HEALTHCARE SYSTEM. Bacteroides. In: *Partners infectious disease images* [online]. 2013. Dostupné z: <http://www.idimages.org/atlas/organism/?atlasentryID=77&organism=Bacteroides>

PATEL, J, 2001. 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Molecular Diagnosis* [online]. 6(4), 313-321. DOI: 10.1054/modi.2001.29158.

PATHOGEN REGULATION DIRECTORATE, , 2010. *Pathogen Safety Data Sheets: Infectious Substances – Fusobacterium spp.* [online]. Ottawa: Public Health Agency of Canada. Dostupné z: <https://www.canada.ca/en/public-health/services/laboratory-biosafety-biosecurity/pathogen-safety-data-sheets-risk-assessment/fusobacterium.html>

PONTES, Daniela, Cláudia LIMA-BITTENCOURT, Edmar CHARTONE-SOUZA a Andréa AMARAL NASCIMENTO, 2007. Molecular approaches: advantages and artifacts in assessing bacterial diversity. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* [online]. 34(7), 463-473. DOI: 10.1007/s10295-007-0219-3.

POTEMPA, J, Nadine PAVLOFF a James TRAVIS, 1995. Porphyromonas gingivalis: a proteinase/gene accounting audit. *Trends in Microbiology* [online]. 3(11), 430-434. DOI: 10.1016/S0966-842X(00)88996-9.

QADRI, S., M.I. DESILVA a S. ZUBAIRI, 1980. Rapid test for determination of esculin hydrolysis. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 12(3), 472-474

- RADHA, Sudhakar, Anwar Aliya FATHIMA, Sellamuthu IYAPPAN a Mohandass RAMYA. Direct colony PCR for rapid identification of varied microalgae from freshwater environment. *Journal of Applied Phycology* [online]. 2013, 25(2), 609-613. DOI: 10.1007/s10811-012-9895-0.
- RELLER, L., M. WEINSTEIN a C. PETTI, 2007. Detection and Identification of Microorganisms by Gene Amplification and Sequencing. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 44(8), 1108-1114. DOI: 10.1086/512818.
- RIORDAN, T., 2007. Human Infection with *Fusobacterium necrophorum* (Necrobacillosis), with a Focus on Lemierre's Syndrome. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 20(4), 622-659. DOI: 10.1128/CMR.00011-07.
- ROSSELLÓ-MORA, Ramon a Rudolf AMANN, 2001. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 25(1), 39-67. DOI: 10.1111/j.1574-6976.2001.tb00571.x.
- ROSSELLÓ-MÓRA, Ramon a Rudolf AMANN. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 2015, 38(4), 209-216. DOI: 10.1016/j.syapm.2015.02.001.
- SHAH, H. a D. COLLINS, 1990. NOTES: *Prevotella*, a New Genus To Include *Bacteroides melaninogenicus* and Related Species Formerly Classified in the Genus *Bacteroides*. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 40(2), 205-208. DOI: 10.1099/00207713-40-2-205.
- SHATALIN, K., E. SHATALINA, A. MIRONOV a E. NUDLER, 2011. H2S: A Universal Defense Against Antibiotics in Bacteria. *Science* [online]. 334(6058), 986-990. DOI: 10.1126/science.1209855.
- SCHER, Jose, Andrew SCZESNAK, Randy LONGMAN et al., 2013. Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis. *ELife* [online]. 2(1),. DOI: 10.7554/eLife.01202.
- SCHLEIFER, Karl, 2009. Classification of Bacteria and Archaea: Past, present and future. *Systematic and Applied Microbiology* [online]. 32(8), 533-542. DOI: 10.1016/j.syapm.2009.09.002. ISSN 07232020.
- STACKEBRANDT, E., 2002. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *INTERNATIONAL JOURNAL OF SYSTEMATIC AND EVOLUTIONARY MICROBIOLOGY* [online]. 52(3), 1043-1047. DOI: 10.1099/ij.s.0.02360-0.
- TILLE, Patricia. *Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology*. 14. St. Louis, Missouri: Elsevier, 2017. ISBN 978-032-3354-820.
- TOPRAK, Nurver, Bahadır GÜLLÜOĞLU, Özlem ÇAKIÇI, M. AKIN, Pakize DEMIRKALEM, Tuncay ÇELENK a Güner SÖYLETİR, 2005. Do Antimicrobial Susceptibility Patterns of Colonic Isolates of *Bacteroides* Species Change after Antibiotic Prophylaxis with Cefoxitine during Elective Abdominal Surgery?. *World Journal of Surgery* [online]. 29(10), 1311-1315. DOI: 10.1007/s00268-005-7961-3.

- VAN VEEN, S., E. CLAAS a Ed KUIJPER, 2010. High-Throughput Identification of Bacteria and Yeast by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry in Conventional Medical Microbiology Laboratories. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 48(3), 900-907. DOI: 10.1128/JCM.02071-09.
- VELOO, A.C.M., H. JEAN-PIERRE, U.S. JUSTESEN et al., 2017. A multi-center ring trial for the identification of anaerobic bacteria using MALDI-TOF MS. *Anaerobe* [online]. 48, 94-97. DOI: 10.1016/j.anaerobe.2017.07.004.
- VENTOSA, A., E. QUESADA, F. RODRIGUEZ-VALERA, F. RUIZ-BERRAQUERO a A. RAMOS-CORMENZANA, 1982. Numerical Taxonomy of Moderately Halophilic Gram-negative Rods. *Microbiology* [online]. 128(9), 1959-1968. DOI: 10.1099/00221287-128-9-1959.
- VOTAVA, Miroslav, 2000. *Kultivační půdy v lékařské mikrobiologii*. 1. vyd. Brno: Hortus. ISBN 80-238-5058-x.
- VOTAVA, Miroslav, 2003. *Lékařská mikrobiologie speciální*. 1. Brno: Neptun. ISBN 80-902-8966-5.
- VOTAVA, Miroslav, 2010. *Lékařská mikrobiologie - vyšetřovací metody*. 1. Brno: Neptun. ISBN 978-808-6850-048.
- WASHIO, Jumpei, Yuko SHIMADA, Masakazu YAMADA, Ryouichi SAKAMAKI, Nobuhiro TAKAHASHI a H. NOJIRI. Effects of pH and Lactate on Hydrogen Sulfide Production by Oral Veillonella spp. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2014, 80(14), 4184-4188. DOI: 10.1128/AEM.00606-14.
- WIESER, Andreas, Lukas SCHNEIDER, Jette JUNG a Sören SCHUBERT, 2012. MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics—identification of microorganisms and beyond (mini review). *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 93(3), 965-974. DOI: 10.1007/s00253-011-3783-4.