

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Molekulárně-biologické postupy pro identifikaci *Arcobacter* spp.

Karin Stephányová

Bakalářská práce

2019

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2018/2019

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Karin Stephányová**
Osobní číslo: **C16277**
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**
Studijní obor: **Zdravotní laborant**
Název tématu: **Molekulárně-biologické postupy pro identifikaci *Arcobacter* spp.**
Zadávající 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. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma, v úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriích rodu *Arcobacter*.
2. Shromážděte informace o molekulárně-biologických metodách, uveďte jejich rozdělení dle různých hledisek.
3. Zpracujte rešeršní text o metodách využitelných pro identifikaci arkobakterů, popř. o výhodách a nevýhodách jednotlivých metod. Zaměřte se na metody polymerázové řetězové reakce využitelné pro identifikaci těchto bakterií.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu".

Rozsah grafických prací: **dle potřeby**

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**

Katedra biologických a biochemických věd

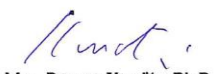
Datum zadání bakalářské práce: **21. prosince 2018**

Termín odevzdání bakalářské práce: **4. července 2019**



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2019

Prohlašuji:

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.

V Pardubicích dne 25.6.2019

Karin Stephányová

ANOTACE

Tato bakalářská práce je zaměřena zejména na identifikaci bakterií *Arcobacter* spp., dále se zabývá výhodami či nevýhodami detekcí tohoto rodu. V první části bakalářské práce je popsán výskyt, kultivace, přenos, biochemické testy a jednotlivé druhy rodu *Arcobacter*. Druhá část popisuje principy a postupy všech metod v molekulární biologii. Ve třetí části je podrobně rozepsána polymerázová řetězová reakce a její možné kombinace při identifikaci *Arcobacter* spp. Závěr je zaměřen na vyhodnocení nejlepšího možného výběru molekulárně-biologických metod pro identifikaci a detekci rodu *Arcobacter*.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter spp., polymerázová řetězová reakce, identifikace, detekce

TITLE

Molecular – biological procedures for the identification of *Arcobacter* spp.

ANOTATION

This bachelor thesis is focused on identification of bacteria *Arcobacter* spp., It also deals with advantages or disadvantages of detection of this genus. The first part of the thesis describes the occurrence, cultivation, transfer, biochemical tests and individual species of the genus *Arcobacter*. The second part describes the principles and procedures of all methods in molecular biology. The third part describes the polymerase chain reaction and its possible combinations in the identification of *Arcobacter* spp. In conclusion, the aim is to evaluate the best possible selection of molecular-biological methods for the identification and detection of the genus *Arcobacter*.

KEYWORDS

Arcobacter spp., polymerase chain reaction, identification, detection

Obsah

0. Úvod.....	10
1. Rod <i>Arcobacter</i>	11
1.1 Kultivace.....	12
1.2 Biochemické testy	19
1.3 Chemotaxonomie.....	20
1.4 Výskyt zástupců <i>Arcobacter</i> spp.	21
2. Molekulárně-biologické metody	27
2.1 Metody molekulární biologie	27
2.2 Izolace.....	27
2.3 Amplifikační metody	29
2.3.1 PCR.....	29
2.3.2 Ligázová řetězcová reakce (LCR).....	32
2.3.3 Amplifikace replikázou Q β (QBR).....	33
2.3.4 3SR Amplifikační reakce (self-sustained sequence replication).....	33
2.4 Neamplifikační metody	33
2.5 Klasické metody sekvenování	36
3. Metody využitelné pro zjišťování identifikace arkobakterů	39
3.1 Klasické PCR metody.....	39
3.2 Kombinované PCR metody.....	42
3.3 Identifikace <i>Arcobacter</i> spp. pomocí MALDI-TOF MS.....	46
3.4 Porovnání metod pro identifikaci <i>Arcobacter</i> spp.....	47
4. Závěr	52
5. Použitá literatura	53

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Buňky <i>Arcobacter</i> spp. zachycené el. mikroskopem (Snelling <i>et al.</i> , 2005)	11
Obrázek 2 Kultivace <i>A. marinus</i> spolu s <i>A. halophilus</i> (Salas-Masso <i>et al.</i> , 2016)	13
Obrázek 3 <i>Campylobacter</i> Blood-Free Selective Agar (CCDA), (Sultana, 2017)	14
Obrázek 4 Biochemické testy pro identifikaci <i>Arcobacter</i> spp. (převzato z Biomérieux)	20
Obrázek 5 Výskyt druhů rodu <i>Arcobacter</i> (Ramees <i>et al.</i> , 2017)	21
Obrázek 6 Izolace genomové DNA (převzato z LabGuide)	28
Obrázek 7 Reakce reverzní PCR (převzato z Bioline)	30
Obrázek 8 Molekulární maják (Li J. a McDonald J., 2014)	32

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Růstové možnosti <i>Arcobacter</i> spp. v různorodém prostředí (Levican <i>et al.</i> , 2014); (Levican <i>et al.</i> , 2013).....	15
Tabulka 2 Schopnost růstu za specifických podmínek pro jednotlivé zástupce <i>Arcobacter</i> (Levican <i>et al.</i> , 2014); (Levican <i>et al.</i> , 2013)	16
Tabulka 3 Biochemické testy pro <i>Arcobacter</i> spp. (Levican <i>et al.</i> , 2014); (Levican <i>et al.</i> , 2013).....	17
Tabulka 4 Biochemické testy a rezistence na antibiotika pro <i>Arcobacter</i> spp. (Levican <i>et al.</i> , 2013).....	18
Tabulka 5 Pět metod pro izolaci a podmínky jejich inkubace (Merga <i>et al.</i> , 2011).....	49

SEZNAM ZKRATEK

A.	<i>Arcobacter</i>
AT	adenin-thymin
bp	base pair
C.	<i>Campylobacter</i>
CASA	Chromogenní Agar Selektivní pro <i>Campylobacter</i>
cDNA	complementary (komplementární) DNA
CFU	Colony Forming Unit (kolony tvořící jednotky)
dATP	deocyadenosintrifosfát
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
ddNTP	dideoxyribonukleotid
dUTP	deoxyuridintrifosfát
F	Flourofor
GC	guanin-cystein
KNO ₃	dusičnan draselný
MH	Mueller-Hinton agar
MPA	Masopeptonový agar
NaCl	chlorid sodný
NaOH	hydroxid sodný
NH ₃	amoniak
NO ₃	dusičnan
NO ₂	dusitan
PCR	Polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
Q	Quencher (zhášedlo)
qPCR	kvantitativní polymerázová řetězová reakce

rRNA	ribosomální RNA
RNA	ribonukleová kyselina
TSA	Tryptonový Sójový Agar
VBNC	Viable but non Culturable (životaschopná ale nekultivovatelná)

0. Úvod

Mikrobiologie se zabývá mikroorganismy ve vztahu k člověku, zvířatům a samotnému okolí. Mikroorganismy mohou žít v souladu s organismem člověka a zvířat, anebo mohou naopak škodit našemu organismu. Pokud mluvíme o mikroorganismech žijících v souladu, nazýváme je nepatogenní. Jedná se o takové druhy bakterií, které napomáhají ke správnému fungování orgánů, přispívají k funkcím metabolismu, a to jen díky využití prostředí daného hostitele (člověka, zvířete, rostliny). Existují mikroorganismy, takzvaní škůdci, kteří vznikli za určitých podmínek (slabou obranyschopností) hostitele. Na druhou stranu mikroby patogenní mohou vyvolat za určitých podmínek onemocnění. Patogenními mikroby se zabývá lékařská mikrobiologie, která zkoumá jejich přenos z okolí na člověka anebo ze zvířete na člověka, zkoumá také zneškodnění tohoto přenosu či nákazy samotné. Rozlišují se čtyři základní druhy mikrobů: viry, bakterie, prvoci a houby. Lékařská mikrobiologie se zabývá nejenom zneškodněním mikroorganismů, ale v první řadě původem onemocnění. Infekčním onemocněním a podmínkami výskytu infekce se zabývá klinická mikrobiologie.

Zástupci rodu *Arcobacter* jsou gramnegativní pohyblivé tyčinky. Nejvíce se vyskytuje v masných výrobcích jako je kuřecí, vepřové, hovězí a jehněčí maso a také dokonce v mléku, sýrů či měkkýších. Stále není jasná příčina, proč se vyskytují v odpadních vodách a potravinách.

Je považován za potravinový patogen – může zapříčinit onemocnění člověka anebo zvířete. Vyvolává lidskou bakterémií a průjem. Účinnou léčbou proti nim je podání antibiotik.

1. Rod *Arcobacter*

Bakterie *Arcobacter* byly poprvé izolovány jako aerotolerantní mikroorganismy podobný kamylobakterům z potrazených plodů skotů v roce 1977 (Ellis *et al.*, 1977). Bakterie byly zřazeny v roce 1991 do nového rodu *Arcobacter*. (Vandamme *et al.*, 1991). Během vývoje byly arkobaktery nejdříve přiřazeny do rodu *Campylobacter* spolu s kamylobaktery jsou zařazeny do čeledi *Campylobactarecae*, třídy *Epsilonproteobacteria* (Vandamme *et al.*, 1991).

Rod *Arcobacter* spp. má velice rozmanitá místa výskytu (živočišné, rostlinné a vodní). Někteří ze zástupců *Arcobacter* spp. jsou považováni za lidské enteropatogeny, to znamená, že mohou způsobovat u člověka a zvířat potíže v gastrointestinálním traktu, které vedou k průjmům. Arkobaktery jsou také považovány za potenciální zoonotické mikroorganismy, které mohou šířit infekci mezi zvířaty. Tato infekce se však potenciálně může šířit i na člověka (Collado a Figueras, 2011).



Obrázek 1 Buňky *Arcobacter* spp. zachycené el. mikroskopem (Snelling *et al.*, 2005)

Tento rod bakterií se řadí ke gramnegativním, aerobním bakteriím, tvořící zakřivené tyčinky a netvořící spory (viz Obrázek 1). Arkobaktery jsou pohyblivé bakterie, jejichž pohyb se podobá vývrtu. Svým tvarem připomínají buď šroubovici, anebo písmeno S. Šířka bakterií se pohybuje od 0,2-0,9 μm a jeho délka je od 0,5-3,6 μm . Zásadní podmínkou pro kultivaci je závislost jednotlivého druhu na teplotních podmínkách během růstu. Některé druhy nejsou schopny růst za aerobních podmínek, ale naopak rostou při mikroaerofilních podmínkách. Optimální teplota růstu se udává 15-42 $^{\circ}\text{C}$ při 5 % O_2 (Ferreira *et al.*, 2017).

1.1 Kultivace

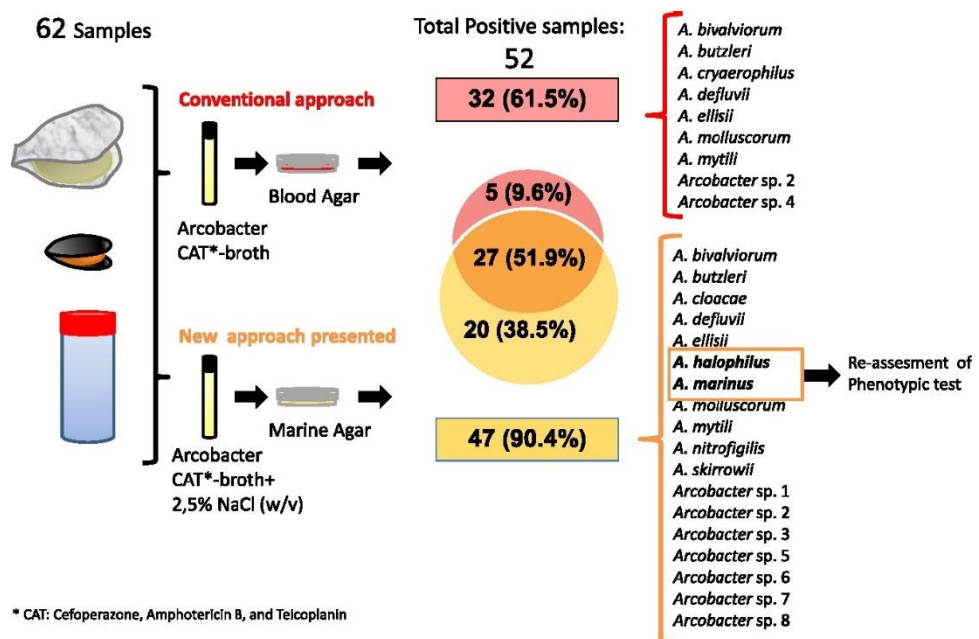
Ze sledování kultivace různých typů vzorků, jako jsou například mořské, sladké i odpadní vody, nebo vzorky zvířecí a lidské stolice, moče a masa, lze potvrdit výskyt rodu *Arcobacter*. Za důležitou součást výzkumu se považuje odebrání materiálu a jeho použití pro výzkumné účely. Odebrané materiály byly nejdříve odebrány z hospodářských zvířat (kuřata, prasata, skot, ovce a další), dále i z mořských živočichů (měkkýšů, konkrétně mušlí, škeblí, plže a tak dále) a nakonec se odebíraly i lidské vzorky. Kultivace mohou probíhat na speciálních kultivačních půdách za mikroaerofilních podmínek (Banting *et al.*, 2016).

Dříve, když byl rod *Arcobacter* součástí rodu *Campylobacter*, se používala celá řada médií vhodných pro kampylobaktery. Tato vhodná média mohou být například: TSA, CASA, MH a MPA (Banting *et al.*, 2016).

Tryptonový sójový agar (TSA) je takzvaným univerzálním médiem, který umožňuje růst daného mikroorganismu, a proto je vhodný nejen pro kultivaci kampylobakterů, ale i pro *Arcobacter* spp. Slouží jako takzvané počáteční médium a jeho hlavním účelem je pozorování morfologie kolonií. Obsahuje enzymatický hydrolyzát kaseinu, sójový pepton, NaCl a agar. Na tomto médiu vznikají krémově bílé kolonie. Jako dalším vhodným médiem pro kultivaci arkobakterů, slouží Mueller-Hintonův agar (MH). MH agar obsahuje hovězí extrakt, hydrolyzát kaseinu, škrobu a agar. Principem tohoto média je testování citlivosti na antibiotika. Běžně v rutinním vyšetření se používá MH agar s 5 % ovčí krví pro *Campylobacter* spp. (tedy i *Arcobacter* spp. může být užitečný) na testování citlivosti antibiotik. Vysoce účinným chromogenním médiem je takzvaný Chromogenní agar selektivní pro *Campylobacter* (CASA). Ten se používá pro vysoce selektivní výčet z *Campylobacter* spp. tudíž se hodí i pro *Arcoabcter* spp. Principem je umožnit snadnou intepretaci charakteristických kolonií, kdy po inkubaci (24–48 h) se projeví červené kolonie a příslušná selektivní činidla inhibují ostatní druhy (Le Bars *et al.*, 2011).

Pro kultivaci *Arcobacter* spp., bychom mohli použít i masopeptonový agar (MPA) takzvané základní médium využívané hlavně pro pomnožení nenáročných bakterií (Banting *et al.*, 2016).

Speciální agar pro růst arkobakterů takzvaný „*Arcobacter-CAT* agar“ obsahuje výživný bujón č. 2, aktivní uhlí, kaseinový hydrolyzát, deoxylát sodný, síran železnatý, pyruvát sodný, agar (pH 7,4 ± 0,2 při 25 °C). Například u nedávno popsaného *A. anaerophilus*, byly prokázány nutné anaerobní podmínky kultivace (Jyothsna *et al.*, 2013). Dalším členem rodu je *A. halophilus*, který se označuje jako halofilní bakterie a vyžaduje 2% chlorid sodný pro svůj růst na agaru (Donachie *et al.*, 2005). Nedávno byl *A. halophilus* spolu s *A. marinus* izolován z vody a měkkýšů za použití obohaceného tekutého média „*Arcobacter-CAT*“ doplněný 2,5 % NaCl (w / v) a následně kultivován na mořském agaru (Salas-Masso *et al.*, 2016), (viz Obrázek 2).



Obrázek 2 Kultivace *A. marinus* spolu s *A. halophilus* (Salas-Masso *et al.*, 2016)

Některé kmeny vykazují termotoleranci při teplotě 42 °C a také toleranci k 1,5 % NaCl (Vandamme *et al.*, 1992, Levican *et al.*, 2013).

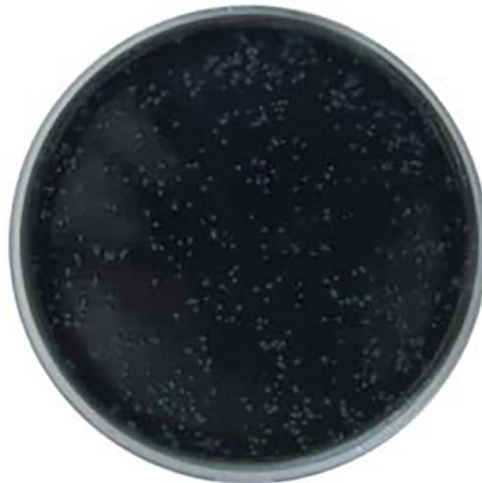
A. cryaerophilus byl izolován na agaru „*Arcobacter-CAT*“, který neobsahoval 2,5 % NaCl, což znamená, že nedokáže růst na agaru obsahující sůl. (Salas-Mass *et al.*, 2016). Za ideální prostředí pro růst arkobakterů je považováno minimální médium. Minimálním médiem se rozumí médium obsahující základní růstové faktory (viz Tabulka 1); (Banting *et al.*, 2016).

Některé druhy rodu *Arcobacter* mohou růst na selektivních půdách. Spousta druhů rodu *Arcobacter* roste i na MacConkeyho agaru, jehož principem je rozdělení bakterie na laktózu pozitivní, nebo negativní, bakterie metabolizující laktózu rostou do růžových až červených

kolonií. Za nejméně náročný druh, který roste na agaru obsahujícím laktózu, glukózu a citrát je *A. butzleri*, který má schopnost redukovat dusičnany (Vandamme *et al.*, 1992; Levican *et al.*, 2013). *A. butzleri* spolu s *A. skirrowii*, *A. molluscorum*, *A. theaeus*, *A. nitrofigilis* a dalšími druhy mohou růst buď za aerobních podmínek, nebo za mikroaerobních podmínek, nebo i kombinovaně při 37 °C (viz Tabulka 1).

Pro kultivaci vybraných druhů (viz Tabulka 1) lze použít Campy Blood-Free Selective Medium (CCDA), které obsahuje aktivní uhlí, síran železnatý a pyruvát sodný, výživný bujón č. 2, kyselý hydrolyzát kaseinu, deoxycholát sodný a je doplněn o cefoperazon. Principem CCDA média je použití cefoperazonu pro selektivní izolaci *Campylobacter* spp. tedy i *Arcobacter* spp. (viz Tabulka 1); (Sultana, 2017).

Pro kultivaci všech druhů *Arcobacter* spp. se používá krevní agar s 5 % ovčí krví, nebo speciálně obohacený agar „*Arcobacter*-CAT agar“ (Banting *et al.*, 2016).



Obrázek 3 *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar (CCDA), (Sultana, 2017)

Tabulka 1 Růstové možnosti *Arcobacter* spp.¹ v různorodém prostředí (Levicán *et al.*, 2014); (Levicán *et al.*, 2013)

<i>Arcobacter</i> spp. a rok	CCDA	Aerobní O ₂ při 37 °C	Mikroaerobní O ₂ při 37 °C	MacConkey agar	Minimální médium
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (1991)	+	+	+	–	–
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> (1991)	–	–	–	–	–
<i>Arcobacter butzleri</i> (1991)	+	+	+	+	+
<i>Arcobacter skirrowii</i> (1992)	+	+	+	–	–
<i>Arcobacter cibarius</i> (2005)	–	–	+	+	+
<i>Arcobacter halophilus</i> (2005)	–	+	+	–	–
<i>Arcobacter thereius</i> (2009)	–	–	–	+	+
<i>Arcobacter mytili</i> (2009)	–	+	+	+	–
<i>Arcobacter marinus</i> (2010)	–	+	+	–	–
<i>Arcobacter defluvii</i> (2011)	+	+	+	+	+
<i>Arcobacter ellisii</i> (2011)	+	+	+	+	+
<i>Arcobacter molluscorum</i> (2011)	–	+	+	+	–
<i>Arcobacter trophiarum</i> (2011)	+	–	–	+	–
<i>Arcobacter bivalvorum</i> (2012)	–	+	+	–	–
<i>Arcobacter venerupis</i> (2012)	+	–	+	+	+
<i>Arcobacter anaerophilus</i> (2013)	N	–	–	N	N
<i>Arcobacter cloacae</i> (2013)	+	+	+	+	+
<i>Arcobacter suis</i> (2013)	–	–	–	+	+
<i>Arcobacter aquimarinus</i> (2014)	–	+	+	–	–
<i>Arcobacter ebronensis</i> (2014)	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter lantieri</i> (2015)	+	+	+	+	N
<i>Arcobacter pacificus</i> (2016)	N	+	+	–	–
<i>Arcobacter haliotis</i> (2017)	+	+	+	–	–
<i>Arcobacter lekithochrous</i> (2017)	–	–	–	–	–
<i>Arcobacter canalis</i> (2018)	N	+	+	+	+

¹ „+“ znamená pozitivní růst arkobakterů; „–“ znamená, že nerostou a N znamená neprokázán tímto testem

Tabulka 2 Schopnost růstu za specifických podmínek pro jednotlivé zástupce *Arcobacter* (Levican *et al.*, 2014); (Levican *et al.*, 2013)

<i>Arcobacter</i> spp. a rok	Živné médium s obsahem		
	0,05 % safraninu	0,01 % deoxylát sodný	0,04 % TTC
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (1991)	+	+	+
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> (1991)	–	–	–
<i>Arcobacter butzleri</i> (1991)	+	+	+
<i>Arcobacter skirrowii</i> (1992)	+	+	–
<i>Arcobacter cibarius</i> (2005)	+	+	–
<i>Arcobacter halophilus</i> (2005)	–	–	–
<i>Arcobacter thereius</i> (2009)	+	–	–
<i>Arcobacter mytili</i> (2009)	–	+	–
<i>Arcobacter marinus</i> (2010)	+	–	–
<i>Arcobacter defluvii</i> (2011)	–	+	–
<i>Arcobacter ellisii</i> (2011)	–	+	–
<i>Arcobacter molluscorum</i> (2011)	+	+	–
<i>Arcobacter trophiarum</i> (2011)	+	+	+
<i>Arcobacter bivalvorum</i> (2012)	–	–	–
<i>Arcobacter venerupis</i> (2012)	–	–	–
<i>Arcobacter anaerophilus</i> (2013)	N	N	N
<i>Arcobacter cloacae</i> (2013)	+	+	–
<i>Arcobacter suis</i> (2013)	+	+	+
<i>Arcobacter aquimarinus</i> (2014)	+	+	–
<i>Arcobacter ebronensis</i> (2014)	+	–	–
<i>Arcobacter lanthieri</i> (2015)	N	N	+
<i>Arcobacter pacificus</i> (2016)	N	N	N
<i>Arcobacter haliotis</i> (2017)	+	–	–
<i>Arcobacter lekithochrous</i> (2017)	+	–	+
<i>Arcobacter canalis</i> (2018)	+	N	N

Tabulka 3 Biochemické testy pro *Arcobacter* spp. (Levican *et al.*, 2014); (Levican *et al.*, 2013)

<i>Arcobacter</i> spp. a rok	Produkce					
	Sulfanu	Amylázay	Gelatinázy	Kyselin	Citrátu	Dusičnanů
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (1991)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> (1991)	+	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter butzleri</i> (1991)	+	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter skirrowii</i> (1992)	–	–	–	–	–	–
<i>Arcobacter cibarius</i> (2005)	–	–	–	–	–	–
<i>Arcoabcter halophilus</i> (2005)	–	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter thereius</i> (2009)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter mytili</i> (2009)	–	N	N	N	N	–
<i>Arcobacter marinus</i> (2010)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter defluvii</i> (2011)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter ellisii</i> (2011)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter molluscorum</i> (2011)	–	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter trophiarum</i> (2011)	N	N	N	N	N	–
<i>Arcobacter bivalvorum</i> (2012)	–	N	N	N	N	–
<i>Arcobacter venerupis</i> (2012)	–	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter anaerophilus</i> (2013)	+	–	–	N	+	+
<i>Arcobacter cloacae</i> (2013)	–	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter suis</i> (2013)	–	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter aquimarinus</i> (2014)	–	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter ebronensis</i> (2014)	–	N	N	–	N	–
<i>Arcobacter lantieri</i> (2015)	–	–	–	–	–	+
<i>Arobacter pacificus</i> (2016)	–	–	+	–	–	+
<i>Arcobacter haliotis</i> (2017)	–	N	N	N	–	+
<i>Arcobacter lekithochrous</i> (2017)	–	N	–	–	–	–
<i>Arcobacter canalis</i> (2018)	+	–	–	–	–	–

Tabulka 4 Biochemické testy a rezistence na antibiotika pro *Arcobacter* spp. (Levican *et al.*, 2013)

<i>Arcobacter</i> spp. a rok	Hydrolyza			Rezistence	
	Kaseinu	Leutinu	Indoxylacetátu	Cefalotin	Cefoperazon
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> (1991)	–	–	+	+	–
<i>Arcobacter nitrofigilis</i> (1991)	N	N	N	+	N
<i>Arcobacter butzleri</i> (1991)	–	–	+	+	–
<i>Arcobacter skirrowii</i> (1992)	–	–	+	+	–
<i>Arcobacter cibarius</i> (2005)	–	–	+	+	+
<i>Arcobacter halophilus</i> (2005)	–	–	+	+	+
<i>Arcobacter thereius</i> (2009)	–	–	+	+	+
<i>Arcobacter mytili</i> (2009)	N	N	–	N	–
<i>Arcobacter marinus</i> (2010)	–	–	+	–	–
<i>Arcobacter defluvii</i> (2011)	–	–	+	–	+
<i>Arcobacter ellisii</i> (2011)	–	–	+	–	+
<i>Arcobacter molluscorum</i> (2011)	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter trophiarum</i> (2011)	N	N	+	+	+
<i>Arcobacter bivalvorum</i> (2012)	–	–	+	N	+
<i>Arcobacter venerupis</i> (2012)	–	–	+	–	+
<i>Arcobacter anaerophilus</i> (2013)	+	N	N	N	N
<i>Arcobacter cloacae</i> (2013)	–	–	+	N	+
<i>Arcobacter suis</i> (2013)	–	–	+	N	+
<i>Arcobacter aquimarinus</i> (2014)	–	–	+	–	–
<i>Arcobacter ebronensis</i> (2014)	–	–	+	N	–
<i>Arcobacter lanthieri</i> (2015)	–	N	+	N	N
<i>Arcobacter pacificus</i> (2016)	–	–	+	–	–
<i>Arcobacter haliotis</i> (2017)	N	N	N	N	+
<i>Arcobacter lekithochrous</i> (2017)	–	–	–	–	+
<i>Arcobacter canalis</i> (2018)	–	–	–	+	+

1.2 Biochemické testy

Pro identifikaci kmenů, které patří do rodu *Arcobacter* se používají biochemické testy (viz Tabulka 3 a 4). Za typické biochemické testy se považuje pozitivní aktivita na katalázu a ureázu (*A. canalis*, *A. defluwii*, *A. haliotis*, *A. lanthieri*, *A. lekithochrous*, *A. nitrofiginilis*, *A. thereius*), schopnost redukovat dusičnany (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. molluscorum*, *A. pacificus*, *A. marinus*, *A. lekithochrous*, *A. lanthieri*, *A. halophilus*, *A. haliotis*, *A. defluwii*, *A. nitrofiginilis*, *A. anaerophilus*) a některé jsou schopny hydrolyzovat indoxylacetát (*A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus*, *A. thereius*, *A. nitrofiginilis*, *A. cibarius*, *A. defluwii*, *A. halophilus*, *A. lanthieri*, *A. marinus*, *A. pacificus*, *A. trophiarum*); (Colado a Figueras, 2011). Některé druhy také mohou vykazovat negativní aktivitu na katalázu (*A. butzleri*, *A. anaerophilus*, *A. halophilus*, *A. marinus*) a ureázu (*A. anaerophilus*, *A. trophiarum*, *A. bilvalvorum*, *A. pacificus*, *A. cibarius*, *A. butzleri*, *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. marinus*, *A. thereius*, *A. skirrowii*, *A. molluscorum*, *A. cryaerophilus*) a naopak mohou projevit pozitivní aktivitu na katalázu (*A. thereius*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. molluscorum*, *A. trophiarum*, *A. bilvalvorum*); (Colado a Figueras, 2011).

Důkaz katalázy se provádí kvůli rozlišení druhů rodu *Arcobacter*. Některé druhy arko-bakterů mohou obsahovat enzym kataláza (rozkládá peroxid vodíku na vodu a molekulu kyslíku). Principem je zjištění, zda testovaná bakterie má přítomný enzym, dochází tak ke vzniku bublin (Harraß *et al.*, 2010)

Důkaz ureázy se provádí na půdě s močovinou. Principem je produkce ureázy, která rozkládá močovinu a dochází tak k alkalizovanému prostředí a zružovění půdy za přítomnosti indikátoru (Harraß *et al.*, 2010).

Redukce dusičnanů na dusitany spočívá ve stanovení aktivity nitrátasy. Bakterie mohou redukovat dusičnany několika způsoby: asimilací (dusičnany se redukují a dusitany a dále vzniká amoniak, který je důležitý pro syntézu aminokyselin), disimilací (mikroby využívají dusičnany jako konečným akceptorem elektronu za nepřítomnosti kyslíku: $\text{NO}_3 \rightarrow \text{NO}_2 \rightarrow \text{NH}_3$ tato reakce je iniciována enzymem nitrátoreduktasou) a denitrifikací (některé mikroby mohou redukovat dusičnany až na dusík nebo dusitany). Stanovení redukce dusičnanů obvykle probíhá růstem mikrobů za přítomnosti KNO_3 . Během růstu vznikají dusitany, které se dokazují kyselinou sulfanilovou a α -naftylaminem. Dusitany s kyselinou vytváří diazoniovou sůl, která s α -naftylaminem dává za vzniku červeného azobarviva (Harraß *et al.*, 2010).

Hydrolyza indoxylacetátu (LAH) je snadno čitelná, dochází k hydrolyze uvolňující indoxyl ze sloučeniny indoxylacetátu. Za přítomnosti vzduchu dochází ke změně barvy na indigo bílý z indigo (Harraß *et al.*, 2010).

Mezi další biochemické testy vhodné k identifikaci rodu *Arcobacter* řadíme produkci sulfanu, gelatinázy, kyselin, citrátu a také hydrolyzu leucinu, škrobu (na důkaz amyláz) a kaseinu, které se dají zjistit za pomoci systému API®CAMPY (viz Tabulka 4, Obrázek 4); (Harraß *et al.*, 2010).

Většina druhů arkobakterů je rezistentní na konkrétní antibiotika (např. cefalotin, cefoperazon); (viz Tabulka 4). Rezistence na antibiotika znamená, že bakterie dokážou růst i za přítomnosti antibiotik (Schindler, 2014).



Obrázek 4 Biochemické testy pro identifikaci *Arcobacter* spp. (převzato z **Biomérieux**)

1.3 Chemotaxonomie

Chemotaxonomie, nebo chemosystematika je odvětví taxonomie, které využívá kvalitativních i kvantitativních shod a odlišností ve výskytu chemických látek v tělech nebo skeletech organismů ke stanovení příbuzenských vztahů. Kmeny rodu *Arcobacter* obsahují respirační chinony, které jsou považovány za citlivé indikátory aerobního metabolismu a anaerobního metabolismu v bakteriálních populacích (Hegnauer, 2001).

Respiračními chinony jsou ubiquinony, které lze nalézt v eukaryotech a existují v některých gramnegativních bakteriích. Dalšími jsou menachinony, které lze nalézt v gramnegativních, grampozitivních bakteriích. Desmethylmenachinony nejsou tak široce distribuovány a je možné je nalézt v některých patogenních enterobakteriích a *Streptococcus faecalis* (Hegnauer, 2001). Příkladem respiračních chinonů v rodě *Arcobacter* jsou menachinon 6 a 7 (*A. haliotis*). U *A. lekithochrous* i *A. pacificus* je hlavním chinonem mastná kyselina 6.

mikroorganismů, představující vážné riziko pro lidské zdraví (Vandenberg *et al.*, 2004). *A. butzleri* je klasifikován jako potenciální lidský enteropatogen. Při nepříznivých podmínkách ztrácí svoji kultivovatelnost, ale přesto je schopný života a růstu v tzv. VBNC formách (Vandamme *et al.*, 1992). Tento druh byl poprvé izolován z pohlavních tekutin býků a skotu. Dále byl izolován ze vzorků studničních, pitných vod a dutiny ústní kočky (Houf *et al.*, 2002, Fera *et al.*, 2010). Tento druh byl často izolován i z potravin (Bangkok), kde se prokázala vyšší prevalence, než u běžných enteropatogenů (*Salmonella* či *Campylobacter*). Je spojen s enteritidou a bakterémií. Mezi příznaky arkobakteriózy patří bolest břicha, nauzea, zvracení, horečka nebo vodnaté průjmy. (Vandenberg *et al.*, 2004; Vandamme *et al.*, 1992).

Arcobacter cryaerophilus

Tento druh je spojen s enteritidou a příležitostně bakterémií. Vyskytuje se ve znečištěných pitných vodách. Také byl izolován z ústní dutiny zvířat, výkalů koček i psů. (Neill *et al.*, 1985; Vandamme *et al.*, 1991).

Arcobacter skirrowii

Tento druh byl nalezen ve výkalech hospodářských zvířat, v odpadních a fekálně kontaminovaných vodách. Způsobuje chronické průjmy. Je nejčastějším izolovaným a identifikovaným druhem spolu s *A. cryaerophilus* a *A. butzleri* (Lehnera *et al.*, 2005; Vandamme *et al.*, 1992).

Arcobacter thereius

Hlavním zdrojem *A. thereius* jsou zvířata (v játrech, ledvinách, kloakách). Na krevním agaru za mikroaerofilních podmínek po 72 h při 28 °C tvoří bělavé a hladce zaoblené kolonie o průměru 2 mm. Průsvitné až neprůhledné kolonie s hladkým zaoblením o průměru 1-2 mm jsou patrné na „*Arcobacter*-selektivním agaru“ (Houf *et al.*, 2009).

Arcobacter defluwii

Důležitým rezervoárem pro *A. defluwii* je odpadní voda a kanalizace. Týká se to hlavně odpadních vod ve Milwaukee, Reus (Španělsko). Na krevním agaru za aerobních podmínek při 30 °C po 48 h vyrůstají béžové až bílé kolonie s kruhovým okrajem (Collado *et al.*, 2011).

Arcobacter halophilus a *Arcobacter marinus*

Významným zdrojem pro tyto bakterie je mořská voda a znečištěná sladká voda. *A. marinus* se vyskytuje v mořských řasách a hvězdicích. *A. marinus* vyrůstá na mořském agaru po 3 dnech při 37 °C v krémově bílých koloniích. Za vhodných podmínek inkubace na SBA (Sheep Blood Agar) vyrůstaly kolonie nepravidelné a šedé (Kim *et al.*, 2010).

Co se týče *A. halophilus* tak na krevním agaru obsahující 5 % ovčí krev a 3,5 % NaCl, který byl inkubován 72 hodin při 18-22 °C, má vzhled hladkých bílých kolonií (Donachie *et al.*, 2005).

Arcobacter nitrofigilis

A. nitrofigilis je méně vyskytujícím se druhem. Nalézají se v kořenech nebo kolem kořenů *Spartina alternativa*, což je vytrvalá listnatá tráva, která se nachází v mokřadech a zejména v ústí řek. Může se také nalézat v mořích, mase a měkkýších. Má podobné vlastnosti jako *C. nitrofiginilis*, jak kultivačně, tak biochemicky (Vandamme *et al.*, 1991).

Arcobacter mytili

A. mytili patří také k méně často izolovaným druhům. Za hlavní rezervoár *A. mytili* jsou považovány mušle. Protože mořské plody jsou velmi oblíbenou pochoutkou, je velmi důležité dodržovat hygienické předpisy při jejich zpracování a zajistit kvalitu a čerstvost těchto potravin s důrazem na zajištění veřejného zdraví (Collado *et al.*, 2009).

Arcobacter molluscorum

Zdrojem výskytu této bakterie jsou stejně jako u *A. mytili* mušle, ale častěji byla izolována z měkkýšů. Na krevním agaru inkubovaném za aerobních podmínek při teplotě 30 °C po dobu 48 h jsou vyrůstající kolonie béžové až téměř bílé (Figueras *et al.*, 2011).

Arcobacter cibarius

Největším výskytem pro *A. cibarius* je potrava (nejčastěji drůbež). Za nejčastější izolaci této bakterie je kůže zdechliny (kuřecí) z Belgie (2002). Na krevním agaru za mikroaerobních podmínek, inkubace při 30 °C po dobu 72 h, vyrůstá v bělavých hladce zaoblených koloniích. Na „selektivním-Arcobacter“ agaru tvoří průhledné, matné a hladce kolonie o průměru 1-2 mm (Houf *et al.*, 2005).

Arcobacter trophiarum

A. trophiarum byl izolován z výkalů selat (Belgie). Na krevním agaru za mikroaerofilních podmínek, inkubace 48 h při 30 °C, vyrůstá v bělavých, hladkých koloniích. Na „selektivním-*Arcobacter*“ agaru jsou kolonie průsvitné až neprůhledné s hladkým zaoblením (De Smet *et al.*, 2011).

Arcobacter suis

Hlavní údaje o výskytu této bakterie pochází z oblasti Španělska. Konkrétně byly nalezeny ve vepřovém mase, hnoji, a i v buvolím mléce. Dokonce byla tato bakterie objevena při zpracování špenátu. *A. suis* je bakterie, která může vyvolat potrat u prasat. Kultivace je možná při 30 °C po dobu 48 h za aerobních podmínek na anaerobním bazálním agaru, který obsahuje 5 % koňské krve (Giacometti *et al.*, 2015b; Levican *et al.*, 2013).

Arcobacter bilvalvorum

Tento druh má širokou škálu hostitelů, může být izolován i z vodního prostředí, kde žijí korýši. Hlavně byl izolován z mušlí, které se vyskytovaly v okolí Španělska. Přežívá v aerobním prostředí při 30 °C. Kultivace se provádí na anaerobním bazálním agaru obsahující 5 % koňskou krev (Levican *et al.*, 2012).

Arcobacter anaerophilus

Tato bakterie byla izolována v ústí a sedimentu řek v Bengálsku a Indii. *A. anaerophilus* patří mezi nepohyblivé zástupce rodu *Arcobacter*. Na nitrátovém agaru za anaerobních podmínek vyrůstá v koloniích světle žluté barvy. Může růst na médiích, které mají omezenou přítomnost zdroje uhlíku. (Sassi *et al.*, 2013).

Arcobacter canalis

A. canalis byl izolován z mušlí, ústřic a neošetřené městské kanalizace z různých částí Španělska (Pobleno, Katalánsko). *A. canalis* vyrůstá na mořském agaru ve světle žlutých až bledě oranžových koloniích (Perez-Cataluna *et al.*, 2018).

Arcobacter haliotis

Tento kmen byl nalezen v ušních *Haliotis gigantia*. Jeho bílé kolonie lze spatřit na mořském agaru inkubovaném 3 dny při 25 °C (Tanaka *et al.*, 2017).

Arcobacter lanthieri

Hlavní výskyt této bakterie byl v místech chovu prasat a skotu v Kanadě. Na modifikovaném agaru *Arcobacter* po inkubaci 3 dny při 30 °C tvoří malé, průsvitně bělavé až béžové kolonie. Nefermentuje sacharidy (Whiteduck-Léveillé *et al.*, 2015).

Arcobacter lekithochrous

Tento kmen se nachází v mlži hřebenatky (*Pecten maimus*) a mořské vodě v Norsku. Na mořském agaru vyrůstají kolonie malé a lehce nahnědlé (Dieguez *et al.*, 2017).

Arcobacter pacificus

A. pacificus se vyskytuje v povrchové mořské vodě v Jižním Pacifiku, proto se tak i nazývá. Na mořském agaru za aerobních podmínek, inkubovaný 48 h při 37 °C vyrůstá ve světle žluté, kruhové kolonie (Zhang *et al.*, 2016).

Arcobacter aquimarinus

A. aquimarinus je endemit na pobřeží Španělska (oblast Katalánska). Z jeho názvu „aqua“ je patrné, že ke svému životu potřebuje vodu, hlavně v oblasti Středozemního moře. Na krevním agaru za aerobních podmínek, inkubovaný 48 h při 30 °C, vyrůstá v béžovou až téměř bílou kolonii (Levican *et al.*, 2015).

Arcobacter cloacae

Tento druh byl izolován z měkkýšů, ropných zásobníků v Číně, průmyslového digestoře v Mexiku a z čistírny odpadních vod v Reusu, Katalánsku ve Španělsku. Na krevním agaru za aerobních podmínek, inkubovaný 48 h při 30 °C, vyrůstá kolonie stejná jako *A. aquamarinus* (Levican *et al.*, 2013).

Arcobacter ebronensis

A. ebronensis je přítomný v mušlích odebraných z delty řeky Ebro v Katalánsku, která je jedna z nejdelších a nejvýznamnějších řek na Pyrenejském ostrově. Jedná se o taxonomickou bakterii. Na krevním agaru za aerobních podmínek inkubovaný 48 h při 30 °C, se tvoří béžové až bílé hladké kolonie (Levican *et al.*, 2015).

Arcobacter venerupis

Název *A. venerupis* pochází z mlže, konkrétně se jedná o druh škeble zvané *Venerupis pullastra*. Tento druh škeble se hlavně vyskytuje ve Španělsku (v oblasti Ferrolu, Galicie), Portugalsku, Francii a Itálii. Na krevním agaru za aerobních podmínek, inkubovaný 48-78 h při 30 °C, tvoří bílou a kruhovou kolonii (Levican *et al.*, 2012).

Arcobacter ellisii

Název *A. ellisii* pochází od objevitele a zkoumatele Ellise. Nachází se v mušlích, které můžeme získat z řek v oblasti Španělska. Na krevním agaru za aerobních podmínek, inkubovaný při teplotě 48 h při 30 °C, vytváří téměř bílé a kruhové kolonie (Figueras *et al.*, 2011).

2. Molekulárně-biologické metody

Molekulární biologie je vědním oborem, který se zabývá buněčnými procesy na jejich molekulární úrovni. Jde o studie zkoumající fungování biologických jevů, dále studuje strukturu makromolekul DNA, RNA a proteinů, jejich vzájemnou interakci a regulaci funkce. Molekulární biologie integruje s biologickými, chemickými a fyzikálními obory (Albert *et al.*, 2002; Bresler, 1966).

2.1 Metody molekulární biologie

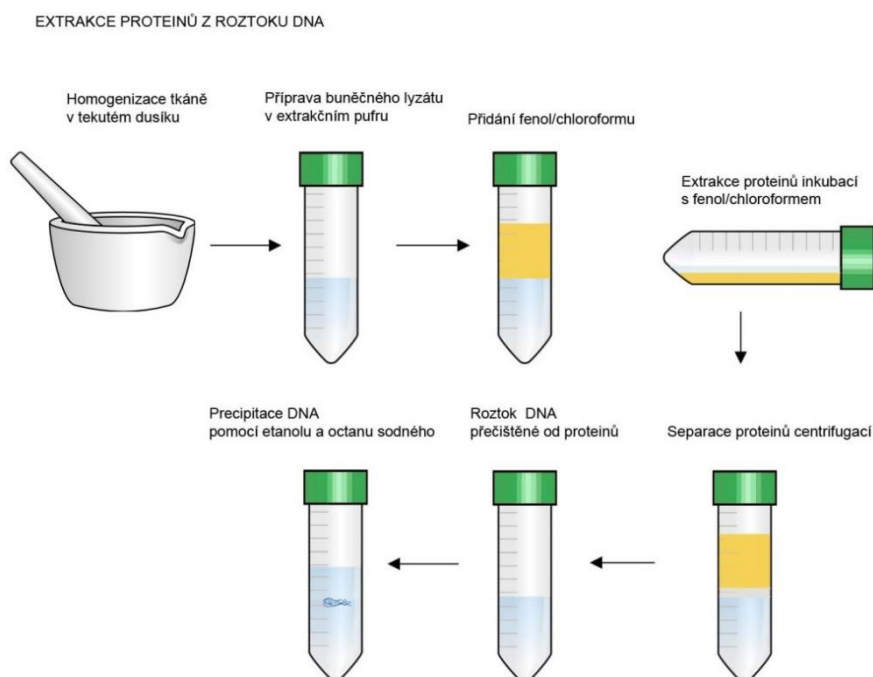
Metody molekulární biologie umožňují analýzu biologicky významných molekul, které nesou genetickou informaci (nukleové kyseliny, bílkoviny). Za posledních dvacet let se rozvoj metod zlepšil, velmi rychle se rozvíjely genotypové metody. Ty se zaměřují na polymorfizmu molekul DNA a RNA (Albert *et al.*, 2002). Poskytují tedy velmi přesné, objektivní a reprodukovatelné výsledky a mohou identifikovat nekultivovatelné mikroorganismy. Genotypové metody se zaměřují na celkovou DNA, určitý úsek DNA, RNA anebo analýzu plazmidové DNA. Díky tomu se dnes využívají v klinické diagnostice, léčbě a profylaxích lidských nemocí (Šmarda, 2010).

Za nejvyužívanější metodu dnes řadíme polymerázovou řetězovou reakci (PCR). K dalším metodám molekulární biologie můžeme zařadit separační a charakterizační metody např. chromatografie, elektroforéza, elektronová mikroskopie a spektroskopie. V dnešní době se pro identifikaci bakterií vyvinula celá řada metod (Albert *et al.*, 2002). Za klasické neamplifikační metody řadíme hybridizace jako je Southern blot a Northern blot, kdy vzorek obsahuje velké množství DNA či RNA a nedochází k amplifikaci (zmnožení) (Pavlík, 1999c). Oproti tomu amplifikační metody jsou založeny na polymerázové řetězové reakci (PCR) značené vysokou specifitou a senzitivitou. Jsou funkční i při malém množství cílových nukleových kyselin ve vzorku. Pro všechny molekulárně-biologické techniky je důležitý první krok – izolace (Pavlík, 1999c; Šmarda, 2010).

2.2 Izolace

Izolace je prvním krokem při provádění genotypových metod, jde o extrakci nukleových kyselin (chromosomální či plasmidová DNA, virová DNA či RNA) a oddělení od ostatních složek buňky (Bursová *et al.*, 2014). Izolace se provádí ze vzorku, pomnožovacího média nebo z kolonií mikroorganismu. O úspěšnosti výsledků rozhoduje správně zvolený výběr

techniky na základě množství a kvality nukleových kyselin (viz Obrázek 6). Můžeme izolovat dva typy nukleových kyselin z prokaryot a virů. (Bursová *et al.*, 2014; Šmarda, 2010).



Obrázek 6 Izolace genomové DNA (převzato z **LabGuide**)

Izolace DNA prokaryot dochází k narušení buněčných membrán a uvolnění buněčného obsahu a také zahrnuje odstranění RNA od DNA. K oddělení se využívají jak detergenty iontové povahy (soli žlučových kyselin), neionogenní detergenty (Triton X100), nebo ultrazvuk (Šmarda, 2010). K uvolnění a oddělení buněčného obsahu se využívá ohřev, srážení organickými rozpouštědly, vysolování, fenol-chloroformová extrakce, chelatační iontoměničové pryskyřice atd. Degradace molekuly RNA je možné za použití enzymu RNasy (ribonukleasy), nebo proteinasy (Bursová *et al.*, 2014).

Izolace genomové DNA virů se provádí přímo z buněk ze vzorku. Zahrnuje navíc krok, kdy je nutné oddělit obsahující nízkomolekulární DNA (viru) od vysokomolekulární DNA (hostitele) za použití vysrážením chloridem lithným. Zbývající nízkomolekulární DNA se extrahuje vysrážením ethanolem, nebo isopropanolem (Bursová *et al.*, 2014).

Izolace genomové RNA virů je složitější, kdy zahrnuje další krok pro ochranu RNA před rozkladem RNasou. RNasa je protein, který odolává mnohým chemickým činidlům a je též termorezistentní (Šmarda, 2010). Za inhibitor RNasy se používá guanidin thiokyanátu (GTC).

Příklady genotypizačních metod k analýze genomů virů: pro adenoviry se používá RFLP-analýza, pro Flaviviry (Virus horečky Dengue) se využívá sekvenování genomu a pro Paramyxoviry (Virus spalniček) se používá RT-PCR-RFLP-analýza (Brusová *et al.*, 2014; Šmarda, 2010).

2.3 Amplifikační metody

2.3.1 PCR

PCR (angl. *polymerase chain reaction* neboli polymerázová řetězová reakce) je používaná metoda k množení specifického úseku DNA *in vitro*. Jeho princip je podobný jako replikace DNA *in vivo* (Pavlík, 1999a). Zkopírovaný úsek DNA je syntetizován dle templátu, tzv. jednořetězové DNA za pomoci DNA-polymerázy na principu komplementarity bazí (Šmarda, 2010). Komplementarita bazí je způsob, kdy dochází ke spojování nukleových bazí, jak v DNA či RNA, za pomoci vodíkových můstků (White *et al.*, 1992). K párování bazí dochází mezi adeninem a thyminem (při RNA s uracilem) a guaninem s cysteinem (Pavlík, 1999a).

V průběhu PCR se střídají opakovaně 3 kroky:

- 1) **Denaturace** – kdy při 95 °C dochází k uvolnění vodíkových můstků a z dvouřetězové DNA (*dsDNA*) vznikne jednořetězová DNA (*ssDNA*).
- 2) **Annealing** – připojení (hybridizace) primerů k templátu, probíhá při 50 až 65 °C. Dochází tak k ohraničení cílové sekvence. Tento krok závisí jak na teplotě tání primerů, tak i na nukleotidových sekvencích.
- 3) **Elongace** – poslední krok, kdy dochází ke vzniku nového vlákna DNA při 72 °C a za pomoci DNA-polymerasy, 2'-deoxyribonukleosid-5'-trifosfáty.

Protože je nutné znát přesné hodnoty teplot a dobu trvání jednotlivých kroků. Tak celý proces amplifikace probíhá v přístroji termocykler, kde se teplota mění v časových intervalech, které jsou naprogramovány (Pavlík, 1999a). Pro správný průběh PCR se připravují reakční směsi. Reakční směsi se používají k zabránění kontaminace vzorku, jsou to takzvané slepé kontroly (Mullis *et al.*, 1994; Pavlík, 1999a). Její složení obsahuje templátovou DNA (ze vzorku), primery, směsi nukleotidů ve formě trifosfátů (dNTP, dATP) a termostabilní enzym polymerázu (*Taq*) a pufr obsahující Mg^{2+} ionty (pro aktivitu enzymu), dnes se používá systém AmpEraseTM (Uracil-N-glykosylasa). Pro detekci mohou být některé

směsi značeny, například nukleotidy se značí digoxigeninem, primery na 5'konci bývají značeny biotinem (Šmarda, 2010).

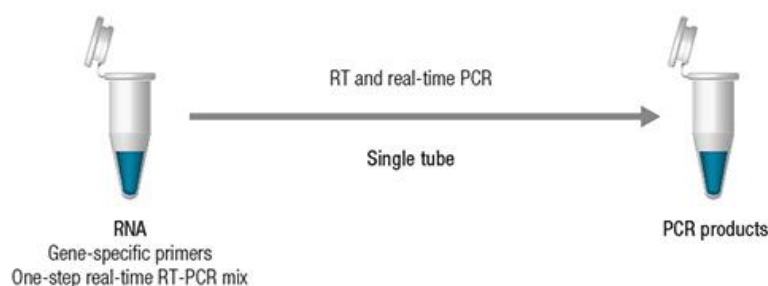
Výsledný produkt (nový úsek DNA) lze stanovit gelovou elektroforézou, štěpením restričních enzymů, RFLP (vznikají restriční fragmenty), hybridizací či sekvenováním (Pavlík, 1999a). Pro syntézu cDNA podle RNA se využívá reverzní PCR (RT-PCR), která potřebuje reverzní transkriptázu (Mullis *et al.*, 1994; Šmarda, 2010).

Nested PCR

Jedná se o oblíbenou metodu používanou k vědeckým i diagnostickým účelům v laboratořích. Využívá jak vnější, tak vnitřní primery. Amplifikace probíhá dvoufázově (Pavlík, 1999a). V prvním kroku dochází k amplifikaci za přítomnosti první, vnější dvojice primerů. Poté následuje druhý krok, kdy vzniklý produkt PCR tzv. matrice, se amplifikuje s druhou, vnitřní dvojicí primerů (Pavlík, 1999a).

Reverzní PCR (RT-PCR)

Tato metoda *in vitro* amplifikuje molekulu RNA. Dochází k detekci RNA přepsáním na cDNA (komplementární DNA) za pomoci enzymu reverzní transkriptázy (viz Obrázek 7). Tento enzym je termolabilní (nesnášenlivý teploty nad 40 °C) (Pavlík, 1999a). Řetězce RNA tvoří často svoje stabilní sekundární struktury, a tak nemusí být transkripce dokonalá. Proto se využívá enzymu *Tth* DNA-polymerasa (RNA-dependentní DNA-polymerasa), která umožňuje nejen přepis RNA do DNA při teplotě 72 °C, ale i vlastní amplifikaci a tvorbu PCR produktu (Pavlík, 1999a).



Obrázek 7 Reakce reverzní PCR (převzato z **Bioline**)

In situ-PCR

Jedná se o speciální metodu, kdy probíhá amplifikace specifické sekvence přímo v buňce nebo tkáni. (Bursová *et al.*, 2014) Při postupu je nutné zahrnutí fixace buněk k podložnímu sklíčku a nastavení podmínek pro permeabilitu nezbytných reagensů (v PCR) do buňky. *In situ* detekce probíhá buď hybridizací nebo imunochemicky (Šmarda, 2010).

Repetitivní PCR (REP-PCR)

Je to metoda, při níž dochází k oddělení opakující se sekvenci takzvané repetici. Prokaryotické i eukaryotické genomy obsahují repetici a mezi repetitivní elementy se v prokaryotním genomu nacházejí i krátké nekódující sekvence. Výhodou je, že se dá díky této metodě získat charakteristický amplikon pro daný mikroorganismus (Šmarda, 2010). Jednotlivý profil jejich genomu je zobrazený spektrem PCR produktů nazývaný fingerprint. A pak jsou jednotlivé amplikony porovnávány s typovými kmeny v počítačovém systému, který vytvoří dendogram a identifikuje izoláty. (Bursová *et al.*, 2014) K nejčastěji používaným primerům při REP-PCR u prokaryot náleží například (GTG)₅, Rep-elementy, BOX-elementy atd. Na druhou stranu při REP-PCR u eukaryot náleží dle amplifikujících markerů, které jsou například: komplementární markery (ISTR), (GATA)₄, nebo reakce s jedním primerem (Šmarda, 2010).

Náhodná PCR (RAPD)

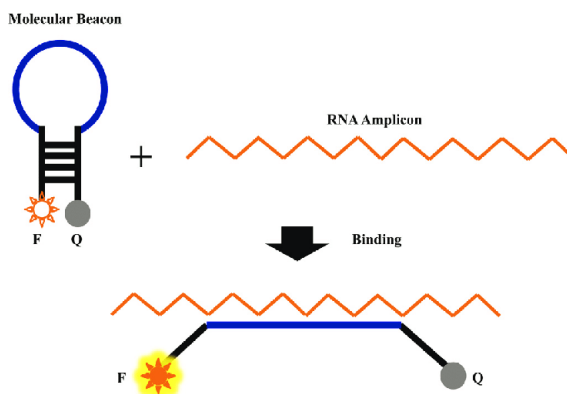
Za rychlou, jednoduchou a fingerprintovou metodu, pro zobrazení profilu DNA konkrétního mikroorganismu, řadíme náhodnou PCR (Bursová *et al.*, 2014). Používá se pro identifikaci a typizaci druhů bakterií. Podobně jako u REP-PCR vzniká soubor amplikonů na základě vázanosti primeru (oligonukleotidového) k templátové DNA (Šmarda, 2010). Amplikony se mohou detekovat za pomoci agarózové gelové elektroforézy, kdy jsou detekovány amplifikované fragmenty o různé velikosti a tím vzniká specifický fingerprint pro testující mikroorganismus (Šmarda, 2010).

„Real-time“ PCR (qPCR)

Jedná se o metodu poskytující velmi přesnou, reprodukovatelnou kvantifikaci genomových kopií. Akumulaci produktu PCR se měří za pomoci fluorescenčních barviv, fluorescenčně značených sond s dvojitou značkou (*TaqMan*) nebo značených primerů (LUX, AmpliFlourTM). Nejdříve se používají barviva př. SYBR[®] Green I, které fluoreskují po

vazbě na dvouřetězcová DNA (Bursová *et al.*, 2014). Zvýšením množství PCR produktu se zvýší i fluorescenční signál. Nevýhodou je nerozlišení PCR produktu od nespecifických naamplifikovaných sekvencí. (Šmarda, 2010) Další způsob detekce je za využití sond, které se komplementárně váží na vnitřní část amplikonu. Příkladem fluorescenčně značených hybridizačních sond jsou fluorofory (FAM), zhášec (TAMRA), nebo sonda TaqMAN TM, kdy lze snímat fluorescenci až po rozložení sondy za pomoci enzymu *Taq* DNA-polymerasy při elongaci ((Bursová *et al.*, 2014; Šmarda, 2010).

Dalším typem sond mohou být takzvané molekulární majáky. Molekulární majáky jsou specifické oligonukleotidy obklopené krátkými repeticemi, kdy vzniká vlásenka se smyčkou (Li J. a McDonald J., 2014). Pokud je F (Fluorofor) a Q (Quencher – zhášedlo) blízko sebe nedochází ke vzniku fluorescence. Po 100 % hybridizaci na templát se F a Q dostanou od sebe a dochází ke fluorescence (viz Obrázek 8); (Li J. a McDonald J., 2014; Šmarda, 2010).



Obrázek 8 Molekulární maják (Li J. a McDonald J., 2014)

Metoda qPCR zaznamenává vznik amplikonů v průběhu celé reakce, a právě proto se nejvíce využívá při kvantifikačních metodách (Šmarda, 2010).

Existuje celá řada dalších PCR metod jako například Alelově specifická PCR (AS-PCR), Amplifikační refrakční mutační systém (ARMS), rychlá amplifikace cDNA (RACE), Asymetrická PCR, Multiplexová reakce, CMC (Chemical mismatch cleavage) a spousta dalších (Šmarda, 2010).

2.3.2 Ligázová řetězcová reakce (LCR)

Tato metoda slouží k detekci stopových množství DNA o známé sekvenci. Jedná se o dvoufázovou cyklickou reakci, kdy při první fázi za tepla (95 °C) se cílová dvouvláknová

DNA rozvine na jednovláknovou. V druhé fázi při 70 °C se dvě komplementární oligonukletidy hybridizují na cílové jednovláknové molekuly za pomoci termostabilní ligasy (*Tth* DNA ligasa, *Pfu* DNA ligasa) (Šmarda, 2010).

2.3.3 Amplifikace replikázou Q β (QBR)

RNA bakteriofág replikuje svůj genom za využití Q β RNA polymerasy. Nejprve se sonda naváže na Q β templát a po hybridizaci následuje amplifikace. Vhodný templát pro Q β replikasu je jednořetězcová molekula RNA. Ke snadné amplifikaci vede jakékoliv hybridizační pozadí a také pro aplikaci metody, je nutná absolutní specifita hybridizace sondy (Pavlík, 1999d).

2.3.4 3SR Amplifikační reakce (self-sustained sequence replication)

Tato reakce využívá účinku reverzní transkriptázy, RNasy H a T7 RNA polymerasy na syntézu komplementární DNA (cDNA). Na ní se používá hybridní primer, který má v sobě cílovou oblast a konec s promotorem pro T7 RNA polymerasu, který s ní nehybridizuje (Šmarda, 2010). Kopie cDNA má promotor na jednom konci. RNasa H degraduje RNA na RNA/RNA hybridu, ale T7 RNA polymeráza syntetizuje mnoho kopií RNA (dle DNA). Ty kopie jsou cílem pro reverzní transkriptázu a ta syntetizuje další cDNA (Bursová *et al.*, 2014). Vše probíhá za stejné teploty a používají se reakční činidla, která jsou v koncentracích pro akumulaci produktu (Šmarda, 2010)

2.4 Neamplifikační metody

Do neamplifikačních metod řadíme hybridizace, která vytváří dvouřetězcové (*dd*, angl. *double stranded*) molekuly z jednořetězcových (*ss*, angl. *single stranded*) molekul nukleových kyselin. Hybridizovat tedy lze *ssDNA* tak *ssRNA*, pokud se vyznačují úplnou či částečnou komplementaritou bazí. Podle typu molekul lze párovat, jako například DNA/DNA hybridizace, DNA/RNA hybridizace a RNA/RNA hybridizace (Šmarda, 2010).

Před hybridizací se musí denaturovat molekuly (dvouřetězcové) nukleových kyselin buď teplotně, enzymaticky, či chemicky (př. NaOH). Hybridizace se provádí na pevných nosičích. Na ně se naváže polynukleotid schopný hybridizace. Při vlastní hybridizaci se smíchá

vyšetřovaná nukleová kyselina s hybridizační sondou a zajistí se pro ni vhodné podmínky (koncentrace iontů, teplota). Poté se nenávaná sonda vymyje a detekuje se hybridizační produkt. Nastavení hybridizačních podmínek umožňuje vytvořit hybridizační produkty s nespárovanými úseky. Čím jsou podmínky vyšší (vyšší teplota tání sondy), tím vzniká dokonalejší vazba a hybridy jsou stabilnější (Bursová *et al.*, 2014). Opakem, kdy nedochází k dokonalé vazbě mohou častěji vznikat nestabilní hybridy. Stabilitu hybridů neovlivňuje jenom teplota, ale také délka a zastoupení GC a AT párů, pH, koncentrace solí v roztoku a přítomnost látek destabilizující vodíkové můstky mezi řetězci (Bresler, 1966).

Před hybridizací se připraví sondy. Sonda je jednořetězcová radioaktivně či chemicky značená nukleotidová sekvence DNA nebo RNA, která se váže komplementárně na cílovou sekvenci. Pro požadovanou sekvenci může být hybridizační sonda, uměle vytvořena (př. PCR). Nejdříve byly značené sondy radioaktivně, kdy do sekvence se začlenily radioaktivní izotopy (³²P, ³³P, ³⁵S, ³H). Radioaktivní záření je signálem sondy, kterou můžeme detekovat autodiograficky na vrstvě fotografického papíru, filmu nebo emulze. Tento způsob je velmi citlivý, a tak dnes převažuje chemicky značená sonda (Pavlík, 1999b; Šmarda, 2010). Tato sonda obsahuje v sekvenci chemicky modifikované nukleotidy dUTP, které nesou molekulu digoxigeninu (DIG) nebo biotinu. Tyto molekuly působí jako antigen, který je rozpoznáván protilátkou. U sondy s DIG je detekce prováděna se specifickou protilátkou anti-DIG. U sondy s biotinem lze použít protilátky jako avidin, nebo streptavidin (Šmarda, 2010). Na specifických protilátkách je navázán enzym (peroxidasa, luciferasa) nebo fluorescenční barvivo (fluorescein, rhodamin). Po přidání substrátu k sondě, je katalyzována reakce enzymem a dochází tak ke změně barvy a rozpustnosti, emisi světla či fluorescence substrátu (Bresler, 1966; Šmarda, 2010). Pokud jsou sondy fluorescenčně značeny, provádí se technika fluorescenční hybridizace *in situ* (FISH). FISH metoda se využívá k detekci či confirmaci bakterií. Navázané sondy můžeme vidět přes fluorescenční mikroskop. Díky tomu, že jsou sondy fluorescenčně značené, umožňují identifikaci polohy několika genů současně (Bursová *et al.*, 2014).

Za hybridizační experimenty, které jsou variabilní se provádí například v roztoku, gelu, na filtrech, čípech, v elektronovém mikroskopu nebo *in situ* (Bresler, 1966; Pavlík, 1999b; Šmarda, 2010).

Hybridizace v roztoku

Jedná se o nejcitlivější techniku, která využívá reakční směsi pro rychlejší vytvoření hybridizačního produktu (Bresler, 1966). Pro tuto metodu stačí malé množství vzorku. Vzorek se přidá na konci hybridizace do roztoku obsahující S1-nukleasu, která rozkládá jednořetězovou DNA, ale hybridy zůstanou nedotčeny (Pavlík, 1999b). Hybridy jsou pak vysráženy trichloroctovou kyselinou, nebo jsou navázány na hydroxyapatit (Bursová *et al.*, 2014; Šmarda, 2010).

Hybridization protection Assay (HPA)

Metoda umožňuje semikvantitativní hodnocení. Základní složkou je sonda značená akridinesterem navázaným s kovovým jádrem. Tato sonda je komplementární se specifických úsekem 16S ribosomální RNA u hledaného infekčního agens (Šmarda, 2010). Hybridizace probíhá hodinu ve vodní lázni při 60 °C. Za pomoci diferenciální alkalické hydrolyzy následuje separace hybridů v roztoku (Pavlík, 1999b). Dojde k degradaci nenavázané sondy a k hydrolyze akridinesteru. Jelikož hybridy obsahují kovové jádro, dají se separovat za použití magnetického stojánku. Na závěr se přidá induktor luminiscence. Intenzita indukovaného světla je měřena v luminometru (Bursová *et al.*, 2014; Pavlík, 1999b; Šmarda, 2010).

Hybridizace na pevných podkladech (SSHA)

Nejčastěji používaná metoda, při níž denaturovaná molekula DNA nebo RNA, je přenesena na pevný podklad (nitrocelulózový filtr, nylonová membrána). Rozlišujeme tři typy hybridizace podle přenosu nukleových kyselin (Bursová *et al.*, 2014):

- hybridizace kolonií nebo plaku – přenos nukleových kyselin na membránu z bakteriální kolonie nebo plaku bakteriofágů (na živných médiích)
- tečková hybridizace – přenos nanášen na membránu ve formě kapek (roztoku)
- zpětná (reverzní) hybridizace – soubor neznačených sond přenesen na pevný podklad, na kterém hybridizuje vzorek s testovanou značenou DNA
- přenos po elektroforetické separaci v agarózových nebo polyakrylamidových gelech – **kapilární přenos** (nukleové kyseliny přenesené puřem prostupujícím gelem), **elektroforetický přenos** (přenos ovlivněný elektrickým polem) a **vakuový přenos** (rychlý přenos, kdy je gel položen na membránu, na kterou je přelit roztok)

Také rozlišujeme podle typu:

- Southernův přenos – přenos DNA
- Northernův přenos – přenos RNA
- Westernův přenos – přenos proteinů (např. stafylokokové enterotoxiny)

Southernův a Northernův přenos nukleových kyselin na membránu je zvláštní v tom, že následná hybridizace předchází elektroforetickému rozdělení (Bursová *et al.*, 2014; Pavlík, 1999b; Šmarda, 2010).

Hybridizace in situ

Metoda je založená na detekci (hybridizaci) nukleových kyselin na pevném nosiči. Také zajišťuje morfologii tkáně a posuzuje její abnormality, rozlišuje aktivní a latentní infekci. Umožňuje detekci nukleových kyselin z cytologických preparátů (chromosomů, buněk, tkání) a stanovení jejich prostorové lokalizaci (Pavlík, 1999b).

2.5 Klasické metody sekvenování

Cílem sekvenování je stanovit pořadí nukleotidů v molekulách DNA. Metody jsou rychlé a spolehlivé, vhodné pro stanovení nukleotidů při analýze genomů, či molekulární podstat základních biologických procesů (Albert *et al.*, 2002). Znalost sekvence nám umožňuje informovat o aminokyselinové sekvenci proteinů, regulaci jejich tvorby a také lze detailně stanovit charakter mutace (projev z vzniklých genetických chorob); (Sanger and Coulson, 1975; Šmarda, 2010).

Maxam-Gilbertova metoda

Jedná se o chemickou metodu, která používá chemické štěpení jednotlivých typu bází. Pracuje se souborem čtyř stejných jednovláknových DNA radioaktivně značených na svém konci (Maxam, and Gilbert, 1977). Z každých čtyřech typů, vložených do zkumavek, lze štěpit jen v místě určitých bází (Smith, 1986). Tím pak dochází ke vzniku směsi dlouhých fragmentů, které končí v místě určité báze a určíme rozdíly délky fragmentů za použití elektroforézy v hustém polyakrylamidovém gelu. Odečtením poloh jednotlivých bází na vzniklém autoradiogramu lze stanovit sekvenci DNA (Maxam, and Gilbert, 1977; Smith, 1986; Šmarda, 2010).

Sangerovo sekvencování

Nejběžnější metoda využívající enzymovou reakci sekvencování. Pro sekvenci DNA se musí použít matrice tedy DNA, která slouží pro syntézu řetězců různé délky za pomoci enzymu DNA-polymerasy. Reakce je prováděna ve čtyřech oddělených zkumavkách podobně jako u chemické metody (Sanger and Coulson, 1975). Na začátek se připraví reakční směs obsahující purifikovanou molekulu DNA, primer (pro připojení na část nebo místo na molekule DNA, může se jednat např.: krátké restriční fragmenty, uměle vytvořené oligonukleotidy o délce 18 bází), směs obsahující 4 nukleotidy ze čtyř ddNTP a v neposlední řadě DNA-polymerasu (T7 DNA-polymerasu tzv. Sequenase TM, Taq DNA-polymerasu). Po detekci nasyntetizovaných řetězců je označen primer, ddNTP nebo jeden ze čtyřech dNTP radioaktivně nebo neradioaktivně. Poté dojde k polymerázové reakci, která vytvoří produkty, které se denaturují a separují elektroforézou s polyakrylamidovým gelem. Odečítá se na autoradiogramu (Sanger and Coulson, 1975; Šmarda, 2010).

Automatické sekvenování DNA

Je významným pokrokem pro stanovování sekvenci DNA enzymatickou metodou. Dochází k syntéze DNA v PCR reakci, kdy je každý ddNTP značen jinou fluorescenční značkou. Vznikající dlouhé úseky jednovláknové DNA jsou označeny tou fluorescenční značkou (Raclavský, 2003). Pro stanovení sekvence DNA se používá přístroj, genetický analyzátor zvaný „sekvenátor“. Detekce vzniklého úseku probíhá kapilární elektroforézou (tenkou kapilárou naplněnou gelem) a za pomoci laserového detektoru, který je napojen na počítač a vyhodnocuje samotnou sekvenci (Šmarda, 2010).

Sekvenování genomů

Metoda pro stanovení sekvenci fragmentu DNA, která obsahuje 500-1000 bází, které v jedné reakci lze analyzovat. Metoda se může provádět dvojím typem, který závisí na velikosti stanovované sekvence (Raclavský, 2003).

1) Náhodné sekvenování

Připravené nastříhané genomy z DNA fragmentů o velikosti 1300-2000 bp se po úpravě klonují do vhodného vektoru za vzniku velkého počtu klonů. Na štěpení DNA se využívá sonikace, nebo pankreatická DNáza za přítomnosti Mn^{2+} (Raclavský, 2003). Pro připojení k vektoru v blízkosti klonovacího místa se používají primery, kdy jsou stanoveny sekvence

krátkých úseků na konci klonovací molekuly. Primery musí znát sekvenci pro prodloužení řetězce DNA-polymerázou (Šmarda, 2010).

2) Uspořádané sekvenování sousedních úseků

Metoda je pomalejší a dražší kvůli nutnosti navrhovat a syntetizovat nové primery. Používají se exonukleázy (Raclavský, 2003; Šmarda, 2010).

Pyrosekvenování

Jedná se o velmi přesnou metodu, která je založená na uvolnění pyrofosfátu při enzymatické syntéze DNA. V konečném kroku reakce se emituje viditelné světlo. Míra emise světla je úměrná množství nukleotidů (Šmarda, 2010).

Sekvenování pomocí hybridizace

Účinná a perspektivní varianta této metody je prostřednictvím DNA čipů neboli DNA microarray. Její klíčový faktor je miniaturizace pro společné množství detekcí hybridizujících molekul (Šmarda, 2010).

Minisekvenování

Metoda, která slouží k prodloužení 3' konce primeru o jeden značený nukleotid. Také slouží k ověření jednonukleotidových polymorfizmů a k odlišení jednotlivých alel genů (Šmarda, 2010).

3. Metody využitelné pro zjišťování identifikace arkobakterů

Nejvíce rozšířenou molekulárně-biologickou metodou pro identifikaci *Arcobacter* spp. je polymerázová řetězová reakce (PCR). Aby se mohla použít tato metoda, tak nejdříve se musely navrhnout a vytvořit primery a sondy potřebné k detekci kmenů arkobakterů. PCR metoda se používá hlavně díky své využitelnosti: zmnožení DNA, detekce DNA o určité sekvenci (používané ve forenzní genetice a molekulární diagnostice) a kvantifikaci.

Pro detekci a identifikaci druhů rodu *Arcobacter* se používala jak klasická PCR metoda (specifická, kvantifikační, „real-time“, multiplexní atd.), ale i kombinovaná s metodami ELISA, RFLP a dalšími. Jednotlivé typy se po čase upravovaly, či měnily a následně zlepšily, tak aby poskytovaly mnohem lepší výsledky.

3.1 Klasické PCR metody

Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Poprvé se setkáváme s PCR metodou v roce 1995 za použití primerů zaměřených na amplifikaci 16S rRNA genů, které detekovaly jeden fragment nukleové kyseliny ze tří rodů – *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Arcobacter* (Wesley *et al.*, 1995). Dále byly navrženy příslušné druhově specifické 16S a 23S rRNA sondy pro detekci arkobakterů (Wesley *et al.*, 1995). V ten samý rok byl vyvinut genově specifický test (pro detekci všech druhů *Arcobacter* spp.) a specifická PCR amplifikace (pro detekci tří druhů arkobakterů) pro rozlišení kmenu arkobakterů (Bastyns *et al.*, 1995). Tyto testy byly založeny na cílové sekvenci, která obsahuje nejvíce variabilní oblasti 23S rDNA. Testy sloužily hlavně pro detekci a pro rozlišení tří základních druhů tj. *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Specifičnost této metody byla rozsáhle testována s využitím 54 arkobakterů a 71 příbuzných referenčních kmenů (Bastyns *et al.*, 1995).

Rok na to se vyvinula PCR metoda zaměřená na 16S rRNA pro identifikaci *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Kdy tato metoda používala primery (BUTZ, Arco I, Arco II a Arco II) cílené na geny kódující 16S rRNA. Pro detekci *A. butzleri* PCR metodou byly vybrány primery BUTZ a Arco II a po syntéze došlo ke vzniku fragmentu o velikosti 463 bp. Pro detekci všech třech druhů (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*) se nakonec použil primer Arco III. Jednalo se o identifikaci u klinicky nemocných lidí a u hospodářských zvířat (Harmon a Wesley, 1996).

Roku 2008 byla opět prováděna metoda PCR, tentokrát na extrahovaných DNA z jednotlivých kolonií u patogenních druhů *Vibrio*, *Aeromonas* a *Arcobacter* spp. v průlivu Messina (Itálie). Pro fenotypovou identifikaci (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*) se prováděla multiplexní PCR, kdy test zahrnul využití pět primerů BUTZ, ARCO, CRY1 a CRY2, SKIR na základě amplifikace 16S rRNA a 26S rRNA. Molekulární metoda zlepšila detekci bakterií v mořském prostředí často z nekultivovatelného stavu (Gugliandolo *et al.*, 2008).

V roce 2009 se vyvinula vylepšená PCR, ve které se použily druhově specifické primery, pro detekci *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius* v kuřecím mase. Pro *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius* byly navrženy primery na základě genu *gyrA*. Tyto specifické primery sloužily pro amplifikaci fragmentů nukleové kyseliny o velikostech 212, 257 a 145 bp. Pro *A. butzleri* byly navrženy specifické primery tak, aby amplifikovaly DNA fragment o velikosti 203bp v 16S rRNA genu. Po selektivním kroku (18 h) následovala PCR amplifikace se čtyřmi sadami primerů a její specifičnost byla hodnocena panelem druhů *Arcobacter* a ostatních potravinových bakterií. Amplifikace odhalila přítomnost 87,5 % *Arcobacter* spp. (ze vzorku drůbež), z toho 50 % *A. butzleri* a 35,7 % byl pozitivní nález *A. butzleri* i *A. cryaerophilus*, ale neprokázali se druhy *A. skirrowii* a *A. cibarius*. Můžeme říci, že PCR je specifickou a rychlou alternativou pro průzkum kontaminace arkobakterů v mase (Pentimali *et al.*, 2009).

Jednostupňová PCR

V roce 2003 byl pro identifikaci tří nejdůležitějších druhů z rodu *Arcobacter* vyvinut druhově specifický PCR test (jednostupňová PCR). U něj se použily primery, které amplifikují v oblasti 23S rRNA genu a také byly navrženy tak aby prováděly specifickou identifikaci jednostupňovou PCR. Pro jednostupňovou PCR metodu se použily smíšené primery (N.butz, N.c1.A, Nc1B a N.ski), které byly vytvořeny z referenčních kmenů. Primery použité přes tuto metodu byly ještě hodnoceny na 10 japonských izolátech a byly takto detekovány všechny druhy rodu *Arcobacter* (Kabeya *et al.*, 2003).

Multiplexní PCR

Roku 1997 byla testována metoda detekce multiplexní PCR, která sloužila k identifikaci izolátů arkobakterů a také pro odlišení *A. butzleri* od ostatních druhů. Test využíval dvě sady primerů. Specifičnost sad primerů byla hodnocena s použitím referenčních kmenů (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp., *Helicobacter*

spp. a *Wolinella succinogenes*). První sada primerů amplifikuje část 16S rRNA genů *Arcobacter* spp. a druhá sada amplifikuje část genů 23S rRNA pro *A. butzleri*. Po amplifikaci poskytla PCR metoda amplicon o velikosti 1223 bp pro všechny izoláty, ale pro *A. butzleri* poskytla jak 1223 bp amplicon tak i druhově specifický amplicon o velikosti 686 bp. Dále došlo k analýze kmenů arkobakterů (n=108), které byly dříve charakterizovány DNA-DNA hybridizací, ribotypizací nebo sérologií. Multiplexní PCR test je velmi rychlý, specifický a snadno interpretovatelný, a proto může objasnit prevalenci, epidemiologii a zoonotický potenciál *Arcobacter* spp. (Harmon a Wesley, 1997).

Po třech letech se multiplexní metoda vyvinula za současné detekce a identifikace tří druhů *Arcobacter* spp. (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*). Tato metoda využívala test s pěti primery, které amplifikovaly geny 16S a 23S rRNA. Nakonec se vybraly primery tři: 257-bp fragment z *A. cryaerophilus*, 401-bp fragment z *A. butzleri* a 641-bp fragment z *A. skirrowii*. Detekce sloužila pro identifikaci kultur *in vitro* z živné půdy „*Arcobacter*“-CAT a také k jejich identifikaci (Houf *et al.*, 2000).

O šest let později se multiplexní PCR vyvinula natolik, že se použila pro detekci a rozlišení alimentárních patogenů v jedнокrokovém postupu. Cílem bylo vymyslet takovou metodu, která by identifikovala nejvýznamnější patogeny vyskytující se v potravě a v drůbežích produktech. Pro test se navrhly primery společně reverzní a specifické, které byly navrženy hybridizací na 16S rRNA. PCR založená na 16S rRNA genu rodů *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Arcobacter* amplifikovala 1216 bp fragment. Amplicony byly štěpeny restričními enzymy *Rsa I* a *EcoRV*. Nejdříve se izolovala DNA (ve fosfátovém pufru), poté následovala extrakce za pomoci Qiagen technologie dle instrukcí výrobce. Dále bylo provedeno klonování a sekvenování 16S rRNA, která byla amplifikována za pomoci primerů (reverse: 5'-GGA GTC TGG ACC GTG TCT CA-3' a forward: 5'-CTA CAC ACG TGC TAC AAT GG-3'). Pro analýzu vzorků na sekvenování se použil automatický sekvenátor ABI 3774. Pro PCR postup se použili primery nukleotidové sekvence genů 16S rRNA publikované v databankách. Během testu se pro identifikaci izolátů zkoumala metoda polymorfismu délky restričních fragmentů v kombinaci s polymerázovou řetězovou reakcí (PCR-RFLP). Za další velmi užitečný test pro rozlišení druhů *Arcobacter* posloužila PCR metoda založená na hippurikázovém genu. Výsledkem bylo, že primery vytvořené pro amplifikace části 16S rRNA genu všech druhů. Získané produkty měly velikost 822 bp pro *Arcobacter* spp., 946 bp pro termofilní *Campylobacter* a 1107 bp pro *Helicobacter*. I když touto metodou nelze získat druhovou identifikaci, je užitečná pro zjištění těchto patogenů ve vzorcích (Neubauer a Hess, 2006).

„Real-time“ PCR

Rychlá a přesná detekce *Arcobacter* spp. proběhla roku 2010. Pro detekci arkobakterů vzorků potravin (kuřata, játra) a odpadních vod byl vyvinut test v reálném čase PCR s barvivem vázajícím DNA (SYBR Green). Izoláty byly identifikovány multiplexní PCR a analýzou polymorfismu délky restrikčního fragmentu PCR-amplifikovaného DNA fragmentu a typovány náhodně amplifikovanou polymorfní DNA. *Arcobacter* spp. byly zjištěny za pomoci „real-time“ PCR (96 % z kuřat, 40% játra a 100% odpadní voda a bez obohacení) a konvenční PCR (kuřata, ale až po 48 h pomnožení). Multiplexní PCR byly detekovány *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* a polymorfismem délky restrikčního fragmentu PCR (PCR-RFLP) byly detekovány *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Náhodnou PCR-RFLP byla pozorována velká genetická heterogenita. Test PCR v reálném čase se ukázal jako lepší detekční metoda než konvenční PCR, spolu s kratšími časy testování vzorků, a proto se jeví za rychlé a přesné monitorování kontaminované arkobaktery v potravě a vodě (González *et al.*, 2010).

3.2 Kombinované PCR metody

Kombinace PCR-RFLP

V roce 1999 byla provedena rychlá identifikace izolovaných bakterií rodů *Campylobacter*, *Arcobacter* a *Helicobacter* analýzou polymorfismu délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP) genů 16S rRNA. Jedná se o rychlý dvoufázový systém založený na analýze polymorfismu délky restrikčního fragmentu (PCR-RFLP). Pro tuto metodu byla připravena purifikovaná DNA nebo bakteriální buněčný lyzát a využívala jenom jednu sadu primerů. Pro identifikaci mikroorganismů (hlavně rodu *Arcobacter*) se použil restrikční enzym (enzym *Taq* I). DNA se extrahovala metodou fenol-chloroformovou, byla přečištěna a detekována spektrofotometricky. Buněčný lyzát izolátů byl připraven z resuspendovaných buněk, vařením a odstředěním centrifugací. Sekvence primerů (CAH 16s 1a a CAH 16S 1b) se navrhly tak, aby amplifikovaly 1004 bp fragment kódující oblast 16S rRNA genu izolovaných rodů. Cíle pro primery sloužily oblasti, kde došlo k vyrovnání sekvencí úplných 16S rRNA z izolátů (*C. jejuni*, *A. butzleri* a *H. pylori*). Oligonukleotidy byly syntetizovány zařízením DNA jádra Bureau of Microbiology of Health Canada. PCR amplifikace byla provedena za pomoci DNA polymerázy AmpliTaq na termocykleru PC-200. RFLP sloužil k odlišení druhů *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* enzymem *Taq* I, ale neodlišil je

fenotypicky. Proto se použilo doplňkové testování hippurikázové aktivity, kdy pro odlišení nových druhů se použila sekvence genů hippurikázy. Lze říci, že PCR-RFLP metoda sloužila pro genetickou identifikaci mnoha druhů – *Campylobacter*, *Arcobacter* a *Helicobacter* (Marshall *et al.*, 1999).

V roce 2008 byla pro rozlišení druhů arkobakterů vyvinuta metoda 16S rDNA-RFLP, ve které byly použité dvě skupiny hybridizačních skupin. Metoda byla založena hlavně na použití primerů a endonukleázy I. Ty byly využity pro odlišení referenčních kmenů od izolátů. Metoda byla rychlá, snadno proveditelná a umožňovala rychlé a spolehlivé rozpoznání rodu *Arcobacter* (Figueras *et al.*, 2008). V roce 2012 se dříve popsaná metoda 16S rRNA-RFLP aktualizovala pro charakterizaci arkobakterů. Dříve metoda používala jednu endonukleázu (*Mse I*) pro šest druhů a od té doby se počet zvýšil na 17 druhů. Cílem bylo aktualizovat metodu tak, aby charakterizovala všechny druhy rodu *Arcobacter*. Proto se zavedly nové enzymy: endonukleáza *Mnl I* a *Bfa I*, které generovali specifické RFLP vzory. 16S rRNA-RFLP analýza identifikovala 17 arkobakterů elektroforézou (na polyakrylamidu nebo agarázovém gelu). Poprvé byla zdokumentována mikroheterogenita rodu (zejména *A. cryaerophilus*) v 16S rRNA genu, která interferovala s identifikací RFLP (Figueras *et al.*, 2012).

Rok poté se provedl rychlý přístup k identifikaci genů z významných enterických bakteriálních patogenů. Zahrnoval částečnou amplifikaci genu 16S rRNA pomocí PCR, použili se kolonie ze selektivního média a následně došlo ke štěpení restrikcí enzymem jako například *EcoRI*, *HindIII* a *Sall*. Na základě rozkladu enzymu se rozlišovali různé rody (*Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*, *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Yersinia* a *Listeria*), (Vergis *et al.*, 2013).

Kombinace PCR-ELISA

Pro rychlé stanovení počtu *Arcobacter* spp. se roku 2001 vyvinula kombinovaná technika testu PCR-ELISA. Test se prováděl pro vyšetření kuřecího masa za pomoci polymerázové řetězové reakci spojené s metodou ELISA. Vzorek drůbeže byl pomnožen selektivně. DNA byla extrahována a amplifikována za použití specifického primeru pro digoxigenin specifický pro 16S rDNA sekvenci arkobakterů. Amplifikované fragmenty byly tepelně denaturovány a poté kvantifikovány testem ELISA. U ní se použila biotinylovaná sonda imobilizovaná na streptavidinem potažených mikrodestičkách a sloužila pro zachycení produktů digoxigeninu – PCR. Na destičku byl přidán konjugát peroxidázy antidigoxigeninu a za přítomnosti substrátu byly PCR produkty kvantifikovány (Antolin *et al.*, 2001).

Kombinace PCR a hybridizace

V roce 2007 se k metodě PCR v reálném čase přidala hybridizace sond pro identifikace druhu *Arcobacter* a analýza křivek tání. Rozlišování druhů arkobakterů bylo přímé, protože odpovídající teploty tání vykazovaly významné rozdíly s charakteristickými teplotami tání 63,5 °C, 58,4 °C, 60,6 °C a 51,8 °C pro *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* a *A. nitrofigilis*. Specifičnost testu byla potvrzena na lidských klinických a veterinárních izolátech identifikovaných fenotypově a sekvenováním genu 16S rRNA. Poté byl použit screening ze vzorků stolice získaných od pacientů s průjmem a test detekoval nejvíce zastoupený *A. butzleri*. Potvrzení výsledků bylo prokázáno metodou konvenční PCR, která umožňuje cílit na 16S rRNA gen s následným sekvenováním PCR produktu. PCR v reálném čase detekuje a odlišuje druhy *Arcobacter* v čisté kultuře, ale i v komplexním vzorku. Tento test je ekonomický kvůli využití každé jedné označené sondy při testu a lze tedy v jednom testu identifikovat několik druhů arkobakterů (Abdelbagi *et al.*, 2007).

Kombinace PCR a nukleotidové sekvence (QRDR)

V roce 2007 byla navržena nukleotidová sekvence genu *gyrA* z *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. cibarius* a *A. skirrowii*. Protein *gyrA* je úzce spjatý s proteiny *W. succinogenes* a *H. pullorum*, ale u *Campylobacter* vykazoval menší sekvenční identitu. Z fylogenetické analýzy sekvence genu *gyrA* došlo k výsledné podobnosti s genovou sekvencí 16S rRNA a umožňuje tedy rozlišit druhy (*A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*) mezi *A. butzleri*. Gen *gyrA* kódující podjednotku DNA-gyrázu, je označen za důležitou složku pro bakteriální fylogenetické vlastnosti a také pro identifikace různých mikroorganismů (střevní bakterie, *Mycobacterium*, druhy *Bacillus*, *Legionella*, *Klebsiella*). Nejenom tento gen je taxonomickou složkou, ale i geny *gyrB* a *rpoB*, *rpoC*. Sekvenování genu *gyrA* by mohlo být užitečné do budoucna pro nový vývoj PCR v reálném čase. Kromě tohoto také došlo k mutaci, v poloze 254 *gyrA* genu ve třech rezistentních arkobakterech. Došlo k aminokyselinové substituci threoninu na izoleucin v poloze 86 proteinu *gyrA* v kmenech rezistentních na ciprofloxacin (*C. coli*). Substituce Threoninu-85 z kmenů *Arcobacter* (*A. butzleri* a *A. cryaerophilus*) může být příčinou rezistence vůči chinolonu (Abdelbagi *et al.*, 2007).

V roce 2014 se zlepšila použitá metoda PCR amplifikace se sekvenováním tentokrát genu *atpA* pro identifikaci členů *Campylobacteraceae* a *Helicobacteraceae*. Byl použit jenom jeden pár primerů pro amplifikaci DNA ze všech současných popsanych taxonů. Tato metoda

jednoznačně identifikovala všechny testované taxony, také po testování enviromentálních kamylobakterů bylo zpozorováno pět nových taxonů. Rozsah a rozlišení z metody činí důležitý doplněk ve studii epidemiologie a vývoje epsilonproteobakterií (Miller *et al.*, 2014).

Kombinace multiplexní a „real-time“ PCR

Dále se můžeme setkat s testovým vývojem multiplexní a „real-time“ PCR pro identifikaci *A. butzleri* a *A. cryaerophilus*, spolu se dvěma specifickými testy TaqMan používané cíleně na nově vznikající patogeny. Testy zahrnují vnitřní kontrolu pro ověření přítomnosti bakteriální cílové DNA a integrity amplifikace. Pro multiplexní test se použili publikované primery CRY1 a CRY2 (Houf *et al.*, 2000) a nový primer pro *A. butzleri* navržený pro cílení na rpoB/C a 23S rRNA genové sekvence. Identita generovaných amplikonů byla potvrzena sekvenováním DNA. Dva testy TaqMan poskytly lepší detekční citlivost nežli multiplexní PCR. Pro vyhodnocení účinku TaqMan testu byla použita pro screening vzorků DNA (přípravené ze stolice, kůže a opracování masa) TaqMan testy prokázaly, že 1,3 % izolátů je pozitivní na *A. butzleri* a 7,3 % je pozitivní na *A. cryaerophilus* (Brightwell *et al.*, 2007).

Také se setkáváme v roce 2012 s detekcí rodu *Campylobacter* a *A. butzleri* (izolovaných ze stolice) pomocí multiplexní a „real-time“ PCR. Pro detekci izolátů se použily primery například gen *hsp60* (*A. butzleri*), gen *ceuE* (*C. coli*), *mapA* (*C. jejuni*), C16S_Lund test (5 potvrzených patogenních *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*, *C. hyointestinalis*) a C16S_Lvl test (pro *Campylobacter* test). Při *Campylobacter* testu na DNA kamylobaktery byl pozitivní výsledek 71,4 % a u testu C16S_Lund činil pozitivní nález 4,7 %. Poté následovala identifikace vzorků detekční frekvencí, která poskytla kladné výsledky: 4,1 % *C. jejuni*, 0,4 % *C. coli* 0,4 % *C. upsaliensis* i u *A. butzleri*. Při sekvenování vzorků podskupiny došlo k pozitivnímu výsledku na C16S_Lvl testu a zároveň byl pozitivní na *C. concisus*, což bylo sjednoceno se vzácnými klinickými symptomy, které byly spojené s průjemem a krví. Hodnoty prahového cyklu (C_T) u *C. jejuni*/*C. coli* PCR-pozitivních vzorků byly srovnatelné s hodnotami C16S_Lund PCR. U obou testů vykazoval prahový cyklus menší hodnotu než u testu C16S_Lvl. Z toho vyplývá, že kombinované testy jsou specifické a jsou užitečné pro rutinní účely screeningu. A také, že detekční frekvence vznikajícího patogenu (*C. concisus*) byl podobný *C. jejuni* (Boer *et al.*, 2012).

3.3 Identifikace *Arcobacter* spp. pomocí MALDI-TOF MS

Jako další rychlá a citlivá metoda pro charakterizaci mikroorganismů se ukázala metoda laserové desorpční/ionizační spektrometrie spojené s ionizační dobou (MALDI-TOF MS). Pro tuto metodu se použila referenční databáze (obsahující patogenní původce potravin, několik zástupců rodů *Arcobacter*, *Helicobacter* a *Campylobacter*) kvůli stanovení druhové specifity v navržených referenčních databázích (MALDI Biotyper). Po kultivaci na Columbia agaru poskytly kmeny reprodukovatelné a jedinečné profily hmotnostních spekter, které lze porovnávat se standardy v databázi Bruker Biotyper verze 2 (tato databáze je použita pro identifikaci klinických izolátů). MALDI-TOF MS metoda hodnotila před testováním reprodukovatelnost výsledků s ohledem na stáří a skladování bakterií (jak pokojová teplota, tak 4 °C). Identifikace bakterií byla úspěšná na agaru Campyloselect, ale nebyla úspěšná po kultivaci na modifikovaném agaru s deoxycholátem s aktivním uhlím. Výsledky tedy ukazují, že MALDI-TOF MS metoda je rychlá a spolehlivá pro identifikaci mikroorganismů *Arcobacter* spp. a pro jejich odlišení od fenotypově podobných druhů *Campylobacter* (Alispahic *et al.*, 2010).

Nejenom v amplifikaci došlo ke značnému vývoji, ale také se navrhla nová genomová sekvence tří druhů arkobakterů. Tento návrh byl vytvořen z kultivovaných vzorků z chovu skotu. Vzorky byly izolovány z nádrže na prasečí hnůj (AF1430 a AF1440) a z nádrže na mléko (AF1581). Sekvenování genomu bylo provedeno nejdříve na základě vícenásobného párového uspořádání 16S rRNA genu, poté purifikace se prováděla na Illumina HiSeq 2500 s chemií TruSeq verze 3. Návrhové genomy byly anotovány pro predikci genu za pomoci anotačního serveru RAST. Návné genomové sekvence AF1430, AF1440 a AF1581 byly uloženy jako celo genomové projekty na DDBJ/EMBL/GenBank pod přístupovým číslem (Adam *et al.*, 2014).

V posledních letech dochází ke zjišťování genů spojených s virulencí *Arcobacter* spp. Bakterie rodu *Arcobacter* pocházejí z potravin a vody a jsou pro člověka a zvířata obávanými bakteriemi. Dosud nebyla zcela objasněna jejich virulence, a proto je sledováno hlavně osm faktorů spojených s virulencí (*ciaB*, *cj1349*, *pldA*, *irgA*, *hecA*, *tlyA*, *mviN*, *hecB*). Izoláty byly získány z potravin, vody a klinických vzorků (pacientů s enteritiou). Detekce těchto genů spojených s virulencí byla použita multiplexní PCR a matrice asistované laserovou desorpční ionizací s hmotností spektrometrií (MALDI-TOF MS). Tyto metody sice omezují výsledky pro nově popsané arkobaktery, ale pro *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* jsou spolehlivé. Nejdříve došlo ke stanovení genů spojených s virulencí-DNA izolátů se izolovala, poté byla

homogenizována anebo skladována při -20 °C. Stanovení genů proběhlo multiplexní PCR za použití primerů využívaných z předelších studií z roku 2012. Pro reakci nesměla chybět *Taq* polymeráza a extrahovaný DNA templát. Reakce PCR amplifikace proběhla v termocyklu. Amplifikované produkty byly elektroforeticky odděleny na agarózovém gelu barveném ethidiumbromidem. Nakonec pro analýzu osmi genů spojených s virulencí se použila statická analýza (chví-kvadrát test). Vzniklá hodnota $P < 0,05$ byla považována za staticky významnou. Výsledky testů na virulenci ukázaly, že za nejčastější detekované geny u *A. butzleri* byly: *ciaB* (98,8 %), *pldA* (98,8 %), *tlyA* (95,0 %) a *cj1349* (95,0 %). Nejčastější gen u *A. butzleri*, který se vyskytoval u všech izolátů byl *cj1349*. Naopak za nejčastěji detekované geny virulence u izolátů (vzorky masa a voda) *A. cryaerophilus* byly *ciaB* (95,5 %), *mviN* (90,9 %) a *tlyA* (31,8 %). *Campylobacter-invazivní antigen (ciaB)*, gen *tlyA* hemolysinu a faktor *mviN* patří mezi nejběžnější faktory virulence v arkoobakterech. Vysoká prevalence některých genů virulence dokazuje, že tyto domnělé patogenní determinanty jsou běžné u vznikajících druhů ze zdrojů. No pro objasnění úlohy virulence v patogenenzi infekcí způsobených *Arcobacter spp.* je zapotřebí další studie (Šilha *et al.*, 2019).

3.4 Porovnání metod pro identifikaci *Arcobacter spp.*

V roce 2010 došlo k porovnání metod izolace arkoobakterů v Cheshire (Spojené Království). Pět publikovaných metod pro izolaci ze zvířecích výkalů se porovnávalo, aby se určila ta nejcitlivější a nejspecifičtější metoda. Pro porovnání metod bylo odebráno 77 vzorků stolice od skotů, ovcí a jezevců. Vzorkování proběhlo jednou a z něho bylo odberáno 6 až 12 vzorků stolice. Jeden gram fekálního materiálu byl přenesen do 9 ml obohaceného bujónu. Byl míchán třepáním a inkubován buď aerobně, nebo mikroaerobně, v závislosti na bujónu, po dobu 24h. Byly použity následující bujóny: bujón H (Houf), který je specifický pro *Arcobacter* (s přísávkou antibiotik), AC bujón (specifický pro *Arcobacter* obsahující *Arcobacter* bujón), C bujón (specifický pro *Campylobacter*). Po první inkubaci byly obohacené bujóny nanášené na pevné médium a znovu inkubovány. Pevnými médii byly: H médium (obsahující H bujón se stejnými antibiotiky), CC médium (obsahující modifikovaný agar s aktivním uhlím s přísávkou CAT), C médium (specifické pro izolaci *Campylobacter* obsahující mCCDA). Byla vytvořena kombinace pěti médií s příslušnými podmínkami (viz Tabulka 6). Těchto pět vytvořených izolačních metod bylo pojmenováno jako: HH (Houf bujón a Houf plotny), HCC (Houf bujón s mCCDA-CAT destičkami), ACH (*Arcobacter* bujón-CAT bujón s Houf plotnami), ACCC (*Arcobacter* broth-CAT bujón

s mCCDA-CAT destičkami) a CC (*Campylobacter*-specifický bujón a *Campylobacter*-specifické destičky). Obohacené vzorky byly nanесeny na pevné médium v duplikátu a každý vzorek byl podroben pěti izolačními metodami. Rozdíl ve specificitě každé izolační metody byl testován za pomoci takzvaného Fisherova exaktního testu s využitím bezplatného online kalkulatoru (GraphPad QuickCalcs). Z buněčné suspenze se připravil supernatant, který sloužil jako templát pro PCR. Všechny izoláty se testovaly přes PCR za použití ReddyMix PCR Master Mix, pro identifikaci více druhů *Arcobacter*. Pro identifikaci *Campylobacter* se použila multiplexní PCR. Pro vyhodnocení rozlišení druhů bylo pomocí multilokusové sekvenční typizaci (MLST) získáno 11 sekvenčních typů: ST-1 (*A. butzleri*), ST-206 (*A. cryaerophilus*) a ST-243 (*A. skirrowii*) z 39 izolátů. Sekvenční typy se uspořádaly do stromu pro referenční účely za pomoci přístroje ClustalW. Cílem této studie bylo porovnat citlivost a specificitu metod pro izolaci druhů arkobakterů. Pět testovaných metod izolovalo různé rozdíly *Arcobacter* spp. Tyto rozdíly byly s největší pravděpodobností způsobeny různou citlivostí antibiotických doplňků používaných v médiích. Nejčastěji izolovaným druhem byl *A. skirrowii*, poté následoval *A. butzleri* a pak *A. cryaerophilus*. Jako nejvíce reprezentativní metoda ze všech pěti je HCC metoda. Další nejspecificitější je metoda HH. Vzhledem ke skutečnosti, že zmrazení vzorků stolice vedlo ke snížení regenerace *Arcobacter* spp. se doporučuje pro optimální izolaci tohoto rodu nutnost použít vzorky čerstvé a nemrazené. Protože některé druhy arkobakterů mohou být více či méně náchylné k zamrznutí, je možné provést šetření účinku zmrazení. Závěrem lze říci, že tato studie stanovila citlivou a specifickou metodu izolace arkobakterů ze zvířecích výkalů – doporučuje se jako standardní metoda izolace *Arcobacter* spp. MLST analýza ukázala, že mezi izoláty ze skotu existuje velké množství diverzity (Merga *et al.*, 2011).

Tabulka 5 Pět metod pro izolaci a podmínky jejich inkubace² (Merga *et al.*, 2011)

Metoda	Typ bujónu	Pevné médium	Podmínky inkubace
HH	H	H	30 °C, aerobní
HCC	H	CC	30 °C, aerobní
ACH	AC	H	30 °C, aerobní
ACCC	AC	CC	30 °C, aerobní
CC	C	C	30 °C, mikroaerobní

V roce 2013 se porovnávali popsání výsledky pěti metod na bázi PCR zaměřených na geny 16S rRNA, 23S rRNA, nebo *gyrA* pro identifikaci arkobakterů. Vyběr metod pro identifikaci arkobakterů se použila multiplexní PCR se třemi primery: první primer (pro detekci *A. skirrowii*, *A. butzleri* a *A. cryaerophilus*), druhý primer (je zaměřený na *A. skirrowii*, *A. butzleri*, *A. crayaerophilus* a *A. cibarius*) a třetí primer (je zaměřený na *A. butzleri.*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius* a *A. thereius*) a 16S rRNA-RFLP zaměřená na *A. nitrofigilis* a *A. halophilus*. Vyhodnocení výkonnosti výsledků metod bylo založené na procentuálním podílu kmenů cílových druhů (správně výsledky) a na počtu necílených druhů (nesprávně výsledky). Všechny pět metod dávalo nespolehlivé výsledky. Došlo k mylné identifikaci sledovaných kmenů, které byly závislé na cílové oblasti testovaných genů. Nejhorší výsledek byl při použití genu 23S rRNA u *A. butzleri* a *A. cryaerophilus*, kde došlo i k záměně s necílenými druhy. Žádná ze srovnávacích metod nebyla zcela spolehlivá a vykazovala různé míry chybné identifikace jak pro cílené, tak necílené druhy a zdůraznila omezení porovnávaných metod. Proto se musela rozšířit diverzita

² 1)Metody: HH (Houf bujón a Houf plotny), HCC (Houf bujón s mCCDA-CAT destičkami), ACH (*Arcobacter* bujón-CAT bujón s Houf plotnami), ACCC (*Arcobacter* broth-CAT bujón s mCCDA-CAT destičkami) a CC (*Campylobacter*-specifický bujón a *Campylobacter*-specifické destičky)

2)Bujóny: bujón H (Houf), který je specifický pro *Arcobacter* (s přísadkami antibiotik), AC bujón (specifický pro *Arcobacter* obsahující *Arcobacter* bujón), C bujón (specifický pro *Campylobacter*)

3)Media: H médium (obsahující H bujón se stejnými antibiotiky), CC médium (obsahující modifikovaný agar s aktivním uhlím s přísadkami CAT), C médium (specifické pro izolaci *Campylobacter* obsahující mCCDA).

a v budoucích studiích se musela použít spolehlivější metoda identifikace (Levican a Figueras, 2013).

Po roce následovalo porovnání konvenční, multiplexní PCR a izotermní amplifikační testy pro rychlou detekci druhu *Arcobacter*. Cílem bylo vyvinout metodu izotermní amplifikace (LAMP) pro rychlou detekci *Acrobacter*. Pro porovnání bylo použito 42 druhů *Arcobacter* spp. a 27 patogenních původců potravin. Vzorky druhů arkobakterů byly kultivovány buď s použitím kultivačního média, nebo přidaného technického agaru. Vzorky patogenů byly kultivovány infuzním bujónu mozkového srdce. Pro detekci druhů arkobakterů byla použita multiplexní PCR s vyvinutými primery (ARCO, BUTZ, SKYR, CRY1 a CRY2). Pro detekci genu 23S bakterie *A. butzleri* se navrhly online softwarem (PrimerExplorer V4) LAMP primery a byly následující: F3, B3, FIP a BIP. Pro přesné srovnání byly citlivosti multiplexní PCR a LAMP porovnány s citlivostí běžné metody konvenční PCR. Pro konvenční PCR byly použity primery Arc1 a Arc2, které generovali 181 bp DNA produkt pro *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Pro analýzu všech třech metod byl použit Fisherův exaktní test pomocí softwaru SAS 9.2. Hodnoty $P < 0,05$ byly považovány za statisticky významné. Pro vyhodnocení specifity sady primerů byly použity multiplexní PCR a LAMP pro detekci DNA. Multiplexní PCR detekovala a diferenciovala *A. butzleri*, *A. skirrowii* a *A. cryaerophilus* a také 1 kmen *C. coli* a 5 kmenů *C. jejuni*. Metodou LAMP se detekovalo 37 kmenů *A. butzleri*, 4 *A. skirrowii* a 1 *A. cryaerophilus* a bez detekce druhů rodu *Campylobacter*. Analýza prokázala, že LAMP detekce vykazovala 10-1000krát vyšší citlivost než multiplexní a konvenční PCR. Proto je metoda LAMP citlivější a spolehlivější pro detekci rodu *Arcobacter*, protože u ní nedocházelo k mísení s ostatními patogenními druhy než při multiplexní PCR a konvenční (Wang *et al.*, 2014).

V roce 2016 došlo ke srovnání detekce a kvantifikace pro *A. butzleri* nalezeného ve stolici u lidí s či/bez průjmu v oblasti Kanady. Pro testování enterického patogenu (*A. butzleri*) se použila komparativní analýza celé genomové sekvence pro přímý vývoj primerů, dále citlivost a specifita jednotlivých primerů a poslední kvantitativní PCR pro srovnání DNA. Nejdříve se vyvinuly PCR primery (IAC-f a IAC-r, IAC, které cílí sekvenci o velikosti 285 bp) pomocí komparativní analýzy genomu, a poté se použili pro přímou detekci *A. butzleri* a enterických patogenů. Kvantifikace DNA byla prováděna v komplexních matricích. Tyto primery byly použity hlavně pro detekci *A. butzleri* spolu s molekulárními a kulturními metodami v Kanadě. Kvantitativní PCR metodou došlo k častějšímu výskytu této bakterie (59,6 %) u lidí s průjmem než naopak. Nejvíce spolehlivá kulivační detekce a kvantifikace probíhala membránovou filtrací na CBA (46 %). Kvůli nevhodně použitým

detekčním podmínkám není doposud pochopena u *A. butzleri* jeho patogenita a epidemiologie. Kvantifikace DNA byla vyšší u lidí s průjmem než bez. Patogenita *A. butzleri* je specifická a může záviset na jiných faktorech, například jak je rezistentní hostitel (Webb *et al.*, 2016).

Bakterie rodu *Arcobacter* jsou také spojeny s faktory virulence, které byly porovnány a optimalizovány třemi testy s multiplexní PCR. Tato metoda může detekovat více genů spojených s virulencí (VAG) u *Arcobacter* spp. Uznávaným cílovým faktorem pro testy byly proteiny vázající fibronektin (*cj1349*), vláknitý hemagglutinin (*hecA*), aktivační protein hemolysinu (*hecB*), hemolysin (*tlyA*), integrální membránový protein (*mviN*), invazin (*ciaB*), vnější membránový protein (*irgA*) a fosfolipázy (*pldA*). Výsledky byly získány z jednotlivých testů PCR, tak i multiplexní PCR a nedocházelo k žádné křížové reakce během testování blízké příbuzných bakteriálních druhů. Citlivost testů se pohybovala od 1 ng do 100 ng DNA. Vyvinuté testy s kombinací dvojic duplexních nebo triplexových PCR primerů VAG byly dále hodnoceny a validovány na izoláty *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* (z fekálních vzorků lidského a zvířecího původu). Distribuce genů *ciaB* (90 %), *mviN* (70 %), *tlyA* (50 %) a *pldA* (45 %) u těchto cílových druhů byla významně vyšší než *hecA* (16 %), *hecB* (10 %) a každý z genů *irgA* a *cj1349* (6 %). Proto tedy nově vyvinuté testy multiplexní PCR mohou být použity jako rychlá technika pro detekci, prevalenci a profilování virulence v *Arcobacter* spp. Navíc mohou být tyto testy snadno prováděny s vysokou průchodností, aby se dostihlo domnělé identifikace patogenu v epidemiologickém vyšetření lidských infekcí (White-Léveillé *et al.*, 2016).

4. Závěr

Bakterie rodu *Arcobacter* jsou považovány za lidské patogeny, které jsou nebezpečné pro lidské zdraví, protože způsobují gastroenteritidu nebo bakterémii. Klinické znaky infekce těchto druhů zahrnují vodnatý průjem a průjem spojený z bolesti břicha. Za lidské patogeny jsou též považovány rody *Campylobacter* a *Helicobacter*.

Pro zjištění identifikace a vlastností jednotlivých druhů rodu *Arcobacter* se pro jejich detekci použily různé molekulárně-biologické metody. Detekce rodu arkobakterů je důležitá kvůli tomu, aby se zamezilo jejich šíření a také se stanovil jejich výskyt, patogenita a virulence.

K identifikaci rodu *Arcobacter* se nejčastěji využívají metody: multiplexní PCR, „real-time“ PCR, PCR-RFLP, MALDI-TOF MS a LAMP.

Dalším neméně významným způsobem zjišťování rodu *Arcobacter* je kombinace metod multiplexní PCR s MALDI-TOF MS. Je to velmi rychlá a šetrná metoda, která se také využívá pro charakterizaci jednotlivých druhů arkobakterů. Tato kombinace vedla k lepším výsledkům při detekci *Arcobacter* spp.

Další neméně důležitou metodou k detekci je kombinace metody PCR s testy na virulenci, které prokázala velmi dobré výsledky, hlavně pro identifikaci patogenů při vyšetření lidských onemocnění.

Závěrem je možné konstatovat, že doposud neexistuje standardizovaná metodika pro sledování výskytu arkobakterů a je i těžké identifikovat všechny izoláty vzhledem k rozmanitosti celého rodu.

5. Použitá literatura

1. **Abdelbaqi, K., Ménard, A., Prouzet-Mauleon, V., Bringaud, F., Lehours, P., Mégraud, F. [2007].** Nucleotide sequence of the *gyrA* gene of *Arcobacter* species and characterization of human ciprofloxacin-resistant clinical isolates. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, **49**, 337-345.
2. **Abdelbaqi, K., Buissonnière, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F., Ménard, A. [2007].** Development of a „real-time“ fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, **45** (9), 3015–3021.
3. **Adam, Z., Whiteduck-Leveillee, K., Cloutier, M., Tambong, J. T., Chen, W., Lewis, C. T., Lévesque, C.A., Topp, E., Lapen, D.R., Talbot, G., Khan, I. U. [2014].** Draft genome sequences of three *arcobacter* strains of pig and dairy cattle manure origin. *Genome announcements*, **2** (3), 00377-14.
4. **Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. [2002].** Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. *Molecular Biology of the Cell, 4th edition, New York: Garland Science*, ISBN 10: 0-8153-4072-9.
5. **Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M., Hess, C. J. [2010].** Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Medical Microbiology*, **59** (3), 295-301.
6. **Antolín, A., González, I., García, T, Hernández, P. E., Martín, R. [2001].** *Arcobacter* spp. enumeration in poultry meat using a combined PCR-ELISA assay. *Meat Science*, **59** (2), 169-174, ISSN 0309-1740.
7. **Atanassova, V., Kessen, V., Reich, F., Klein, G. [2008].** Incidence of *Arcobacter* spp. in poultry: quantitative and qualitative analysis and PCR differentiation. *Journal of food protection*, **71**, 2533–2536.
8. **Banting, G. S., Braithwaite, S., Scott, C., Kim, J., Jeon, B., Ashbolt, N., Ruecker, N., Tymensen, L., Charest, J., Pintar, K., Checkley, S., Neumann, N. F.**

- [2016]. Evaluation of Various *Campylobacter*-Specific Quantitative PCR (qPCR) Assays for Detection and Enumeration of *Campylobacteraceae* in Irrigation Water and Wastewater via a Miniaturized Most-Probable-Number-qPCR Assay. *Applied and environmental microbiology*, 82, 4743–4756.
9. **Banting, G., Figueras, S. M. J. [2017].** *Arcobacter*. In: JB Rose a B. Jiménez-Cisneros, *Global Water Pathogen Project*, Dostupné z <http://www.waterpathogens>.
 10. **Bastyns, K., Cartuyvels, D., Chapelle, S., Vandamme, P., Goossens, H., De, Wachter, R. [1995].** A Variable 23S rDNA Region is a Useful Discriminating Target for Genus-Specific and Species-Specific PCR Amplification in *Arcobacter* Species. *Systematic and Applied Microbiology*, **18** (3), 353-356, ISSN 0723-2020.
 11. **Bresler S. J. [1966].** Molekulární biologie: vysokoškolská příručka. Praha: Academia, ISBN 1042-1852.
 12. **Brightwell, G., Mowat, E., Clemens, R., Boerema, J., Pulford, D. J., On, S. L. [2007].** Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *Journal of Microbiological Methods*, **68** (2), 318-325, ISSN 0167-7012.
 13. **Bursová, Š., Dušková, M., Necedová, L., Karpíšková, R., Myšková, P. [2014].** Mikrobiologické laboratorní metody. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, ISBN 978-80-7305-676-6.
 14. **Collado, L, Figueras, M. J. [2011].** Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Review*, **24** (1), 174-92.
 15. **Collado, L., Levican, A., Perez, J., Figueras, M. J. [2011].** *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *International journal of systematic bacteriology*, **61**, 2155-2161.
 16. **Collado, L., Cleenwerck, I., Van Trapen, S., De, Vos, P., Figueras, M. J. [2009].** *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International journal of systematic bacteriology*, **59**, 1391-1396.

17. **De, Smet S., Vandamme, P., De, Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., Houf, K. [2011].** *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International journal of systematic bacteriology*, **61**, 356-361.
18. **Dhama, K., Karthik, K., Chakraborty, S., Tiwari, R., Kapoor, S., Kumar, A., Thomas, P., [2014].** Loop-mediated isothermal amplification of DNA (LAMP): a new diagnostic tool lights the world of diagnosis of animal and human pathogens: a review. *Pakistan Journal of Biology Science*, **17** (2), 151–166.
19. **Diequez, A. L., Balboa, S., Magnesen, T., Romalde, J. L. [2017].** *Arcobacter lekithochrous* sp. nov., isolated from a molluscan hatchery. *International journal of systematic bacteriology*, **67**, 1327-1332.
20. **Donachie, S. P., Bowman, J.P., On, S.L.W., Alam, M. [2005].** *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International journal of systematic bacteriology*, **55**, 1271-1277.
21. **Doudah, L., De, Zutter, L., Van, Nieuwerburgh, F., Deforce, D., Ingmer, H., Vandenberg, O., Van, den, Abeele, A.M., Houf, K. [2014].** Presence and analysis of plasmids in human and animal associated *Arcobacter* species. *PLOS one*, **9** (1), 85487.
22. **Ellis, W. A., Neill, S. D., O'Brien, J. J., Ferguson, H. W., Hanna, J. [1977].** Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Veterinary Record*, **100** (21), 451-2.
23. **Fallas-Padilla, K. L., Rodríguez-Rodríguez, C. E., Fernández, J. H., Arias-Echandi, M. L. [2014].** *Arcobacter*: comparison of isolation methods, diversity, and potential pathogenic factors in commercially retailed chicken breast meat from Costa Rica. *Journal of food protection*, **77**, 880–884.
24. **Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F. C. [2017].** Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant. *Journal of Applied Microbiology*, **123** (4), 1019-1026.
25. **Figueras, M. J., Collado, L., Guarro, J. [2008].** A new 16S rDNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, **62** (1), 11-15, ISSN 0732-8893.

26. **Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L., Inza, M. I., Yustes, C. [2011].** *Arcobacter ellisii* sp. nov., isolated from mussels. *Systematic and Applied Microbiology*, **34**, 414-418.
27. **Figueras, M. J., Collado, L., Levican, A., Perez, J., Solsona, M. J., Yustes, C. [2011].** *Arcobacter molluscorum* sp. nov., a new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, **34**, 105-109.
28. **Figueras, M. J., Levican, A., Collado, L. [2012].** Updated 16S rRNA-RFLP method for the identification of all currently characterised *Arcobacter* spp. *BMC Microbiology*, **12** (1), ISSN 1471-2180.
29. **Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I. Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., Serraino, A. [2015a].** *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* Circulation in a Dairy Farm and Sources of Milk Contamination. *Applied and environmental mikrobiology*, **81** (15), 5055–5063.
30. **Giacometti, F., Salas-Massó, N., Serraino, A., Figueras, M. J. [2015b].** Characterization of *Arcobacter suis* isolated from water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk. *Food microbiology*. **51**, 186–191.
31. **González, A., Suski, J., Ferrús, M. A. [2010].** Rapid and Accurate Detection of *Arcobacter* Contamination in Commercial Chicken Products and Wastewater Samples by Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Foodborne Pathogens and Disease*, **7** (3), 327-338, ISSN 1535-3141.
32. **Gugliandolo, C., Irrera, G. P., Lentini, V., Maugeri, T. L. [2008].** Pathogenic *Vibrio*, *Aeromonas* and *Arcobacter* spp. associated with copepods in the Straits of Messina (Italy). *Marine pollution bulletin*, **56** (3), 300-3.
33. **Harmon, K. M., Wesley, I. [1996].** Identification of *Arcobacter* isolates by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, **23**, 241-244.
34. **Harmon, K. M., Irene, V., Wesley, I. [1997].** Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacters*. *Veterinary Microbiology*, **58** (2–4), 215-227, ISSN 0378-1135.

35. **Harraß, B., Schwarz, S., Wenzel, S. [1998].** Identification and Characterization of *Arcobacter* Isolates from Broilers by Biochemical Tests. Antimicrobial Resistance Patterns and Plasmid Analysis. *Journal of Veterinary Medicine*, **45**, 87-94.
36. **Hausdorf, L., Neumann, M., Bergmann, I., Sobiella, K., Mundt, K., Fröhling, A., Schlüter, O., Klocke, M. [2013].** Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter* spp. in a spinach-processing plant and evaluation of two *Arcobacter*-specific quantitative PCR assays. *Systematic and Applied Microbiology*. **36**, 235–243.
37. **Hegnauer, R., Hegnauer, M. [2001].** Chemotaxonomie der Pflanzen: eine Übersicht über die Verbreitung und die systematische Bedeutung der Pflanzenstoffe. Basel: Birkhäuser, *Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften*, **14**, ISBN 978-3-7643-2299-1.
38. **Hill, J., Paccagnella, A., Law, K., Melito, P., Woodward, D., Price, L., Leung, A., Ng L., Hemmingsen S, Goh S. J. [2006].** Identification of *Campylobacter* spp. and discrimination from *Helicobacter* and *Arcobacter* spp. by direct sequencing of PCR-amplified cpn60 sequences and comparison to cpnDB, a chaperonin reference sequence database. *Journal of Medical Microbiology*, **55** (4), 393-399.
39. **Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Mast, J., Van, Hoof, J., Vandamme, P. [2005].** *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International journal of systematic bacteriology*, **55**, 713-717.
40. **Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., De, Smet, S., Vandamme, P. [2009].** *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International journal of systematic bacteriology*, **59**, 2599-2604.
41. **Houf, K., Tutenel, A., De, Zutter, L., Van, Hoof, J., Vandamme, P. [2000].** Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters*, **193** (1), 89–94.
42. **Jyothsna, S., Rahul, T. S., Ramaprasad, K., Sasikala, E. V. V., Ramana, CH. [2013].** *Arcobacter anaerophilus* sp. nov., isolated from an estuarine sediment and emended description of the genus *Arcobacter*. *International journal of systematic bacteriology*, **63**, 4619–4625.

43. **Kabeya, H., Kobayashi, Y., Maruyama, S., Mikami, T. [2003].** One-step polymerase chain reaction-based typing of *Arcobacter* species. *International Journal of Food Microbiology*, **81** (2), 163-168, ISSN 0168-1605.
44. **Karthik, K., Rathore, R., Thomas, P., Arun, T. R., Viswas, K. N., Agarwal, R. K., Manjunathachar, H. V., Dhama, K. [2014].** Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) test for specific and rapid detection of *Brucella abortus* in cattle. *Veterinary Quarterly*, **34** (4), 174-179, ISSN 0165-2176.
45. **Kim, H. M., Hwang, C. Y., Cho, B. C. [2010].** *Arcobacter marinus* sp. nov. *International journal of systematic bacteriology*, **60**, 531-536.
46. **Le, Bars, H., Kayal, S., Bonnaure-Mallet, M., Minet, J. [2011].** CASA Chromogenic Medium for Enteric *Campylobacter* Species. *International journal of systematic bacteriology*, **49** (10), 3675–3677.
47. **Lee, G. J., Murano, E. A. [1999].** Development of a New Medium for the Isolation of *Arcobacter* spp. *Journal of Food Protection*, **62** (5), 456-462.
48. **Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. [2005].** Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal Food Microbiology*, **102**, 127-135.
49. **Levican, A., Figueras, M. J. [2013].** Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp. *BMC mikrobiology*, **13**, 220.
50. **Levican, A., Collado, L., Figueras, M. J. [2013].** *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*, **36**, 22-27.
51. **Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L., Figueras, M. J. [2015].** *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology*, **38**, 30-35.
52. **Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diégez, A. L., Romalde, J. L., Figueras, M. J. [2012].** *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*, **35**, 133-138.

53. **Li J., Macdonald J. [2014].** Advances in isothermal amplification: Novel strategies inspired by biological processes. *Biosensors & bioelectronics*, **64**, 196-211.
54. **Marshall, S. M., Melito, P. L., Woodward, D. L., Johnson, W. M., Rodgers, F. G., Mulvey, M. R. [1999].** Rapid identification of *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* isolates by PCR-restriction fragment length polymorphism analysis of the 16S rRNA gene. *Journal of clinical microbiology*, **37** (12), 4158–4160.
55. **Maxam, A. M., Gilbert, W. [1977].** A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **74** (2), 560–4.
56. **Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J. [2011].** Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and environmental microbiology*, **77** (5), 1646–1650.
57. **Miller, W., Yee, E., Jolley, K., Chapman, M. [2014].** Use of an improved *atpA* amplification and sequencing method to identify members of the *Campylobacteraceae* and *Helicobacteraceae*. *Letters of Applied Microbiology*, **58**, 582-590.
58. **Mullis, K. B., Ferré, F., Gibbs, R. A. [1994].** The Polymerase Chain Reaction. Birkhauser, Boston, ISBN 9781461202578.
59. **Neubauer, C., Hess, M. [2006].** Detection and identification of food-borne pathogens of the genera *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter* by multiplex PCR in poultry and poultry products. *Journal of Veterinary Medicine*, **53**, 376-381.
60. **Nollau, P., Wagener, Ch. [1997].** Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment. *Journal of Clinical Chemistry*, **43** (7), 1114-1128.
61. **Neill, S. D., Campbell, J. N., O'Brien, J. J., Weatherup, S. T. C., Ellis, W. A. [1985].** Taxonomic Position of *Campylobacter cryaerophila* sp. nov. *International journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **35** (3), 342-356.
62. **Pavlík, MUDr. E. [1999a].** Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 3. Univerzita Karlova a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie a patobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Dostupné z:< <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.

63. **Pavlík, MUDr. E. [1999b]**. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 2. Univerzita Karlova a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie a patobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Dostupné z:< <http://www. Roche-Diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.
64. **Pavlík, MUDr. E. [1999c]**. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 1. Univerzita Karlova a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie a patobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Dostupné z:< <http://www. Roche-Diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.
65. **Pavlík, MUDr. E. [1999d]**. Molekulárně biologické techniky pro mikrobiologickou diagnostiku-část 8. Univerzita Karlova a Oddělení molekulárně biologické diagnostiky Ústavu biochemie a patobiochemie Fakultní nemocnice Královské Vinohrady. Dostupné z:< <http://www. Roche-Diagnostics.cz/download/la/odborne/pcr3.pdf>.
66. **Pentimalli, D., Pegels, N., García, T., Martín, R., González, I. [2009]**. Specific PCR detection of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, *Arcobacter skirrowii*, and *Arcobacter cibarius* in chicken meat. *Jouranal of Food Protection*, **72** (7), 1491–1495.
67. **Raclavský V. [2003]**. Metody molekulární genetiky. Ústav biologie Lékařské fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, Kapitola 8. Sekvenování DNA.
68. **Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K. [2017]**. *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, **37** (1), 136-161.
69. **Samarajeewa, A. D., Hammad, A., Masson, L., Khan, I. U. H., Scroggin,s R., Beaudette, L. A. [2015]**. Comparative assessment of next-generation sequencing, denaturing gradient gel electrophoresis, clonal restriction fragment length polymorphism and cloning-sequencing as methods for characterizing commercial microbial consortia. *Journal of Microbiological Methods*, **108**, 103-111.
70. **Sanger, F., Coulson, A. R. [1975]**. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of Molecular Biology*, **94** (3), 441–8.

71. **Schindler, J. [2014].** Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů. 2, Praha: Grada, ISBN 978-80-247-4771-2.
72. **Smith, L. M., Sanders, J. Z., Kaiser, R. J., Hughes, P., Dodd, C., Connel, C. R., Heiner, C., Kent, S. B., Hood, L. E. [1986].** Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature*, 321, 674–9.
73. **Snelling, W., Matsuda, M., Moore, J., Dooley, J. [2006].** Under the Microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*, 42, 7-14.
74. **Suarez, D. L., Wesley, I. V., David, J., Larson, D. J. [1997].** Detection of *Arcobacter* species in gastric samples from swine. *Veterinary Microbiology*, 57 (4), 325-336, ISSN 0378-1135.
75. **Sultana, S. [2017].** Detection of *Campylobacter* spp. from Poultry and Poultry Products in Dhaka, Bangladesh. *Journal of Network Medicine and Targeted Therapies*, 1 (1).
76. **Šilha, D., Vacková, B, Šilhová, L. [2019].** Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiologica*, 64 (1), 25-31.
77. **Šmarda, J. [2010].** Metody molekulární biologie. Brno: Masarykova univerzita, ISBN 978-80-210-3841-7.
78. **Tanaka, R., Cleenwerck, I., Mizutani, Y., Iehata, S., Bossier, P., Vandamme, P. [2017].** *Arcobacter haliotis* sp. nov., isolated from abalone species *Haliotis gigantea*. *International journal of systematic bacteriology*, 67, 3050-3056.
79. **Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., De, Ley, J. [1991].** Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International journal of systematic bacteriology*, 41, 88-103.
80. **Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., Van, den, Borre, Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., Goosens, H. [1992].** Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant

- bacterium isolated from veterinary specimens. *International journal of systematic bacteriology*, 42, 344–356.
81. **Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., Vandamme, P. [2004].** *Arcobacter* species in humans. *Emerging infectious diseases*, 10, 1863–1867.
 82. **Van, Driessche, E., Houf, K. [2008].** Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of applied microbiology*, **105**, 443–451.
 83. **Vergis, J., Negi, M., Poharkar, K., Das, D. P., Malik, S. V. S., Kumar, A., Doijad, S. P., Barbuddhe, S. B., Rawool, D. B. [2013].** 16S rRNA PCR followed by restriction endonuclease digestion: A rapid approach for genus level identification of important enteric bacterial pathogens. *Journal of Microbiological Methods*, 95 (3), 353–356, ISSN 0167-7012.
 84. **Wang, X., Seo, D. J., Lee, M. H., Choi, C. [2014].** Comparison of conventional PCR, multiplex PCR, and loop-mediated isothermal amplification assays for rapid detection of *Arcobacter* species. *Journal of clinical microbiology*, **52** (2), 557–563.
 85. **Webb, A. L., Boras, V. F., Kruczkiewicz, P., Selinger, L. B., Taboada, E. N., Inglis, G. D. [2016].** Comparative Detection and Quantification of *Arcobacter butzleri* in Stools from Diarrheic and Nondiarrheic People in Southwestern Alberta, Canada. *Journal of clinical microbiology*, **54** (4), 1082–1088.
 86. **Wesley, I. V. [1996].** *Helicobacter* and *Arcobacter* Species: Risks for Foods and Beverages. *Journal of Food Protection*, **59** (10), 1127–1132.
 87. **Wesley, I. V., Schroeder-Tucker, L., Baetz, A. L., Dewhirst, F. E., Paster, B. J. [1995].** *Arcobacter*-specific and *Arcobacter butzleri*-specific 16S rRNA-based DNA probes. *Journal of clinical microbiology*, **33** (7), 1691–1698.
 88. **White, T. J., Madej, R., Persing, D. H. [1992].** The polymerase chain reaction: clinical applications. *Adventure Clinical Chemistry*, **29**, 161–196.
 89. **Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Topp, E., Lapen, D. R., Talbot, G., Villemur, R., Khan, I. U. H. [2016].** Development and evaluation of multiplex PCR assays for

rapid detection of virulence-associated genes in *Arcobacter* species. *Journal of Microbiological Methods*, **121**, 59-65, ISSN 0167-7012.

90. **Whiteduck-Léveillé, K., Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Tambong, J. T., Xu, R., Topp, E., Arts, M. T., Chao, J., Adam, Z., Andre-Lévesque, C., Lapen, D. R., Villemur, R., Talbot, G., Khan, I. U. H. [2015].** *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International journal of systematic bacteriology*, **65**, 2709-2716.
91. **Zhang, Z., Yu, C., Wang, X., Yu, S., Zhang, X. H. [2016].** *Arcobacter pacificus* sp. nov., isolated from seawater of the South Pacific Gyre. *International journal of systematic bacteriology*, **66**, 542-547.
92. **Biomérieux.** Biochemické testy pro identifikaci *Arcobacter* spp. [cit. 2019-21-6]. Dostupné z: <https://biomerieuxdirect.com/industry/Bacteriology/ID-AST-Manual/ID-AST-API/ID-Manual/Api-galleries-Others/API%26reg-CAMPY-%2812STRIPS%2B24MEDIA%29/p/20800>.
93. **Bioline.** Reakce reverzní PCR [cit. 2019-21-6]. Dostupné z: <https://www.bioline.com/one-step-vs-two-step-real-time-pcr.html#>
94. **LabGuide.** Izolace genomové DNA [cit. 2019-21-6]. Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/%20izolace-a-purifikace-nukleovych-kyselin/izolace-genomove-dna/>