

**UNIVERZITA PARDUBICE**  
**FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**2021**

**Zuzana Koutníková**

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická

Typizační metody pro identifikaci bakterií čeledi *Arcobacteraceae*  
Zuzana Koutníková

Bakalářská práce  
2021

Univerzita Pardubice  
Fakulta chemicko-technologická  
Akademický rok: 2020/2021

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Zuzana Koutníková**  
Osobní číslo: **C18244**  
Studijní program: **B3912 Speciální chemicko-biologické obory**  
Studijní obor: **Zdravotní laborant**  
Téma práce: **Typizační metody pro identifikaci bakterií čeledi *Arcobacteraceae***  
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

### Zásady pro vypracování

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši na zadané téma. Zabývejte se bakteriemi čeledi *Arcobacteraceae* dle aktuální taxonomie.
2. Vypracujte literární rešerši o možnostech typizace mikroorganismů a dostupných typizačních metodách.
3. Zabývejte se konkrétními metodikami a protokoly popsánymi právě pro typizaci „*Arcobacter*-like mikroorganismů“ – srovnání výhod a nevýhod, příklady identifikace, atp.
4. Bakalářskou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“.

Rozsah pracovní zprávy: **25 s.**  
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**  
Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí bakalářské práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**  
Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání bakalářské práce: **18. prosince 2020**  
Termín odevzdání bakalářské práce: **2. července 2021**

L.S.

---

**prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.**  
děkan

---

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

V Pardubicích dne 26. února 2021

**Prohlašuji:**

Práci s názvem „Typizační metody pro identifikaci bakterií čeledi *Arcobacteraceae*“sem 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., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, 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. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 30. 6. 2021

Zuzana Koutníková v. r.

## **Poděkování**

Tímto bych ráda poděkovala vedoucímu bakalářské práce Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za jeho cenné rady, trpělivost a odborný dohled, který mi při zpracování této bakalářské práce poskytl.

Poděkování obzvláště také patří mé rodině, která mi po celou dobu studia poskytovala neocenitelnou oporu a rodinné zázemí.

**Anotace**

Bakalářská práce je věnována obecně typizaci a typizačním metodám, především rozdělení těchto metod, jejich popisu a také kritériím pro vhodný výběr typizačních metod. Významná část bakalářské práce se zabývá potravinovými patogeny řadícími se do čeledi *Arcobacteraceae*. Závěrečná část práce hodnotí typizační metody, které se zaměřují na typizaci *Arcobacter*-like bakterií.

**Klíčová slova**

Typizace, typizační metody, genotypizace, fenotypizace, *Arcobacter*-like, *Arcobacteraceae*

**Title**

Typing methods for identification of bacteria of the family *Arcobacteraceae*

**Annotation**

This thesis is devoted to general typing and typing methods, especially the division of these methods, their description and also the criteria for the appropriate selection of typing methods. A significant part of the thesis deals with emerging food pathogens belonging to the family *Arcobacteraceae*. The final part of the work evaluates typing methods that focus on the typing of *Arcobacter*-like bacteria.

**Keywords**

Typing, typing methods, genotyping, fenotyping, *Arcobacter*-like, *Arcobacteraceae*

# Obsah

Úvod.....	14
<b>1 Typizace a typizační metody.....</b>	<b>14</b>
1.1 Kritéria pro hodnocení typizačních metod.....	15
1.1.1 Kritéria výkonu.....	15
1.1.2 Kritéria pro komfort použitelnosti.....	16
<b>2 Fenotypové metody.....</b>	<b>18</b>
2.1 Biotypizace a proteinová analýza.....	18
2.2 Sérotypizace.....	20
2.3 Fagotypizace.....	20
2.4 Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika.....	21
<b>3 Genotypové metody.....</b>	<b>23</b>
3.1 Ribotypizace.....	23
3.2 Pulzní gelová elektroforéza.....	24
3.2.1 Vnořená PCR.....	24
3.2.2 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí.....	26
3.2.3 Kvantitativní PCR v reálném čase.....	26
3.2.4 Multiplexní polymerázová řetězová reakce.....	27
3.2.5 Inverzní polymerázová řetězová reakce.....	27
3.3 Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů.....	28
3.4 Sekvenování DNA.....	29
3.5 Multilokusová sekvenční typizace.....	29
<b>4 Čeleď <i>Arcobacteraceae</i>.....</b>	<b>31</b>
4.1 Taxonomie.....	31
4.1.1 Vybrané rody z čeledi <i>Arcobacteraceae</i> .....	33
4.2 Výskyt a způsob přenosu.....	34
4.2.1 Výskyt bakterií čeledi <i>Arcobacteraceae</i> .....	34
4.2.2 Způsob přenosu.....	35
4.3 Klinický význam.....	36
4.4 Patogenita a virulence.....	37
<b>5 Typizační metody k identifikaci bakterií čeledi <i>Arcobacteraceae</i>.....</b>	<b>39</b>
5.1 Izolace <i>Arcobacter</i> .....	39



5.2	Identifikace <i>Arcobacter</i> fenotypovými metodami.....	40
5.2.1	Kultivační techniky identifikace <i>Arcobacter</i> .....	40
5.2.2	Biochemické testy identifikace <i>Arcobacter</i> .....	41
5.2.3	Sérologické testy k identifikaci <i>Arcobacter</i> .....	42
5.2.4	Identifikace <i>Arcobacter</i> za pomoci MALDI-TOF-MS.....	42
5.2.5	Testování antimikrobiální citlivosti <i>Arcobacter</i> .....	43
5.3	Identifikace <i>Arcobacter</i> genotypovými metodami.....	44
5.3.1	Identifikace <i>Arcobacter</i> metodou MLST.....	45
5.3.2	Identifikace <i>Arcobacter</i> metodou AFLP.....	46
5.3.3	Identifikace <i>Arcobacter</i> pomocí PFGE.....	46
5.3.4	Identifikace <i>Arcobacter</i> metodou PCR.....	48
	<b>Závěr</b> .....	<b>52</b>

## Seznam použitých zkratek

AFLP	Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů (z angl. <i>Amplified fragment length polymorphism</i> )
ELISA	Enzymatický imunosorbentní test (z angl. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
LCR	Ligázová řetězová reakce (z angl. <i>Ligase chain reaction</i> )
MALDI-MS	Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací (z angl. <i>Matrix assisted laser desorption/ionization mass spectrometry</i> )
MLST	Multilokusová sekvenční typizace (z angl. <i>Multilocus sequence typing</i> )
PCR	Polymerázová řetězová reakce (z angl. <i>Polymerase chain reaction</i> )
PFGE	Pulzní gelová elektroforéza (z angl. <i>Pulsed-field electrophoresis</i> )
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (z angl. <i>Restriction fragment length polymorphism</i> )
TAS	Zesilovací systém založený na transkripci (z angl. <i>Transcription-based amplification system</i> )
kbp	Kilobázový pár (z angl. <i>Kilobase pair</i> )
bp	Pár bazí (z angl. <i>Base pair</i> )
ATB	Antibiotika (z angl. <i>Antibiotics</i> )
DNA	Deoxyribonukleová kyselina (z angl. <i>Deoxyribonucleid acid</i> )
cDNA	Komplementární DNA (z angl. <i>Complementary DNA</i> )
RNA	Ribonukleová kyselina (z angl. <i>Ribonucleoid acid</i> )
rRNA	Ribosomální RNA (z angl. <i>Ribosomal RNA</i> )
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (z angl. <i>Revers transcription polymerase chain reaction</i> )
CFU	Jednotky tvořící kolonie (z angl. <i>Colony forming units</i> )

## Seznam tabulek

<b>Tabulka 1</b> Metody používané v klinických laboratořích pro bakteriální identifikaci nebo typizaci (Castro-Escarpulli <i>et al.</i> , 2015).....	15
<b>Tabulka 2</b> Přehled charakteristik několika v současné době používaných metod mikrobiální typizace (upraveno dle Belkum <i>et al.</i> , 2001, Stefani <i>et al.</i> , 2012, Saghrouni <i>et al.</i> , 2013, Rodriguez <i>et al.</i> , 2016) .....	18

## Seznam ilustrací

<b>Obrázek 1</b> Schéma MALDI-TOF MS pro identifikaci mikroorganismů (Pavlovic <i>et al.</i> , 2013) .....	20
<b>Obrázek 2</b> Schéma principu metody MALDI-TOF MS (Pavlovic <i>et al.</i> , 2013) .....	21
<b>Obrázek 3</b> Výsledky testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika (Tenover, 2009) .....	23
<b>Obrázek 4</b> Schéma principu polymerázové řetězové reakce (Garabian and Avashia, 2013). .....	26
<b>Obrázek 5</b> <i>Arcobacter butzleri</i> v elektronovém mikroskopu na membránovém filtru (Snelling <i>et al.</i> , 2006) .....	32
<b>Obrázek 6</b> Fylogenetické schéma založené na analýza genu 16 S rRNA (On <i>et al.</i> , 2019). .....	34
<b>Obrázek 7</b> Postupný vznik a vývoj <i>Arcobacter</i> (Ramees <i>et al.</i> , 2017).....	36
<b>Obrázek 8</b> Možné cesty přenosu <i>Arcobacter-like</i> (Ferreira <i>et al.</i> , 2019) .....	37
<b>Obrázek 9</b> Přehled patogeneze a přenosu bakterií rodů <i>Arcobacter-like</i> (Rammes <i>et al.</i> , 2017) .....	39
<b>Obrázek 10</b> Mechanismus virulence <i>Arcobacter spp.</i> , (Collado and Figueras, 2020) .....	39
<b>Obrázek 11</b> Schéma izolace <i>Arcobacter-like</i> z tkáních potracených selat (Tucker <i>et al.</i> , 1996) .....	41
<b>Obrázek 12</b> PFGE profily kmenů <i>Arcobacter</i> (Rivas <i>et al.</i> , 2004) .....	48
<b>Obrázek 13</b> Výsledek multiplexní PCR u izolátu <i>Arcobacter-like</i> (Celik and Unver, 2015) .....	51

## Seznam grafů

<b>Graf 1</b> Analýza počtu vědeckých publikací využívající fenotypové metody pro typizaci mikroorganismů (Brzowski <i>et al.</i> , 2017) .....	18
<b>Graf 2</b> Analýza počtu vědeckých publikací využívající genotypové metody pro typizaci mikroorganismů (Brzowski <i>et al.</i> , 2017) .....	18

## Úvod

Typizace neboli klonální analýza se zabývá bližší klasifikací mikroorganismů. Typizační metody prokazují genotypové a fenotypové znaky specifické pro izoláty, které lze použít k objasnění zdrojů a cest šíření bakterií (Belkum *et al.*, 2001). Důležitá je především typizace a identifikace patogenních mikroorganismů tedy těch, kteří způsobují infekce u lidí nebo zvířat. Získané informace nám poté umožňují předvídat etiopatogenní důsledky těchto patogenních mikroorganismů, jejich klinický vývoj a aplikaci účinné antimikrobiální terapie. Tato identifikace musí být nejen klinicky užitečná, ale i především rychle proveditelná (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

Typizaci můžeme rozdělit na dvě velké skupiny. Fenotypové typizační metody, pod které spadá např. sledování antimikrobiální citlivosti, biotypizace, sérotypizace nebo fágová typizace. Mezi genotypové typizační metody řadíme PCR, sekvenování DNA, ribotypizaci nebo PFGE.

Ve své práci se blíže zaměřím na typizační metody využitelné a také aplikovatelné pro typizaci bakteriální čeledi *Arcobacteraceae*. Přesná typizace zástupců této čeledi má velký význam, jelikož tato čeleď zahrnuje rody a druhy, které jsou považovány v současné době za patogeny přenášené potravinami, vodou či se jedná o potenciální původce zoonóz (Wang *et al.*, 2020).

# 1 Typizace a typizační metody

Typizace (klonální analýza) slouží především k zařazení mikroorganismů mezi jednotlivé kmeny (klony). Mikrobiální typizace je používána k určení zdroje a cesty nákazy, k potvrzení nebo vyloučení ohnisek onemocnění, ke sledování křížového přenosu patogenů, k rozpoznání virulentních kmenů a také k vyhodnocení účinnosti kontrolních opatření (Karimi *et al.*, 2018).

Typizační techniky zlepšují naše znalosti v oblasti epidemiologie mikroorganismů. Široké uplatnění mají zejména v diagnostice mikroorganismů nebo ve výzkumu patogeneze mikroorganismů. Schopnost rozlišovat mezi kmeny patogenních mikroorganismů je pro nás zásadní pro epidemiologickou a dozorovou analýzu, studium struktury a dynamiky populace mikroorganismů a také pro vylepšení strategie kontroly veřejného zdraví. Aby bylo dosaženo takovýchto cílů, bylo navrženo několik typizačních metod (Pérez-Losada *et al.*, 2017).

Postupy typizačních metod jsou specifické pro různé fenotypové nebo genotypové charakteristiky. Typizační metody jsou obecně použitelné pro jakýkoliv mikrobiální druh nebo mikrobiální rod (Belkum *et al.*, 2001). Jednou z typizačních metod je tradiční fenotypová typizace používaná již mnoho let, která je založena na analýze fenotypových vlastností – např. sérotypizace, biotypizace, fágová typizace či analýza antibiogramů (Foxman *et al.*, 2005). Mezi další typizační metody řadíme novější genotypové metody založené na analýze genetické příbuznosti, a to buď na nepřímé (např. fingerprintové metody) nebo na přímé analýze příbuznosti pomocí sekvence vybraných genů (Meltner and Malmgren, 2014). Tabulka 1 zobrazuje nejčastěji používané metody v klinických laboratořích, které jsou vhodné pro bakteriální typizaci a identifikaci.

**Tabulka 1** Metody používané v klinických laboratořích pro bakteriální identifikaci nebo typizaci (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015)

Fenotypové metody	Genotypové metody
Biochemické reakce	Ribotypizace
Serologická typizace	Ligázová řetězová reakce (LCR)
Citlivost k antibakteriálním látkám	Analýza polymorfismu plazmidů
Fagotypizace	Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její varianty
Citlivost na bakteriociny	Pulzní gelová elektroforéza (PFGE)
Profil buněčných proteinů	Multilokusová sekvenční typizace (MLST)

## 1.1 Kritéria pro hodnocení typizačních metod

Před použitím jakékoli typizační metody musí být prokázána její vhodnost. Každá typizační metoda je validována a hodnocena řadou kritérií. Typizační metody jsou hodnoceny z hlediska jejich výkonu (reprodukovatelnost, typizovatelnost atd.) a komfortu použitelnosti (rychlost, cena, dostupnost reagentů) (Adzitey *et al.*, 2013). Kritéria výkonu stanovují hodnotu metody a taktéž její vhodnost pro typizaci konkrétního mikrobiálního druhu. Kritéria proveditelnosti jsou důležitá pro výběr vhodné metody v závislosti na finanční a technické dostupnosti (Belkum *et al.*, 2007).

Typizační systém by měl být reprodukovatelný, lehce aplikovatelný s vysokou diskriminační kapacitou a měl by poskytovat snadno interpretovatelné výsledky (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015), zároveň musí být rychlý a levný. Pokud se typizační metoda používá pro nepřetržitý provoz, musí v průběhu studovaného období přinést především výsledky s vysokou stabilitou izolátu. Díky tomu je možné interpretovat účinná opatření pro zpětnou kontrolu. Dále je vhodné, aby byly tyto typizační metody použitelné pro širokou škálu mikroorganismů (Sabat *et al.*, 2013).

### 1.1.1 Kritéria výkonu

#### Stabilita

Stabilita epidemiologických markerů podmiňuje schopnost typizačního systému rozpoznat klonální příbuznost kmenů, a to navzdory fenotypové nebo genotypové variaci, ke které může dojít během laboratorního uchování a replikace nebo během klonálního šíření v přírodě (Struelens *et al.*, 1996). Při testování stability je potřeba zpracovat více subkultur stejného izolátu skladovaných za různých podmínek a ve stejném cyklu, aby se minimalizovaly laboratorně zavedené variace daného mikroorganismu (Belkum *et al.*, 2007).

#### Typizovatelnost

Typizovatelnost lze chápat jako procentuální vyjádření počtu izolátů, které je možné typizační metodou zařadit do rodu, druhu nebo poddruhu, v poměru k jejich celkovému počtu (Hamal *et al.*, 2007).



## **Diskriminační síla**

Chápeme ji jako průměrnou pravděpodobnost, při které typizační systém přiřadí stejný typ kmene kmenům náhodně vzorkovaným ze stejné skupiny (Foxman *et al.*, 2005). Diskriminační síla je ovlivněna mnoha faktory, jako jsou použité enzymy, primery, enzymatické, či amplifikační podmínky (Li *et al.*, 2009). V případě fenotypových metod je diskriminační síla nízká. U metod dochází k málo shodám s dostupnými epidemiologickými podklady, je to způsobeno díky možné podobnosti fenotypových vlastností odlišných kmenů (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015).

## **Reprodukovatelnost**

Jedná se o schopnost typizační metody dosáhnout stejného výsledku při každém provedení stejného testu (Li *et al.*, 2009). Při zjišťování reprodukovatelnosti metody jsou jednotlivá měření prováděna se změnou některých podmínek např. časový odstup, změna místa nebo měřicího přístroje. Metody poskytující vysokou reprodukovatelnost umožňující začlenění výsledků do databází a analyzování specializovaným softwarem (Belkum *et al.*, 2007).

### **1.1.2 Kritéria pro komfort použitelnosti**

#### **Rychlost**

Týká se času potřebného k přechodu z bakteriálních izolátů do konečných výsledků typizace. Nejlepšího času lze dosáhnout pomocí metod, které se aplikují přímo na klinické materiály, tzn. postupy nezávislé na izolované kultuře (Belkum *et al.*, 2007). Čas potřebný k získání výsledků je jedním z důležitých aspektů při výběru typizační metody (Li *et al.*, 2009).

#### **Dostupnost a obtížnost aplikace metody**

Závisí na dostupnosti reagensů, vybavení a dovednostech v dané laboratoři. Lehkost použití zahrnuje technickou jednoduchost, pracovní zátěž a vhodnost pro zpracování velkého množství izolátů, snadné bodování a interpretaci výsledků (Belkum *et al.*, 2007). Z praktického hlediska by měl být typizační systém především snadno použitelný a interpretovatelný (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015). Při výběru typizační metody je důležitým aspektem také obtížnost dané techniky (Li *et al.*, 2009).

#### **Finanční nákladnost**

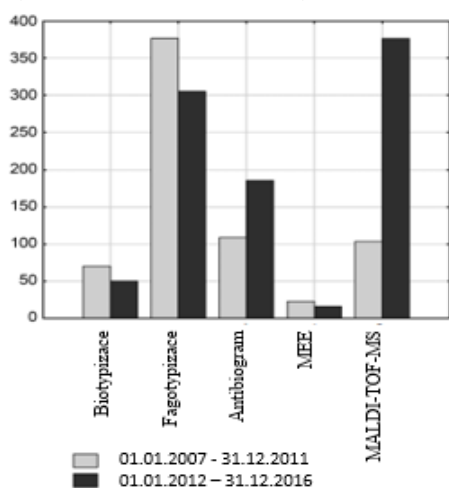
Řadíme sem náklady na zařízení, servis, cenu potřebného vybavení, snadnou dostupnost náhradních dílů a náklady na spotřební reagentie. Dále personální náklady, které závisí na počtu a platové třídě personálu, jeho zaškolení a kompetencí pro akreditaci (Belkum *et al.*, 2007).

**Tabulka 2** Přehled charakteristik několika v současné době používaných metod mikrobiální typizace (upraveno dle Belkum *et al.*, 2001; Stefani *et al.*, 2012; Saghrouni *et al.*, 2013; Rodriguez *et al.*, 2016)

Metoda	Typizovatelnost	Reprodukovatelnost	Obtížnost	Náklady
<b>Fenotypové metody</b>				
<b>Antibiogram</b>	Dobrá	Dobrá	Snadná	Nízké
<b>Biotypizace</b>	Vynikající	Proměnlivá	Snadná	Nízké
<b>Sérotypizace</b>	Variabilní	Dobrá	Snadná	Vysoké
<b>Fagotypizace</b>	Variabilní	Proměnlivá	Snadná	Nízké
<b>Proteinová Analýza</b>	Variabilní	Variabilní	Snadná	Vysoké
<b>Genotypové metody</b>				
<b>Ribotypizace</b>	Vysoká	Problematická	Náročná	Vysoké
<b>PFGE</b>	Vysoká	Vysoká	Zdlouhavá	Vysoké
<b>PCR</b>	Vysoká	Dobrá	Snadná	Vysoké
<b>AFLP</b>	Vysoká	Dobrá	Obtížná	Nízké
<b>MLST</b>	Dobrá	Vysoká	Snadná	Vysoké

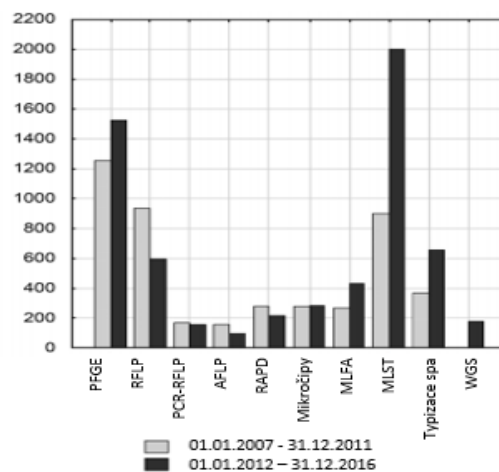
PFGE – Pulzní gelová elektroforéza; PCR – Polymerázová řetězová reakce; AFLP – Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů; MLST – Multilokusová sekvenční analýza

**Graf 1** Analýza počtu vědeckých publikací využívající fenotypové metody pro typizaci mikroorganismů (Brzozowski *et al.*, 2017)



MLEE – Multi-lucus enzymová elektroforéza; MALDI-TOF-MS – Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorcpcí a ionizací

**Graf 2** Analýza počtu vědeckých publikací využívající genotypové metody pro typizaci mikroorganismů (Brzozowski *et al.*, 2017)



PFGE – Pulzní gelová elektroforéza; RFLP – Polymorfismus délky restričních enzymů; AFLP – Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů; RAPD – Náhodný amplifikovaný polimorfismus DNA; MLST – Multilokusová sekvenční analýza; WGS – Sekvenování celého genomu

## 2 Fenotypové metody

Fenotypové metody jsou využívány v epidemiologii a diagnostice mikroorganismů. Při identifikaci mikrobiálních izolátů fenotypizací je důležitá přítomnost nebo nepřítomnost metabolických a biologických aktivit izolovaného organismu (Brzozowski *et al.*, 2017; Eberle and Kiess, 2012). Fenotypizace zahrnuje sledování a hodnocení morfologie, barvy, zápachu a dalších makroskopických rysů kolonií (Belkum *et al.*, 2007). Dále sem můžeme zařadit biotypizaci, sérotypizaci, fágová typizace, analýza antiobiogramu a metody proteinové analýzy. Jelikož mikroorganismy mohou měnit genovou expresi v závislosti na prostředí, mohou dva geneticky ideální organismy být fenotypově uznány jako navzájem odlišné. V opačném případě existuje možnost jednotlivých bodových mutací, inserce nebo delece mezi izoláty jednoho kmene, které mohou pozměnit fenotyp (Brzozowski *et al.*, 2017).

Pomocí fenotypových metod můžeme identifikovat mikroorganismy na úrovni druhu, méně často na úrovni kmene. Fenotypizace mikroorganismů je vyhodnocována kombinací výsledků z více fenotypových metod. Fenotypová identifikace je především založena na srovnávání fenotypových charakteristik neznámých mikroorganismů s charakteristikami typové kultury (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015). Dále je založena na údajích poskytnutých všemi typizačními metodami, které nejsou založeny na analýze DNA nebo RNA, včetně chemotaxonomických metod, které informují o chemickém složení mikrobiálních buněk.

Fenotypové metody samy o sobě nestačí k úplné identifikaci mikroorganismů a musí být doprovázeny genotypovou analýzou (Doneli *et al.*, 2012). Všechny tyto metody vyžadují přísnou standardizaci z důvodu náchylnosti fenotypu ke změnám podmínek prostředí (Belkum *et al.*, 2007).

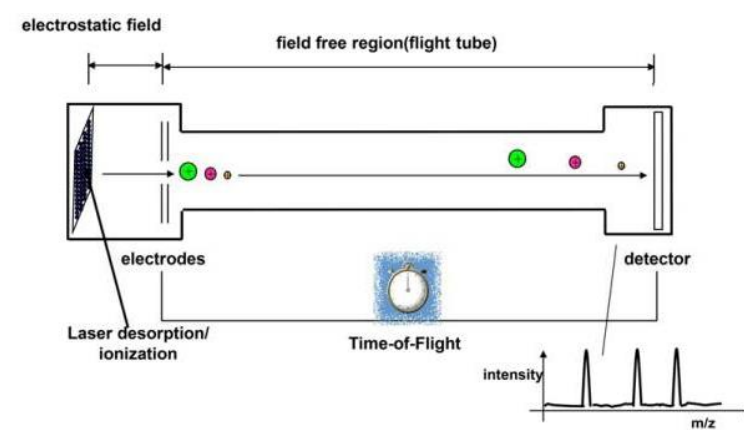
### 2.1 Biotypizace a proteinová analýza

Metody založené na biotypizaci jsou snadné na provedení, relativně levné a rychlé. Díky těmto charakteristikám jsou tyto metody vhodné pro rychlou identifikaci izolátů (Eberle and Kiess, 2012).

Biotypizace bakterií je založena na metabolických aktivitách mikroorganismů (Brzozowski *et al.*, 2017). Tyto aktivity mohou být popsány pomocí biochemických reakcí (Eberle and Kiess, 2012), které zahrnují enzymatickou aktivitu, produkci plynu, zkvašování glukósy a sledování dalších biochemických reakcí izolovaného mikroorganismu (Donelli *et al.*, 2012).

I přes značnou proteinovou podobnost mezi jednotlivými druhy má každý mikroorganismus charakteristický proteinový profil „otisk prstu“. Při identifikaci konkrétního mikroorganismu lze využít právě rozdílů v expresi proteinů (Váradi *et al.*, 2017). Metody analýzy proteinů můžeme provádět pomocí elektroforézy nebo lze proteiny identifikovat hmotnostní spektroskopií (Brzozowski *et al.*, 2017). Následně se proteiny porovnávají se vzorci celobuněčných, denaturovaných proteinů nebo se vzorci proteinů na vnějších membránách mikroorganismu s referenčními databázemi (Olsen *et al.*, 2011).

Biotypizace i proteinová analýza se také můžou provádět pomocí automatizovaných nebo poloautomatizovaných systémů jako jsou MALDI-TOF MS, MIKROLA a VITEK (Brzozowski *et al.*, 2017).

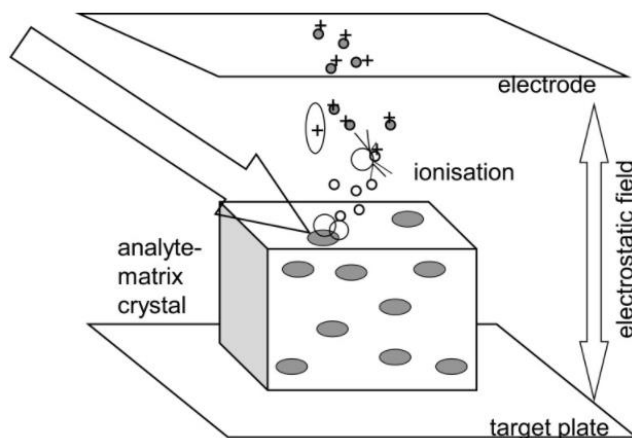


**Obrázek 1** Schéma MALDI-TOF MS pro identifikaci mikroorganismů (Pavlovic *et al.*, 2013)

Výsledky získané z automatických nebo poloautomatických systémů se uvádí jako procento podobnosti známých druhů. Obvykle se uvádí 80 % a více jako dostatečné pro druhovou identifikaci, zřídka kdy je výsledek 100 % (Meltner and Malmgren, 2014). Tyto výsledky jsou tak srovnatelné s výsledky standardizovaných testů nebo s databázemi profilů známých druhů mikroorganismů (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015). Reprodukovatelnost metody závisí především na studovaném organismu (Belkum *et al.*, 2007).

MALDI-TOF MS má velký význam při typizaci epidemiologických kmenů a detekci antimikrobiální citlivosti. Metoda hmotnostní spektroskopie je založena na detekci spektrálních znaků pocházejících z proteinů. Jedná se o proteiny ribozomální a proteiny vázající nukleové kyseliny (Giacometti *et al.*, 2018). Tato metoda je založena na generování profilu molekul biomarkrů pomocí měření přesného poměru hmotnosti a náboje peptidu a proteinu (Alispahic *et al.*, 2010). Pro analýzu pomocí automatizovaných systémů jsou potřeba

specializovaná zařízení, jako je laserový denzitometr a počítačové programy pro porovnávání vzorků. Tyto metody prokázaly špatnou diskriminační schopnost (Olsen *et al.*, 2011).



**Obrázek 2** Schéma principu metody MALDI-TOF MS (Pavlovic *et al.*, 2013)

## 2.2 Sérotypizace

Sérotypizace jsou spolehlivé, vysoce diskriminační, reprodukovatelné metody se širokou použitelností (Belkum *et al.*, 2007). Pro dosažení nezvratných výsledků může být sérotypizace časově i finančně náročná, jelikož je pro takovéto výsledky nezbytné využití velké sady drahých antisér (Sabat *et al.*, 2013).

Metody sérotypizace využívají odlišností v povrchových strukturách mikroorganismů. Pro detekci těchto povrchových struktur jsou používána komerčně dodávaná antiséra a protilátky (Eberle and Kiess, 2012). Sérotypizace tedy funguje na velmi podobném principu jako imunologická typizace (Liu *et al.*, 2011). Mezi sérotypizační metody můžeme zařadit aglutinaci, precipitaci, imunofluorescenci, jako modernější metody můžeme uvést metodu ELISA nebo Western blotting (Olsen *et al.*, 2011). Typicky se sérotypizace provádí sklíčkovou metodou za použití sad antisér, které po reakci s izolátem definují konkrétní sérotyp mikroorganismu (Jenkins *et al.*, 2017).

## 2.3 Fagotypizace

Fagotypizace je založena na rozlišování antigeně a biochemicky shodných bakteriálních kmenů pomocí standardních specifických bakteriofágů (Abedon *et al.*, 2009). Základním principem fágové typizace je hostitelská specifita bakteriofágů. Na tomto základě bylo vyvinuto

několik schémat fágové typizace pro sérovary klinického nebo epidemiologického významu (Crump and Wain, 2017). Bakteriofág (fág) je vir schopný infikovat bakterie a způsobit jejich rozklad. Fágy jsou extrémně hojné ve vodním a suchozemském prostředí a jsou přítomny všude tam, kde mohou jejich hostitelské bakterie prospívat (Abedon *et al.*, 2009).

Tato technika byla po mnoho let používána jako referenční metoda epidemiologických studií. Diskriminační síla této metody se může lišit v závislosti na zvolení typu bakteriofága a na typu testované bakterie. Výhodou je, že není třeba drahého specializovaného vybavení. Samotná typizace bakterií pomocí bakteriofága však nemusí stačit k identifikaci kmene a zdroje ohniska nákazy (Brzozowski *et al.*, 2017).

## **2.4 Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika**

Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika slouží k posouzení pravděpodobnosti, zda konkrétní antimikrobiální látka bude účinná k léčbě infekce způsobené konkrétním mikroorganismem (Wanger *et al.*, 2017). Mezi hlavní fenotypové metody citlivosti mikroorganismů na ATB řadíme metodu diskové difúze a metodu testování minimální inhibiční koncentrace (Banaei *et al.*, 2016). Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika je stále důležitější při léčbě infekčních onemocnění, jelikož se mezi mikroorganismy stále šíří schopnost rezistence na antibiotika. To má samozřejmě dopad jak na empirickou, tak na definitivní terapii. Díky těmto novým fenotypům rezistence u mikroorganismů je někdy obtížné stanovit citlivost mikroorganismů na antibiotika (Tenover, 2009). Užitečnost této metody závisí na stabilitě mikroorganismu vůči lékové rezistenci. Testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika je jednoduchá, levná a rutinně používaná metoda (Brzozowski *et al.*, 2017).

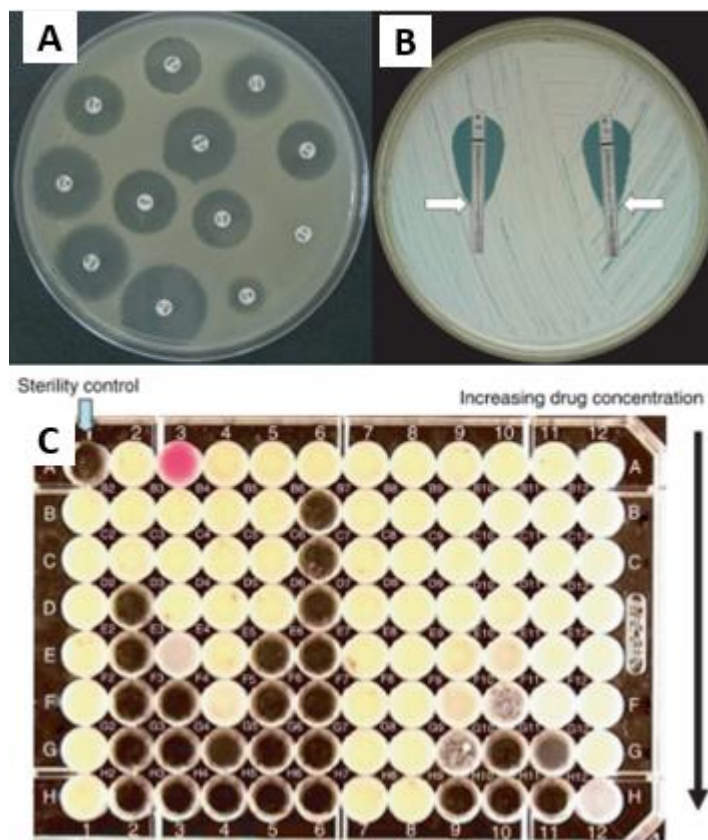
Metoda diskové difúze spočívá v umístění disků nasycených antimikrobiálními látkami na povrch agarového média, které je naočkované bakteriálním izolátem. Po následné inkubaci se hodnotí velikost inhibiční zóny kolem disku (Tenover, 2009).

Minimální inhibiční koncentrace představuje nejnižší koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst mikroorganismů. Tato hodnota je důležitá pro potvrzení rezistence mikroorganismů na antimikrobiální látku a také pro stanovení účinnosti nových antibiotik (Wanger *et al.*, 2017). Mezi metody, které využívají hodnotu minimální inhibiční koncentrace, řadíme diluční metodu, mikrodiluční metodu nebo metodu E-testu (Tenover, 2009).

Metody testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika rozlišují izoláty na citlivé nebo rezistentní. Výsledek vyhodnocen jako kmen citlivý znamená, že organismus bude pravděpodobně reagovat na léčbu antibiotikem ve standardní dávce. Rezistentní výsledek

znamená, že organismus pravděpodobně nebude reagovat na léčbu tímto antibiotikem (Banaei *et al.*, 2016).

Obrázek 3 znázorňuje v části A je znázorněn diskový difúzní test. Okolo disků jsou viditelné inhibiční zóny růstu mikroorganismu. Inhibiční zónu nevidíme v okolí disku, který je konkrétně v tomto případě napuštěn ampicilinem. V části B je vyobrazen E-test, který v tomto případě ukazuje výsledky pro vankomicin a teikoplainin. Hodnotu minimální inhibiční koncentrace odečítáme ze spodní části elipsy na přiloženém proužku. V části C je znázorněn test na citlivost antibiotik pomocí mikrodiluční metody (Tenover, 2009).



**Obrázek 3** Výsledky testování citlivosti mikroorganismů na antibiotika (Tenover, 2009)

### 3 Genotypové metody

Genotypové metody hodnotí širokou škálu jedinců včetně mikroorganismů, a to s ohledem na jejich celkovou strukturu, přesnou nukleotidovou sekvenci nebo s ohledem na přítomnost či nepřítomnost plazmidů (Belkum *et al.*, 2007). Genotypové metody poskytují citlivější diferenciaci kmenů a vyšší úroveň standardizace, reprodukovatelnosti a diskriminační síly oproti metodám fenotypizace (Eberle and Kiess, 2012). Genotypizace umožňuje identifikaci mikroorganismů na základě variability v jejich genomech, které mohou být způsobeny genetickou rekombinací nebo mutací, která vzniká během replikace. Čím více je rozdílů v DNA, tím méně jsou zkoumané mikroorganismy příbuzné (Brzozowski *et al.*, 2017).

Ideální metoda genotypizace by měla být použitelná na všechny izoláty, reprodukovatelná, rozlišitelná, rychle a snadno proveditelná a měla by být efektivní z hlediska finančních nákladů. Volba, kterou z těchto genotypizačních metod použít závisí také kromě citlivosti nebo reprodukovatelnosti metody především na dostupnosti nutného vybavení a na kvalifikaci personálu dané laboratoře (Li *et al.*, 2009).

Běžně používané genotypové metody typizace jsou ribotypizace, PCR, PFGE a amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů (AFLP) (Eberle and Kiess, 2012). Tyto metody jsou založeny na restrikční analýze DNA, polymerázové řetězové reakci, na amplifikaci a identifikaci polymorfismů specifické sekvence DNA (Donelli *et al.*, 2012). Pro analýzu genotypovými metodami je potřeba rozštěpení genomu mikroorganismu pomocí restrikčních enzymů. Tímto štěpením získáme jednotlivé fragmenty DNA o různých velikostech, které dále analyzujeme (Castro-Escarpulli *et al.*, 2017).

#### 3.1 Ribotypizace

Ribotypizace je jednou z genotypizačních metod vhodných k identifikaci a klasifikaci mikroorganismů. Tato metoda využívá rozdílu v rRNA mikroorganismu (Donelli *et al.*, 2012). Ribotypizace je nejpoužívanější varianta metody RFLP neboli analýzy délky restrikčních fragmentů (Li *et al.*, 2009).

Pro provedení ribotypizace je nutné izolovat genomovou DNA, která je následně rozštěpena za pomoci restrikčních enzymů. Vzniklé fragmenty jsou odděleny elektroforézou. Fragmenty jdou dále za pomoci blotovacích technik přeneseny na nylonovou membránu. Membrána s fragmenty DNA je hybridizována značenou sondou, která je komplementární ke specifickým sekvencím 16 S RNA a 23 S RNA. Dojde tak ke zvýraznění fragmentů, které budou obsahovat



gen rRNA (Eberle and Kiess, 2012). Jelikož jsou strukturální geny rRNA univerzální, je možné metodu ribotypizace použít bez předchozí znalosti genomové sekvence DNA. Výsledky této metody jsou snadno interpretovatelné díky vytváření menšího počtu fragmentů (Li *et al.*, 2009).

Kvůli pracovní náročnosti byly vyvinuty automatizované systémy (Hata, 2010), které zvyšují citlivost, rychlost a spolehlivost identifikace. Automatizovanou ribotypizaci lze použít v kombinaci s jinými metodami, jako jsou např. MLST, RFLP, PCR (Eberle and Kiess, 2012).

### **3.2 Pulzní gelová elektroforéza**

Pulzní gelová elektroforéza (PFGE) je považována za zlatý standard genotypových metod (Sabat *et al.*, 2013). Poskytuje nám informace o identifikaci na úrovni kmene. PFGE vyvinul David Schwartz v roce 1984 pro separaci molekul DNA větších než 10 kbp. Přesto tato metoda není vhodná pro rutinní provoz, jelikož je časově náročná, a to v řádu několika dnů (Donelli *et al.*, 2012). Metoda pulzní gelové elektroforézy zahrnuje vložení bakteriálních buněk do bloků agarového gelu. Zde jsou bakteriální buňky podrobeny štěpení genomové DNA pomocí specifické restriční endonukleázy. U vzniklých fragmentů DNA dochází k frakcionaci a oddělení fragmentů podle jejich velikosti za pomoci střídavého elektroforetického pole. Výsledné vzory DNA na agarovém gelu jsou odlišné a označují se jako DNA fingerprint nebo PFGE pattern, který je určován počtem a umístěním restričních míst v bakteriálním genomu (Wang *et al.*, 2015). Za pomoci počítačového gelového skenování a analýzy byly vytvořeny softwarové datové banky vzorců PFGE, které umožňují srovnání kmenů a identifikaci fylogenetického vztahu s jinými kmeny (Magalhães *et al.*, 2014).

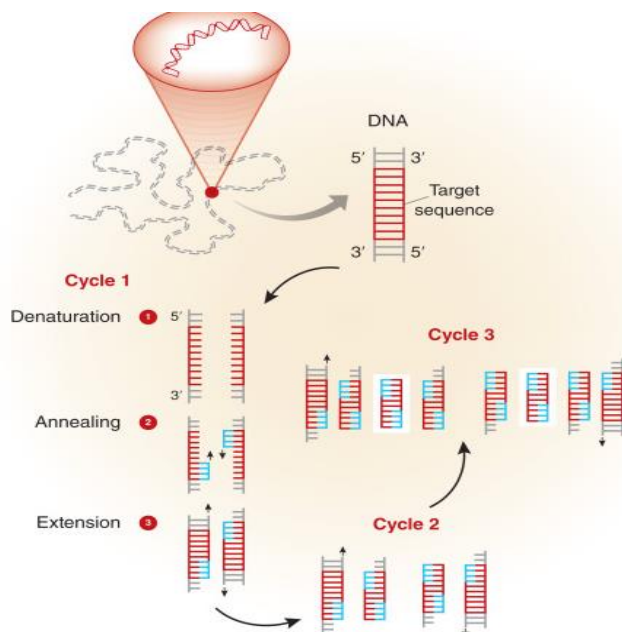
Tato metoda má vysoký diskriminační index a epidemiologické shody. Metoda PFGE se vyznačuje také vynikající typizovatelností. Během posledních let byly vytvořeny mezinárodní databáze DNA fingerprint, které umožňují sledování šíření patogenních mikroorganismů (Sabat *et al.*, 2013). PFGE se vyznačuje také vysokou reprodukovatelností za podmínky použití standardních protokolů. Má také několik nedostatků zejména časovou náročnost a potřebné drahé vybavení (Eberle and Kiess, 2012).

### **3.3 Polymerázová řetězová reakce**

Polymerázová řetězová reakce (PCR) je velmi citlivá molekulárně-biologická technika používaná pro amplifikaci specifického fragmentu DNA a to za pomoci jednoduché enzymatické reakce, při které dochází k několikanásobné replikaci specifické oblasti DNA. PCR je revoluční metodou především v oblasti molekulární biologie a lékařského výzkumu. Je

také široce používána napříč různými obory (Jalali *et al.*, 2016). Metoda polymerázové řetězové reakce je důležitá v diagnostice infekčních onemocnění. Tato metoda se uplatňuje i v oblasti forenzní analýzy, testu otcovství a také v molekulární biologii. Je to vysoce specifická a citlivá metoda (Rahman *et al.*, 2013).

K provedení testu PCR je vyžadována přítomnost templátové DNA, primerů, nukleotidů a DNA polymerázy, která spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku produktu PCR. Při polymerázové enzymatické reakci je templátová DNA amplifikována vymezením dvojic sousedících primerů (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015). Primery, které v reakci využíváme, jsou převážně oligonukleotidy, které jsou díky své komplementaritě navázány k templátové DNA. Tyto primery jsou nezbytné pro zahájení syntézy DNA za účasti DNA polymerázy (Garibyan and Avashia, 2013). PCR reakce se provádí v prostředí tepelného cyklování. Jedná se o mechanismus, který zajistí opakované zahřívání a ochlazování roztoku, který obsahuje mj. templátovou DNA. Tento proces zajišťuje přesnou teplotu pro každý krok reakce PCR (Rahman *et al.*, 2013). Polymerázovou řetězovou reakcí dochází k exponenciální tvorbě kopií templátové DNA. Produktem této reakce je tedy několikanásobné navýšení DNA (Garibyan and Avashia, 2013).



**Obrázek 4** Schéma principu polymerázové řetězové reakce (Garabian and Avashia, 2013).

Proces amplifikace polymerázové řetězové reakce má dvojí účel, a to zvýšit počet molekul představující konkrétní cílové místo a označit ho. Nejčastěji pomocí fluorescenčního barviva, které umožní detekci. Kromě fluorescenčního značení lze použít i chemická barviva, jako je ethidiumbromid (Butler, 2012). Pro vizualizace produktů PCR se nejčastěji používá elektroforéza na agarovém gelu. Umožňuje nám stanovení přítomnosti a velikosti získaných produktů PCR.

Tyto produkty PCR mohou být snadno kontaminovány díky vysoké citlivosti metody. Tato kontaminace nám může poskytnout falešné výsledky metody PCR. Nevýhodou této metody jsou také použité primery, které se mohou nespecificky hybridizovat se sekvencemi podobnými, ale ne úplně identickými s cílovou DNA (Garibyan and Avashia, 2013). Vedle klasické PCR metody byly popsány i další modifikace za účelem rozšířit aplikaci PCR v praxi.

### **3.3.1 Vnořená PCR**

Vnořená polymerázová řetězová reakce byla navržena ke zlepšení citlivosti a specificity PCR. Tato modifikace PCR snižuje případné kontaminace templátové DNA, ke kterým může docházet při náhodné vazbě primerů. Vnořená PCR se provádí za použití dvou různých sad primerů ve dvou po sobě následujících cyklech PCR (Rahman *et al.*, 2013).

První reakční amplifikace PCR o 15-30 cyklech s použitím jednoho páru primerů generuje reakční produkt, který se používá jako templát pro další reakční amplifikaci PCR pomocí primerů, které nasedají na místa v prvním amplikonu a zesilují vnitřní sekvenci. Pokud je první produkt PCR amplifikován z požadované sekvence, vygeneruje druhá reakce produkt očekávané velikosti (Wilczynski, 2009).

Zvýšená citlivost plyne z vysokého počtu celkových cyklů a zvýšená specificita plyne z nasednutí druhé sady primerů na sekvence produkované v první reakci PCR (Shen, 2019).

### **3.3.2 Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí**

Polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí (RT-PCR) je metoda, která využívá dvou samostatných enzymatických reakcí, a to za předpokladu je-li výchozím materiálem RNA. Při první enzymatické reakci dochází k tvorbě DNA pomocí reverzní transkriptázy, která je komplementární k cílové sekvenci RNA. Tato vzniklá komplementární DNA se jinak označuje jako cDNA. Druhá enzymatická reakce zajišťuje zesílení již vzniklé cDNA s využitím *Tag* DNA polymerázy (Eberle and Kiese, 2012).

RT-PCR lze provést v jednom nebo ve dvou krocích. Jednokroková RT-PCR je prováděna v jedné zkumavce, kde probíhají současně obě enzymatické reakce. V případě dvou krokové metody dochází k přenosu syntetizované cDNA do druhé zkumavky, kde probíhá následná PCR reakce. Oba postupy mají své výhody i nevýhody. Jednokroková RT-PCR je snadno proveditelná a ideální pro screening s vysokou propustností. Dvoukroková RT-PCR je vhodná pro detekci více transkriptů z jedné cDNA nebo k jejímu uchování a pozdějšímu využití (Jalali *et al.*, 2017).

RT-PCR je citlivá metoda, která je schopná měřit více cílových sekvencí v každém vzorku (Eberle and Kiess, 2012). Tato metoda je široce využívána napříč různými obory, ale převážně se používá k mapování exprese určitých genů (Rahman *et al.*, 2013).

### **3.3.3 Kvantitativní PCR v reálném čase**

Kvantitativní PCR v reálném čase nebo také real-time PCR využívá fluorescenční barviva a sondy k identifikaci amplifikovaných fragmentů během procesu PCR v reálném čase (Rahman *et al.*, 2013). Tato technika tedy detekuje produkty PCR během amplifikace, zatímco se generují kopie templátové DNA. PCR v reálném čase je tedy schopna měřit množství produktu v každém cyklu reakce. Real-time PCR je založena na sondách, které fluoreskují pouze v případě, že jsou přímo v produktu PCR. Pro real-time PCR existují dva typy sond, které jsou vhodné pro detekci a kvantifikaci produktu. Lze použít sondy SYBR green, které fluoreskují při navázání na DNA. Běžnější jsou oligonukleotidové sondy, které jsou komplementární ke specifické sekvenci a fluoreskují v případě, že je sonda začleněna do amplifikačního produktu reakce (Wilczynski, 2009).

Výhody PCR v reálném čase jsou především rychlost a jednoduchost analýzy. U real-time PCR je sníženo riziko kontaminace díky provedení v uzavřené zkumavce, avšak omezením této modifikace PCR je počáteční přístrojová investice (Coleman and Tsongalis, 2016).

### **3.3.4 Multiplexní polymerázová řetězová reakce**

Při multiplexní polymerázové řetězové reakci (m-PCR) se využívá více sad primerů v rámci jedné PCR reakce. To nám umožňuje amplifikovat dvě a více cílových sekvencí DNA (Eberle and Kiess, 2012). Primery pro m-PCR je nutné vybrat tak, aby měly podobné teploty žihání. Rovněž velikost ampikonů by měla být dostatečně odlišná, aby bylo možné po separaci všechny fragmenty identifikovat (Shen, 2019).

Výhodou m-PCR reakce je její citlivost a možnost detekce více než jedné látky při provedení jednoho testu. Díky tomu se tato metoda stává finančně úspornější. Další výhodou je amplifikace relativně krátkých sekvencí. (Mahony and Chernesky, 2007).

### **3.3.5 Inverzní polymerázová řetězová reakce**

Inverzní PCR lze použít za předpokladu, že známe informace o sekvenci na jedné straně cílové oblasti DNA (Clark and Pazdernik, 2015). Pomocí restrikčního enzymu je štěpena známá sekvence DNA a její přilehlá oblast. Vzniklé restrikční fragmenty se intermolekulární ligací převádí na kruhovou molekulu. Takto získaná cirkulovaná DNA se využije jako templát v PCR reakci. PCR kruhového templátu DNA je amplifikována pomocí dvou primerů vázající se na známou sekvenci a směřující opačným směrem. Produktem amplifikace je lineární molekula s krátkými úseky známé DNA obsahující jedno místo pro restrikční enzym původně používaný k rozštěpení DNA. Takovéto místo značí spojení s dříve klonovanou sekvencí se sousedícími sekvencemi. Distribuce restrikčních enzymů ve známých i na sousedících sekvencích DNA určují velikost amplifikovaného fragmentu (Green and Sambrook, 2019).

Zavedením inverzní polymerázové řetězové reakce bylo umožněno použít PCR pro amplifikaci DNA i mimo známou oblast sekvence. Inverzní PCR je metoda snadno proveditelná a jednoduchá na optimalizaci. Citlivost této metody je však omezena díky slabší detekci integračních míst. Omezení citlivosti metody může vést k neefektivní amplifikaci. (Laufs *et al.*, 2010).

## **3.4 Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů**

Amplifikovaný polymorfismus délky fragmentů (AFLP) je užitečná technika pro rychlou vizualizaci polymorfních fragmentů DNA z organismů bez předchozích informací o sekvenci. Tato metoda je široce používána pro studium biologie, genetiky, ekologie a fylogeneze mnoha organismů. AFLP je vysoce reprodukovatelná, citlivá a robustní technika, a to díky tomu že kombinuje specificitu RFLP a citlivost PCR (Restrepo *et al.*, 2013). Metoda amplifikace polymorfismu délky fragmentů je specifická především tím, že nám umožňuje vyhodnocení sto až tisíc různých oblastí DNA distribuovaných náhodně po celém genomu.

Postup metody AFLP lze rozdělit do tří kroků. Prvním krokem je štěpení DNA pomocí dvou různých restrikčních endonukleáz s následnou ligací vzniklých fragmentů na nukleotidové adaptéry. Ve druhém kroku metody AFLP dochází k amplifikaci fragmentů, které jsou odvozeny ze štěpení oběma enzymy. Ve třetím kroku této metody dochází k detekci a rozdělení

fragmentů DNA gelovou nebo kapilární elektroforézou (Shen, 2019). Během procesu amplifikace je také možné využít pouze jeden restriční enzym a jeden primer (Hata, 2010).

### 3.5 Sekvenování DNA

Metody genotypizace spočívající v sekvenování DNA nám poskytují informace o původní sekvenci nukleotidů. Díky tomu jsme schopni rozlišovat mezi jednotlivými mikrobiálními kmeny z polymorfismu jejich DNA. Metody sekvenování DNA jsou vysoce reprodukovatelné a mohou být použity pro diferenciaci a fylogenetickou analýzu mikrobiálních kmenů. Metoda sekvenování DNA je také užitečná v identifikaci virulence mikroorganismů. Touto metodou jsme schopni mezi sekvencemi DNA identifikovat i různé typy rozdílů. Jednat se může o různé genotypové variace, jako jsou delece, inserce nebo duplikace (Li *et al.*, 2009).

Existují dvě tradiční metody sekvenování DNA a to Maxam-Gilbertovo sekvenování a Sangerovo sekvenování. U první z nich se jedná o chemickou metodu, kde dochází k chemické modifikaci nukleotidů DNA. Následně dochází ke štěpení DNA v místě, kde se nacházejí modifikované nukleotidy. Metody sekvenování dle Sangera využívají k vyhledání specifických oblastí DNA oligonukleotidové primery. Primer je připojen poblíž sledované sekvence a prodloužen DNA polymerázou. U takto vytvářejícího se řetězce poté dochází k ukončení prodloužení náhodným začleněním fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidů. Z chromatogramu získáme nukleotidové báze daného mikroorganismu (Shyamalina, 2019).

Existují i tzv. metody sekvenování nové generace, které poskytují řadu metod pro komplexnější, hlubší analýzu struktury a obsahu mikrobiálních genomů. Pro typizaci mikrobiálních sekvencí DNA jsou vhodné metody sekvenování založené na celém genomu. Tyto nové metody jsou stále častěji využívány v klinické a veřejné mikrobiologii (Pérez-Losada *et al.*, 2018).

### 3.6 Multilokusová sekvenční typizace

Multilokusová sekvenční typizace je metoda, která byla zavedena Maiden *et al.* (1998) kteří tak umožnili porovnávat výsledky typizace mezi jednotlivými laboratořemi. MLST je metodou molekulární genotypizace, založené na znalostech o sekvenování genů a na dobře známých principech fenotypové multilokusové enzymové elektroforézy (Eberle and Kiess, 2012).

Multilokusová sekvenční typizace je založena na sekvenování více genů DNA, obvykle sedmi nebo také na sekvenování genomových fragmentů v mikroorganismu. MSLT nám tedy

poskytuje informace o alelických variantách konzervovaných genů. Sekvence každého genu či fragmentu genomu, které mají být charakterizovány, jsou srovnány a hodnoceny rozdíly, dokonce i při jediném nukleotidu, jsou přiřazeny jako odlišné alely. Následně ke každému izolátu je přiřazen konkrétní typ MLST podle jedinečné kombinace polymorfismů (Magalhães *et al.*, 2014).

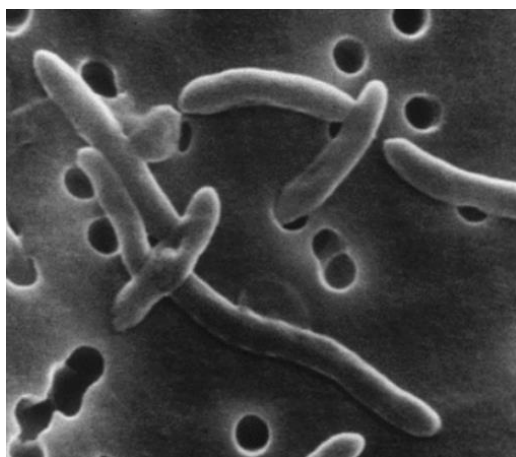
Multilokusová sekvenční typizace je vhodnou metodou pro analýzu struktur mikrobiální populace, hlavně při subtypizaci druhů vykazující genetické rekombinace. Tato metoda je tedy také široce využívána v evolučních a populačních analýzách (Li *et al.*, 2009).

Metoda MLST poskytuje vysoce variabilní, univerzálně srovnatelné výsledky, které jsou mezi laboratořemi snadno ověřitelné. Multilokusová sekvenční typizace je považována za vysoce reprodukovatelnou metodu. Nevýhodou této metody je její vhodnost pouze pro patogeny, které vykazují dostatečné množství variací v celém svém genomu. U patogenů s velmi malými variacemi nebo naopak u patogenů s mnoha variacemi v genomu neposkytuje metoda MLST adekvátní výsledky vhodné pro typizaci (Pérez-Losada *et al.*, 2017).

## 4 Čeleď *Arcobacteraceae*

Bakteriální rody z čeledi *Arcobacteraceae* si získávají čím dál větší pozornost, a to díky jejich izolování z mnoha hostitelů a potravin živočišného původu (Shah *et al.*, 2012). Jsou tak považovány za nově vznikající potravinové patogeny (Hausdorf *et al.*, 2013).

Jedná se o gram-negativní bakterie, které jsou schopné růstu při nízkých teplotách a za aerobních podmínek. Právě tyto vlastnosti odlišují rod *Arcobacter* od rodu *Campylobacter* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). Zástupci rodů *Arcobacter* jsou nesporulující mikroorganismy, obvykle spirálovitého nebo mírně zakřiveného tvaru (Talay *et al.*, 2016). Tyto mikroorganismy jsou dlouhé 0,5-3,5  $\mu\text{m}$  a široké 0,2-0,9  $\mu\text{m}$ . Jejich pohyb je zajištěn pomocí jednoho a někdy i dvou polárních bičičků. Jako zdroje uhlíku využívají organické kyseliny a aminokyseliny, ale nefermentují sacharidy. Pro zástupce rodů *Arcobacter* jsou typické pozitivní biochemické testy na katalázu, oxidázu a ureáru. Tyto zástupci mají schopnost redukovat dusičnany. Někteří ze zástupců *Arcobacter* jsou schopni hydrolyzovat indoxylacetát. (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).



**Obrázek 5** *Arcobacter butzleri* v elektronovém mikroskopu na membránovém filtru (Snelling *et al.*, 2006)

### 4.1 Taxonomie

*Epsilonproteobacteria* byly popsány na začátku roku 1990 a byly zpočátku zařazeny jako pátá podtřída spadající do kmene *Proteobacteria*. Následně byl změněn stav z podtřídy na třídu *Epsilonproteobacteria* v rámci tohoto kmene. *Epsilonproteobacteria* jsou známé chemolithotrophy, kteří jsou rozšíření především v podzemních a mořských vodách včetně hlubinných hydrotermálních prúdů. Při posuzování několika stovek fylogenetických

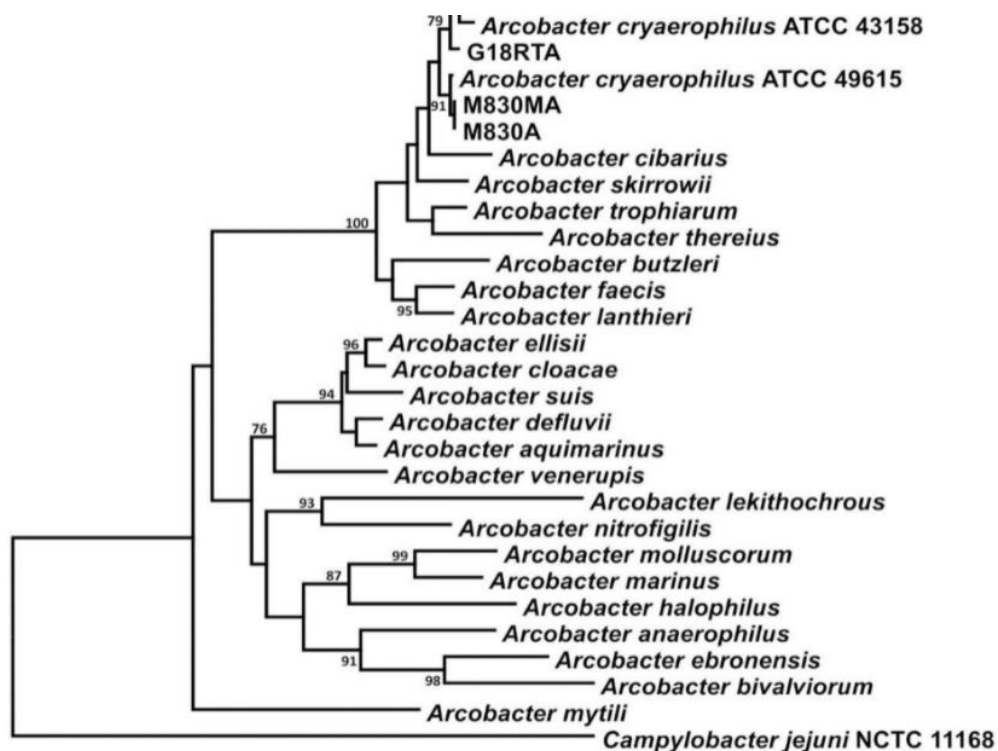


topologií bylo dosaženo závěru, že zařazování *Epsilonproteobacter* v rámci kmene *Proteobacteria* je nespolehlivé, a tak byla navržena reklasifikace. Při reklasifikaci došlo k přearování třídy *Epsilonproteobacteria* do nového kmene *Epsilonbacteraeota* (Waite *et al.*, 2017).

Kmen *Epsilonbacteraeota* zahrnuje jak patogenní, tak i nepatogenní mikroorganismy. Mezi první patogeny, které byly studovány v rámci tohoto kmene, jsou *Campylobacter* a *Helicobacter*, které řadíme do řádu *Campylobacterales* (Porcelli *et al.*, 2013). Mezi další významné fylogenetické skupiny patřící do toho kmene jsou *Arcobacter*, *Wolinella*, *Sulfurospirillum* a *Thiovulum*, které se vyskytují v našem přirozeném prostředí jako volně žijící mikroorganismy nebo v symbiotickém spojení se zvířaty (Engel *et al.*, 2003).

Nepatogenní *Epsilonbacteraeota* se hojně vyskytují v prostředí s extrémními podmínkami a jsou metabolicky všestranné a poskytují nový pohled na původ zvířecích nebo lidských patogenů (Nakagawa and Takaki, 2009).

Rod *Arcobacter* vychází z polyfázické taxonomie *Campylobacter* a jim příbuzným mikroorganismům (On *et al.*, 2020). Rod *Arcobacter* byl poprvé popsán Vandamem *et al.* v roce 1991 a byly sem zařazeny dva aerotolerantní druhy *Campylobacter cryaerophila* a *Campylobacter nitrofigilis* (nyní *Arcobacter cryaerophila* a *Arcobacter nitrofigilis*). Od toho roku byly do rodu *Arcobacter* postupně přiřazovány další druhy (Collado and Figueras, 2011). Relativně nedávno došlo na základě genomických a fenotypových analýz k vytvoření nové čeledi *Arcobacteraceae* kam patří rod *Arcobacter*, který původně patřil do čeledi *Campylobacteraceae*. Následně došlo také k dalšímu rozdělení této čeledi do sedmi rodů včetně *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Pseudoarcobacter*, *Halacobacter*, *Malacobacter*, *Poseidonibacter* a rod *Arcomarinus* (Khan *et al.*, 2020). Ve studii On *et al.* (2020) byla však tato reklasifikace vyvrácena, a to na základě tvrzení, že rod *Arcobacter* je dle fylogenetické analýzy rodem jasně odlišným od ostatních *Epsilonbacteraeot*. V současné době rod *Arcobacter* zahrnuje 33 uznaných druhů (Mateus *et al.*, 2021).



**Obrázek 6** Fylogenetické schéma založené na analýze genu 16 S rRNA (On et al., 2019).

#### 4.1.1 Vybrané rody z čeledi *Arcobacteraceae*

Rod *Malacobacter* byl popsán v roce 2009 (Vasiljevic *et al.*, 2019). Tento rod, je izolován především ze slávek a brakické vody. *Malacobacter* není schopen hydrolyzovat indoxyl-acetát a je citlivý k cefoperazonu. Tyto vlastnosti jej odlišují od ostatních druhů *Arcobacter*-like (Collado *et al.*, 2009). Rod *Malacobacter* je uznávaným obligádním halofilem mezi *Arcobacter*-like (Donachie *et al.*, 2005). Do rodu *Malacobacter* jsou řazeny druhy *M. halophilus*, *M. mytili*, *M. marinus*, *M. molluscorum* a *M. pacificus* (Pérez-Cataluna *et al.*, 2018). *Malacobacter halophilus* byl poprvé izolován z hypersalinní laguny na Havaji a představuje první obligádně halofilní druh *Arcobacter*-like. *Malacobacter mytili* byl poprvé izolován ze slávek ve Španělsku a je považován za první druh, který není schopný hydrolyzovat indoxyl-acetát. *Malacobacter molluscorum* je druhým druhem rodu *Malacobacter*, který není schopný hydrolyzovat indoxyl-acetát a byl izolován z mušlí a ústřic (Collado and Figueras, 2020). Rod *Malacobacter* se podílí na závažných akutních gastrointestinálních obtížích po požití měkkýšů, kontaminované vody nebo nedostatečně upraveného masa (Vasiljevic *et al.*, 2019).

Pod *Aliarcobacter* je řazeno dalších devět druhů (Khan *et al.*, 2020). Jmenovitě se jedná např. o druhy *A. cryaerophilus*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. thereius*, *A. trophiarum*

nebo *A. faecis* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). U druhu *A. cryaerophilus* jsou definovány dvě skupiny. Jedná se o skupiny 1A a 1B *A. cryaerophilus*. Takovéto rozdělení bylo provedeno na základě různých délek restričních fragmentů (RFLP) a na různém obsahu mastných kyselin a celebuněčného proteinu. Skupina 1B *A. cryaerophilus* je izolována mnohem častěji než skupina 1A. Jsou známé ale i izololáty kdy jsou přítomné obě skupiny *A. cryaerophilus*. Takovéto izoláty pocházejí převážně z potravinářských produktů. Druh *A. cibarius* byl poprvé izolován z jatečně upravených těl brojlerů v Belgii (Collado and Figueras, 2020). Druhy *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. thereius* a *A. trophiarum* jsou izolovány převážně u hospodářských zvířat a potravin živočišného původu. Tyto druhy jsou tedy spojovány s nemocemi hospodářských zvířat, ale známy jsou také případy kolonizace těmito druhy u zdravých zvířat. Některé druhy z rodu *Aliarcobacter* jsou schopné růst v přítomnosti safraninu nebo oxgallu. *Aliarcobacter* ovšem neroste v přítomnosti 4 % NaCl (Chieffi *et al.*, 2020).

Rod *Haloarcobacter* zahrnuje tři druhy, a to *Haloarcobacter bivalviorum*, *H. ebronensis* a *H. anaerophilus*. Tento rod je spojován s mořskými organismy převážně se jedná o krevety, měkkýše a ústřice, dále je můžeme nalézt v sedimentu řek (Baek *et al.*, 2021). Rod *Haloarcobacter* ovšem není schopen fermentovat sacharidy a je citlivý k cefalosporinu (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018).

## 4.2 Výskyt a způsob přenosu

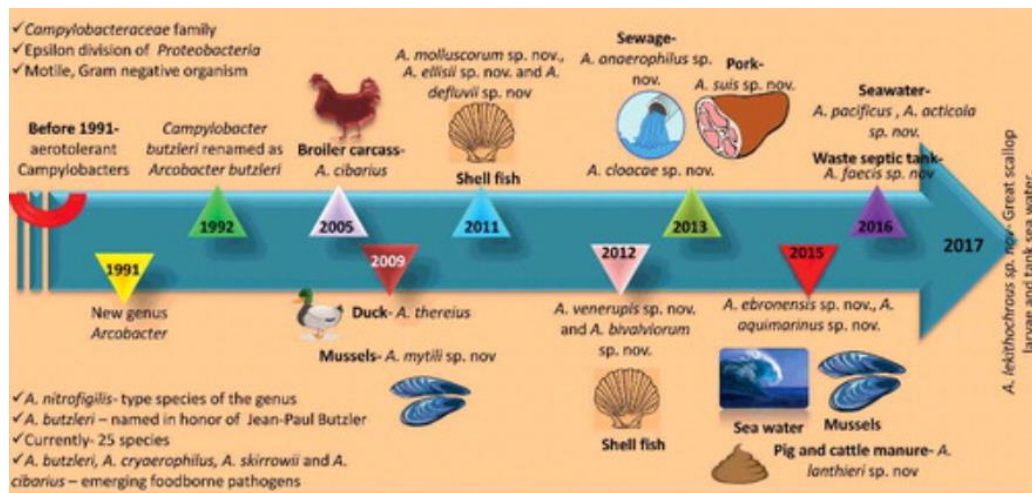
### 4.2.1 Výskyt bakterií čeledi *Arcobacteraceae*

Výskyt bakterií z čeledi *Arcobacteraceae* byl prokázán v zelenině, mléčných výrobcích nebo produktech živočišného původu. *Arcobacter* spp. byl izolován z potravin zpracovávaných na farmách, v maloobchodech, ale i v potravinách připravovaných k přímé spotřebě (Ferreira *et al.*, 2019). V průběhu let se zvýšil počet případů izolace těchto bakterií ze syrových mastných výrobků. Také se ukázalo, že izolace organismů z čeledi *Arcobacteraceae* je mnohem vyšší z kuřecího masa než u vepřového či hovězího masa (Snelling *et al.*, 2006).

Dále byly bakterie rodu *Arcobacter* detekovány ve vzorcích vody, a to jak z pitné, tak odpadní vody. Bakterie z této čeledi se vyskytují také ve vodě říční, vodě v ústí řek i ve vodě mořské. Izolovány byly ve vzorcích škeblí, ústřic, měkkýšů a dalších mořských plodů (Ramees *et al.*, 2017).

Výskyt *Arcobacter*-like lze hodnotit i z hlediska ekonomického rozvoje. Země na vysoké ekonomické úrovni vykazují mnohem vyšší prevalenci *Arcobacter*-like ve srovnání se zeměmi

s nízkou a střední ekonomickou úrovní. Na výskyt arcobacterů se lze podívat i z geografického hlediska zemí a kontinentů. Prevalence *Arcobacter*-like byla pozorována nejvíce v zemích jako je Belgie, Dánsko, Austrálie, Severním Irsko a Portugalsko. V případě kontinentů byla nejvyšší prevalence *Arcobacter*-like zaznamenána v Oceánii, kterou následuje Evropa a poté Severní a Jižní Amerika. Naopak nejnižší prevalence v rámci kontinentů byla pozorována v Asii a Africe (Mateus *et al.*, 2021).



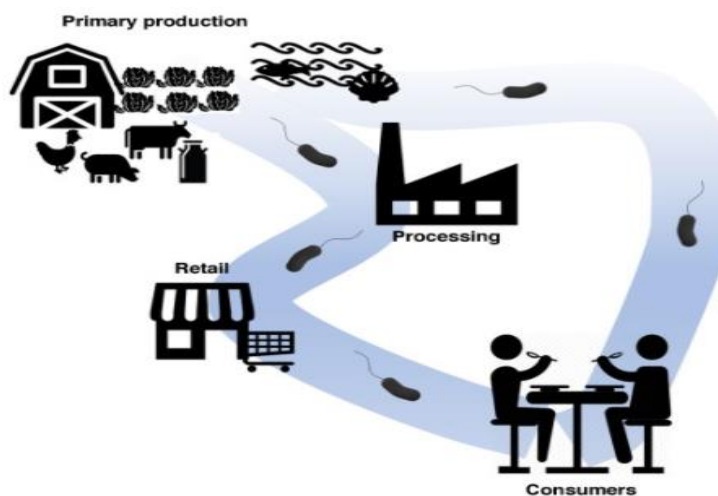
**Obrazek 7** Postupný vznik a vývoj *Arcobacter* (Ramees *et al.*, 2017)

#### 4.2.2 Způsob přenosu

Nejběžnější cestou přenosu bakterií z čeledi *Arcobacteraceae* na člověka je manipulace a konzumace kontaminovaných potravin a vody v důsledku rozsáhlého výskytu arkobacterů v potravinovém řetězci a ve vodních zdrojích. Způsoby přenosu *Arcobacter*-like nejsou dodnes zcela objasněny a správně definovány (Mateus *et al.*, 2021). Ke kontaminaci potravin živočišného původu, může docházet v různých fázích procesu od porážky zvířete až po samotnou tepelnou úpravu masa (Shah *et al.*, 2012). *Arcobacter*-like je často izolován z výkalů hospodářských zvířat a také z odpadních vod farem. Z tohoto můžeme usuzovat, že fekální kontaminace vod je další možnou cestou přenosu. Bylo také prokázáno, že schopnost arkobacterů přežít ve vodě závisí na přítomnosti organické hmoty a na teplotě vody (Collado and Figueras, 2011).

Zvířata se mohou nakazit fekální kontaminací v prostředí nebo příjmem kontaminované vody. U některých zvířat je také znám vrozený nebo postnatální přenos, což je další možná cesta přenosu mezi zvířaty (Shah *et al.*, 2012). *Arcobacter* spp. byl izolován i ve střevním traktu

a vejcovodech u chovných hejn slepic, ale důkaz o přenosu infekce ze slepice na vejce nebyl dosud prokázán (Collado and Figueras, 2011).



**Obrázek 8** Možné cesty přenosu *Arcobacter*-like (Ferreira *et al.*, 2019)

### 4.3 Klinický význam

*Arcobacter*-like species jsou považovány za potravinové enteropatogeny způsobující onemocnění nejen u lidí, ale také u zvířat (Chieffi *et al.*, 2020). Bakterie rodů *Arcobacter* přítomné v kontaminované vodě a potravinách, následně způsobující onemocnění, jsou problémem veřejného zdraví. I přes zlepšení opatření v oblasti bezpečnosti potravin jsou takovéto nemoci způsobené arkobaktery stále velmi časté (Ferreira *et al.*, 2019). Faktory jako výskyt, infekční dávka, celkový zdravotní stav, věk pacienta, náchylnost populace nebo také obezita či hypertenze, mohou ovlivnit riziko a vývoj onemocnění způsobené čeledí *Arcobacteraceae* (Shah *et al.*, 2011).

U lidí bakterie rodů *Arcobacter* vyvolávají onemocnění gastrointestinálního traktu, enteritidu a bakteriemií. Časté klinické projevy těchto onemocnění jsou vodnaté průjmy, nevolnost, bolesti břicha, zvracení (někdy doprovázeno i horečkou) a křeče v břiše (Talay *et al.*, 2016; Pérer-Cataluña *et al.*, 2018). Déle trvající symptomy či větší závažnost onemocnění, může vyžadovat antibiotickou léčbu, naopak při lehkém průběhu onemocnění samo odezní (Chieffi *et al.*, 2020).

Tyto bakterie napadají pouze určité druhy hospodářských zvířat, jak se ukázalo na základě dřívějších studií (Pérer-Cataluña *et al.*, 2018). Infekce způsobená arkobaktery u zvířat způsobuje průjem nebo mastitidu, které velmi často přispívají k potratům. Infekce však zůstává

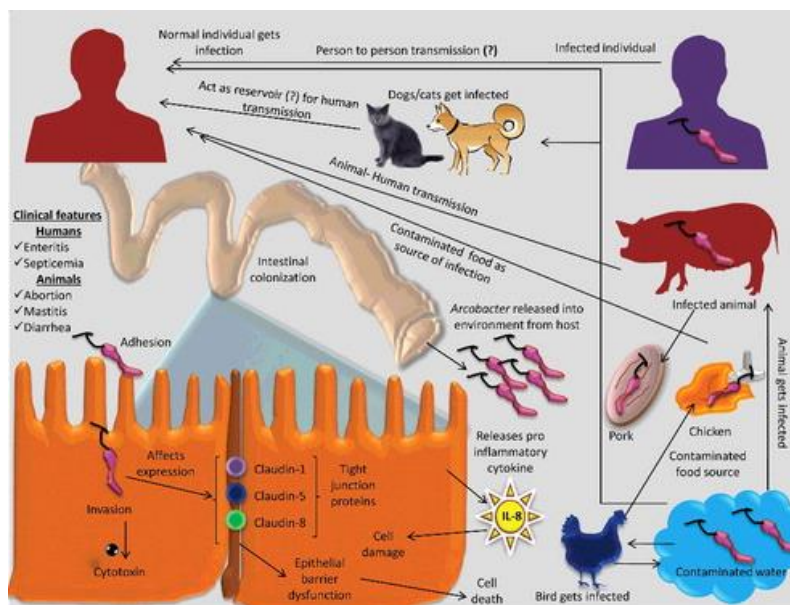
asymptomatická a jen málokdy se projeví klinický stav průjmem (Ramees *et al.*, 2017). U prasat, ovcí a skotu způsobují bakterie čeledi *Arcobacteraceae* enteritidu a u ovcí způsobují převážně hemoragickou kolitidu. Nejvíce jsou *Arcobakter* spp. rozšířeny u drůbeže, která je tak považována za přirozený rezervoár. Většina případů onemocnění zvířat je omezena na savce, ačkoli je znám také případ izolace u pstruha duhového (Collado and Figuerals, 2011).

Epidemiologie a patogenita bakterií čeledi *Arcobacteraceae* u lidí i zvířat nebyla doposud zcela objasněna, a proto jsou infekce spojeny s touto čeledí považovány za nízké riziko ve veřejném zdraví. Důvodem může být nesprávná identifikační záměna s *Campylobacter* (Khan *et al.*, 2020).

#### 4.4 Patogenita a virulence

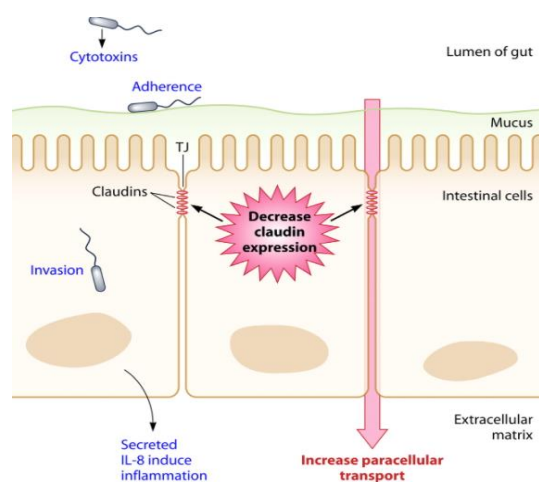
O mechanismech patogenity a faktorech virulence je doposud známo velice málo informací (Lehner *et al.*, 2005). I přesto bylo identifikováno několik domnělých genů, které jsou spojené s virulencí. Jedná se o geny virulence *cadF* a *cjl349* související s buněčnou adhezí a produkcí dvou proteinů vázající fibronektin, gen *ciaB* kóduje invazní protein. Gen *mviN*, kóduje protein důležitý pro biosyntézu peptidoglykanu. Dále také *pldA* a *tlyA* což jsou geny, které kódují fosfolipázu a hemolysin. Mezi faktory virulence také patří gen *hecB*, který kóduje hemolyzinový aktivační protein. Dále k faktorům virulence řadíme gen *hecA* kódující vláknitý hemaglutinin, který se podílí na agregaci (Kim *et al.*, 2019; Pérez-Cataluña 2018; Šilha *et al.*, 2019).

Primárně se vycházelo ze znalostí patogenity od blízce příbuzného rodu *Campylobacter*. Několik studií zkoumajících patogenitu akrobakterů uvádí, že adheze, invaze a cytotoxicita jsou detekovány až u 85 % kmenů. Tyto studie tedy poukázaly na schopnost arkobakterů adherovat a napadat buňky podobně jako kampakobakterie nebo jiné bakterie (Nuri Acik *et al.*, 2016). Byla nalezena přítomnost několika genů, které by mohly přispívat k rezistenci na antibiotika. Bičíky hrají velkou roli ve schopnosti *Arcobacter*-like podílet se na motilitě a chemotaxi buněk. Jsou důležité pro kolonizaci, invazi hostitelské buňky, přičemž jsou primárním cílem imunitního systému a důležitým faktorem virulence (Rammes *et al.*, 2017).



**Obrázek 9** Přehled patogeneze a přenosu bakterií rodů *Arcobacter*-like (Rammes *et al.*, 2017)

Virulentnější druhy arkobakterů jsou schopny napadat jak střevní tkáň, tak placentu a mohou se tak šířit k plodu. Obrázek 10 schématicky znázorňuje v současnosti známý mechanismus virulence *Arcobacter* spp. U arkobakterů byla prokázána schopnost adheze, produkce cytotoxicity, schopnost invaze a indukce zánětu. Invaze a zánět je zprostředkovaný interleukinem-8. Dochází ke snížení exprese kladinu v těsných spojkách s následnou dysfunkcí epiteliální bariéry a zvýšení paracelulárního transportu, který vede k nejčastějšímu projevu infekce rodu *Arcobacter*-like tedy k průjmu (Collado and Figueras, 2011).



**Obrázek 10** Mechanismus virulence *Arcobacter* spp. (Collado and Figueras, 2020)

## 5 Typizační metody k identifikaci bakterií čeledi *Arcobacteraceae*

Bakterie z čeledi *Arcobacteraceae* způsobují infekce, u kterých je obtížné určit zdroj a epidemiologickou oblast. Což je způsobeno především ubikvitárním výskytem arkobakterů a jejich časté izolaci u lidí i zvířat. U těchto bakterií je obtížná typizace a nedostačující dostupnost identifikačních metod (On *et al.*, 2003; Rahman *et al.*, 2020).

Kvůli snadné záměně těchto bakterií s *Campylobacter* je identifikace fenotypizací velice obtížná (Levican and Figueras, 2013). Tyto mikroorganismy jsou metabolicky poměrně interní, jejich izolace zůstává zlatou střední metodou k dosažení diagnostického závěru. Pokroky v diagnostice nám poskytly různé molekulárně-biologické a detekční metody pro rychlou identifikaci (Ramees *et al.*, 2017). Dalším důvodem obtížné identifikace je také omezení metabolických, biochemických metod a analytických procesech. Proto se k typizaci používají především metody, které jsou založeny na technice PCR (Celik and Ünver, 2015).

K provedení epidemiologického dozoru a vyšetřování *Arcobacter* spp. jsou nutné rychlé a spolehlivé metody typizace a identifikace. Mezi další metody, kterými je možné tyto bakterie identifikovat řadíme metody založené na sekvenování, smyčkově zprostředkované izotermické amplifikaci, microarray techniky, anebo MALDI-TOF MS. V současné době neexistuje pro identifikaci *Arcobacter* spp. standardizovaná metoda (Wang *et al.*, 2020).

Frekvence detekce u blízkých druhů *Arcobacter*-like se výrazně zvýšila s vylepšením izolačních a identifikačních technik. Za pomoci kombinace kultivačních technik a PCR bylo dosaženo i detekce a izolace nekultivovatelných forem (Snelling *et al.*, 2006).

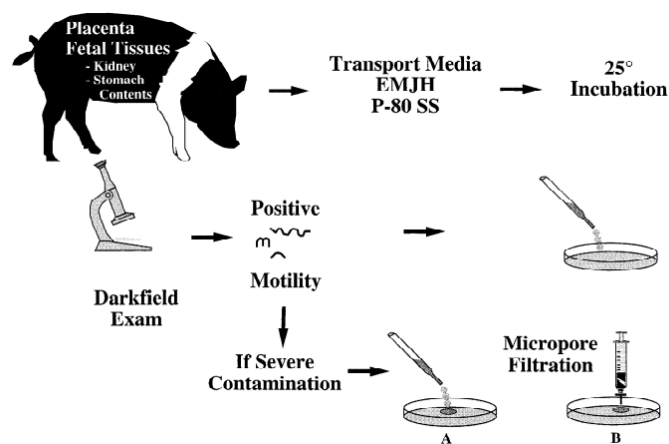
### 5.1 Izolace *Arcobacter*

Standardní metody izolace musí být specifické, rutinní pro běžné praktické použití a poměrně časově nenáročnější. Dodnes neexistuje standardní protokol pro izolaci *Arcobacter*-like species. První metody, které se začaly používat k izolaci arkobakterů byly založeny především na metodách používaných pro izolaci *Campylobacter*. Protokoly vytvořené pro *Arcobacter*-like zahrnují především aerobní růst za nízkých teplot, který je odlišuje od *Campylobacter* (Phillips, 2001; Rahman *et al.*, 2020).

Účinná izolace *Arcobacter*-like z různých zdrojů vyžaduje obohacení kultivačního média specifickými živinami, tak aby byly napodobeny podmínky původního prostředí výskytu daného druhu (Rahman *et al.*, 2020). Izolace jsou prováděny na selektivním médiu za použití růstových a selektivních faktorů, jako je koňská krev, pyruvát, kyselina thioglykolová,



novobiocin, amfotericin nebo trimethoprim. Následuje 48hodinová inkubace, po které je obohacené médium nanášeno na selektivní agarovou půdu a dále inkubováno za nízkých teplot a mikroaerobních podmínek dalších 48 hodin až 5 dnů. Po tuto dobu jsou půdy pravidelně kontrolovány, dokud není zaznamenán růst kolonií (Serraino *et al.*, 2013, Celik and Ünver 2015).



**Obrázek 11** Schéma izolace *Arcobacter*-like z tkání potracených selat (Tucker *et al.*, 1996)

## 5.2 Identifikace *Arcobacter* fenotypovými metodami

Identifikace a diferenciacie *Arcobacter*-like species je obtížná, jelikož jsou tyto organismy relativně interní a náročné na růst. Náročnost detekce souvisí i s morfológickou a biochemickou podobností mezi rody *Arcobacter* a *Campylobacter* (Atabay *et al.*, 2006). Takovéto záměně lze zabránit provedením testu na hydrolyzu idoxyl-acetátu, který je pro *Arcobacter*-like silně pozitivní, zatímco *Campylobacter* poskytují na hydrolyzu indoxyl-acetátu negativní výsledky testů (Schroeder-Tucker *et al.*, 1996).

### 5.2.1 Kultivační techniky identifikace *Arcobacter*

*Arcobacter*-like species mají tvar připomínající vývrtku. Pohybují se pomocí jednoho nebo dvou polárních bičků. V případě inkubace při 30 °C na krevním agaru vyrůstají v našedlých či bělavých koloniích o velikosti přibližně 2–4 mm (Phillips, 2001).

Detekce arkobakterů pomocí kultivačních technik se provádí za aerobních podmínek a při 25 °C. Je zde navíc krok pomnožení. Kultivace trvá v průměru 4 až 5 dnů. Použít můžeme komerčně dostupná média, jako jsou agar CAT obsahující cefoperazon, amfotericin B

a teikoplanin, nebo deoxycholátový agar CCDA, který je specifický především pro kultivaci *Arcobacter butzleri*.

Pro kultivaci *Arcobacter*-like bylo testováno několik médií včetně CVA agaru, Houfův bujón, Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris-Polysorbate-80 bujón (EMJH P80) nebo Johnson-Murano bujón. Na Houfovou agaru vyrůstají *Arcobacter*-like v drobných koloniích. U Johnson-Murano bujónu je pozorována tmavě červená barva kolem kolonií a je také považován za neúčinnější půdu pro růst bakterie *Arcobacter* spp. (Son *et al.*, 2007, Blackburn and McClure 2009).

Ve studii Johnson a Murano (1999) dosáhly nejlepších výsledků kultivace pomocí kombinace obohaceného bujónu JM s agarem JM. Tato metoda JM je považována za nejcitlivější, detekuje kmeny *Arcobacter* spp. až na úroveň 10 CFU/g v 75-100 % vzorků. Za stejně účinnou metodu lze považovat také metodu Collinsovu (Lehner *et al.*, 2005). Studie dle Scullion *et al.* (2004), ve které se srovnávají tři metody kultivace *Arcobacter*-like. Jednou z nejlepších metod dle této studie je kultivace, kde bujón je obohacen na bázi uhlí a obsahuje dvě antibiotika. Po 48hodinové kultivaci je výtěžnost této metody až 68 %. Je to tedy metoda citlivá, jednoduchá na provedení a má vysokou rozmanitost v množství detekovaných druhů *Arcobacter*-like (Scullion *et al.*, 2004).

Po kultivaci je hodnocena morfologie narostlých kolonií. *Arcobacter*-like jsou zakřivené tyčinky, většinou jsou nehemolytické, s výjimkou několika kmenů jako jsou *A. skirrowii* a *A. butzleri*, které jsou alfa-hemolitické. Barva kolonií je nejlépe viditelná na mediích, která jsou na bázi uhlí a u většiny kolonií kolísá barva od bělavé přes béžovou až po žlutou. Kolonie *A. skirrowii* jsou převážně našedlé (Vandamme *et al.*, 1992). Dle Gramova barvení jsou arko bakterie gram-negativní štíhlé tyčinky, často ve tvaru písmene S. Jsou pohyblivé pomocí nezakrytého bičíku, který je umístěn polárně na obou nebo jednom konci buňky (Collado and Figueras, 2011).

### **5.2.2 Biochemické testy identifikace *Arcobacter***

Identifikace *Arcobacter*-like pomocí biochemických testů je velmi obtížná na úrovni druhů, jelikož arko bakterie mají rozmanité biochemické vlastnosti. Proto jsou zapotřebí nové metody, aby bylo možné tyto organismy spolehlivě identifikovat při jejich rostoucím počtu druhů, které souvisí s onemocněním lidí i zvířat (Schroeder-Tucker *et al.*, 1996). Izoláty *Arcobacter*-like můžeme odlišit od ostatních druhů za pomoci biochemických testů jako jsou testy na aktivitu katalázy a ureázy nebo testy na redukci dusičnanů. Většina druhů *Arcobacter* vykazují pozitivní

reakce na oxidázový i katalázový test a současně pozitivní test na hydrolýzu indoxyl-acetátu a redukci dusičnanů. Naopak test hydrolýzy hippurátu a ureázový test jsou negativní. Stejně tak i test na produkci H<sub>2</sub>S a fermentaci cukru s produkcí sirovodíku jsou negativní (Ramees *et al.*, 2017).

Často se setkáváme s tím, že klasické biochemické testy, které jsou běžně používány k identifikaci bakterií, přinesly u druhů *Arcobacter*-like proměnlivé nebo negativní výsledky. Tedy, až na výsledky sad testů využitelných pro odlišení druhů *Arcobacter*-like, které byly navrženy v Bergey's Manual of Systematic Bacteriology in 2005 (Collado and Figueras, 2011).

### 5.2.3 Sérologické testy k identifikaci *Arcobacter*

Sérologické testy k identifikaci *Arcobacter*-like species se příliš často nepoužívají, na rozdíl od jiných mikroorganismů jako jsou salmonely, kampylobaktery nebo listerie. Často při pokusech identifikace arkobakterů za pomoci specifické aglutinace protilátky dochází k neúspěchu této techniky. Důvodem selhávání sérologických testů při identifikaci může být vysoká antigenní heterogenita *Arcobacter*-like (Soncini, 2010).

Jak již bylo řečeno dříve, sérologické metody jsou založeny na odlišné bakteriální povrchové struktuře (Eberle and Kiess, 2012). Povrchová struktura *Arcobacter*-like je stále do jisté míry neznámá, ať už se jedná o specifické proteiny s porinovými nebo adhezivními vlastnostmi nebo o polysacharidové složky, odpovědné právě za sérotypovou specifitu (Soncini, 2010).

Identifikace gastrointestinálních patogenů je neustálou výzvou. Konvenční diagnostické postupy, které zahrnují i sérotypizaci jsou pracné a časově náročné, jelikož konečných výsledků jsme schopni, díky potřebné kultivaci, dosáhnout až v řádu několika dnů (Arguello *et al.*, 2015). Sérologické metody sice nevyžadují čisté kultury, ale mají nízkou úroveň diskriminační síly a jsou aplikovatelné pouze na druhy, pro které jsou dostupná antiséra (Pavlovic *et al.*, 2013).

### 5.2.4 Identifikace *Arcobacter* za pomoci MALDI-TOF MS

Stále důležitější je spolehlivá a rychlá identifikace rodů *Arcobacter*-like species a jejich fenotypové rozlišení od podobných bakterií. Hmotnostní spektroskopie, ve spojení s laserovou desorpční/ionizací vzorku (MALDI-TOF MS), se ukázala jako rychlá a citlivá metoda pro identifikaci mikroorganismů. Především *Arcobacter*-like, *Helicobacter* a jejich fenotypové rozlišení s podobnými druhy jako je *Campylobacter* (Alispahic *et al.*, 2010).

MADLI-TOF MS je chemotaxonická metoda umožňující rychlou identifikaci bakterií. Lze ji snadno zařadit pro rutinní analýzy v laboratořích (Pavlovic *et al.*, 2013). Kromě identifikace bakterií má MALDI-TOF MS také význam v epidemiologickém typování kmenů a při detekci antimikrobiální citlivosti/rezistence.

Tato fenotypová metoda je založena na detekci charakteristických znaků, které vycházejí z bílkovin, především se jedná o ribozomální a nukleové proteiny vázané na kyseliny (Giacometti *et al.*, 2018). Kromě bílkovin je MALDI schopné detekovat i cukry a další biomolekuly. Základním principem metody je ionizace neutrální molekuly. Následuje přesné stanovení výsledných primárních iontů a jejich produktů rozpadu ve vysokém vakuu. Hmotnostní spektrometr je složen ze tří částí, kterými jsou zdroj iontů, hmotnostní analyzátor a detektor. Analyzátoři TOF navíc využívají skutečnosti, že všechny zrychlené ionty ve stejném elektrickém poli mají stejnou kinetickou energii. K rozrušení buněk existují tři možné postupy, a to příprava vzorku zahrnující buď metodu přímého nátěru, metodu terčové extrakce anebo extrakci acetonitrem po kroku čištění ethanolem. Izoláty *Arcobacter*-like jsou kvůli jejich struktuře připravovány extrakcí kyselinou ethanolvou (Pavlovic *et al.*, 2013).

Přesnost identifikace pomocí MALDI-TOF MS může ovlivnit příprava vzorku k identifikaci. Jsou zapotřebí drahé chemické látky, dále může přesnost metody ovlivnit exprese bílkovin, která závisí na kultivačních podmínkách a jiných biologických procesech (Wang *et al.*, 2020).

### 5.2.5 Testování antimikrobiální citlivosti *Arcobacter*

*Arcobacter*-like jako významný lidský i zvířecí patogen je nejčastěji spojován s průjemovým onemocněním. *Arcobacter butzleri* byl popsán jako nejrozšířenější a nejčastěji detekovaný druh z *Arcobacter*-like species (Ferreira *et al.*, 2019). Pro antibakteriální rezistenci jsou k dispozici omezené údaje. Studie se zabývají především druhem *A. butzleri* vzhledem ke klinickému významu (Ramees *et al.*, 2017). Významná je také jeho adhezivita, invazivita, schopnost intracelulárního přežití a indukce prozánětlivých cytokinů (Ferreira *et al.*, 2019).

Ve studii dle Parissi *et al.* (2019) byly popsány geny, které jsou zodpovědné za rezistenci arko-bakterů k některým antibiotikům. Jmenovat můžeme třeba gen *adeF*, který u 100 % izolátů *Arcobacter*-like potvrdil rezistenci vůči fluorochinolovým a tetracyklinovým antibiotikům. Dále 90 % izolátů obsahovalo v genomu gen *acrB*, který ovlivňuje rezistenci vůči rifamycinu, cefalosporinu, triclosanu, glycylycyklinu a také rezistenci na tetracyklin a fluorochinolon. Cefalosporiny se přidávají do selektivních médií *Arcobacter*-like pro potlačení růstu

doprovodných mikroorganismů (Parisi *et al.*, 2019). Ze skupiny  $\beta$ -laktamů je většina izolátů *Arcobacter*-like rezistentní vůči ampicilinu.

Kmeny *Arcobacter*-like vykazují citlivost k erythromycinu a gentamicinu (Ferreira *et al.*, 2017). O citlivosti *Arcobacter*-like na antimikrobiální látky máme omezené informace. Většina studií potvrzují náchylnost *Arcobacter*-like k aminoglykosidům, a tetrycyklinům. Dále byla prokázána citlivost na gentamicin, streptomycin, a kanamycin (Ramees *et al.*, 2017).

Možné neshody v porovnávání citlivosti/rezistenci *Arcobacter*-like na antibiotika mohou být způsobeny použitím rozdílných technik a postupů při interpretaci nebo v přípravě vzorků. Proto je takovéto porovnávání považováno za nebezpečné (Abeele *et al.*, 2016).

### 5.3 Identifikace *Arcobacter* genotypovými metodami

Převažující výskyt arkobakterů v potravinách je často podceňován kvůli absenci standardizované metody pro izolaci tohoto patogenu. V současnosti se používají metody genotypizace převážně k identifikaci *Arcobacter*-like pro epidemiologické a molekulární studie (Caruso *et al.*, 2018). Metody založené na DNA byly zavedeny především pro správnou identifikaci *Arcobacter*-like species na úrovni druhu, jelikož mnoho používaných fenotypových testů, které se používají kvůli biochemickému profilu *Arcobacter*-like nejsou dostatečně citlivé ke správnému rozlišení těchto mikroorganismů na úrovni druhů (Aydin *et al.*, 2006). Dalším důvodem, proč jsou stále častěji používané metody genotypizace je fakt, že konvenční metody identifikace včetně biochemických a fyzikálních testů jsou časově náročné i pracné (Khan *et al.*, 2017). Naopak testy založené na DNA používané k identifikaci *Arcobacter*-like jsou rychlé a mají vyšší specifitu (Houf *et al.*, 2000).

Metody založené na DNA analýze vyžadují převážně použití několika druhově specifických primerů PCR, hybridizačních sond nebo restrikčních enzymů. Za nevýhodu se dá považovat to, že tyto metody nejsou navrženy tak, aby byly schopné rozlišit všechny známé druhy současně (Alispahic *et al.*, 2010). Existuje několik metod popisujících identifikaci arkobakterů založených na genotypizaci. Jedná se o ribotypizaci, metody PCR založené buď na opakujících se prvních nebo náhodných sekvencích, metody PFGE, multilokusová sekvenční typizace nebo metody amplifikace délky polymorfismu (Atabay *et al.*, 2004).

Je známá vysoká genetická rozmanitost populace arkobakterů, která však brání v epidemiologických studiích při potřebě dohledání zdroje infekce. Vysoká heterogenita je uváděna autory různých studií i mezi izoláty identifikovanými pomocí různých

genotypizačních metod (Caruso *et al.*, 2020). Příčinou vysoké úrovně heterogenity *Arcobacter*-like může být přítomnost více rodičovských genotypů nebo vysoké genetické rekombinace mezi potomky původních genotypů. Takováto heterogenita také souvisí s možnou kontaminací z více zdrojů (Ramees *et al.*, 2014).

### 5.3.1 Identifikace *Arcobacter* metodou MLST

Epidemiologické molekulární studie v současné době používají řadu metod založených na genotypizaci a každá z nich vykazuje jinou diskriminační sílu. Mezi tyto metody řadíme i metodu MLST, která ale oproti ostatním představuje výhodu v dostupnosti online databáze pro *Arcobacter*-like. Tato databáze Pub MLST umožňuje srovnávání kmenů, které byly izolovány při různých studiích i z různých geografických oblastí (Parisi *et al.*, 2019). Aktuálně je v databázi Pub MLST k dispozici více než 600 profilů a vysoký počet identifikovatelných typů sekvencí. Tyto počty ukazují na vysokou genetickou rozmanitost arkobakterů, které byly identifikovány metodou MLST. Byla tak potvrzena vysoká diskriminační schopnost této metody. MLST se tedy dá považovat za vhodnou metodu pro epidemiologická vyšetření (Caruso *et al.*, 2018).

Technika MLST funguje na principu sekvenování fragmentů sedmi genů o velikosti 450 až 500 bp. Takováto analýza nám umožňuje identifikaci identických klonů nebo vysoce příbuzných linií. Z toho vyplývá, že se jedná o markery, které zůstaly stabilní po dobu vývoje a mohou se tak používat pro srovnání kmenů v různých časových měřítkách a geografických oblastech (Castro-Escarpulli *et al.*, 2015). Protokol typizace multilokusové sekvence byl v roce 2009 Millerem *et al.* (2009) vytvořen pro druhy *Arcobacter*-like, a to na základě sekvenční informace na sedmi lokusech (Cesare *et al.*, 2015).

Schéma metody MLST používané pro příbuzné organismy jako jsou *C. jejuni* a *H. pylori*, bylo nedávno vyvinuto pro identifikaci *Arcobacter*-like (Webb *et al.*, 2015). V metodě MLST pro *Arcobacter*-like je sada genů, která je identická se sadou genů pro *C. jejuni*. Jedná se o geny *atpA*, *glnA*, *glyA*, *aspA*, *gltA*, *tkt* a *pgm*. Takováto shoda umožňuje fylogenetické srovnání mezi rody *Campylobacter* a skupinou *Arcobacter*-like species. Vývoj metody MLST pro *Arcobacter*-like nám pomohl v dokončení genomové sekvence kmene *A. butzleri*, který je nejčastěji izolováním druhem arkobakterů (Miller *et al.*, 2009).

Při srovnávání metod MLST s jinými genotypizačními metodami je považována za dobrou typizační metodu, neboť poskytuje rychlé a srovnatelné výsledky. Tato technika je používána

jako rutinní postup při molekulární typizaci *Arcobacter*-like v několika studiích (Caruso *et al.*, 2020).

### 5.3.2 Identifikace *Arcobacter* metodou AFLP

Metoda amplifikace polymorfismu délky fragmentů je další z metod bakteriální genotypizace, používaná k identifikaci *A. butzleri*. Několik studií prokázalo vysokou citlivost této metody. Technika AFLP se jeví jako úspěšná metoda genotypizace pro využití v molekulárních epidemiologických studiích. AFLP je také metoda levnější, rychlejší a vhodnější pro identifikaci velkého počtu izolátů. Oproti ostatním celogenomovým metodám je AFLP snáze proveditelná (Atabay *et al.*, 2004). Protokol popsáný Duim *et al.* (1999) se ukázal jako užitečný pro studování diverzity blízce příbuzného rodu *Campylobacter*. Tento protokol byl následně optimalizován pro *Arcobacter*-like s důrazem na *A. cryarophilus* (Debruyne *et al.*, 2010).

Amplifikace polymorfismu délky fragmentů zahrnuje štěpení celé genomové DNA za pomoci restrikčních enzymů BgI II a Csp 6I. Vzniklé fragmenty podléhají následné amplifikaci PCR a detekci fragmentů mezi sousedními restrikčními místy v genetickém kódu sledovaného vzorku (On *et al.*, 2003). Metoda AFLP je využívána především k analýze rozmanitosti mezi izoláty a k předběžné identifikaci druhů, které zahrnují dobře charakterizované kmeny jako jsou například *Campylobacter*, *Arcobacter*-like anebo *Helicobacter* (Gilbert *et al.*, 2014).

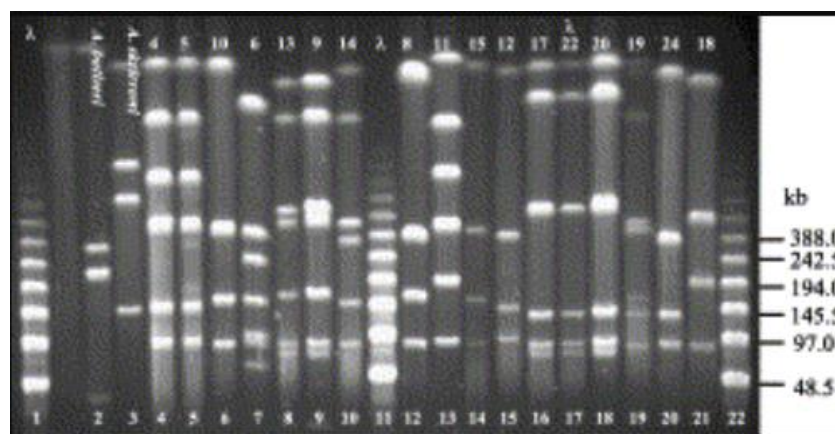
AFLP je v laboratořích rutinně používaná metoda. Jedná se o vysoce robustní a diskriminační metodu, která vyžaduje referenční databázi a je poměrně náročná na provedení. Harrington a On prokázali použitelnost metody AFLP k identifikaci *Arcobacter* a účinnost této metody při identifikaci genetické rozmanitosti *Arcobacter* mezi různými klonálními typy z odlišných zeměpisných oblastí. Pro separování *Arcobacter*-like byla také prokázána srovnatelná korelace metody AFLP s m-PCR. Při potvrzování izolátů *Arcobacter* je ale metoda m-PCR o něco přesnější (Phillips, 2001).

### 5.3.3 Identifikace *Arcobacter* pomocí PFGE

Gelová elektroforéza v pulzním poli je genotypizační metoda schopná odlišit bakteriální izoláty na úrovni kmene. V průběhu PFGE dochází na gelu ke generalizaci otisku fragmentů DNA, které se následně porovnávají v databázích (Quainoo *et al.*, 2017). K získání fragmentů DNA se používají restrikční enzymy. Jmenovat můžeme třeba enzymy SmaI, SalI, KpnI, XhoI, SacII nebo EagI. Kombinací dvou nebo tří těchto restrikčních enzymů se značně zvyšuje

diskriminační schopnost PFGE. Tato technika je v rámci molekulární typizace považována za zlatý standard. Hume *et al.* (2001) využili PFGE pro identifikaci *Arobacter*-like species. PFGE se ukázala jako velmi užitečná metoda pro typizaci především potravinových patogenů, mezi které kromě *Arcobacter*-like můžeme zařadit i např. listerie a salmonely (Rivas *et al.*, 2004).

Izoláty *Arcobacter*-like species jsou kultivovány na agarovém médiu mikroaerobně při 25 °C 48 hodin. Vyrostlé jednotlivé kolonie jsou následně pomnoženy v médiu a opět kultivovány. Po 48 hodinách inkubace je kultura *Arcobacter*-like několikrát promytá fosfátovým pufrům a centrifugovaná (Hume *et al.*, 2001). Vzniklá suspenze obsahující DNA *Arcobacter* je podrobena štěpení restričními endonukleázami. Štěpení probíhá po dobu 4 hodin a při teplotě 37 °C. Restriční fragmenty izolátů *Arcobacter*-like se oddělují elektroforézou na agarózovém gelu po dobu 22,5 hodiny při teplotě 14 °C. Čas elektroforézy se může lišit v závislosti na použití restričních enzymů (Giacometti *et al.*, 2015). Při této separaci elektroforézou je aplikován elektrický proud, který periodicky mění směr v gelové matici (Adzitey *et al.*, 2013). Po dokončení elektroforézy je agarózový gel obarvován roztokem ethidiumbromidu po dobu 30 minut nebo lze gel obarvit roztokem GelRed, který je třeba nechat působit 1 hodinu. Následuje promývání destilovanou vodou a posléze může být gel vizualizován UV dokumentačním systémem (Giacometti *et al.*, 2015).



**Obrázek 12** PFGE profily kmenů *Arcobacter* (Rivas *et al.*, 2004)

Při typizaci *Arcobacter*-like byla metodou PFGE odhalena značná heterogenita mezi izoláty. Přičemž některé z izolátů jsou rezistentní na štěpení restričním enzymem KpnI, a tudíž nebylo možné tyto izoláty identifikovat metodou PFGE (Revez *et al.*, 2013). Značná heterogenita byla popsána u *Arcobacter*-like species izolovaných od lidí s průjmovým onemocněním, kdy při typizaci metodou PFGE byly zjištěny různé pulstotypy. Tento vysoký



stupeň heterogenity mezi izoláty při identifikaci *Arcobacter*-like, který je zmiňován v několika dalších studiích, poukazuje na existenci mnoha zdrojů kontaminace arkobaktery v prostředí (Kayman *et al.*, 2012). Podobná studie byla provedena u skotu, u kterého byly zjištěny také různé pulsootypy *Arcobacter*-like pomocí metody PFGE. Tyto výsledky nám rovněž potvrdily roli vody při přenosu druhů *Arcobacter* (Giacometti *et al.*, 2015).

Při porovnání studií typizace *Arcobacter*-like metodami PFGE a MLST, vykazuje metoda PFGE výrazně vyšší diskriminační index. Metoda MLST je naopak vůči metodě PFGE méně náročná na analyzování a interpretaci dat. Při kombinaci těchto dvou metod se významně zvýšila pravděpodobnost diferenciací izolátů než při použití metod samostatně. Ovšem kombinací metod se zvýšily náklady a také doba provedení identifikace izolátů (Cesare *et al.*, 2015).

Metoda gelové elektroforézy v pulzním poli se jeví jako nepostradatelná technologie v epidemiologických studiích. Na druhou stranu má i své nevýhody, protože je u této metody relativně časově náročný postup, který může trvat i několik dní. Někdy mohou také různé rekombinace a genomové přeskupení činit složitější interpretaci výsledků metody PFGE (On *et al.*, 2003).

### **5.3.4 Identifikace *Arcobacter* metodou PCR**

Metody PCR jsou další z významných identifikačních technik se schopností detekovat *Arcobacter* jako důležité patogeny a jejich cílové geny. Tyto metody jsou mnohem rychlejší a přesnější ve srovnání s kulturačními, mikroskopickými a antigenními testy, které mají omezenou detekci na úrovni druhů (Zambri *et al.*, 2019). Pro identifikaci *Arcobacter*-like se používají metody PCR, které jsou založeny na konvenční PCR, multiplexní PCR, real-time PCR a denaturační gradientové gelové elektroforéza PCR. Většina těchto metod je zaměřena na rodovou identifikaci, anebo identifikaci na úrovni druhu, nejčastěji *A. butzleri* či *A. cryaerophilus* (Levican and Figueras, 2013).

Bylo vytvořeno mnoho metod PCR, které slouží k identifikaci *Arcobacter*-like species na úrovni druhu nebo rodu. Ve studii dle Harmon a Wesley (1996) bylo pro identifikaci *Arcobacter*-like využito genově specifického páru primerů k amplifikaci fragmentu genu 16 S rRNA. Stanovení se dále provádělo s využitím potvrzovací sondy hybridizující s generovaným produktem PCR. Tento postup použití PCR obohacený biochemickými a cytotoxickými testy byl využit ve studii Villarruel *et al.* (2003) což pomohlo k detekci *Arcobacter*-like izolovaných z různých masových produktů. Metoda PCR dle Bastyns *et al.*

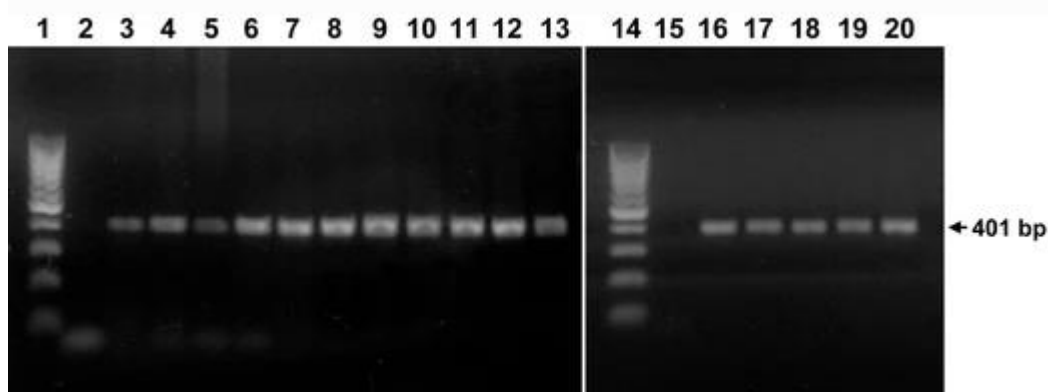
(1995) využívá pár primerů specifických pro rod *Arcobacter* a současně využívá tři páry primerů specifických pro druhy *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Tyto primery jsou navrženy na gen 23 S rRNA. Na podobném principu je navržena i studie dle Pentimalii *et al.* (2009) kde se využívají čtyři sady primerů, které jsou zaměřeny na geny *GyrA* a 16 S rRNA. Tato studie PCR dle Pentimalii *et al.* (2009) je specifická pro detekci *A. butzleri*, *A. cryaerophilus*, *A. skirrowii* a *A. cibarius* izolované z drůbežího masa (González *et al.*, 2011; Harmon and Wesley, 1997).

Při identifikaci *Arcobacter*-like metodou PCR je využíváno schopnosti této metody amplifikovat specifické oblasti DNA. Přímá amplifikace je obtížná díky detekci malého množství *Arcobacter*-like ve vzorcích. Z tohoto důvodu je nutné před samotnou PCR provést krok obohacení vzorku a následnou purifikace bakteriální DNA. Metodu PCR lze provést za použití specifických sad primerů a specifických sond DNA, založených na 16 S rRNA. Specifické sondy a primery nám tak umožňují detekci patogenů (Phillips, 2001). Ribozomální geny 16 S a 23 S rRNA jsou vzhledem k jejich velkému zastoupení v buňce, mozaikové struktúře fylogeneticky konzervovaných a variabilních oblastí, vhodné jako detekční markery konkrétních mikroorganismů. Kromě genů 16 S a 23 S rRNA byly nalezeny alternativní geny, které mají vyšší variabilitu sekvence. Jedná se o geny *gyrA*, *rpoB/C* nebo *hsp60*, které se ukázaly jako vhodné pro identifikaci arkobakterů (González *et al.*, 2011).

Multiplexní PCR je použita pro identifikaci na úrovni druhu. Metodou multiplexní PCR jsou analyzovány kolonie s charakteristickou morfologií a dalšími biochemickými testy odpovídající *Arcobacter*-like species. Obohacený bujón s koloniemi vykazující charakteristiky *Arcobacter*-like je prvně identifikován dle Houf *et al.* (2000) pokud je výsledek negativní jsou izoláty podrobeny další analýze multiplexní PCR podle Doudahema *et al.* (2010) (Ferreira *et al.*, 2017). Primery zameřené na geny 16 S a 23 S rRNA jsou použity s několika modifikacemi, buď na obohaceném médiu nebo na čisté kultuře *Arcobacter*. Templátová DNA je extrahována metodou lýzi, kdy je suspenze mikroorganismů zahřívána na teplotu asi 98 °C s následnou centrifugací. Vzniklý supernatant je použit jako templát DNA pro PCR reakci. Multiplexní PCR začíná krokem denaturace, která je prováděna za vysoké teploty okolo 94 °C po dobu 45 sekund, následuje žihání primeru při teplotě 61 °C po dobu 45 sekund a prodloužení řetězce DNA při teplotě 72 °C po dobu 30 sekund. Tyto kroky jsou prováděny v termálním cyklu. Získané amplifikované produkty jsou detekovány elektroforézou na agarózovém gelu, který je obarven roztokem ethidiumbromidu. Amplikony, o definované velikosti jsou identifikovány jako *Arcobacter*-like na základě intenzity zbarvení a molekulové hmotnosti, které jsou

zachyceny pomocí počítačové techniky (Zambri *et al.*, 2019; Houf *et al.*, 2000; Ferreira *et al.*, 2017).

K identifikaci arkobakterů lze kromě mutliplex PCR použít i kvantitativní testy PCR. Jedná se o rodově specifické testy PCR. V kvantitativním testu se využívá buď TaqMan real-time PCR, nebo se využívá SYBR Green I real-time PCR. TaqMan real-time PCR používá dva nezávislé systémy PCR-primer-sonda, kdy jeden je specifický na gen *rpoB/C* a druhý je cílený na 23 S rRNA pod jednotku. Real-time PCR s využitím SYBER Green je specifický pro gen *gyrA* a 16 S rRNA pod jednotku (Hausdorf *et al.*, 2013). Obrázek 13 nám znázorňuje výsledek multiplexní PCR, kde ve sloupci 1 a 14 je znázorněný marker DNA, 2 a 15 jsou negativní kontroly, 3 a 16 jsou pozitivní kontroly, 4-13 a 17-20 jsou potvrzené izoláty *Arcobacter butzleri* (Celik and Unver, 2015).



**Obrázek 13** Výsledek multiplexní PCR u izolátu *Arcobacter*-like (Celik and Unver, 2015)

Techniky PCR je také možné kombinovat s kultivací což je považováno za spolehlivou a rychlou metodu, pro hodnocení kontaminace potravin arcobactery. Kromě vhodných sad primerů je zapotřebí provést předběžné selektivní obohacení. *Arcobacter*-like se obohacuje dle protokolů vyvinutých původně pro leptospiry anebo kampylobaktery s jistými modifikacemi jako je např. snížení teploty. Po 16 hodinách kdy probíhá obohacení *Arcobacter*, následuje PCR zaměřená na 16 S rRNA. (Phillips, 2001; González *et al.*, 2001).

Metody PCR jsou schopné detekovat patogeny a geny mnohem rychleji a přesněji než metody kultivační, mikroskopické nebo antigenní testy (Zambri *et al.*, 2019). PCR se velice osvědčila díky možné detekci specifické pro rod nebo druh *Arcobacter*, v závislosti na specifičnosti detekčního systému (Hänel *et al.*, 2016). Metody PCR poskytují výhody v rychlosti, citlivosti, specifičnosti i schopnosti detekovat malé množství cílové nukleové

kyseliny, zajišťují spolehlivou identifikaci rutinních i nejednoznačných patogenů. Tyto informace jsou důležité pro diagnostiku onemocnění, epidemiologické studie, a i pro výzkum (Fera *et al.*, 2004).

## Závěr

Typizační metody jsou zásadní pro identifikaci mikroorganismů a jsou tedy nedílnou součástí při léčbě širokého spektra onemocnění. Metody typizace se stále rychle vyvíjí, zdokonalují a hlavně automatizují. Genotypové metody jsou pro identifikaci mikroorganismů značně přesnější, citlivější, reprodukovatelnější, a proto jsou také mnohem více používány. Přesto se genotypizace stále neobejde bez metod fenotypových, které zahrnují kultivaci, biochemické a další testy založených na fenotypových znacích mikroorganismu.

Nedávno reklasifikovaná čeleď *Arcobacteraceae* si získává značnou pozornost. Rody z této čeledi jsou značně rozšířeny, a to jak ve vodních zdrojích sladkých i slaných vod, tak v různých potravinách, dokonce jsou tyto rody izolovány i z různých zvířat. Doposud není zcela znám způsob přenosu těchto rodů. Lidé i zvířata se nejčastěji pravděpodobně nakazí právě z kontaminované potravy, anebo z kontaminované vody. Z tohoto důvodu je důležité dodržování hygienických postupů při konzumaci a při úpravě potravin nebo na jatkách což může být jedna z možností, jak šíření a nákazy způsobené rody *Arcobacter*-like eliminovat. Znepokojujícím faktorem je také zvyšující se odolnost *Arcobacter*-like vůči běžně používaným antimikrobiálním látkám.

Identifikace rodů *Arcobacter*-like je značně obtížná, donedávna se velmi snadno tyto rody zaměňovaly s rody *Campylobacter*, díky jejich úzké podobnosti. Genotypové metody založené na DNA a zejména techniky založené na PCR, jsou zaměřeny na identifikaci rodu *Arcobacter*-like anebo pouze na *A. butzleri*. Mezi další metody používané k identifikaci *Arcobacter*-like patří AFLP, která je rychlá, levná a vhodná pro typizaci velkého počtu izolátů, na provedení je jednodušší než např. metody MLST a PFGE. Při použití jakékoli typizační metody pro identifikaci *Arcobacter*-like nedosáhneme zcela 100 % výsledků. Každá z použitých metod vykazuje jistou míru chybné identifikace. Je však pravděpodobné, že metody typizace se budou stále zdokonalovat a detekce *Arcobacter*-like bude čím dál přesnější. Stejně tak charakterizace a kontrola tohoto nově vznikajícího potravinového patogenu.

## Seznam použité literatury

- 1) **ABEDON S.T., DUFFY S., SOUSTRUŽNÍK P.E.,** Bacteriophage ecology. *Encyclopedia of microbiology*. 2009, (3), 42-57.
- 2) **ABEELE de van A., VOGELAERS D., VANLAERE E., HOUF K.,** Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2016, (71) 5, 1241-1244.
- 3) **ACIK N.M., YÜKSEL H., ULUCAN A., CETINKAYA B.,** The first experimental research on the pathogenicity of *Arcobacter butzleri* in zebrafish, *Veterinary microbiology*, 2016, (189), 32-38.
- 4) **ADZITEY F., HUDA N., RAHMAT ALI G.R.,** Molecular techniques for detecting and typing of bacteria, advantages and application to foodborne pathogens isolated from ducks, *3 Biotech*, 2013, (3) 2, 97-107.
- 5) **ALISPAHIC M., HUMMEL K., JANDRESKI-CVETKOVIC D., NÖBAUER K., RAZZAZI-FAZELI E., HESS M., HESS C.,** Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis, *Journal of medical microbiology*, 2010, (59) 3, 295-301.
- 6) **ARGUELLO E., OTTO C.C., MEAD P., BABADY E.N.,** Bacteremia caused by *Arcobacter butzleri* in an immunocompromised host, *Journal of clinical microbiology*, 2015, (53) 4, 1448-1451.
- 7) **ATABAY H.I., ON S.L.W., AMISU O.K., COKER O.A., HARRINGTON C.S.,** Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis, *Letters in applied microbiology*, 2004, (39) 4, 347-352.
- 8) **ATABAY I.H., WAINO M., MADSEN M.,** Detection and diversity of various *Arcobacter* species in danish poultry, *International journal of food microbiology*, 2006, (109) 1-2, 139-145.
- 9) **AYDIN F., GÜMÜSSOY K.S., ATABAY H.I., ICA T., ATABY S.,** Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR, *Journal of applied microbiology*, 2006, (103) 1, 27-35.
- 10) **BAEK J., JEONG J., KIM J., SUKHOO A., KIM W.,** *Halarcobacter arenosus* sp. nov., isolated from marine sediment, *Archives of microbiology*, 2021, (203), 817-822.
- 11) **BANAEI MUDr. N., MUDr. DERESINSKI S.C., MUDr. PINSKY B.A. PhD.,** Microbiologic diagnosis of lung infection. *Murray and nadel's textbook of respiratory medicine*, 2016 (1) 6, 278-298, ISBN 978-1-4557-3383-5.

- 12) **BELKUM A. van. P.T., TASSIOS L., DIJKSHOOM S, HAEGGMAN S., COOKSON B., FRY N.K., GREEN J., FEIL E., GERNER-SMIDT P., BRISSE S., STRUELENS M.,** Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical microbiology and infection*, 2007, (13) 3, 1-46.
- 13) **BELKUM A. van., STRUELENS M., VISSER de A., VERBRUGH H., TIBAYRENC M.,** Role of genomic typing in taxonomy evolutionary genetics, and microbial epidemiology. *Clinical microbiology reviews*, 2001, (14) 3, 547-560.
- 14) **BLACKBURN de C.W., MCCLURE P.J.,** *Campylobacter* and *Arcobacter*, *Foodborne Pathogens*. 2009, (2) 20, 718-762.
- 15) **BRZOZOWSKI M., KWIATKOWSKI P., KOSIK-BOGACKA D., JURSA-KULESZA J.,** Metody genotypowe i fenotypowe wykorzystywane w typowaniu drobnoustrojów do celów epidemiologicznych. *Postepy mikrobiologii*, 2017, (3) 56, 353-366.
- 16) **BUTLER J.M.,** PCR Amplification: Capabilities and cautions. *Advanced topics in forensic DNA typing: methodology*, 2012, (1) 4, 69-97, ISBN 978-0-12-374513-2.
- 17) **CARUSO M., GIOVANNI N., MICCOLUPO A., CAPOZZI L., BONERBA E., DIFATO L., DI PINTO A., MOTTOLA A., SANTAGADA G., PARISI A.,** Large genetic diversity of *Arcobacter butzleri* isolated from raw milk in Southern Italy, *Food mikrobiology*, 2020, (89) 103403, 1-4.
- 18) **CARUSO M., LATORRE L., SANTAGADA G., FRACCALVIERI R., DIFATO M.L., MICCOLUPO A., CAPOZZI L., BONERRBA E., MOTTOLA A., PARISI A.,** *Arcobacter* spp. in bovine milk: An emerging pathogen with potential zoonotic risk, *Italian journal of food safety*, 2018, (7) 4, 209-212.
- 19) **CASTRO-ESCARPULLI G., ALONSO-AGUILAR N. M., SÁNCHEZ G. R., BOCANEGRA-GARCIA V., GUO X., JUÁREZ-ENRÍQUEZ R.S., LUNA-HERRERA J., MARTÍNEZ M.C., GUADALUPE A.M.,** Identification and typing methods for the study of bacterial infestation, *Archives of clinical microbiology*, 2015, (7) 1:3, 1-10.
- 20) **CELIK E., ÜNVER A.,** Isolation and identification of *Arcobacter* spp. by multiplex PCR from water sources in kars region, *Current microbiology*. 2015, (71) 5, 546-550.
- 21) **CESARE de A., PARISI A., GIACOMETTI F., SERRAINO A., PIVA S., CARUSO M., SANTIS de L.P.E., MANFREDA G.,** Multilocus sequence typing of *Arcobacter butzleri* isolates collected from dairy plants and their products, and comparison with their PFGE types, *Journal of applied microbiology*, 2015, (120) 1, 165-174.
- 22) **CLARK D.P., PAZDERNIK N.J.,** DNA Synthesis in vivo and in vitro *Biotechnology*, 2015, (2) 4, 97-130, ISBN 978-0-12-385015-7.

- 23) COLEMAN W.B, TSONGALIS G.J.**, Laboratory approaches in molecular pathology—The polymerase chain reaction, *Diagnostic molecular pathology*, 2016, (1) 2, 15-23, ISBN 978-0-12-800886-7.
- 24) COLLADO L., FIGUERAS M.J.**, Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*, *Clinical microbiology*, 2011, (24) 1, 174–192.
- 25) COLLADO L., CLEENWERCK I., TRAPPEN van T., VOS de P., FIGUERAS M.J.**, *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels, *Journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2009, (59) 6, 1391-1396.
- 26) CRUMP J.A., WAIN J.**, *Salmonella*, *International encyclopedia of public health*, 2017, (2), 425-433.
- 27) DEBRUYNE L., HOUF K., DOUIDAH L., SMET de S., VANDEMME P.**, Reassessment of the taxonomy of *Arcobacter cryaerophilus*, *Systematic and applied microbiology*, 2010, (31) 1, 7-14.
- 28) DONACHIE P.S., BOWMAN P.J., ON LW.S., ALAM M.**, *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*, *Internatiolan journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2005, (55) 3, 1271-1277.
- 29) DONELLI G., VUOTTO C., MASTROMARINO P.**, Phenotyping and genotyping are both essential to identify and classify a probiotic microorganism. *Microbial ecology in health and disease*, 2012, (24) 1, 1-9.
- 30) EBERLE K.N., KIESS A.S.**, Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry, *Poultry science*, 2012, (91) 1, 255-264.
- 31) ENGEL S.A., LEE N., PORTER L.M., STERN, L.A., BENNETT C.P., WAGNER M.**, Filamentous “*Epsilonproteobacteria*” dominate microbial mats from sulfidic cave springs, *American society for microbiology journals*, 2003, (69) 9, 5503-5511.
- 32) FERA T.M., MAUGERI L.T., GUGLIANDOLO C., BENINATI C., GIANNONE M., CAMERA E.L., CARBONE M.**, Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the mediterranean sea, *Applied and environmental microbiology*, 2004, (70) 3, 1271-1276.
- 33) FERREIRA S., LUÍS A., OLESTRO M., PEREIRA L., DOMINGUES C.F.**, A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance, *Journal of global antimicrobial resistance*, 2019, (16), 130-139.
- 34) FERREIRA S., OLEASTRO M., DOMINGUES F.**, Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain, *Current opinion in food science*, 2019, (26), 9-17.



- 35) FERREIRA S., OLEASTRON M., DOMINGUES F.C.,** Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* spp. in a dairy plant, *Journal of applied microbiology*, 2017, (123) 4, 1019-1026.
- 36) FOXMAN B., ZHANG L., KOOPMAN J.S., MARRS C.F., MANNING F.C.,** Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies, *Epidemiologis perspectives & innovations*, 2005, (2) 10, 1-8.
- 37) GARIBYAN L., AVASHIA N.,** Polymerase chain reaction (PCR). *Journal of investigative dermatology home*, 2013, (3) 133, 1-4.
- 38) GIACOMETTI F., LUCCHI A., FRANCESCO DI A., DELOGU M., GRILLI E., GUARNIERO I., STANCAMPIANO L., MANFREDA G., MERIALDI G., SERRAINO A.,** *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* circulation in a dairy farm and sources of milk contamination, *Applied and environmental microbiology*, 2015, (81) 15, 5055-5063.
- 39) GIACOMETTI F., PIVA S., VRANCKX K., BRUYNE de K., DRIGO I., LUCCHI A., MANFREDA G., SERRAINO A.,** Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types, *International journal of food microbiology*, 2018, (277), 50-57.
- 40) GILBERT J.M., KIK M., TIMMERMAN J.A., SEVERS T.T., KUSTERS G.J. DUIM B., WAGER A.J.,** Occurrence, Diversity, and Host Association of Intestinal *Campylobacter*, *Arcobacter*, and *Helicobacter* in reptiles, *PLoS ONE*, 2014, (9) 7, 1-8.
- 41) GONZÁLEZ I., GARCÍA T., ANTOLÍN A., HERNÁNDEZ P.E., MARTÍN R.,** Development of a combined PCR-culture technique for the rapid detection of *Arcobacter* spp. in chicken meat, *Letters in applied mikrobiologie*, 2001, (30) 1, 207-212.
- 42) GONZÁLEZ I., GARCÍA T., FERNÁNDEZ S., MARTÍN R.,** Current status on *Arcobacter* research: An update on DNA-based identification and typing methodologies, *Food analytical methods*, 2011, (5), 956-968.
- 43) GREEN M.R., SAMBROOK J.,** Inverse Polymerase chain reaction (PCR). *Cold spring harbor protocols*, 2019, (2), doi:10.1101 / pdb.prot095166.
- 44) HAMAL P.,** Molecular genetic methods in medical mycology: Current state and perspectives, *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*, 2007, (13) 4, 136-144.
- 45) HÄNEL I., TOMASO H., NEUBAUER H.,** *Arcobacter* – Ein unterschätzter Zoonoseerreger, *Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung – Gesundheitsschutz*, 2016, (59) 6, 789-794.

- 46) HARMON M.K., WESLEY V.I.,** Multiplex PCR for the identification of *Arcobacter* and differentiation of *Arcobacter butzleri* from other *Arcobacters*, *Veterinary microbiology*, 1997, (58) 1-2, 215-227.
- 47) HATA D.J.,** Molecular methods for identification and characterization of *Acinetobacter* spp, *Molecular diagnostics*, 2010, (26), 313-326 ISBN 9780080919041.
- 48) HAUSDORF L., NEUMANN M., BERGMANN I., SOBIELLA K., MUNDT K., FRÖHLING A., SCHLÜTER O., KLOCKE M.,** 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*, 2013, (36) 4, 235-243.
- 49) HO T.K.H., LIPMAN J.A.L., WÖSTEN M.S.M.M., ASTEN J.A.M.A., GAASTRA W.,** *Arcobacter* spp. possess two very short flagellins of which FlaA is essential for motility, *FEMS immunology & medical mikrobiology*, 2008, (53) 1, 85-95.
- 50) HOUF K., ON S.L.W., COENYE T., DEBRUYNE L., SMET de S., VANDAMME P.,** *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2009, (59), 2599-2604.
- 51) HOUF K., TUTENEL A., ZUTTER de L., HOOF V.J., VANDAMME P.,** Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*, *FEMS microbiology letters*, 2000, (193) 1, 89-94.
- 52) HUME E.M., HARVEY B.R., STANKER H.L., DROLESKEY E.R., POOLE L.T., ZHANG H.,** Genotypic variation among *Arcobacter* isolates from a farrow-to-finish swine facility, *International association for food protection*, 2001, (64) 5, 654-651.
- 53) CHIEFFI D., FANELLI F., FUSCO V.,** *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen, *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2020, (19) 4, 2071-2109.
- 54) JALALI M., ZABOROWSKA J., JALALI M.,** The Polymerase chain reaction: PCR, qPCR, and RT-PCR, *Basic science methods for clinical researchers*, 2016, (1) 1-18, ISBN 978-0-12-803077-6.
- 55) JENKINS C., RENTENAAR J.R., LANDRAUD L., BRISSE S.,** *Enterobacteriaceae*, *Infectious diseases*, 2017, (2) 180, 1565-1578.
- 56) KAILASA K.S., MEHTA N.V., WU H.,** Recent advances in the direct and nanomaterials-based matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometric approaches for rapid characterization and identification of foodborne pathogens, *Nanotechnology in the agri-food industry*, 2017, (6) 13, 449-480.

- 57) KARIMI Z., AHMADI A., NAJAFI A., RANJBAR R.,** Bacterial CRISPR Regions: General features and their potential for epidemiological molecular typing studies, *The open microbiology journal*, 2018, (12), 59-70.
- 58) KAYMAN T., ABAY S., HIZLISOY H., ATABAY H., DIKER S.K., AYDIN F.,** Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in acute gastroenteritis: molecular identification, antibiotic susceptibilities and genotyping of the isolated *Arcobacters*, *Microbiology society*, 2012, (61) 10, 1439-1444.
- 59) KHAN H.U.I., CLOUTIER M., LIBBY M., LAPEN D.R. WILKES G., TOPP E.,** Enhanced single-tube multiplex PCR assay for detection and identification of six *Arcobacter* species, *Journal of applied microbiology*, 2017, (123) 6, 1522-1532.
- 60) KHAN IUH., BECKER A., CLOUTIER M., PLÖTZ M., LAPEN DR., WILKES G., TOPP E., ABDULMAWJOOD A.,** Loop-mediated isothermal amplification: Development, validation and application of simple and rapid assays for quantitative detection of species of *Arcobacteraceae* family-and species-specific *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri*, *Journal of applied microbiology*, 2020, (1) 131, 288-299.
- 61) KIM H.N., PARK M.S., KIM W.H., CHO J.T., KIM H.S., CHOI CH., RHEE S.M.,** Prevalence of pathogenic *Arcobacter* species in south korea: Comparison of two protocols for isolating the bacteria from foods and examination of nine putative virulence genes, *Food microbiology*, 2019, (78), 18-24.
- 62) LAUFS S., SCHUBERTL., MAIER P., ZELLER W.J., FRUEHAUFS.,** Safety analysis in retroviral gene therapy: identifying virus integration sites in gene-modified cells, *Molecular diagnostics* 2010, (32), 471-484, ISBN 978-0-12-374537-8.
- 63) LEHNER A., TASARA T., STEPHAN R.,** Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen, *International journal of food microbiology*, 2005, (102) 2, 127-135.
- 64) LEVICAN A., FIGUERAS M.J.,** Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp, *BMC Microbiology*, 2013, (13) 220, 1-7.
- 65) LI W., RAOULT D., FOURNIER P.E.,** Bacterial strain typing in the genomic era, *FEMS Microbiology reviews*, 2009, (33) 5, 892-916.
- 66) LIU W., LIU B., ZHU X., YU S., SHI X.,** Diversity of *Salmonella* isolates using serotyping and multilocus sequence typing, *Food mikrobiology*, 2011, (28) 6, 1182-1189.
- 67) MAGALHÃES R., MENA C., FERREIRA V., SILVA J., ALMEIDA G., GIBBS P., TEIXEIRA P.,** Bacteria: *Listeria monocytogenes*, *Encyclopedia of food safety*, 2014, (1), 450-461, ISBN 978-0-12-378613-5.

- 68) MAHONY J.B., CHERNESKY M.A.,** Multiplex polymerase chain reaction, *Molecular methods for virus detection*, 2007, (1) 10, 219-236, ISBN 978-0-12-748920-9.
- 69) MATEUS C., MARTINS R., LUÍS A., OLEASTRO M., DOMINGUES F., PEREIRA L., FERREIRA S.,** Prevalence of *Arcobacter*: From farm to retail – A systematic review and meta-analysis, *Food control*, 2021, (128), 1-9.
- 70) MELTNER O., MALMGREN A.,** Molekulární mikrobiologie a epidemiologie, *Principy a praktika lékařské mikrobiologie*, 2014, (1) 3-7, 21-54, ISBN 978-80-246-2414-3.
- 71) MILLER G.W., WESLEY V.I., ON L.W.S., HOUF K., MÉGRAUD F., WANG G., YEE E., SRIJAN A., MASON J.C.,** First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp., *Microbiology BMC*, 2009, (9) 196, 1-10.
- 72) MILTENBURG M.G., CLOUTIER M., CRAIOVAN E., LAPEN D.R., WILKES G., TOPP E., KHAN I.U.H.,** Real-time quantitative PCR assay development and application for assessment of agricultural surface water and various fecal matter for prevalence of *Aliarcobacter faecis* and *Aliarcobacter lanthieri*, *Microbiology BMC*, 2020, (20) 164, 1-14.
- 73) NAKAGAWA S., TAKAKI Y.,** Nonpathogenic *Epsilonproteobacteria*, *Encyclopedia of life sciences. John Wiley & Sons Ltd*, 2009, 1-12, dostupné z: [doi.org/10.1002/9780470015902.a0021895](https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021895).
- 74) OLSEN J.E., BROWN D.J., SKOV M.N., CHRISTENSEN J.P.,** Bacterial typing methods suitable for epidemiological analysis. Applications in investigations of salmonellosis among livestock, *Veterinary Quarterly* 2011, (15) 4, 125-135.
- 75) ON S.L.W., HARRINGTON C.S., ATABAY H.I.,** Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces, *Journal of applied microbiology*, 2003, (95) 5, 1096-1105.
- 76) ON S.L.W., MILLER G.W., BIGGS J.P., CORNELIUS J.A., VANDAMME P.,** A critical rebuttal of the proposed division of the genus *Arcobacter* into six genera using comparative genomic, phylogenetic, and phenotypic criteria, *Systematic and applied microbiology*, 2020, (43) 5, 1-10.
- 77) PARISI A., CAPOZZI L., BIANCO A., CARUSO M., LATORRE L., COSTA A., GIANNICO A., RIDOLFI D., BULZACCHELLI C., SANTAGADA G.,** Identification of virulence and antibiotic resistance factors in *Arcobacter butzleri* isolated from bovine milk by whole genome sequencing, *Italian journal of food safety*, 2019, (8) 2, 60-64.
- 78) PAVLOVIC M., HUBER I., KONRAD R., BUSCH U.,** Application of MALDI-TOF MS for the Identification of food borne bacteria, *The open microbiology journal*, 2013, (7), 135-141.

- 79) PÉREZ-CATALUÑA A., COLLADO L., SALGADO O., LEFIÑANCO V., FIGUERAS M.J.,** A Polyphasic and taxogenomic evaluation uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a species complex that embraces four genomovars, *Frontiers in microbiology*, 2018, (9) 805, 1-14.
- 80) PÉREZ-CATALUÑA A.,** Epidemiology and taxogenomics of the genus *Arcobacter*. *Tesis doctorals en xarxa, Universitat Rovira i Virgili*, 2018, 6-22.
- 81) PÉREZ-CATALUÑA A., SALAS-MASSÓ N., FIGUERAS M.J.,** *Arcobacter canalis* sp. nov., isolated from a water canal contaminated with urban sewage, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 2018, (68) 4, 1258-1264.
- 82) PÉREZ-CATALUÑA A., SALAS-MASSÓ N., DIÉGUEZ A.L., BALBOA S., LEMA A., ROMALDE J.L., FIGUERAS M.J.,** Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the chaos, *Frontiers in mikrobiology*, 2018, (9) 2077, 1-19.
- 83) PÉREZ-CATALUÑA A., TAPIOL J., BENAVENT C., SARVISÉ C., GÓMEZ F., MARTÍNEZ B., TERRON-PUIG M., RECIO G., VILANOVA A., PUJOL I., BALLESTER F., REZUSTA A., FIGUERAS J.M.,** Antimicrobial susceptibility, virulence potential and sequence types associated with *Arcobacter* strains recovered from human faeces, *Journal of medical microbiology*, 2017, (66) 12, 1736–1743.
- 84) PÉREZ-LOSADA M., ARENAS M., CASTRO-NALLAR E.,** Microbial sequence typing in the genomic er, *Infection genetics and evolution*, 2017, (63), 346-359.
- 85) PÉREZ-LOSADA M., ARENAS M., CASTRO-NALLAR E.,** Multilocus sequence typing of pathogens: methods, analyses, and applications, *Genetics and evolution of infectious diseases*, 2017, (2) 16, 383-404, ISBN 978-0-12-799942-5.
- 86) PHILLIPS C.A.,** *Arcobacter* spp. in food: isolation, identification and control, *Trends in food science & technology*, 2001, (12) 8, 263-275.
- 87) PORCELLI I., REUTER M., PEARSON M. B., WILHELM T., VLIET van H.M.A.,** Parallel evolution of genome structure and transcriptional landscape in the *Epsilonproteobacteria*, *BMC Genomics*, 2013, (14) 616, 2-17.
- 88) QUAINOO S., COOLEN PM.J., HIJUM van AFT.S., HUYNEN A.M., MELCHERS JG.W., SCHAIK van W., WERTHEIM FL.H.,** Whole-Genome sequencing of bacterial pathogens: the future of nosocomial outbreak analysis, *Clinical microbiology reviews*, 2017, (4) 30, 1015-1063.
- 89) RAHMAN M.T., UDDIN M.S., SULTANA R., MOUE A., SETU M.,** Polymerase chain reaction (PCR), *Anwer khan modern medical college journal*, 2013 (1) 4, 30-36.

- 90) RAHMAN U.F., ANDREE K.B., SALAS-MASSÓ N., FERNANDEZ-TEJEDOR M., SANJUAN A., FIQUERAS M.J., FURONES D.M.,** Improved culture enrichment broth for isolation of *Arcobacter*-like species from the marine environment, *Scientific reports*, 2020, (10) 14547, 1-12.
- 91) RAMEES P.T., DHAMA K., KARTHIK K., RATHORE S.R., KUMAR A., SAMINATHAN M., TIWARI R., MALIK S.Y., SINGH K.R.,** *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review, *Veterinary quarterly*, 2017, (37) 1, 136-161.
- 92) RAMEES P.T., RATHORE S.R., BAGALKOT S.P., SAILO B., MOHAN V.H., KUMAR A., DHAMA K., SINGH K.R.,** Genotyping and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolated from different sources by using ERIC-PCR from India, *Veterinary quarterly*, 2014, (34) 4, 211-217.
- 93) RESTREPO C.M., DE LA GUARDIA C., SOUSA O.E., CALZADA J.E., FERNÁNDEZ P.L., LLEONART R.,** AFLP Polymorphisms allow high resolution genetic analysis of american tegumentary leishmaniasis agents circulating in panama and other members of the leishmania genus, *PLoS ONE*, 2013, (9) 8, 1-9.
- 94) REVEZ J., HUUSKONEN M., RUUSUNEN M., LINDSTRÖM M., HÄNNINEN M.,** *Arcobacter* species and their Pulsed-Field gel electrophoresis genotypes in finnish raw milk during summer 2011, *Journal of food protection*, 2013, (76) 9, 1630-1632.
- 95) RIVAS L., FEGAN N., VANDERLINDE P.,** Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat, *International journal of food microbiology*, 2004, (91) 1, 31-41.
- 96) ROY J., JAIN N., SINGH G., DAS B., MALLICK B.,** Small RNA proteome as disease biomarker: An incognito treasure of clinical utility, *AGO-Driven Non-Coding RNAs*, 2019, 101-136, ISBN 978-0-12-815669-8.
- 97) SABAT AJ, BUDIMIR A., NASHEV D., SÁ-LEÃO R., DIJL van J.M., LAURENT F., GRUNDMANN H., FRIEDRICH A.W.,** Overview of molecular typing methods for outbreak detection and epidemiological surveillance, *Eurosurveillance*, 2013, (18) 4, 1-18.
- 98) SCULLION R., HARRINGTON S.C., MADDEN H.R.,** A Comparison of Three Methods for the Isolation of *Arcobacter* spp. from Retail Raw Poultry in Northern Ireland, *Journal of food protection*, 2004, (67) 4, 799-804.
- 99) SERÇE Ç.U., AYYAZ M.,** Diagnosis of the casual viruses of crop plants, *Applied plant virology* 2020, (2) 4, 55-67, ISBN 978-0-12-818654-1.

- 100) SERRAINO A., FLORIO D., GIACOMETTI F., PIVA S., MION D., ZANONI R.G.,** Presence of *Campylobacter* and *Arcobacter* species in in-line milk filters of farms authorized to produce and sell raw milk and of a water buffalo dairy farm in Italy, *Journal of dairy science*, 2013, (96) 5, 2801-2807.
- 101) SHAH A.H., SALEHA A.A., ZUNITA Z., MURUGAIYAH M.,** *Arcobacter* – An emerging threat to animals and animal origin food products, *Trends in food science & technology*, 2011, (22) 5, 225-236.
- 102) SHAH A.H., SALEHA A.A., ZUNITA Z., CHEAH Y.K., MURUGAIYAH M., KOREJO N.A.,** Genetic characterization of *Arcobacter* isolates from various sources. *Veterinary microbiology*, 2012, (160) 3-4, 355-361.
- 103) SHAH A.H., SALEHA A.A., ZUNITA Z., MURUGAIYAH M., ALIYU A.B., JAFRI N.,** Prevalence, distribution and antibiotic resistance of emergent *Arcobacter* spp. from clinically healthy cattle and goats, *Transboundary and emerging diseases*, 2012, (60) 1, 9-16.
- 104) SHEN CH.,** Amplification of nucleic acids, characterization of nucleic acids and proteins *Diagnostic molecular biology*, 2019, (1) 9, 215-276, ISBN 978-0-12-802823-0.
- 105) SCHROEDER-TUCKER L., WESLEY V.I., KIEHLBAUCH A.J., LARSON J.D., THOMAS A.L., ERICKSON A.G.,** Phenotypic and ribosomal RNA characterization of *Arcobacter* species isolated from porcine aborted fetuses, *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 1996, (2) 8, 186-195.
- 106) SNELLING W.J., MATSUDA M., MOORE J.E., DOOLEY J.S.G.,** Under the microscope: *Arcobacter*, *Applied microbiology*, 2006, (42) 1, 7-14.
- 107) SON I., ENGLER M.D., BERRANG M.E., FEDORKA-CRAY J.P., HARRISON M.A.,** Prevalence of *Arcobacter* and *Campylobacter* on broiler carcasses during processing, *International journal of food microbiology*, 2007, (113) 1, 16-22.
- 108) SONCINI G.,** Emerging pathogen *Arcobacter* spp. in food of animal origin, *Università degli Studi di Milano*, 2010, 4-100.
- 109) STRUELENS M.J., BAUERNEFEIND A., BELKUM van A., BLANC D., COOKSON B.D., DIJKSHOORN L., SOLH ELN., ETIENNE J., GARAIZAR J., GERNER-SMIDT P., LEGAKIS N., LENCASTRE de H., NICOLAS H.M., PITT T.L., ROMLING U., ROSDAHL V., WITTE.,** Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems, *Clinical microbiology and infection*, 1996, (2) 1, 2-11.

- 110) ŠILHA D., VACKOVÁ B., ŠILHOVÁ L., Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic, *Folia microbiologica*, 2018, (64) 1, 25-31.
- 111) TALAY F., MOLVA C., ATABAY H.I., Isolation and identification of *Arcobacter* species from environmental and drinking water samples, *Folia microbiologica*, 2016, (61) 6, 479-484.
- 112) TENOVER FC., Antibiotic susceptibility testing, *Encyclopedia of microbiology*, 2009, (3), 67-77, ISBN 978-0-12-373944-5.
- 113) VANDAMME P., VANCANNEYT M., POT B., MELS L., HORSTE B., DEWETTINCK D., VLAES L., BORRE van de C., HIGGINS R., HOMMEZ J., KERSTERS K., BUTZLER J-P., GOOSSENS H., Polyphasic taxonomic Study of the Emended Genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* spp. nov., an Aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens, *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 1992, (42) 3, 344-356.
- 114) VÁRADI L., LUO L.J., HIBBS E.D., PERRY D.J., ANDERSON J.R., ORENGA S., GROUNDWATER P.W., Methods for the detection and identification of pathogenic bacteria: past, present, and future, *Chemical society reviews*, 2017, (46) 16, 4818-4832.
- 115) VASILJEVIC M., FENWICK A.J., NEMATOLLAHI S., GUNDAREDDY V.P., ROMAGNOLI M., ZENILMAN J., CARROLLOVÁ K.C., First case report of human bacteremia with malacobacter (*Arcobacter*) *mytili*, *Open forum infection diseases*, 2019, (6) 7, 479-484.
- 116) WAITE W.D., VANWONTERGHEM I., RINKE CH., PARKS H.D., ZHANG Y., TAKAI K., SIEVERT M.S. SIMON J., CAMPBELL J.B., HANSON E.T., WOYKE T., KLOTZ G.M., HUGENHOLTZ P., Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota*, *Frontiers in microbiology*, 2017, (8) 682, 1-19.
- 117) WANG K., CHEN L., MA X., MA L., CHOU C.K., CAO Y., KHAN UH.I., GÖLZ G., LU X., *Arcobacter* identification and species determination using raman spectroscopy combined with neural networks, *Food microbiology*, 2020, (86) 20, 1-16.
- 118) WANG X., JORDAN K.I., MAYER W.L., A phylogenetic perspective on molecular epidemiology, *Molecular medical microbiology*, 2015, (2) 29, 517-536 ISBN 978-0-12-397169-2.



- 119) WANGER A., CHAVEZ V., HUANG R. SP., WAHED A., HEREC J.K., DASGUPTA A.,** Antibiotics, antimicrobial resistance, antibiotic susceptibility testing, and therapeutic drug monitoring for selected drugs, *Microbiology and molecular diagnosis in pathology*, 2017, (1) 7, 119-153, ISBN 978-0-12-805351-5.
- 120) WEBB L.A., KRUCZKIEWICZ P., SELINGER B.L., INGLIS D.G., TABOADA N.E.,** Development of a comparative genomic fingerprinting assay for rapid and high resolution genotyping of *Arcobacter butzleri*, *Microbiology BMC*, 2015, (15) 94, 1-13.
- 121) WILCZYNSKI S.P.,** Molecular biology, *Modern surgical pathology*, 2009 (1) 7, 85-120 ISBN 978-1-4160-3966-2.
- 122) ZAMBRI M., CLOUTIER M., ADAM Z., LAPEN R.D., WILKES G., SUNOHORA M., TOPP E., TALBOT G., KHAN H.U.I.,** Novel virulence, antibiotic resistance and toxin gene-specific PCR-based assays for rapid pathogenicity assessment of *Arcobacter faecis* and *Arcobacter lanthieri*, *Microbiology BMC*, 2019, (19) 1, 2-15.