

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Typitace izolátů *Capnocytophaga canimorsus* vybranými
mikrobiologickými technikami

Diplomová práce

2023

Bc. Martina Lejsková

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická
Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Lejsková**
Osobní číslo: **C21456**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Typizace izolátů *Capnocytophaga canimorsus* vybranými mikrobiologickými technikami**
Téma práce anglicky: **Typing Of *Capnocytophaga Canimorsus* By Selected Microbiological Techniques**
Zadávající katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí základních informací o bakteriálním druhu *Capnocytophaga canimorsus*.
2. Uveďte možnosti typizace bakterie *Capnocytophaga canimorsus* se zaměřením na molekulárně biologické metody.

Experimentální část:

1. Zaveďte a optimalizujte RFLP-PCR metodu pro kmen *Capnocytophaga canimorsus*.
2. Optimalizovanou metodu aplikujte na kmeny získané z přirozeného prostředí.
3. Pokuste se o sérotypizaci izolátů *C. canimorsus* založenou na PCR.
4. Ověřte tvorbu biofilmu *C. canimorsus*.
5. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
6. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice 'Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací.

Rozsah pracovní zprávy: **35 s.**
Rozsah grafických prací: **dle potřeby**
Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultant diplomové práce: **Ing. Květa Koryčanová, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

prof. Ing. Petr Němec, Ph.D. v.r.
děkan

L.S.

doc. RNDr. Tomáš Roušar, Ph.D. v.r.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji:

Práci s názvem Typitace izolátů *Capnocytophaga canimorsus* vybranými mikrobiologickými technikami jsem vypracovala samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využila, jsou uvedeny v seznamu použité literatury. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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 5. 5. 2023

Bc. Martina Lejsková v. r.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Ing Davidu Šilhovi, PhD. za odborné vedení, připomínky a cenné rady při zpracování práce. Dále bych chtěla moc poděkovat Ing. Květě Koryčanové, PhD. za čas, který mi věnovala, ochotu, cenné rady a pomoc při práci v laboratoři. Zároveň mé díky patří Ing. Leoně Hofmeisterové. Dále děkuji své rodině a přátelům za podporu a trpělivost po celou dobu mého studia.

Anotace

Diplomová práce se zabývá bakteriemi rodu *Capnocytophaga*. V teoretické části je rod charakterizován, jsou zde specifikovány jeho biochemické vlastnosti, faktory virulence a patogenita. Dále je obsah zaměřen na bakterie, které se nacházejí v dutině ústní psů a koček, především na druh *Capnocytophaga canimorsus*. Popsané jsou zde i molekulárně biologické metody, které slouží k rychlé identifikaci tohoto rodu. Cílem experimentální části bylo optimalizovat PCR-RFLP a sérotypizaci pro *C. canimorsus*. Optimalizované postupy byly aplikovány na kmeny získané z přirozeného prostředí. Dále byla zkoumána tvorba biofilmu u *C. canimorsus*. Získané výsledky jsou porovnány a diskutovány.

Klíčová slova

Capnocytophaga, *Capnocytophaga canimorsus*, identifikace, PCR, PCR-RFLP

Title

Typization of *Capnocytophaga canimorsus* isolates by selected microbiological techniques

Annotation

This diploma thesis deals with the bacterial genus *Capnocytophaga*. The theoretical background characterises the genus, specifies its biochemical properties, virulence factors and pathogenicity. Then it focuses on the bacteria present in the oral cavity of dogs and cats, especially the *Capnocytophaga canimorsus* strain. Methodology comprises molecular biology methods serving for the quick identification of this genus. Purpose of the experimental part was to optimise PCR-RFLP and serotyping of *C. canimorsus*. Optimised procedures were applied to bacterial strains obtained from the natural environment. The biofilm production capability of *C. canimorsus* was examined subsequently. Results were compared and discussed.

Keywords

Capnocytophaga, *Capnocytophaga canimorsus*, identification, PCR, PCR-RFLP

Obsah

| | |
|---|----|
| Seznam ilustrací a tabulek | 10 |
| Seznam zkratk | 12 |
| Úvod..... | 14 |
| 1 Teoretická část..... | 15 |
| 1.1 Rod <i>Capnocytophaga</i> | 15 |
| 1.1.1 Taxonomie | 15 |
| 1.1.2 Metabolismus..... | 16 |
| 1.1.3 Morfologie a kultivace..... | 17 |
| 1.2 Biofilm | 19 |
| 1.2.1 Tvorba biofilmu | 19 |
| 1.2.2 Biofilm a rod <i>Capnocytophaga</i> | 20 |
| 1.3 <i>Capnocytophaga canimorsus</i> | 21 |
| 1.3.1 Kultivace | 21 |
| 1.3.2 Antibiotická citlivost..... | 22 |
| 1.3.3 Faktory virulence | 22 |
| 1.3.4 Onemocnění | 23 |
| 1.3.5 Příklady onemocnění člověka v České republice | 24 |
| 1.4 <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> | 25 |
| 1.5 Typizace mikroorganismů..... | 26 |
| 1.6 Molekulárně biologická detekce | 27 |
| 1.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR) | 27 |
| 1.6.1.1 Průběh PCR | 27 |
| 1.6.1.2 Výhody a nevýhody PCR | 29 |
| 1.6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase..... | 29 |
| 1.6.2.1 Kvantifikace | 29 |
| 1.6.2.2 Zařízení a součásti | 30 |

| | | |
|---------|---|----|
| 1.6.2.3 | Výhody a nevýhody..... | 31 |
| 1.6.3 | Další typy PCR | 31 |
| 1.6.4 | Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)..... | 32 |
| 1.6.4.1 | PCR-RFLP a rod <i>Capnocytophaga</i> | 32 |
| 1.6.4.2 | Restrikční endonukleázy | 35 |
| 1.6.5 | Sekvenování..... | 35 |
| 1.6.5.1 | Sekvenování nové generace/masivně paralelní sekvenování (NGS) | 36 |
| 1.6.5.2 | Identifikace bakteriálních druhů pomocí sekvence genu 16S rRNA | 37 |
| 2 | Cíl práce..... | 38 |
| 3 | Experimentální část | 39 |
| 3.1 | Přístroje a zařízení..... | 39 |
| 3.2 | Laboratorní pomůcky | 40 |
| 3.3 | Kultivační média | 40 |
| 3.4 | Chemikálie | 41 |
| 3.5 | Použité kmeny a izoláty <i>Capnocytophaga</i> spp. | 44 |
| 3.6 | Pracovní postupy | 45 |
| 3.6.1 | Kultivace a izolace DNA | 45 |
| 3.6.2 | Identifikace <i>C. canimorsus</i> pomocí PCR..... | 46 |
| 3.6.3 | Identifikace <i>C. cynodegmi</i> pomocí PCR..... | 47 |
| 3.6.4 | PCR-RFLP dle Van Dam <i>et al.</i> , 2009..... | 47 |
| 3.6.5 | PCR-RFLP dle Ciantar <i>et al.</i> , 2005 | 49 |
| 3.6.6 | Sérotypizace izolátu <i>C. canimorsus</i> | 50 |
| 3.6.7 | Hodnocení tvorby biofilmu Christensenovou metodou..... | 52 |
| 3.6.8 | Typizace <i>C. canimorsus</i> pomocí systému BIOLOG GEN III ^{MT} | 53 |
| 4 | Výsledky a diskuze..... | 56 |
| 4.1 | Izolace čisté kultury <i>Capnocytophaga canimorsus</i> a její identifikace..... | 56 |
| 4.2 | Identifikace <i>Capnocytophaga canimorsus</i> pomocí PCR | 58 |

| | | |
|-----|---|----|
| 4.3 | PCR-RFLP dle Van Dam <i>et al.</i> , 2009 | 59 |
| 4.4 | PCR-RFLP dle Ciantar <i>et al.</i> , 2005 | 63 |
| 4.5 | Sérotypizace izolátů <i>C. canimorsus</i> | 67 |
| 4.6 | Tvorba biofilmu <i>Capnocytophaga</i> spp..... | 69 |
| 4.7 | Typizace <i>C. canimorsus</i> a <i>C. cynodegmi</i> pomocí systému BIOLOG GEN III ^{MT} | 73 |
| | Závěr | 80 |
| | Použitá literatura | 82 |

Seznam ilustrací a tabulek

| | |
|--|----|
| Obrázek 1 – Gramovo barvení <i>Capnocytophaga canimorsus</i> | 18 |
| Obrázek 2 – Tvorba biofilmu..... | 20 |
| Obrázek 3 – Růst <i>C. canimorsus</i> na krevním agaru | 21 |
| Obrázek 4 – Graf – zastoupení kapsulárních sérovarů | 23 |
| Obrázek 5 – Růst <i>C. cynodegmi</i> na krevním agaru..... | 26 |
| Obrázek 6 – Polymerázová řetězová reakce (PCR)..... | 28 |
| Obrázek 7 – PCR v reálném čase..... | 30 |
| Obrázek 8 – 16S PCR-RFLP <i>Capnocytophaga</i> spp., použita restriční endonukleáza <i>CfoI</i> ... | 33 |
| Obrázek 9 – PCR-RFLP, použita byla restriční endonukleáza <i>StyI</i> | 34 |
| Obrázek 10 – PCR-RFLP použita byla restriční endonukleáza <i>MseI</i> | 34 |
| Obrázek 11 – Sérotypizace – ověření interference a nespecifického nasedání primerů..... | 51 |
| Obrázek 12 – Identifikace <i>C. cynodegmi</i> pomocí PCR | 57 |
| Obrázek 13 – Identifikace <i>C. canimorsus</i> pomocí PCR | 59 |
| Obrázek 14 – PCR pro vznik amplikonů cca 2000 bp..... | 60 |
| Obrázek 15 – Restrikce enzymem <i>MseI</i> | 61 |
| Obrázek 16 – Restriční profil jednotlivých kmenů <i>C. Canimorsus</i> , jako restriční endonukleáza byl použit enzym <i>MseI</i> | 61 |
| Obrázek 17 – PCR-RFLP provedeno restričním enzymem <i>StyI</i> -HF® | 62 |
| Obrázek 18 – Restriční profil kmenů <i>C. canimorsus</i> po působení <i>StyI</i> -HF® | 62 |
| Obrázek 19 – PCR pro vznik amplikonů cca 1500 bp dle Ciantar <i>et al.</i> , 2005 | 64 |
| Obrázek 20 – Restrikce enzymem <i>MseI</i> dle Ciantar <i>et al.</i> , 2005..... | 65 |
| Obrázek 21 – Restriční profily testovaných kmenů štěpených enzymem <i>MseI</i> | 65 |
| Obrázek 22 – Restriční profily testovaných kmenů izolovaných z lidské dutiny ústní štěpených enzymem <i>MseI</i> | 65 |
| Obrázek 23 – PCR-RFLP s restričním enzymem <i>StyI</i> -HF® | 66 |
| Obrázek 24 – Restriční profily kmenů izolovaných ze psí dutiny ústní, restrikce <i>StyI</i> -HF® | 66 |
| Obrázek 25 – Restriční profily kmenů získaných z lidské dutiny ústní, štěpeno <i>StyI</i> -HF® | 67 |
| Obrázek 26 – Sérotypizace, stanovení sérotypu C | 68 |
| Obrázek 27 – Sérotypizace, stanovení sérotypů A, B, C | 69 |
| Obrázek 28 – Graf – srovnání tvorby biofilmu v BHI a TSB po kultivaci 48 hodin | 72 |
| Obrázek 29 – Graf – Srovnání tvorby biofilmu v BHI a TSB po 7denní kultivaci | 72 |

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 – Seznam a rozdělení rodu <i>Capnocytophaga</i> | 15 |
| Tabulka 2 – Biochemické testy <i>C. canimorsus</i> , <i>C. cynodegmi</i> , <i>C. canis</i> | 17 |
| Tabulka 3 – Růst <i>Capnocytophaga</i> spp na kultivačních médiích..... | 19 |
| Tabulka 4 – Restrikční enzymy, které byly používány v této diplomové práci | 35 |
| Tabulka 5 – Seznam použitých primerů | 43 |
| Tabulka 6 – Seznam používaných kmenů a izolátů <i>Capnocytophaga</i> spp..... | 44 |
| Tabulka 7 – Příprava PCR směsi pro identifikaci <i>C. canimorsus</i> | 46 |
| Tabulka 8 – PCR cyklus při identifikaci <i>C. canimorsus</i> | 47 |
| Tabulka 9 – Optimalizace složení restrikční směsi..... | 47 |
| Tabulka 10 –PCR-RFLP reakční směs pro vznik amplikonů cca 2000 bp | 48 |
| Tabulka 11 – PCR směs pro vznik aplikoni cca 1500 bp | 49 |
| Tabulka 12 – Průběh PCR pro PCR-RFLP dle Ciantar | 49 |
| Tabulka 13 – Restrikční směs pro PCR-RFLP dle Ciantar | 50 |
| Tabulka 14 – Optimalizace PCR směsi pro sérotypizaci..... | 50 |
| Tabulka 15 – Ověření interference u sérotypizace | 51 |
| Tabulka 16 – Složení PCR směsi – sérotypizace..... | 52 |
| Tabulka 17 – PCR cyklus sérotypizace | 52 |
| Tabulka 18 – Rozmístění biochemických testů na destičce..... | 54 |
| Tabulka 19 – Výsledky barvení dle Grama a testů na přítomnost katalázy a cytochromoxidázy u vzorku číslo 51..... | 56 |
| Tabulka 20 – Výsledky barvení dle Grama a testů na přítomnost katalázy a cytochromoxidázy u vzorku číslo 12..... | 57 |
| Tabulka 21 – Seznam identifikovaných kmenů <i>C. canimorsus</i> a <i>C. cynodegmi</i> metodou PCR | 58 |
| Tabulka 22 – Seznam kmenů a izolátů, u kterých byla provedena PCR-RFLP dle Van Dam <i>et al.</i> ,2009 | 59 |
| Tabulka 23 – Seznam kmenů a pro PCR-RFLP dle Ciantar <i>et al.</i> , 2005..... | 64 |
| Tabulka 24 – Seznam kmenů, u kterých byla provedena sérotypizace A-E..... | 68 |
| Tabulka 25 – Rozmezí hodnot A ₅₉₅ a hodnocení tvorby biofilmu..... | 70 |
| Tabulka 26 – Absorbance a tvorba biofilmu <i>C. canimorsus</i> a <i>C. cynodegmi</i> v BHI bujónu.... | 70 |
| Tabulka 27 – Absorbance a tvorba biofilmu <i>C. canimorsus</i> a <i>C. cynodegmi</i> v TSB bujónu ... | 71 |
| Tabulka 28 – Souhrnné vyhodnocení biochemických testů | 73 |
| Tabulka 29 – Souhrnné vyhodnocení testů na citlivost chemických látek | 78 |

Seznam zkratk

| | |
|------------------------------|--|
| ATP | Adenosintrifosfát |
| BCBA | Bacitracin |
| BHI | Mozko-srdcový bujón (brain infusion broth) |
| bp | Páry bází (base pair) |
| CAPE | Colistin, aztreonam |
| CDC | Centrum pro kontrolu nemocí |
| cDNA | Komplementární DNA |
| CO ₂ | Oxid uhličitý |
| CPS | Kapsulární polysacharid |
| ČA | Čokoládový agar |
| DF-2 | Dysgonický fermentor-2 |
| DIC | Diseminovaná intravaskulární koagulace |
| DNA | Deoxyribonukleová kyselina |
| dsDNA | Dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina |
| dNTP, dATP, dGTP, dCTP, dTTP | Dideoxynukleotidový trifosfát |
| EPS | Exopolysacharid |
| FRET | Fluorescenční rezonance |
| Ig | Imunoglobulin |
| KA | Krevní agar |
| LPS | Lipopolysacharid |
| MALDI | Laserová desorpce/ionizace za účasti matrice |
| mRNA | Messenger ribonukleová kyselina |
| NGS | Sekvenování nové generace |

| | |
|----------|---|
| ONPG | O-nitrofenyl- β -D-galaktosid |
| PCR | Polymerázová řetězová reakce |
| PMN | Polymorfonukleární neutrofil |
| Pre-mRNA | Prekurzorová mRNA |
| qPCR | Kvantitativní PCR |
| RFLP | Polymorfismus délky restrikčních fragmentů |
| RNA | Ribonukleová kyselina |
| rRNA | Ribozomální ribonukleová kyselina |
| RT-PCR | Reverzní transkripční PCR |
| RT-qPCR | Kvantitativní PCR v reálném čase |
| SBS | Sekvenování syntézou |
| ssDNA | Single stranded DNA |
| SMRT | Jednomolekulové sekvenování v reálném čase |
| TBE | Tris-borát-ethylendiamintetraoctová kyselina |
| TOF | Detektor doby letu |
| TSB | Triptikázo-sojový bujón |
| VCAT | Vankomycin, kolistin, amfotericin B, trimethoprim |
| VK | Vankomycin, kanamycin |

Úvod

Bakterie rodu *Capnocytophaga* jsou potenciálně patogenní gram negativní tyčky. Podle přirozeného rezervoáru je lze rozdělit na lidské a zvířecí. Nejčastější výskyt lidských kapnocytofág je v dutině ústní. Zvířecí kapnocytophágy můžeme najít v dutině ústní psů a koček, dále se dají izolovat i z krve nebo mozkomíšního moku, pokud tento materiál pochází od nakaženého pacienta. Tato práce byla zaměřena na *Capnocytophaga canimorsus*. Tento mikroorganismus je součástí mikroflóry v dutině ústní psů a koček. U imunokompromitovaných pacientů mohou způsobovat bakteriémie a systémové infekce, dále jsou také ohroženi lidé po splenektomii a alkoholici. Při pozdní léčbě může dojít k rozvoji septického šoku, který může skončit smrtí. I když není incidence *C. canimorsus* velká, mortalita po nakažení je vysoká.

Z důvodů pomalého růstu a náročných podmínek na kultivaci je *C. canimorsus* identifikována spíše molekulárně biologickými metodami. V této diplomové práci byla ověřena identifikace *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* pomocí PCR. Dále byla práce zaměřena na optimalizaci a aplikaci metody PCR-RFLP, sérotypizaci a tvorbu biofilmu na referenčních kulturách nebo na izolátech získaných z přirozeného prostředí.

1 Teoretická část

1.1 Rod *Capnocytophaga*

Bakterie rodu *Capnocytophaga* jsou klouzavé komenzální bakterie. Jsou součástí lidské a zvířecí mikroflóry dutiny ústní [Renzi *et al.*, 2018]. Infekce bakteriemi z rodu *Capnocytophaga* je u lidí vzácná [Chesdachai *et al.*, 2021]. U imunokompromitovaných pacientů mohou způsobovat bakteriémie a systémové infekce [Ehrmann *et al.*, 2013]. Celý rod *Capnocytophaga* obsahuje 14 druhů. Konkrétní kmeny rodu *Capnocytophaga* jsou uvedeny v tabulce 1 [LPSN, 2023].

Tabulka 1 – Seznam a rozdělení rodu *Capnocytophaga*

| Lidská dutina ústní | Zvířecí dutina ústní |
|------------------------------------|----------------------------------|
| <i>Capnocytophaga bilanii</i> | <i>Capnocytophaga canimorsus</i> |
| <i>Capnocytophaga endodontalis</i> | <i>Capnocytophaga canis</i> |
| <i>Capnocytophaga felis</i> | <i>Capnocytophaga cynodegmi</i> |
| <i>Capnocytophaga gingivalis</i> | <i>Capnocytophaga stomatis</i> |
| <i>Capnocytophaga granulosa</i> | |
| <i>Capnocytophaga haemolytica</i> | |
| <i>Capnocytophaga leadbetteri</i> | |
| <i>Capnocytophaga ochracea</i> | |
| <i>Capnocytophaga periodontiti</i> | |
| <i>Capnocytophaga sputigena</i> | |

Druhy *C. gingivalis*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. leadbetteri*, *C. ochracea*, a *C. sputigena* jsou součástí lidské ústní mikroflóry [Chesdachai *et al.*, 2021]. Jsou oportunními patogeny spojovanými s periodontálními onemocněními [Suzuki *et al.*, 2018]. Druhy *C. canimorsus*, *C. canis* a *C. cynodegmi* jsou komenzálové dutiny ústní psů a koček [Chesdachai *et al.*, 2021]. K této skupině byl přidán *C. stomatis*, který je také součástí zvířecí dutiny ústní a vyvolává u člověka mírné infekce [Renzi *et al.*, 2018]. *C. cynodegmi* způsobuje lokalizované infekce a *C. canimorsus* může být u člověka původce systémových infekcí [Ciantar *et al.*, 2005]. Tato práce je především zaměřena na zvířecí druhy rodu *Capnocytophaga*.

1.1.1 Taxonomie

Bakterie rodu *Capnocytophaga* se taxonomicky řadí do podříše *Negibacteria*, kmene *Bacteroidetes*, třídy *Flavobacteriia*, řádu *Flavobacteriales*, čeledi *Flavobacteriaceae*,

[ITIS, 2023]. *Flavobacteriaceae* jsou gram negativní, nesporulující, krátké nebo středně dlouhé až vláknité tyčky, které jsou buď nepohyblivé, nebo se pohybují klouzáním. Kolonie mohou být kulaté nebo nerovnoměrné až rhizoidální, kuželovité až ploché, mohou být zapuštěné do agaru nebo k němu přiléhat. Obvykle nemají pigment, pokud schopnost tvorby pigmentu mají, tvoří světle až jasně žluté nebo oranžové zabarvení. Růst je obvykle aerobní, ale některé rody jsou mikroaerobní až anaerobní. Metabolismus může být respirační nebo fermentační s kyslíkem jako akceptorem elektronů, s výjimkou několika druhů, které jako akceptor elektronů využívají dusičnany nebo dusitany. Obvykle je přítomná kataláza a oxidáza [Whitman *et al.*, 2015].

Organismy jsou nejčastěji izolovány z půdy nebo ze sladké, brakické, mořské vody v mírné, tropické i polární oblasti. Některé druhy se vyskytují v potravinách a mléčných výrobcích. Mají schopnost tvořit biofilm v různých prostředích. Nějaké druhy jsou patogenní pro člověka a teplokrevné živočichy, jiné jsou patogenní pro sladkovodní a mořské ryby, obojživelníky a plazy. Neidentifikovaní členové *Flavobacteriaceae* se mohou vyskytovat ve střevech hmyzu nebo amébách. Mezi příbuzné organismy patří čeleď „*Blattabacteriaceae*“ a *Cryomorpaceae* [Whitman *et al.*, 2015].

Zástupci rodu *Capnocytophaga* mají společné koloniální a buněčné znaky, které jsou charakteristické pro bakterie schopné klouzat po pevném povrchu. Do skupiny klouzavých bakterií se řadí *Myxococcus*, *Cytophaga*, *Flexibacter*, ale jedná se o aerobní mikroorganismy. *Capnocytophaga* spp. je schopná růstu pouze za zvýšené hladiny oxidu uhličitého nebo za anaerobních podmínek, proto byl v roce 1979 navržen vlastní rod [Leadbetter *et al.*, 1979]. Do rodu *Capnocytophaga* byly zařazeny druhy *Capnocytophaga canimorsus*, *C. ochracea*, *C. sputigena* a *C. gingivalis* [Butler, 2015]. V roce 1989 byl přidán *C. cynodegmi* [Brenner *et al.*, 1989]. Tento rod však obsahuje více druhů, viz výše.

Rod *Capnocytophaga* je součástí skupiny HACEK, ve které bakterie mají schopnost způsobit endokarditidu, artritidu, osteomyelitidu nebo periodontitidu. Součástí této skupiny jsou orální mikroorganismy jako *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Aggregatibacter aphrophilus*, *Cardiobacterium hominisc*, *Eikenella corrodens*, *Haemophilus aphrophilus*, *Haemophilus parainfluenzae*, *Haemophilus paraphrophilus*, a *Kengella kingae* [Piau *et al.*, 2013].

1.1.2 Metabolismus

Bakterie rodu *Capnocytophaga* jsou fakultativně anaerobní a kapnofilní (vyžadující oxid uhličitý) bakterie [Gaastra *et Lipman*, 2010]. Název je odvozen od řeckého „*kapnos*“ (kouř), protože bakterie potřebuje k růstu CO₂ [Chanqueo *et Morales*, 2019]. Dále „*cytos*“ (buňka),

„*phagein*“ (jíst), a proto význam slova „*cytophaga*“ znamená požírač/travič buněčných stěn/buněk. Složením jednotlivých slov vzniká „*Capnocytophaga*“, tedy požírač oxidu uhličitého [Leadbetter *et al.*, 1979].

Metabolismus je fermentativní, kdy hlavním konečným produktem je acetát a sukcinát. Rod *Capnocytophaga* může využívat různé sacharidy (glukóza, dextran, glykogen, inulin nebo škrob) jako fermentované substráty a zdroje energie [Gaastra *et Lipman*, 2010]. Fermentovány a rozkládány nejsou agar a celulóza [Leadbetter *et al.*, 1979]. Bakterie je kataláza, oxidáza, O-nitrofenyl- β -D-galaktosid (ONPG) a arginindihydroláza pozitivní. Ureáza, nitrát, indol, DNáza, lysin, ornitin je negativní [Gaastra *et Lipman*, 2010]. Biochemické testy pro *C. canimorsus*, *C. cynodegmi*, *C. canis* jsou uvedeny v tabulce 2.

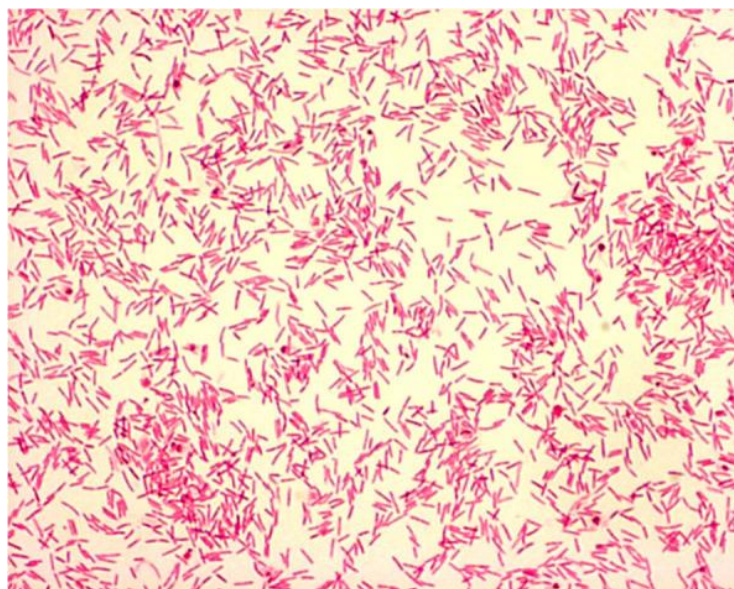
Tabulka 2 – Biochemické testy *C. canimorsus*, *C. cynodegmi*, *C. canis*. Převzato, upraveno podle [Suzuki *et al.*, 2018].

| Druh biochemického testu | <i>C. canimorsus</i> | <i>C. cynodegmi</i> | <i>C. canis</i> |
|------------------------------|----------------------|---------------------|-----------------|
| Fruktóza | - | + | + |
| Glukóza | + | + | + |
| Hydrolyza eskulinu | + | + | - |
| Kataláza | + | + | + |
| Laktóza | + | + | + |
| Maltóza | + | + | + |
| Manitol | - | - | - |
| Manóza | + | + | + |
| Orto-nitrofenyl-P-galaktosid | + | + | + |
| Oxidáza | + | + | - |
| Potřeba CO ₂ | + | + | + |
| Produkce indolu | - | - | - |
| Rafinóza | - | + | - |
| Sacharóza | - | + | + |
| Ureáza | - | - | - |
| Xylóza | - | - | - |

Poznámka: „+“ – pozitivní reakce, „-“ – negativní reakce

1.1.3 Morfologie a kultivace

Capnocytophaga spp. jsou morfologicky dlouhé, rovné nebo mírně zakřivené větvenité nebo vláknité gram negativní bacily [Chanqueo *et Morales*, 2019; Gaastra *et Lipman*, 2010]. Jsou 0,42-0,6 x 2,5-5,7 μ m velké s kulatými konci. Buňky nejsou rozvětvené, opláštěné nebo šroubovité [Leadbetter *et al.*, 1979]. Mikroskopický nálezn *C. canimorsus* je zobrazen na obrázku 1.



Obrázek 1 – Gramovo barvení *Capnocytophaga canimorsus*, zvětšení 10x100 (převzato, upraveno podle [Yang *et al.*, 2021])

Zástupci rodu *Capnocytophaga* mají schopnost pohybovat se klouzáním bez použití bičků. Zdrojem energie je protonová hnací síla. Pomocí klouzání při kontaktu s povrchem je možný pohyb přes biologické bariéry, napadení hostitelské buňky nebo výstup z ní [Piau *et al.*, 2013]. U klouzavých bakterií bylo dokázáno, že hlavní složkou membrány jsou kapniny (2-amino-3-hydroxy-15-methylhexadekan-1-sulfonová kyselina a 1-deoxy-15-methylhexydekafinganin-1-sulfonová kyselina) [Godchaux *et Leadbetter*, 1983].

Morfologie bakteriálních kolonií různých izolátů *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* se na krevním agaru neliší. Po 24-48 hodinách inkubace nejsou kolonie viditelné, jelikož jsou příliš drobné. Po 4-5 dnech jsou vytvořeny viditelné kolonie, které mohou být vypouklé nebo ploché, nepravidelně ohraničené [Chanqueo *et Morales*, 2019]. Kolonie netvoří hemolýzu, jsou lesklé a na okraji se tvoří prstovité výběžky. Zabarvení kolonií může být od růžové po žlutou [Gaastra *et Lipman*, 2010].

Samostatná kultivace mikroorganismu je náročná, protože má specifické požadavky na živiny. Pro svůj růst vyžaduje velké množství exogenního železa. Roste pomalu na krevním agaru (5 % krve) (KA) nebo na čokoládovém agaru (ČA) [Gaastra *et Lipman*, 2010]. Kultivace je prováděna při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře [Suzuki *et al.*, 2018].

Kultivaci *Capnocytophaga* spp. zkoumal Ehrmann s kolegy. Pro testování byla použita neselektivní média jako KA a ČA, na kterých vyrostly referenční kmeny i klinické izoláty. Detekci *Capnocytophaga* spp. narušovala komenzální mikroflóra dutiny ústní, aby se dosáhlo selektivity půdy, byly přidány antimikrobiální látky. Jejich výsledky testovaných kultivačních medií jsou uvedeny v tabulce 3 [Ehrmann *et al.*, 2013].

Tabulka 3 – Růst *Capnocytophaga* spp na kultivačních médiích (převzato, upraveno dle [Ehrmann et al., 2013])

| Médium | KA/ČA | VCAT | CAPE | BCBA | VK |
|-----------------------------------|---|--|--------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Antibiotikum (mg/l) | žádné | Vankomycin (1) Kolistin (3,75) Amfotericin B (0,5) Trimethoprim (1,5) | Colistin (10) Aztreonam (2) | Bacitracin (50) | Vankomycin (7,5) Kanamycin (100) |
| čistá kultura/ klinický izolát | počet kmenů schopných růstu/počet testovaných kmenů | | | | |
| <i>C. ochracea</i> | 3/3 | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 3/3 |
| <i>C. sputigena</i> | 3/3 | 3/3 | 2/3 | 2/3 | 2/3 |
| <i>C. gingivalis</i> | 3/3 | 2/3 | 3/3 | 2/3 | 3/3 |
| <i>C. granulosa</i> | 3/3 | 1/3 | 3/3 | 1/3 | 1/3 |
| <i>C. haemolytica</i> | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 | 1/1 |
| <i>C. leadbetteri</i> | 1/1 | 1/1 | 0/1 | 0/1 | 1/1 |
| <i>C. canimorsus</i> | 1/1 | 0/1 | 1/1 | 0/1 | 1/1 |
| <i>C. cynodegmi</i> | NT | NT | NT | NT | NT |

Poznámka: KA – krevní agar, ČA – čokoládový agar, NT – netestováno

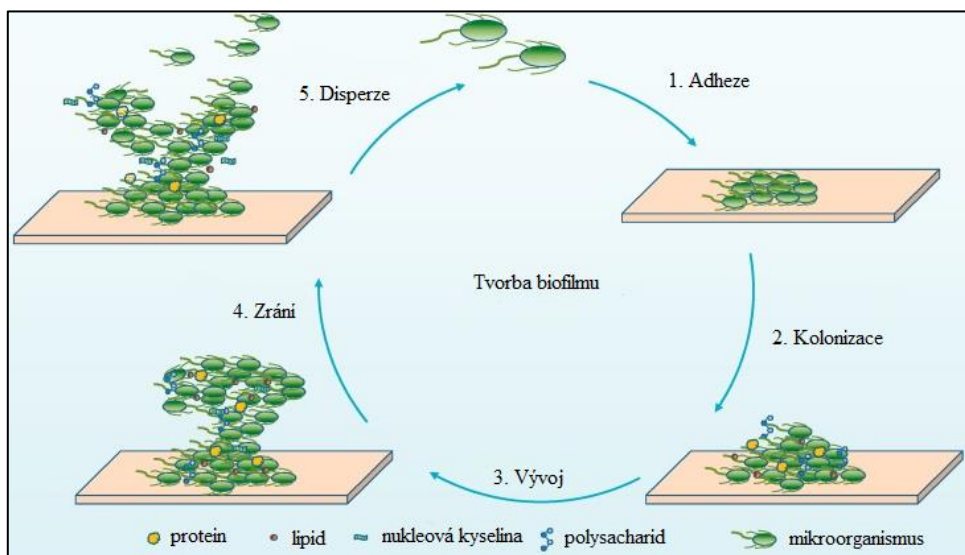
1.2 Biofilm

Je známo, že přibližně 80 % bakteriální populace na Zemi je za určitých podmínek schopno tvořit biofilm [Šilha et al., 2021]. Biofilmy poskytují ochranný mechanismus proti antimikrobiálním látkám a imunitní reakci hostitele. Až 80 % chronických a rekurentních infekcí souvisí s biofilmem. Mikroorganismy jsou 10krát až 1000krát odolnější vůči antibiotikům než planktonické buňky [Fabre et al., 2021].

1.2.1 Tvorba biofilmu

Biofilm je organizovaný shluk mikroorganismů, které žijí ve vlastní matici extracelulárních polymerních látek. Ta je připojena k biotickému nebo abiotickému povrchu. Biofilm je tvořen během několika fází, které se neustále opakují. V první fázi mikroorganismy adherují k povrchu nebo k sobě navzájem. Bakterie přilnou k povrchu reverzibilně pomocí slabých interakcí (například van der Waalsovy síly) [Yin et al., 2019]. Ve fázi druhé vznikají mikrokolonie [Tolker-Nielsen et al., 2015]. Kolonizace mikroorganismy je ireverzibilní proces, kdy jsou využity silnější hydrofilní nebo hydrofobní bičiky, pili, lipopolysacharidy, exopolysacharidy, adhezivní proteiny vázající kolagen. Dále probíhá vývoj biofilmu, kdy se vícevrstevné buňky hromadí a produkují extracelulární polymerní látky, které jsou následně vylučovány. Jako čtvrtou fází můžeme označit zrání biofilmu, kde se stabilně tvoří trojrozměrná struktura, která obsahuje kanálky pro distribuci živin a signálních molekul biofilmu [Yin et al.,

2019]. Během poslední fáze dochází k uvolnění jednotlivých kolonií. Disperze biofilmu může nastat například při nedostatku živin, intenzivní konkurenci nebo přerostlé populaci. Může se uvolnit část nebo celý biofilm, který se následně může uchytit na jiném místě [Våbenø *et al.*, 2015]. Neustálá obnova tvorby biofilmu umožňuje mikroorganismům se přizpůsobit na různá extrémní prostředí [Yin *et al.*, 2019]. Cyklus tvorby biofilmu je zobrazen na obrázku 2.



Obrázek 2 – Tvorba biofilmu, (převzato, upraveno dle [Yin *et al.*, 2019])

Po vytvoření první vrstvy jsou připojovány další buňky, které jsou buď stejné nebo druhově jiné. Biofilm může nabývat tvaru „houby“ nebo „věže“. Pokud je více jak 100 vrstev, jsou bakterie uspořádány podle jejich metabolismu a aerotolerance. Anaerobní bakterie se vyskytují v hlubších vrstvách kvůli nepřítomnosti kyslíku [Våbenø *et al.*, 2015].

Biofilm má schopnost *quorum sensing*, což je skupinové chování mikroorganismů. Mikroorganismy regulují svoji genovou expresi podle změn hustoty buněk v populaci [Yin *et al.*, 2019]. Regulace reakce na hustotu buněk probíhá tak, že bakterie si vyrábějí a uvolňují malé difúzní signální molekuly. Tyto molekuly regulují chování buňky (produkce exofaktorů, které podporují růst, motilitu nebo tvorbu biofilmu). Při vysoké hustotě buněk se zvýší produkce signálních molekul, funguje zde pozitivní zpětná vazba [West *et al.*, 2012].

1.2.2 Biofilm a rod *Capnocytophaga*

Fabre a kolektiv se zabývali tvorbou biofilmu u *Capnocytophaga sputigena*. Produkce biofilmu klinického izolátu byla významně vyšší než produkce referenčního kmene, jak po 24 hodinách, tak po 48 hodinách. Klinický izolát svoji produkci od 24 do 48 hodin více než zdvojnásobil na rozdíl od referenčního kmene [Fabre *et al.*, 2021]. Další publikace spojená s tvorbou biofilmu se zabývala *C. gingivalis*. Nález dentálního biofilmu byl potvrzen u zubních implantátů nebo u komponent implantátů [Piau *et al.*, 2013]. Tvorba biofilmu spojená

s *C. canimorsus* je zmíněná u kazuistiky z Finska, kdy 73letý muž měl aortální chlopu nahrazenou mechanickou protézou. Jalava-Karvinen *et al.* zmiňují, že je možná tvorba biofilmu na materiálech tvořících protézy. Proto byla pacientovi podávána supresivní terapie amoxylinem-klavulanátem [Jalava-Karvinen *et al.*, 2018].

1.3 *Capnocytophaga canimorsus*

Capnocytophaga canimorsus se běžně vyskytuje u koček a psů v dutině ústní [Hannon *et al.*, 2020]. Byla objevena Centrem pro kontrolu nemocí (CDC) v roce 1961. Nejprve byla bakterie klasifikována jako dysgonický fermentor-2 (DF-2). Název byl změněn a druhové označení odvozeno z latinského „*canis*“ a „*morsus*“, což znamená psí kousnutí. [Chanqueo *et Morales*, 2019]. Při pokousání, poškrábání nebo kontaktu se psy či kočkami může dojít ke generalizované infekci touto bakterií, a i přes užití antibiotik může septický šok z 30 % způsobovat smrt [Renzi *et al.*, 2018].

1.3.1 Kultivace

Jak už bylo zmíněno výše, organismus je považován za obtížně kultivovatelný, protože má specifické požadavky na růstové faktory a živiny a potřebuje pro svůj růst velké množství exogenního železa [Gaastra *et Lipman*, 2010]. Roste pomalu na KA nebo na ČA v 5-10% CO₂ atmosféře [Ciantar *et al.*, 2001]. Naočkované misky je nutné inkubovat při 37 °C alespoň 4-5 dnů [Gaastra *et Lipman*, 2010]. *C. canimorsus* má malé (cca 1-2 mm), méně vystouplé průhledné/šedavé kolonie na krevním agaru [Zangenah *et al.*, 2016]. Nárůst kolonií *C. canimorsus* na krevním agaru je zobrazen na obrázku 3.



Obrázek 3 – Růst *C. canimorsus* na krevním agaru, inkubováno 5 dní, při 37 °C, v 5% CO₂ atmosféře, vlastní fotografie

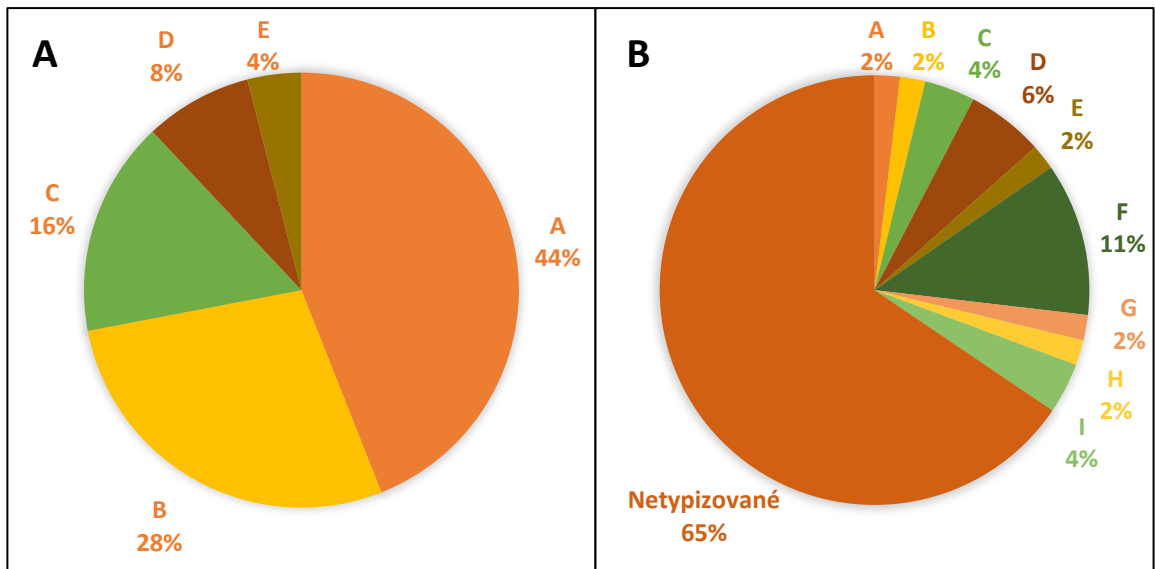
1.3.2 Antibiotická citlivost

Bakterie je citlivá na penicilin, cefalosporiny třetí generace, karbapenemy, klindamycin, doxycyklin, chloramfenikol, imipen, erythromycin, vankomycin, rifampicin a chinolony [Sandoe, 2004]. Doporučená empirická antitiotická léčba *C. canimorsus* je peniciclin/amoxicilin nebo cefalosporin třetí generace [Cadre *et al.*, 2019]. Rezistentní je na aztreonam, trimethoprim, fosfomycin a aminoglykosidy. Byla popsána i tvorba beta-laktamáz, proto by se měla testovat citlivost i na toto antibiotikum [Oliveira *et al.*, 2021].

1.3.3 Faktory virulence

Gram negativní bakterie mají soubor povrchových polysacharidů, které přispívají patogenitě i komensalismu. Mezi povrchové antigeny patří lipopolysacharidy (LPS), kapsulární polysacharidy (CPS) nebo exopolysacharidy (EPS). LPS je hlavní složka membrány a jedna z nejvíce prozánětlivých bakteriálních sloučenin. Je složen z 3 částí: lipid A, zodpovědný za spuštění zánětu, jaderný oligosacharid a O antigen. U *C. canimorsus* je LPS 100x méně endotoxický než LPS u *E. coli* [Renzi *et al.*, 2016].

Díky CPS je *C. canimorsus* odolná vůči fagocytóze polymorfonukleárními leukocyty a makrofágy [Renzi *et al.*, 2016]. Dále CPS zvyšují u bakterie odolnost vůči polymyxinu B a vůči 10% lidskému a králičímu séru [Hess *et al.*, 2017]. CPS je pravděpodobně složený z opakujících se jednotek O antigenu [Renzi *et al.*, 2016]. Kapsulární sérotypizace identifikuje 5 sérovarů (A-E) [Hess *et al.*, 2017]. Polysacharidy typu A, B, C byly izolovány z kmenů nalezených u člověka. Tyto kmeny jsou vůči lidem virulentnější než ostatní, ale jejich výskyt byl prokázán jen ve velmi malém množství (cca u 7 % psů). Lze tedy předpokládat, že nebezpečné kmeny nese málo psů [Renzi *et al.*, 2018]. Hess *et al* zkoumali zastoupení sérovarů u *C. canimorsus* získaných z izolátů z lidských infekcí. Ze souboru 25 izolátů *C. canimorsus* z lidských infekcí bylo identifikováno imunochemicky pomocí antisér 5 kapsulárních sérovarů (A, B, C, D, E). Tedy z vyšetřované sbírky izolátů jich 88 % odpovídalo sérovarům A, B nebo C, toto zastoupení je zobrazeno na obrázku 4A. Dále identifikovali kapsulární sérovary A, B a C *C. canimorsus* izolované ze psí tlamy. K dispozici měli 52 psích izolátů, které pomocí imunochemických metod s využitím antisér identifikovali. Zatímco u lidských izolátů byly zastoupeny sérovary A, B, C, D a E, u psích izolátů zůstalo 65 % netypizovatelných, procentuální zastoupení jednotlivých sérotypů je zobrazeno na obrázku 4B [Hess *et al.*, 2017].



Obrázek 4 – Graf – zastoupení kapsulárních sérovarů, A – prevalence kapsulárních sérovarů A-E v izolátech *C. canimorsus* z lidských infekcí, B – prevalence kapsulárních sérovarů *C. canimorsus* z izolátů ze psí tlamy (převzato, upraveno podle [Hess et al., 2017]).

Mezi další faktory virulence *C. canimorsus* patří odbourávání peroxidu vodíku ve fagocytárních vakuolách. Díky této vlastnosti přežívá ve fagocytech. Také je v séru odolná vůči komplementu. Pro vstup tkáněmi může využít klouzavý pohyb a tím se dostat do krevního řečiště. Bakterie dále obsahuje sialidázu, která jí pomáhá získávat z povrchu hostitelské buňky aminocukry z glykoproteinů [Butler, 2015]. Je schopná získávat železo z transferinu a proliferovat v lidském séru, dále umí deglykosylovat hostitelské glykoproteiny a imunoglobuliny (Ig) [Suzuki *et al.*, 2018] a cytochrom-oxidázu [Renzi *et al.*, 2018]. Při vložení bakterie do lidské krve nebo kultury kultivačních makrofágů vyvolává vyplavování méně prozánětlivých cytokinů a oxidu dusnatého než jiné bakterie, tímto může uniknout imunitnímu systému [Butler, 2015].

1.3.4 Onemocnění

Onemocnění vyvolané *C. canimorsus* se u lidí z 60 % projevuje po pokousání psem, ale rozvinout se může i po kontaktu např. olizováním. Expozice kočkou byly mnohem méně časté, vyskytovaly se u 3 % případů [Butler, 2015]. Onemocnění se může projevit 1.-7. den po rizikovém kontaktu se psem nebo kočkou. Mezi typické projevy patří horečka, dušnost, malátnost a lokalizovaná celulitida v místě infekce [Hundertmark *et al.*, 2019]. Schopností bakterie je expanze do organismu, kdy je patrný jen minimální zánět v místě kousnutí. Bakterie se dostane do krevního oběhu a dochází k bakteriémii. V krevním nátěru je následně velké množství bacilů v polymorfonukleárních neutrofilech (PMN) [Butler, 2015].

Bakterie může způsobovat sepsi, meningitidu nebo endokarditidu [Zangenah *et al.*, 2016]. Mezi nejčastější projevy patří sepse, druhým nejčastějším projevem je meningitida. S těžkou

sepsí a septickým šokem je spojená purpura, petechie, diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC), hemolyticko-uremický syndrom nebo trombotická trombocytopenická purpura. Při pitvě bylo odhaleno krvácení do nadledvin, které je typické pro Waterhouse-Friderichsenův syndrom. Možný symptom je i gangréna vedoucí k amputaci prstů nebo končetin, provázen infekcí mohly bolesti břicha, průjem nebo infarkty myokardu [Butler, 2015].

Pokud dochází k bakteriémii nebo sepsi, tak *C. canimorsus* patří k smrtelným bakteriím. Mortalita se pohybuje od 25 % do 60 % a pravděpodobně může být způsobena pomalou detekcí a identifikací bakterie. Infekcí *C. canimorsus* jsou ohroženi převážně muži nad 50 let [Oliveira *et al.*, 2021]. dále lidé se splenektomií, hyposplenismem, imunosupresí či se sklonem k alkoholismu [Hannon *et al.*, 2020]. Vyšší riziko nakažení hrozí veterinářům, chovatelům a majitelům psů a koček [Gaastra *et Lipman*, 2010].

1.3.5 Příklady onemocnění člověka v České republice

V České republice bylo zaznamenáno několik případů nakažení *C. canimorsus*. Mezi tyto případy můžeme zařadit kazuistiku, která se týká 62leté ženy. Ta měla dvě malé povrchové ranky od psiho kousnutí. V 10 letech jí byla odebrána slezina a od té doby byla zdravá. 36 hodin po kousnutí psem dostala horečku, měla svalové potíže a celkovou slabost. Pacientce byly provedené biochemické a hematologické testy a podána infuze. Po zlepšení stavu byla propuštěna z nemocnice. Za 2 dny se pacientka vrátila zpět do nemocnice a byla přijata na jednotku intenzivní péče s klinickým obrazem septického šoku. Byla nasazena empirická kombinace širokospektrých antibiotik (piperacilin, tazobaktam a ciprofloxacin). Dále bylo podáno mnoho jednotek plazmy, protože byla přítomna diseminovaná intravaskulární koagulace (DIC) a těžká trombocytopenie doprovázená petechiemi. 5. den po přijetí byla v hemokulturách odhalena masivní infekce gram negativních bakterií, které byly identifikovány jako *Capnocytophaga canimorsus*. Klinický stav pacientky se postupně stabilizoval. Než byla vyndána tracheální trubice, pacientčin stav se zhoršil. Byla jí diagnostikována sekundární infekce způsobená *Enterococcus faecium* a *Candida albicans*. Byla nasazena antibiotika vankomycin a flukonazol. Proběhla úspěšná rehabilitace a 103. den od přijetí byla propuštěna zdravá domů [Hloch *et al.*, 2014].

Ve druhé uvedené kazuistice se jedná o 74letého muže, který pociťoval bolest hlavy a ztuhlost šíje. Muž měl v anamnéze léčený kompenzovaný diabetes mellitus II. Také byl léčen na arteriální hypertenzi, dislipidemii a jaterní steatózu. Prodělal cholecystektomii, operaci břišní kýly a částečnou resekci žaludku. Jelikož byl u muže přítomen meningeální syndrom byl pacient převezen na infekční oddělení, kde bylo provedeno celkové vyšetření. Jako léčba byla

nasazena kombinovaná terapie intravenózním dexamethazonem a ceftriaxonem. Pacient byl převezen na jednotku intenzivní péče Fakultní nemocnice v Hradci Králové. Po několika kultivacích, které byly neúspěšné, byly využity molekulárně biologické metody. Následným sekvenováním bakteriální DNA byla identifikována *Capnocytophaga* spp., kterou nebylo možné více specifikovat. Ve stejné době se na anaerobní kultivaci mozkomíšního moku na Schaedlerově agaru začaly objevovat malé průhledné kolonie. Mikroskopicky byly vyhodnoceny gram negativní tyčky a pomocí MALDI-TOF byla identifikována *Capnocytophaga canimorsus*. Terapie antibiotiky byla upravena na intravenózní podání ceftriaxonu a celkový stav pacienta se po aplikaci antibiotik zlepšil. Při rekonvalescenci si pacient vzpomněl, že ho pokousal 4měsíční ovčák na pravém bérce přibližně 14 dnů před nástupem příznaků. 2 týdny po přijetí pacienta do nemocnice byla léčba antibiotiky ukončena a následující den byl zdravý propuštěn [Prasil *et al.*, 2020].

Třetí kazuistika je zaměřena na 38letého muže, který trpěl 2 dny vysokými horečkami se zimnicí, třesavkou a bolestmi v horních a dolních končetinách. Pacient byl kuřák a alkoholik. 4 dny před hospitalizací byl pokousán psem do levé ruky. Drobnou ránu nevyplachoval a nedezinfikoval. Proto se u pacienta rozvinula těžká seps. Byl mu podáván aktivovaný protein C v dávce 24 µg/kg/hod po dobu 96 hodin. Pomocí PCR byla detekována *Capnocytophaga canimorsus*. Jako antibiotická léčba byl podáván ampicilin-sulbactan a ciprofloxacin. 3. den od hospitalizace došlo k rozvoji syndromu akutní respirační tísně. Byla potřeba plicní ventilace. Kvůli oboustranné ventilátorové pneumonii byla upravena antibiotická léčba na cefuroxim, amikacin a kotrimoxazol. Po léčbě antibiotiky došlo ke zlepšení stavu pacienta a ten byl 23. den od začátku hospitalizace propuštěn [Freibergerová *et al.*, 2007].

1.4 *Capnocytophaga cynodegmi*

Capnocytophaga cynodegmi byla dříve pojmenována jako dysgonický fermentor 2-like [Brenner *et al.*, 1989]. Je běžný komenzál ústní dutiny psů a koček s prevalencí až 86 %. *C. cynodegmi* a *C. canimorsus* jsou fenotypově a genotypově podobné [Manfredi *et al.*, 2015]. *C. cynodegmi* se od *C. canimorsus* liší tím, že fermentuje sacharózu, rafinózu, inulin a melibiózu a častější kultivací z kousnutí [Butler, 2015]. *C. cynodegmi* má kolonie na krevním agaru velké 2-3 mm, konvexní, průsvitné až matné [Zangenah *et al.*, 2016]. Barva kolonií může být od bílé až po žlutou. Různorodost kolonií je zobrazena na obrázku 5. *C. cynodegmi* je považována za méně virulentní patogen než *C. canimorsus*. Hlášené případy zahrnovaly převážně infekci ran [Manfredi *et al.*, 2015]. Většina kmenů je citlivá na empirickou léčbu ampicilinem spolu s kyselinou klavulanovou [Zangenah *et Bergman* 2015].



Obrázek 5 – Růst *C. cynodegmi* na krevním agaru, inkubováno 5 dní, při 37 °C, v 5% CO₂ atmosféře, vlastní fotografie

1.5 Typizace mikroorganismů

Typizace se zabývá členěním mikroorganismů. Systémy typování definují specifické charakteristické vlastnosti objektu. Jde o postupy, které jsou specifické pro různé fenotypové nebo genetické parametry. Tyto postupy mohou být obecné pro mikrobiální druh nebo druhově či rodově specifické [Van Belkum *et al.*, 2001]. Identifikace bakterií je prováděna přes různé fenotypové vlastnosti. Organismy jsou rozřazeny do skupin na základě morfologických znaků (makro/mikroskopické znaky, barvení), fyziologických metabolismů (nutriční požadavky, produkty fermentace, podmínky růstu) a schopnosti tvořit spory [Ciantar *et al.*, 2005]. Mezi fenotypové techniky můžeme zařadit sérotypizaci, biotypizaci, testování citlivosti na antibiotika. Metody genetická typizace jsou sekvenování celého bakteriálního genomu, sekvenování jedné nebo více genetických oblastí, polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), gelová elektroforéza v pulzním poli a další [Foxman *et al.*, 2005].

Fenotypové vlastnosti vytvořily základ klasifikace pro bakteriální rody. Tyto vlastnosti jsou nespecifické, protože se liší například při stáří kolonií, při různých podmínkách. I standardizace laboratoře může ovlivnit zařazení do skupiny [Ciantar *et al.*, 2005]. Při neprůkaznosti fenotypových údajů jsou využívány molekulární metody [Van Dam *et al.*, 200]. Dostupnost molekulárně biologických metod změnila bakteriální systematizaci. Zásadní změnu v určování fylogeneze prokaryot provedlo sekvenování rRNA. U bakterií je gen 16S rRNA univerzálně distribuovaný a vysoce konzervovaný. Díky jeho konzervaci je možné gen amplifikovat pomocí PCR a následně identifikovat bakterie [Ciantar *et al.*, 2005]. Rozlišení genotypu mikroorganismů využíváme u taxonomie, výzkumu na objasnění evoluční dynamiky nebo fylogenetických vztahů, populační genetiky mikroorganismů [Van Belkum *et al.*, 2001].

1.6 Molekulárně biologická detekce

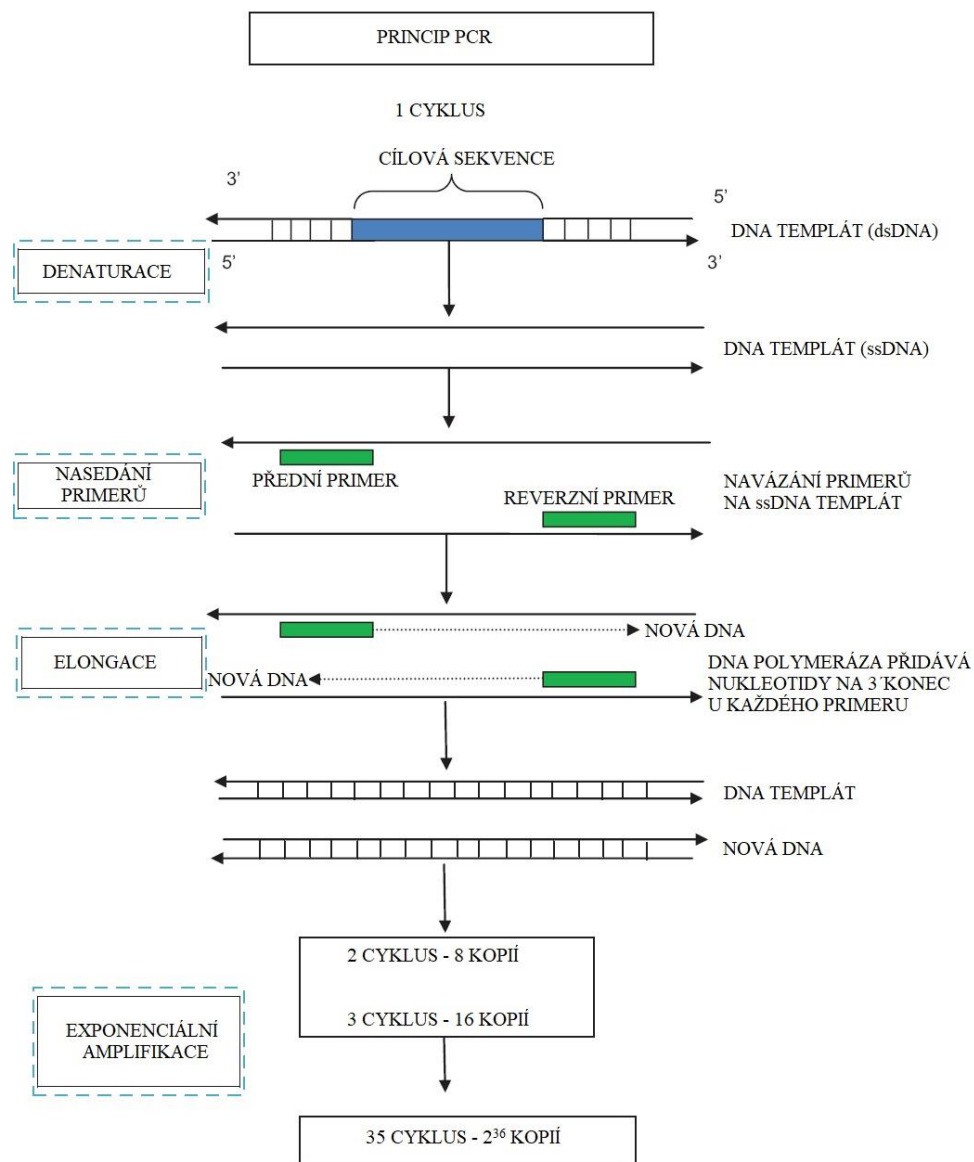
Identifikace *Capnocytopha* spp. jako původce nemoci je obtížná a komplikovaná. Konvenční biochemické testování v mnoha případech neposkytuje relevantní odpovědi. Dalším aspektem může být pomalý růst bakterie, která ještě vyžaduje specifické podmínky, například zvýšený CO₂, čokoládový agar nebo selektivní média s antibiotiky [Prasil *et al.*, 2020]. Polymerázová řetězová reakce a sekvenování mohou pomoci urychlit diagnostiku a identifikaci jednotlivých druhů [Lloret *et al.*, 2013].

1.6.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Polymerázová řetězová reakce je amplifikační technika, která generuje zásobu specifického segmentu DNA (tj. ampikonu) a to pouze z malého množství výchozího materiálu (tj. templátu DNA nebo cílové sekvence) [Lorenz, 2012]. Pro provedení PCR potřebujeme templátovou DNA, primery, nukleotidy a DNA polymerázu, která je klíčovým enzymem, co replikuje DNA a spojuje jednotlivé nukleotidy dohromady za vzniku PCR produktu. [Maheaswari *et al.*, 2016].

1.6.1.1 Průběh PCR

Pro PCR musí být nejprve extrahována nukleová kyselina ze vzorku. Izolace se provádí tepelnými, chemickými nebo enzymatickými metodami. Následně je nukleová kyselina přidávána do reakční směsi, která obsahuje primery, polymerázu a aditiva, které optimalizují aktivitu polymerázy. Mezi aditiva patří pufr, MgCl₂, soli, deoxynukleotidy a enzymy. Zkumavka s PCR směsí se umístí do termocykleru, kde se opakují tři kroky: denaturace, annealing a elongace DNA. Celý cyklus PCR je zobrazen na obrázku 6 [Maheaswari *et al.*, 2016].



Obrázek 6 – Polymerázová řetězová reakce (PCR), dsDNA – double stranded DNA, ssDNA – single stranded. (převzato, upraveno dle [Maheaswari *et al.*, 2016])

Při 92-95 °C DNA řetězec denaturuje. Dochází k separaci DNA řetězců na 2 jednoduché. Dále při 50-70 °C nasedají primery na denaturovanou templátovou DNA, kdy forward primer nasedá na vlákno specifické a reverzní primer nasedá na komplementární vlákno. Prodlužování řetězce probíhá při 72 °C za účasti DNA polymerázy, která nasedá na primery a syntetizuje nová komplementární vlákna. Tyto kroky se opakují v 30-40 cyklech [Gupta, 2019; Ramesh *et al.*, 1992].

Po ukončení amplifikace je výsledný amplikon rozdělen pomocí elektroforézy probíhající na agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu [Maheaswari *et al.*, 2016]. Gel je nutné obarvit, kvůli vizualizaci nukleových kyselin. Nejběžnějším barvivem je ethidium bromid. Mezi další barviva, která jsou méně toxická a jsou schopná se navázat na nukleovou kyselinu, patří

methylenová modř, Crystal Violet, Sybr Safe, Gel Red [Lorenz, 2012]. Produkty se na gelu rozdělují podle velikosti a zobrazují se jako jeden proužek odpovídající amplifikované sekvenci. Amplikony jsou viditelné pod ultrafialovým světlem [Maheaswari *et al.*, 2016].

1.6.1.2 Výhody a nevýhody PCR

Výhody polymerázové řetězové reakce jsou snadná kvantifikace, větší citlivost, rychlá analýza, přesnost, reprodukovatelnost, kontrola kvality a minimální kontaminace. Dále PCR umožňuje přesnou kvantifikaci bakteriálních kmenů s odlišným fenotypem. Lze analyzovat větší množství vzorků najednou. Nemusíme využívat životaschopné buňky, proto je PCR vhodná třeba pro anaerobní bakterie, u kterých by při převozu mohlo dojít k usmrcení [Maheaswari *et al.*, 2016]. Nevýhodou naopak je, že pokud PCR neproběhne správně, mohou se objevit nespecifické produkty DNA, které se na agarózových gelech jeví jako šmouha nebo žebřík, nebo nedojde k vytvoření žádných produktů. Může také dojít k vytvoření heterogenní populace produktů PCR [Lorenz, 2012; Garibyan *et Avashia*, 2013].

1.6.2 Polymerázová řetězová reakce v reálném čase

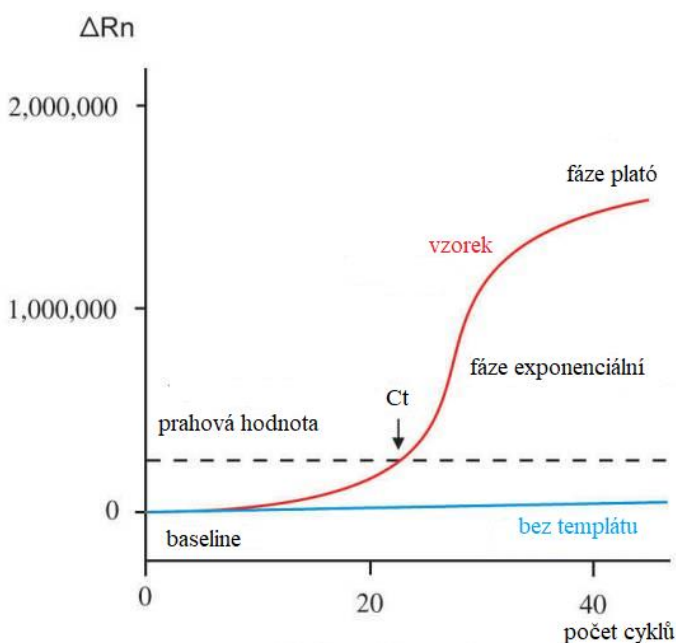
Real time PCR je metoda, která je podobná konvenční PCR. Probíhá zde také amplifikace DNA za využití templátové DNA, termostabilní DNA polymerázy, primerů a nukleotidů. Rozdílem mezi těmito metodami je, že u real time PCR můžeme sledovat průběh PCR v reálném čase. [Artika *et al.*, 2022]. Sledování umožňují fluorescenční molekuly, které se naváží na nukleové kyseliny [Navarro *et al.*, 2015]. Vzniklý signál odpovídá množství PCR produktu v reakci [Green *et Sambrook*, 2018]. Touto metodou je dosaženo vyšší citlivosti, specifičnosti, přesnosti, nízkého rizika kontaminace a zkrácení doby analýzy oproti konvenční polymerázové řetězové reakci [Navarro *et al.*, 2015; Artika *et al.*, 2022]. PCR v reálném čase se využívá ke kvantifikaci cílových nukleových kyselin. Toho se využívá pro kvantifikaci mRNA při analýze genové exprese a stanovení virové zátěže klinického vzorku [Artika *et al.*, 2022].

1.6.2.1 Kvantifikace

Množství DNA přítomné ve výchozí směsi určuje množství výsledného amplikonu pro provedené PCR. Když je tedy na začátku málo molekul DNA, bude množství výsledného amplikonu malé. Pokud je výchozí množství molekul velké, bude i konečné množství produktu velké. Kvantifikace nukleové kyseliny u real time PCR se provádí během exponenciální fáze. Během této fáze existuje přesný kvantitativní vztah mezi výchozím množstvím a množstvím konečného produktu. Detekci amplikonu během exponenciální fáze je možné extrapolovat zpět

na výchozí množství. Vytvořením grafu se závislostí PCR produktu proti počtu provedených cyklů, získáme křivku amplifikace PCR v reálném čase [Artika *et al.*, 2022].

Jednotlivé fáze jsou lineární exponenciální a plató. Během exponenciální fáze má PCR produkt optimální amplifikační periodu a zdvojnásobuje produkt po každém cyklu. Během této fáze je také dosaženo ideálních reakčních podmínek. Pro výpočet dat se využívá intenzita fluorescence v exponenciální fázi [Artika *et al.*, 2022]. Následuje fáze plató, kdy jsou vyčerpány potřebné atributy na amplifikaci. Zde už tedy k amplifikaci nedochází [Wong *et Medrano*, 2005]. Průběh kvantifikace je zobrazen na obrázku 7.



Obrázek 7 – PCR v reálném čase, Amplifikační graf, kde ΔR_n znamená rozdíl fluorescenční emise amplikonu v časovém bodě a fluorescenční emise základní linie, C_t je prahový cyklus, baseline (základní linie) práh fluorescenčního signálu, signály pod baseline jsou nedetekovatelné přístrojem (převzato, upraveno dle [Artika *et al.*, 2022])

1.6.2.2 Zařízení a součásti

Přístroj pro real time PCR je složen z termocykleru, který je důležitou součástí, protože udržuje stejnou teplotu mezi všemi jamkami. K dosažení stejných teplot se využívá topný blok, ohřátý vzduch nebo kombinace obou. Topné bloky mění teplotu pomaleji než ohřátý vzduch, to má za následek delší dobu amplifikace. Rozdíl teplot mezi jednotlivými jamkami by vedl k rozdílné amplifikaci [Valasek *et Repa*, 2005]. Dále je součástí integrovaný zdroj excitačního světla (lampa, laser nebo světlo emitující dioda), fluorescenční detekční systém nebo fluorimetr a software, který převádí fluorescenční záření na křivku amplifikace DNA. Proto je žádoucí přidávat interkalační barvivo nebo fluoroforem značenou sondu [Navarro *et al.*, 2015].

Fluorescenční značky pro analýzu nukleových kyselin můžeme rozdělit do 2 skupin. První skupina jsou interkalační molekuly dvouřetězcové DNA, kdy můžeme používat barviva jako SYBR Green I, EvaGreen. Druhá skupina zahrnuje molekuly, které značíme fluoroforem. Ty můžeme rozdělit do podskupin: primer sondy (Scorpions, Amplifouor®, LUX™), sondy způsobující hydrolýzu (TaqMan (obr.4A), MGB-TaqMan, Snake test) nebo hybridizaci (hybprobe nebo FRET, Molecular Beacons) a analogy nukleových kyselin (PNA, LNA®, ZNA™) [Navarro *et al.*, 2015].

1.6.2.3 Výhody a nevýhody

Výhodou real time PCR je schopnost kvantifikovat nukleové kyseliny [Garibyan *et Avashia*, 2013]. Metoda je vysoce citlivá, protože umožní detekci méně než 5 kopií cílové sekvence. To umožňuje analyzovat i malé množství vzorku. Dále mezi výhody patří rychlost analýzy. Celý proces je prováděn izolovaně, tedy během procesu nemůže dojít ke kontaminaci. Vzorek, který projde real time PCR je analyzován a nejsou potřeba žádné dodatečné manipulace. Nevýhodou je náchylnost k inhibitorům PCR, které se vyskytují ve vzorku. Pro zamezení inhibice se používají upravené DNA polymerázy, které jsou vůči inhibici odolné. Dále u RNA, která je méně stabilní než DNA, musí být provedena izolace pečlivě, aby došlo k odstranění kontaminujících nukleáz a nedošlo k znehodnocení vzorku. Největší omezení pro real time PCR je v lidské chybě [Valasek *et Repa*, 2005].

1.6.3 Další typy PCR

RT-PCR je PCR spojená s reverzní transkripcí. Tato metoda se používá k detekci mRNA, pre-mRNA nebo jiných typů RNA [Rio, 2014]. Metoda je vysoce citlivá. Mechanismus je založen na amplifikaci cDNA z mRNA [Celik *et al.*, 2021]. Při vzniku cDNA z RNA pomáhá postupné nasedání primerů [Ramesh *et al.*, 1992].

Dále můžeme využívat kvantitativní PCR (qPCR), kterou kvantifikujeme počáteční množství nukleové kyseliny. Označení kvantitativní PCR je starší než real time PCR, protože u kvantitativní PCR můžeme kvantifikovat množství nukleové kyseliny i z PCR a následných gelových testů. Termíny real time PCR a kvantitativní PCR se používají zaměnitelně, nebo v kombinaci, protože stejně jako qPCR je i real time PCR používána pro kvantifikaci nukleových kyselin [Valasek *et Repa*, 2005].

RT-qPCR využíváme při analýze genové exprese. Kombinuje se zde tradiční RT-PCR s přenosem fluorescenční rezonanční energie pomocí fluorogenních primerů. Reakce má několik kroků. Nejprve je izolována z cílové tkáně RNA, dále je mRNA reverzně transkribována na cDNA, cDNA je pomocí specifických primerů amplifikována v reálném čase. Koncentrace vybraného transkriptu se počítá z exponenciální fáze reakce [Wagner, 2013].

Mezi další příklady modifikovaných PCR patří hot start PCR [Green *et al.*, 2018], Touchdown PCR [Green *et al.*, 2018] nebo multiplexní PCR [Elnifro *et al.*, 2000].

1.6.4 Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

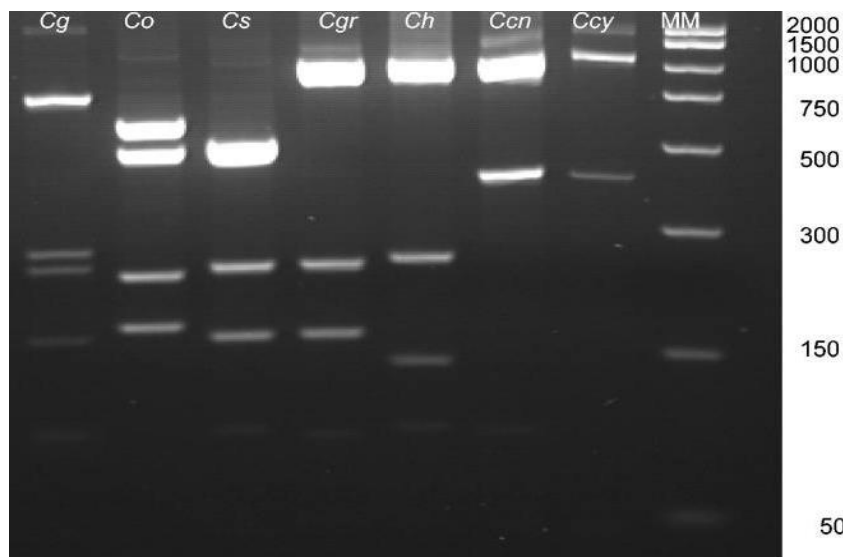
Polymorfismus délky restrikčních fragmentů polymerázové řetězové reakce je metoda, která byla zavedena v roce 1974 [Grodzicker *et al.*, 1974]. Využívá se k identifikaci polymorfismů DNA mezi různými jedinci [Yang *et al.*, 2013]. Může detekovat kodonové mutace [Rosenzweig *et al.*, 2015] nebo odhalit změnu jednoho nukleotidu v sekvenci [Atoui *et al.*, 2017]. Dále se detekují a identifikují přesné taxonomické a genotypové rozmanitosti bakterií [Gonzalez *et al.*, 2012]. PCR-RFLP se využívá v genetickém mapování, testování rodokmenů a kriminalistice. Tato technika je také uplatněna u studia starobylé DNA vyhynulých organismů, mumifikovaných tkání nebo zachovalých rostlinných tkání [Tarach, 2021].

Princip PCR-RFLP je založen na štěpení PCR amplikonu vhodnými restrikčními enzymy za vzniku odlišných polymorfních fragmentů [Kim *et al.*, 2017]. Vzniklé fragmenty jsou různé dlouhé. Tyto odchylky jsou charakteristické pro přirozené sekvenační rozdíly mezi jednotlivci [Jarcho, 1994]. Metoda zahrnuje 4 kroky. Prvním krokem je izolace genetického materiálu a provedení PCR se specifickými primery. Ve druhém kroku je DNA amplikon rozštěpen pomocí restrikčních enzymů, které rozpoznávají restrikční místo velké 4-8 párů bází. Ve třetím kroku je naštěpený amplikon oddělen na elektroforéze. Jako separační matrice se nejčastěji využívá agarózový nebo polyakrylamidový gel. Na konec je provedena vizualizace gelu, kde jsou díky přidanému ethidium bromidu nebo stříbru viditelné fragmenty DNA [Tarach, 2021]. Mezi výhody RFLP patří vysoká spolehlivost a rozlišení heterozygotů a homozygotů. Jejich nevýhody jsou pracné a časově náročné postupy [Yang *et al.*, 2013].

1.6.4.1 PCR-RFLP a rod *Capnocytophaga*

Pomocí PCR-RFLP genu 16S rRNA se dají spolehlivě rozlišit bakteriální druhy. Tato metoda je rychlejší a levnější než fenotypové testy nebo sekvenační analýza [Ciantar *et al.*, 2005]. Pro identifikaci rodu *Capnocytophaga* bylo popsáno několik protokolů PCR-RFLP. Mezi prvními byl publikován protokol od Ciantar *et al.*, 2005, který se zabýval molekulární identifikací *Capnocytophaga* spp. za použití 16S rRNA PCR-RFLP. V publikaci bylo analyzováno 187 klinických izolátů *Capnocytophaga* a 7 referenčních kmenů (*C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. sputigena*, *C. granulosa*, *C. haemolytica*, *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*). Pro restrikci byly využity enzymy *CfoI*, *HaeIII* a *RsaI*, Pouze restrikční enzym *CfoI* u referenčních

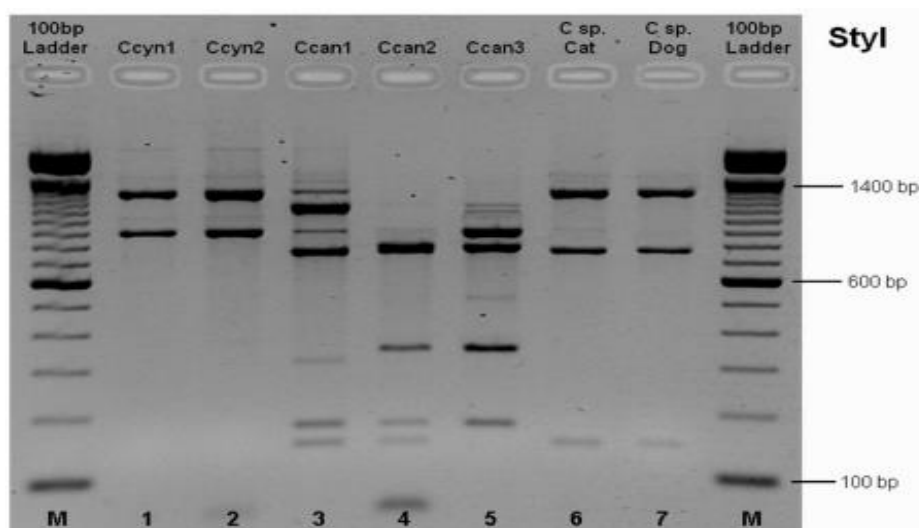
kmenů poskytl 7 různých restričních profilů, které jsou zobrazeny na obrázku 8. [Ciantar *et al.*, 2005].



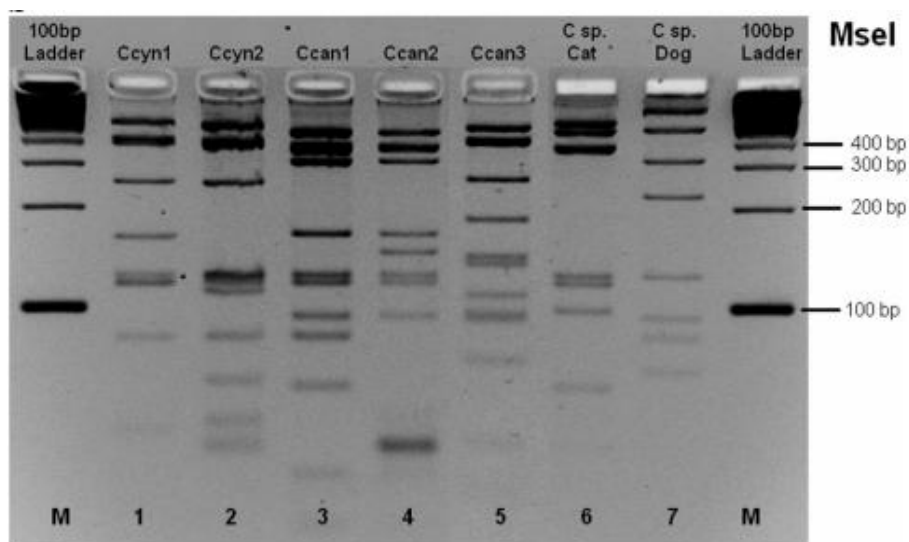
Obrázek 8 – 16S PCR-RFLP *Capnocytophaga* spp., použita restriční endonukleáza *CfoI*, MM – marker o velikosti 50-2000 bp, Cg – *C. gingivalis*, Co – *C. ochracea*, Cs – *C. sputigena*, Cgr – *C. granulosa*, Ch – *C. haemolytica*, Ccn – *C. canimorsus*, Ccy – *C. cynodegmi*. (převzato z [Ciantar *et al.*, 2005])

Klinické izoláty byly stanoveny stejným postupem jako referenční kmeny. Velká většina klinických izolátů byla identifikována jako *C. ochracea*, *C. granulosa*, *C. gingivalis* a *C. sputigena*. Pokud v restričním profilu byla nalezena neshoda se 7 referenčními kmeny, bylo provedeno sekvenování genu 16S rRNA [Ciantar *et al.*, 2005].

Další postup byl publikován Van Damem *et al.*, který se zabývá vývojem PCR-RFLP pro rod *Capnocytophaga*. Do studie bylo zahrnuto 43 vzorků. Po první amplifikaci bylo pozitivních 40 vzorků. Referenční rody *C. ochracea*, *C. haemolytica*, *C. sputigena*, *C. granulosa* a *C. gingivalis* neposkytly po PCR žádný amplifikační produkt. U rodů *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* došlo k vytvoření amplikonu, který byl následně štěpen restričním enzymem *StyI* (obrázek 9) nebo *MseI* (obrázek 10) [Van Dam *et al.*, 2009].



Obrázek 9 – PCR-RFLP, použita byla restriční endonukleáza *StyI*. 1000bp Ladder – marker velikosti od 100-1400 bp. *Ccyn1* – *C. cynodegmi* (ATCC 49045), *Ccyn2* – *C. cynodegmi* (LUMC-Ccyn01), *Ccan1* – *C. canimorsus* (601232), *Ccan2* – *C. canimorsus* (ATCC 35979), *Ccan3* – *C. canimorsus* (LUMC-HCI15), *C sp. Cat* – *Capnocytophaga* spp. kmen LUMC-CatG1, *C.sp. Dog* – *Capnocytophaga* spp. kmen LUMC-DogNido1 (převzato dle [Van Dam et al., 2009])



Obrázek 10 – PCR-RFLP použita byla restriční endonukleáza *MseI*. 1000bp Ladder – marker velikosti od 100-1000 bp. *Ccyn1* – *C. cynodegmi* (ATCC 49045), *Ccyn2* – *C. cynodegmi* (LUMC-Ccyn01), *Ccan1* – *C. canimorsus* (601232), *Ccan2* – *C. canimorsus* (ATCC 35979), *Ccan3* – *C. canimorsus* (LUMC-HCI15), *C sp. Cat* – *Capnocytophaga* spp. kmen LUMC-CatG1, *C.sp.Dog* – *Capnocytophaga* spp. kmen LUMC-DogNido1 (převzato dle [Van Dam et al., 2009])

Při restrikci *C. canimorsus* endonukleázou *StyI* byly nalezeny 3 rozdílné restriční profily, které se opakovaly mezi vzorky. Při použití restričního enzymu *MseI* vznikly u analyzovaných vzorků *C. canimorsus* také 3 různé restriční profily. U testování *C. cynodegmi* byly nalezeny opakující se 2 restriční profily při použití restričního enzymu *MseI*. U enzymu *StyI* byl vytvořen vždy stejný restriční profil, který obsahoval fragmenty o velikosti 1296 a 892 bp [Van Dam et al., 2009].

Další protokol, který se zabýval molekulární identifikací druhů *Capnocytophaga* metodou PCR-RFLP publikoval Idate *et al.* Studie se konkrétně zabývala porovnáním zdravých osob a pacientů s periodontálním onemocněním. Studováno bylo 300 jedinců, z toho 100 mělo periodontální onemocnění. Studie se především zabývala druhy, které se vyskytují v lidské dutině ústní. Zkoumány byly konkrétně *C. sputigena*, *C. haemolytica*, *C. leadbetteri*, *C. genospecies*, *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. granulosa*. Detekovány byly pouze druhy *C. gingivalis*, *C. ochracea* a *C. granulosa* [Idate *et al.*, 2020].

V červnu 2022 Idate a jeho spolupracovníci publikovali studii, která se zabývala porovnáním subgingiválního plaku zdravých jedinců a pacientů s chronickou gingivitidou a chronickou parodontitidou. Identifikovány byly *C. gingivalis*, *C. ochracea*, *C. granulosa*, *C. sputigena*, *C. haemolytica*, *C. genospecies* a *C. leadbetteri*. Na restrikci byl použit enzym *HhaI*. V této studii se opět stanovovaly pouze druhy, které jsou součástí lidské dutiny ústní [Idate *et al.*, 2022].

1.6.4.2 Restrikční endonukleázy

Restrikční enzymy jsou endonukleázy, které jsou součástí antiinfekčního systému bakterií. Bakterie většinou mají více restrikčních enzymů, kdy každá endonukleáza rozlišuje jinou DNA sekvenci. Nejčastěji se při RFLP používá typ II, protože štěpí řetězec uprostřed. Enzymy pro RFLP rozpoznávají 4-8 párů bází velkou sekvenci [Tarach, 2021]. Příklady používaných restrikčních endonukleáz v tabulce 4.

Tabulka 4 – Restrikční enzymy, které byly používány v této diplomové práci (převzato, upraveno dle [NEW ENGLAND BioLabs Inc, *MseI*, 2023, NEW ENGLAND BioLabs Inc.: *StyI-HF*®, 2023])

| Enzym | Původ | Místo štěpení | Literatura |
|------------------|--|--|---|
| <i>MseI</i> | <i>Escherichia coli</i> , která nese klonovaný gen <i>MseI</i> z druhu <i>Micrococcus</i> | 5'... T TAA...3' 3' ...AAT T...5' | NEW ENGLAND <i>BioLabs Inc, MseI</i> , 2023 |
| <i>StyI-HF</i> ® | <i>Escherichia coli</i> , která nese klonovaný a modifikovaný gen <i>StyI</i> ze <i>Salmonella typhi</i> | 5'...C CWWGG...3' 3'...GGWWC C...5' | NEW ENGLAND <i>BioLabs Inc, StyI-HF</i> ®, 2023 |

1.6.5 Sekvenování

Sekvenování je to metoda k určení sekvence DNA [Clarridge, 2004]. Proces sekvenování se dá rozdělit na 3 fáze, které se skládají z přípravy vzorku, fyzikálního sekvenování a opětovného sestavení. V přípravě vzorku dochází k rozbití cílového genomu na fragmenty.

Tyto fragmenty mohou být v závislosti na množství vzorku amplifikovány, ale nemusí. V poslední fázi opětovného sestavení se pomocí bioinformatických softwarů zarovnávají překrývající sekvence. Na konci procesu je získána sekvence genomu [Schadt *et al.*, 2010].

Vývoj sekvenování můžeme rozdělit na 3 generace [Heather *et Chain*, 2016]. Do první generace řadíme sekvenování dle Sangera (tj. enzymatická dideoxy DNA sekvenační technika) a dle Maxama a Gilberta (tj. chemická degradační DNA sekvenační technika) [Pareek *et al.*, 2011].

Druhá generace se od první liší tím, že není využíváno radioaktivní nebo fluorescenční značení dideoxynukleotidů nebo oligonukleotidů před elektroforézou, ale je měřena luminiscence při syntéze pyrofosfátů. Syntéza pyrofosfátů se skládá ze 2 kroků, kdy nejprve ATPsulfuryláza přemění pyrofosfát na ATP, který je substrátem pro luciferázu. Pomocí luciferázy vzniká světlo, které je přímo úměrné množství pyrofosfátů [Heather *et Chain*, 2016]. Dále je u této generace využíván způsob „wash-and-scan“, který zahrnuje postupné zaplavení činidel (jako značené nukleotidy), které se začlení do řetězců DNA. Následuje vymývací krok, kterým se odstraní přebytečné činidlo. Následuje skenování, které identifikuje začleněné báze. Nakonec jsou nově začleněné báze zafixovány, aby nedošlo k jejich narušení při průběhu dalšího cyklu. Cyklus wash-and-scan se opakuje, dokud reakce není „životaschopná“. Tento mechanismus sekvenace je využíván společností Illumina [Schadt *et al.*, 2010].

Třetí generace se od druhé a první liší tím, že by měly být sekvenovány malé molekuly v reálném čase a měla by se odlišovat od předchozích technologií. Do technologií třetí generace patří single molecule real time (SMRT) od společnosti Pacific Biosciences. Zde dochází k polymeraci DNA v mikrofabrikovaných nanostrukturách: vlnovody s nulovým režimem (drobné dírky v kovovém filmu, pokrývající nanočip). Využívá se tu světlo, které projde otvory, než jeho vlnová délka a na dně otvoru způsobí exponenciální rozpad. Toto umožňuje vizualizaci jednotlivých molekul fluoroforů blízko DNA. Promytím požadované DNA knihovny fluorescenčními dNTP lze v reálném čase monitorovat prodloužení řetězců DNA o jednotlivé nukleotidy [Heather *et Chain*, 2016, Pareek *et al.*, 2011].

1.6.5.1 Sekvenování nové generace/masivně paralelní sekvenování (NGS)

Je prováděno souběžné čtení milionů až miliard sekvenovaných úseků o délce desítek až tisíců nukleotidů. Bioinformatické analýzy mapují jednotlivé čtení a následně spojují fragmenty. Každá báze lidského genomu je sekvenována vícekrát, což poskytuje přesná data o sekvenování celých genomů [Behjati *et Tarpey*, 2013]. Bylo využíváno několik technologií, mezi které patří pyrosekvenování, sekvenování pomocí ligace nebo sekvenování založené

na změně elektrického potenciálu. Nyní je nejčastěji využíváno sekvenování syntézou (SBS) od firmy Illumina [Tom *et al.*, 2023].

NGS můžeme využít k identifikaci zárodečných variant ve velkém počtu genů současně. Dále na rozdíl od starších metod, které detekovaly jednonukleotidové záměny nebo krátké inserce a delece. NGS schopno navíc zachytit změny počtu kopií celých genomových oblastí nebo identifikovat strukturní varianty. Toto může konkurovat cytogenetickým vyšetřením. NGS můžeme využít k nalezení mozaikových mutací. V mikrobiologii je možné sekvenovat a odhalit například methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. NGS dále využíváme v onkologii, kdy se sekvenují získané somatické mutace. Individuální sekvenování rakoviny může poskytnout přesnější prognózy onemocnění [Behjati *et Tarpey*, 2013]. V poslední době se využívají tzv. genové panely, kde se nachází soubor desítek až stovek vyšetřovaných genů. Tyto panely jsou zaměřeny na diferenciální diagnostiku konkrétní skupiny onemocnění nebo je lze využít pro obecné analýzy spojené s určitým onemocněním [Tom *et al.*, 2023]. Hlavní nevýhodou NGS v klinické praxi je zavedení potřebné technologie, jako je počítačová kapacita a úložiště, odbornost personálu potřebná k analýze dat a jejich interpretaci [Behjati *et Tarpey*, 2013].

1.6.5.2 Identifikace bakteriálních druhů pomocí sekvence genu 16S rRNA

Gen 16S rRNA nebo 16 rRNA, lze srovnávat mezi všemi bakteriemi. Pomocí sekvenování 16S rRNA můžeme lépe rozeznat nekultivovatelné bakterie nebo rozpoznávat nové patogeny [Clarridge, 2004].

Sekvence genu 16S rRNA je dlouhá asi 1550 bp a je složena z variabilních i konzervovaných oblastí. Gen je dostatečně velký, aby podával statisticky platná a rozlišující měření. Univerzální primery jsou obvykle komplementární ke konzervovaným oblastem na začátku genu (oblast 540 bp) nebo na konci genu (oblast 1550 bp). Variabilní sekvence se používá na srovnání. Celá délka 1500 bp se sekvenuje u odlišení mezi taxony nebo při popisu nového druhu. Pro klinické bakteriální izoláty stačí k identifikaci sekvenace 500 bp [Clarridge, 2004]. Sekvence 16S rRNA jsou porovnávány se sekvencemi v dostupných databázích. Pro identifikaci rodu nebo druhu můžeme používat kritéria: pokud srovnání určité sekvence s referenční sekvencí klasifikovaného druhu poskytlo skóre podobnosti větší než 99 %. Je neznámý izolát přiřazen k tomuto druhu, pokud skóre bylo větší než 99 % izolát řadíme k tomuto rodu, pokud skóre bylo menší než 95 % izolát řadíme k rodině [Bosshard *et al.*, 2003].

2 Cíl práce

Cíle práce byly:

1. Zavedení a optimalizace PCR-RFLP metody pro kmen *Capnocytophaga canimorsus*.
2. Aplikace optimalizované metody na kmeny získané z přirozeného prostředí.
3. Pokus o sérotypizaci izolátů *C. canimorsus* založenou na PCR.
4. Ověření tvorby biofilmu *C. canimorsus*.
5. Interpretace získaných výsledků vhodným způsobem interpretovat.
6. Zpracování diplomové práce v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice „Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací“.

3 Experimentální část

3.1 Přístroje a zařízení

| | |
|---------------------------------|---|
| Analytické váhy | Kern, Německo |
| Autokláv | PS 20 A, BMT, Česká republika |
| DNA/RNA UV-dekontaminační box | UVC/T-AR, Biosan, Lotyšsko |
| Elektroforetický přístroj | Cleaver, Scientific LTD, Spojené království |
| Horkovzdušný sterilizátor | Sterimat 5104, Stigma, USA |
| ChemiDoc™ MP zobrazovací systém | BIO-RAD Laboratories, USA |
| Laminární box | Jouan, Francie |
| McFarland densitometr | Biosan, USA |
| MicroStation | Biolog, USA |
| Mikroskop | Carl Zeiss, Německo |
| Mikrovlnná trouba | LG, Jižní Korea |
| Odstředivka | GeneProof®, Česká republika |
| Odstředivka | Sprout ® plus mini, Česká republika |
| Přístroj na tvorbu ledu FIM | EVERmed, Itálie |
| Tecan Infinite® 200 PRO | Tecan, Švýcarsko |
| Termoblok | SBH130DC, Stuart®, UK |
| Termocykler | TProfessional, Biometra, Německo |
| Termostat | SalvisLab Biocentre, Švýcarsko |
| Turbidimetr | Biolog, USA |
| UV transluminátor | Vilber lourmat, Francie |
| Vortex | MS 3 basic, Ika, Německo |

3.2 Laboratorní pomůcky

Automatické pipety, kahan, L-hokejky, mikrotitrační destičky, mikrozkušavky typu Eppendorf 0,2 ml, mikrozkušavky typu Eppendorf 1,5 ml, očkovací kličky, Petriho misky, plastové špičky, skleněné zkumavky, stojánky na zkumavky, kovová víčka, sběrná zkumavka, QIAamp Mini spin column.

3.3 Kultivační média

Modifikovaný krevní agar

HiMedia, Indie

| | | |
|----------|-------------------|--------|
| Složení: | Proteosový pepton | 15 g/l |
| | Játrový extrakt | 2,5g/l |
| | Kvasničný extrakt | 5 g/l |
| | Chlorid sodný | 5 g/l |
| | Agar | 15 g/l |

Konečné pH $7,4 \pm 0,2$ při 25 °C

| | |
|-------------|----------|
| Beraní krev | 100 ml/l |
| Gentamicin | 20 mg/l |

Příprava: V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 21,25 g dehydratovaného média. Směs byla sterilizována v autoklávu při 120 °C po dobu 15 minut. Po zchlazení média bylo přidáno 10 % beraní krve a antibiotikum gentamicin. Médium bylo rozlito do Petriho misek a po vychlazení a uschnutí bylo uloženo do lednice, kde bylo skladováno.

Antibiotikum gentamicin bylo rozpuštěno ve sterilní destilované vodě a byl připraven zásobní roztok o koncentraci 100 mg/ml. Tento zásobní roztok se přidával ke krevnímu agaru, aby celková koncentrace byla 40 µg/ml.

Müller-Hinton bujón

HiMedia, Indie

| | | |
|----------|-----------------------------|----------|
| Složení: | Dehydratovaná masová infuze | 2 g/l |
| | Kaseinový hydrolyzát | 17,5 g/l |
| | Škrob | 1,5 g/l |

Konečné pH by mělo být $7,3 \pm 0,1$ při 25 °C

Příprava: V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 10,5 g dehydratovaného média. Směs byla sterilizována v autoklávu při 120 °C 15 minut.

Soyabean Casein Medium (Tryptone soya broth) HiMedia, Indie

| | | |
|----------|----------------------------------|---------|
| Složení: | Enzymatický hydrolyzát kaseinu | 17 g/l |
| | Sójový pepton | 3 g/l |
| | Chlorid sodný | 5 g/l |
| | Hydrogenfosforečnan (di)draselný | 2,5 g/l |

Konečné pH $7.3 \pm 0,2$ při 25 °C

Příprava: V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 15 g dehydratovaného média.

Směs byla sterilizována v autoklávu při 120 °C 15 minut.

Brain Heart Infusion Broth Oxoid, Spojené království

| | | |
|----------|-------------------------------------|----------|
| Složení: | Mozková infuze v pevné formě | 12,5 g/l |
| | Hovězí srdcová infuze v pevné formě | 5,0 g/l |
| | Proteosový pepton | 10,0 g/l |
| | Glukóza | 2,0 g/l |
| | Chlorid sodný | 5,0 g/l |
| | Fosforečnan sodný | 2,5 g/l |

Konečné pH $7,4 \pm 0,2$ při 25 °C

Příprava: V 500 ml destilované vody bylo rozpuštěno 18,5 g dehydratovaného média.

Směs byla sterilizována v autoklávu při 120 °C 15 minut.

3.4 Chemikálie

Aceton Penta Chemicals, Česká republika

Agaróza Sigma, Spojené státy americké

Příprava: Pro vznik 1,5% gelu bylo naváženo 1,2 g agarózy, která byla rozpuštěna v 80 ml 1x TBE

Buffer ATL/Buffer AL QIAGEN, Německo

Buffer AW1 QIAGEN, Německo

Buffer AW2 QIAGEN, Německo

CutSmart pufr BioLabs, Nová Anglie

DNA marker 155-970 coloured Top-Bio, Česká republika

DNA marker 200-1500 coloured Top-Bio, Česká republika

| | |
|---|----------------------------------|
| DNA marker SERVA FastLoad 100-3000 bp | SERVA, Německo |
| Ethanol 96 % | Penta Chemicals, Česká republika |
| Ethidium bromid | Top-Bio, Česká republika |
| Ethylendiamidtetraoctová kyselina | Sigma-Aldrich, Německo |
| Fyziologický roztok | |
| Složení: | |
| Destilovaná voda | 1 l |
| Chlorid sodný | 8,5 g |
| Příprava: Chlorid sodný byl rozpuštěn v destilované vodě a roztok byl autoklávován při 120 °C po dobu 15 minut. | |
| Karbolfuchsin | |
| Složení: | |
| Bazický fuchsin | 1 g |
| 96% ethanol | 10 ml |
| 5% vodní roztok fenolu | 100 ml |
| Příprava: Smícháním reagensů vznikla suspenze, která byla filtrována a následně zředěna destilovanou vodou v poměru 1:10. | |
| Krystalová violet | |
| Složení: | |
| Krystalová violet | 5 g |
| 96% ethanol | 220 ml |
| 1% exalacetát amonný | |
| Příprava: Smícháním reagensů vznikla suspenze, která byla zfiltrována. | |
| Kyselina boritá | Penta Chemicals, Česká republika |
| Lugolův roztok | |
| Složení: | |
| Jód | 1 g |
| Jodid draselný | 2 g |
| Destilovaná voda | 300 ml |
| Příprava: Jód a jodid draselný byly rozpuštěny v destilované vodě. | |
| Octan sodný 2% | Penta Chemicals, Česká republika |
| PCR Ultra H ₂ O | Top-Bio, Česká republika |
| Peroxid vodíku pro katalázu | Penta Chemicals, Česká republika |

Složení: Tris-HCl, (NH₄)₂SO₄, 0,02% Tween 20, MgCl₂, dATP, dGTP, dCTP, dTTP,
Taq DNA polymeráza, barvivo, stabilizátory, aditiva

Primery

Tabulka 5 – Seznam použitých primerů

| Název | Sekvence | Literatura | Výrobce |
|---------------|--|------------------------------------|--------------------------------|
| CaL 2 | 5'-GTAGAGTGCTTCGGCACTTG-3' | Suzuki | |
| CaR | 5'-GCCGATGCTTATTCATACA-3' | <i>et al.</i> , | |
| CyR | 5'-GCCGATGCTTATTCGTATG-3' | 2010 | |
| SeroA-fw | 5-CATACCATGGGAAAAAAGTACCAAAG TTTTTATATTTAACC-3' | | |
| SeroA-rev | 5'-CCGCTCGAGTCATTTTTTTATCTTTTTTA ATATATTCCAA-3' | | |
| SeroB-fw | 5'-CATACCCATGGGAATTAACAAAATTC TAATAG-3' | | |
| SeroB-rev | 5'-CCGCTCGAGTTATTTTTTATTTTCAT TAG-3' | | |
| SeroC-fw | 5'-GGCGTAATACGTTGCTATTTTGTATG-3' | Hess <i>et</i> | Generi |
| SeroC-rev | 5'-CTATTAATATTTTCATTGTACACCAC TTC-3' | <i>al.</i> , 2018 | Biotech, Česká republika |
| SeroD-fw | 5'-GATTTAAAAAATATAGTATTTTAGGAA TTATCG-3' | | |
| SeroD-rev | 5'-CTATACTTGTTCCCACTTTTATGTTTC-3' | | |
| SeroE-fw | 5'-GGAGGAGGAAAAGTATTATTAGAT TAT-3' | | |
| SeroE-rev | 5'-CTATTCATAATTCTTAAAGATACTTAT CAATTC-3' | | |
| SRT1 | 5'-CAGTTTATGGATCAAACCAATCC-3' | Van | |
| STR2 | 5'-CCATCTCTCCRAAACGCTGAC-3' | Dam <i>et</i> <i>al.</i> , 2009 | |
| Capno-Fw | 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' | Ciantar | |
| Capno- Rev | 5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG 3' | <i>et al.</i> , 2005 | |

| | |
|--|----------------------|
| Proteináza K | QIAGEN, Německo |
| QIAamp®DNA Mini Kit | QIAGEN, Německo |
| Restrikční endonukleáza <i>MseI</i> a <i>StyI-HF</i> ® | BioLabs, Nová Anglie |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | SERVA, Německo |

Tris-Borát-EDTA pufr 10x

| | | |
|----------|------------------|--------|
| Složení: | Tris | 108 g |
| | Kyselina boritá | 55 g |
| | EDTA | 5,84 g |
| | Destilovaná voda | 1 l |

Příprava: V destilované vodě byl rozpuštěn Tris, kyselina boritá a EDTA. Roztok byl míchán do úplného rozpuštění.

Tris-Borát-EDTA pufr 1x

Příprava: Pro přípravu 1 litru 1x TBE bylo z připraveného koncentrovaného roztoku 10x TBE odebráno 100 ml a doplněno do 1 litru destilovanou vodou.

| | |
|---------------|----------------------|
| Vkládací pufr | BioLabs, Nová Anglie |
|---------------|----------------------|

3.5 Použité kmeny a izoláty *Capnocytophaga* spp.

V této práci byly využity kmeny a izoláty uvedené v tabulce 6. Jako referenční kultura *C. canimorsus* byla použita CCM 3709 a pro *C. cynodegmi* byla využita DSM 19736. Pro ověření specificity byly použité kmeny *Bacillus subtilis*, konkrétně kmen ATCC 6051 a *Pseudomonas aeruginosa* kmen, ATCC 9027. Ostatní izoláty byly získány výtěrem z psí dutiny. U kmenů 118, 119, 122, 128, 78, 79, 83, 84, 85, 86 byla vyizolována čistá kultura *C. canimorsus*. U kmenů 51, 4/1, 4/2, 4/3, 7, 12 byla vyizolována čistá kultura *C. cynodegmi*. U ostatních kmenů byla dostupná jen směsná kultura, která obsahovala i jiné komenzální bakterie psí dutiny ústní.

Tabulka 6 – Seznam používaných kmenů a izolátů *Capnocytophaga* spp.

| Označení kmenu | Původ | Označení kmenu | Původ |
|----------------|------------------|----------------|------------------|
| CCM 3709 | Česká republika | 91 | psí dutina ústní |
| DSM 19736 | Německo | 92 | psí dutina ústní |
| 118 | psí dutina ústní | 96 | psí dutina ústní |
| 119 | psí dutina ústní | 97 | psí dutina ústní |
| 122 | psí dutina ústní | 100 | psí dutina ústní |
| 128 | psí dutina ústní | 101 | psí dutina ústní |

Tabulka 6 – Pokračování – Seznam používaných kmenů a izolátů *Capnocytophaga* spp.

| Označení kmenu | Původ | Označení kmenu | Původ |
|----------------|------------------|----------------|---------------------|
| 78 | psí dutina ústní | 104 | psí dutina ústní |
| 79 | psí dutina ústní | 112 | psí dutina ústní |
| 83 | psí dutina ústní | 119 | psí dutina ústní |
| 84 | psí dutina ústní | 158 | psí dutina ústní |
| 85 | psí dutina ústní | 159 | psí dutina ústní |
| 86 | psí dutina ústní | 160 | psí dutina ústní |
| 51 | psí dutina ústní | 161 | psí dutina ústní |
| 4 | psí dutina ústní | 162 | psí dutina ústní |
| 4/1 | psí dutina ústní | 163 | psí dutina ústní |
| 4/2 | psí dutina ústní | 164 | psí dutina ústní |
| 4/3 | psí dutina ústní | 165 | psí dutina ústní |
| 7 | psí dutina ústní | 166 | psí dutina ústní |
| 12 | psí dutina ústní | 167 | psí dutina ústní |
| 61 | psí dutina ústní | 172 | psí dutina ústní |
| 62 | psí dutina ústní | 196 | psí dutina ústní |
| 66 | psí dutina ústní | 197 | psí dutina ústní |
| 68 | psí dutina ústní | 198 | psí dutina ústní |
| 69 | psí dutina ústní | 199 | psí dutina ústní |
| 72 | psí dutina ústní | 200 | psí dutina ústní |
| 74 | psí dutina ústní | 201 | psí dutina ústní |
| 75 | psí dutina ústní | 1 | lidská dutina ústní |
| 76 | psí dutina ústní | 2 | lidská dutina ústní |
| 77 | psí dutina ústní | 3 | lidská dutina ústní |
| 80 | psí dutina ústní | 4 | lidská dutina ústní |
| 87 | psí dutina ústní | 5 | lidská dutina ústní |
| 88 | psí dutina ústní | 6 | lidská dutina ústní |

3.6 Pracovní postupy

3.6.1 Kultivace a izolace DNA

Vlastní postup:

Vzorky bakteriálních kultur byly uchovávány v kryozkumavkách při -80 °C. Z rozmrazeného vzorku bylo odebráno 100 µl. Objem byl přenesen na krevní agar s antibiotikem a rozetřen L hokejkou. Inkubace probíhala po dobu 4-5 dnů v CO₂ atmosféře při 37 °C, kdy byly viditelné bílé kolonie. Obvykle bylo provedeno přeočkování na nový modifikovaný krevní agar se stejnou inkubací. U suspektních kolonií bylo provedeno Gramovo barvení a test na katalázu a oxidázu pro prvotní ověření rodu *Capnocytophaga*. Poté následovala lýza bakteriálních buněk. Působením tepla (95 °C, 10 minut v termobloku) byla uvolněna bakteriální DNA do roztoku.

DNA byla přečištěna pomocí QIAamp®DNA Mini Kitu. Do zkumavky bylo vloženo 200-280 µl buněčného lyzátu. Bylo přidáno 20 µl proteinázy K. Směs byla vortexována a následně inkubována při 56 °C 15 minut. Po inkubaci byla opět vortexována a zcentrifugována. Dále bylo přidáno 200 µl AL pufru a celá směs byla zvortexována a inkubována při 70 °C 10 minut. Po inkubaci byla směs vortexována 15 sekund. Dále bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu, kdy následovalo 15sekundové vortexování a centrifugace. Celý objem směsi byl přenesen na kolonku a následovala centrifugace při 6 000 x g (8 000 rpm) po dobu 1 minuty. Potom byla kolonka předána do nové sběrné zkumavky a bylo přidáno 500 µl AW1 pufru. Opět byla provedena centrifugace při 6 000 x g (8 000 rpm) po dobu 1 minuty. Kolonka byla přenesena do nové sběrné zkumavky a bylo napipetováno 500 µl AW2 pufru. Směs byla centrifugována při 20 000 x g (14 000 rpm) po dobu 3 minut. Dále byla kolonka opět přenesena do nové sběrné zkumavky a byla centrifugována při 20 000 x g (14 000 rpm) 1 minutu, aby byly odstraněny poslední zbytky tekutiny. Kolonka byla opět přenesena do nové zkumavky a bylo přidáno 200 µl AE pufru. Zkumavka byla 1 minutu inkubována a následně centrifugována při 6000 x g (8000 rpm) po dobu 1 minuty. Poslední krok byl opakován pro vyšší výtěžek. Vzniklý eluát byl použit pro molekulárně biologická stanovení.

3.6.2 Identifikace *C. canimorsus* pomocí PCR

Pro identifikaci *C. canimorsus* byl použit postup z publikace Suzuki *et al.*, 2010. Jako pozitivní kontrola byl použit kmen *Capnocytophaga canimorsus* CCM 3709 z České sbírky mikroorganismů.

Vlastní postup:

Byla připravena PCR směs, která obsahovala PCR vodu, primery CAL2 a CAR, PPP Master mix, množství jednotlivých složek je uveden v tabulce číslo 7. Vzniklá směs (25 µl) byla vložena do termocykleru, kde probíhala vlastní PCR, detailní popis je uveden v tabulce číslo 8.

Tabulka 7 – Příprava PCR směsi pro identifikaci C. canimorsus

| Reagencie | Objem jednoho vzorku (25 µl) |
|----------------|------------------------------|
| PCR voda | 9,25 µl |
| Primer CaR | 0,125 µl |
| Primer CaL2 | 0,125 µl |
| PPP master mix | 12,5 µl |
| Buněčný lyzát | 3 µl |

Tabulka 8 – PCR cyklus při identifikaci *C. canimorsus*

| Fáze | Teplota, čas | Opakování |
|----------------------|------------------|-----------|
| Počáteční denaturace | 95 °C, 5 minut | - |
| Denaturace | 95 °C, 30 sekund | |
| Annealing | 58 °C, 1 minuta | 35krát |
| Extenze | 72 °C, 1 minut | |
| Závěrečná elongace | 72 °C, 7 minut | - |

Při průběhu PCR byl připraven 1,5% agarózový gel. Bylo smícháno 1,2 g agarózy a 80 ml 1x TBE pufu, směs byla zahřívána v mikrovlnné troubě a po zchladnutí na cca 60 °C byly přidány 4 µl ethidium bromidu. Gel byl nalit do připravené formy. Po odstranění bublinek byl vložen hřebínek na vytvoření jamek pro vzorek, tuhnutí probíhalo 20-30 minut. Gel byl umístěn do vany pro elektroforézu a zalit 1x TBE pufrem, dokud nebyl ponořen.

Po dokončení PCR bylo přeneseno na gel 10 µl amlifikovaného PCR produktu a 5 µl DNA markeru o velikosti 155-970 bp. Elektroforéza probíhala 50 minut, při 100 V a 400 mA. Gel byl po dokončení elektroforézy vložen do UV transluminátoru, kde byl vizualizován.

3.6.3 Identifikace *C. cynodegmi* pomocí PCR

U identifikace *Capnocytophaga cynodegmi* bylo postupováno stejně jako u identifikace *Capnocytophaga canimorsus*, protokol byl proveden podle Suzuki *et al.*, 2010. Jediný rozdíl byl v použití primerů. Pro *C. cynodegmi* byly použity primery CaL2 a CyR.

3.6.4 PCR-RFLP dle Van Dam *et al.*, 2009

Optimalizace metody:

Počáteční PCR byla úspěšně optimalizována na referenční kultuře *C. canimorsus* CCM 3709. Při optimalizaci restrikční směsi byl zkoumán nejlepší poměr jednotlivých látek v restrikční směsi. Pro vybrání optimálních poměrů objemů, byly testovány varianty uvedené v tabulce 9.

Tabulka 9 – Optimalizace složení restrikční směsi

| Restrikční směs | 1 | 2 | 3 |
|----------------------|---------|---------|--------|
| PCR voda | 21,5 µl | 20,5 µl | 19 µl |
| Cut Smart | 2,5 µl | 2,5 µl | 2,5 µl |
| Amplikon | 0,5 µl | 1 µl | 3 µl |
| <i>MseI/StyI</i> -HF | 0,5 µl | 1 µl | 0,5 µl |

Dále byla optimalizována koncentrace agarózového gelu. Restrikční směsi 1 a 2 (viz tabulka 9) byly detekovány na 3% gelu, v 1x TBE, 2 hodiny, 400 mA, 100 V. Po provedené elektroforéze nebyly fragmenty vizualizovány. Rozštěpený amplikon byl detekován při následujícím složení směsi: 19 µl PCR vody, 2,5 µl Cut Smart, 3 µl amplikonu a 0,5 µl restrikčního enzymu (restrikční směs 3 v tabulce 9). Byl použit 1,5% gel, 1x TBE, 1 hodina, 400 mA, 100 V. Tímto postupem byly získány restrikční profily, které byly dobře viditelné po osvětlení UV světlem.

Vlastní postup:

Protokol byl převzat od Van Dam *et al.*, 2009. Nejprve byla připravena PCR směs, která obsahovala PCR vodu, primery STR1 a STR2, PPP Master mix. Jednotlivé zastoupení složek je uvedeno v tabulce 10.

Tabulka 10 –PCR-RFLP reakční směs pro vznik amplikonů cca 2000 bp

| Reagencie | Objem jednoho vzorku (25 µl) |
|----------------|------------------------------|
| PCR voda | 9,25 µl |
| Primer STR1 | 0,125 µl |
| Primer STR2 | 0,125 µl |
| PPP master mix | 12,5 µl |
| Buněčný lyzát | 3 µl |

Vzorky byly vloženy do termocykleru, kde proběhla PCR. Teplotní program probíhal dle parametrů v tabulce 8. Po amplifikaci DNA byla provedena elektroforéza, 10 µl amplikonu a 5 µl DNA markeru (100-3000 bp) bylo naneseno na 1% agarózový gel. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 100 V a 400 mA. Gel byl po elektroforéze vizualizován pomocí transluminátoru. Pro pokračování metody se při vyhodnocení hledaly amplikony o velikosti 2190 bp, které byly následně podrobeny restrikčnímu štěpení.

Dále byla připravená restrikční směs o objemu 25 µl, složení směsi je uvedeno v tabulce 9, restrikční směs 3. Restrikční směs se nechala inkubovat v termobloku nejdříve při 37 °C 15 minut a následně byla provedena inaktivace enzymu při 65 °C po dobu 20 minut. Takto připravená směs byla smíchána s vkladacím pufrem a nanesena na 1,5% gel. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 100 V a 400 mA v 1x TBE pufru. Po skončení elektroforézy byl gel vizualizován pomocí UV stanice BioRad CFX.

3.6.5 PCR-RFLP dle Ciantar *et al.*, 2005

Optimalizace metody:

PCR uvedená ve studii podle Ciantar *et al.*, 2005 byla optimalizována pro tento postup. Pro elektroforézu byl zvolen 0,8% gel, 100 V 400 mA, po dobu 60 minut. Objemy jednotlivých složek restriční směsi byly optimalizovány a vizualizace fragmentů probíhala na 1,5% agarózovém gelu, 60 minut, 100 V a 400 mA.

Vlastní postup:

Podle Ciantar *et al.*, byly nasyceny primery Capno-fw, Cano-rev, sekvence primerů je uvedena v tabulce 5. (*Seznam použitých primerů*). Při přípravě PCR směsi bylo postupováno dle tabulky 11. Následně byly vzorky vloženy do termocykléru a byla provedena PCR, jejíž průběh je zaznamenán v tabulce 12.

Tabulka 11 – PCR směs pro vznik aplikoni cca 1500 bp

| Reagencie | Objem jednoho vzorku (25 μ l) |
|------------------|-----------------------------------|
| PCR voda | 9,25 μ l |
| Primer Capno-fw | 0,125 μ l |
| Primer Capno-rev | 0,125 μ l |
| PPP Master mix | 12,5 μ l |
| Buněčný lyzát | 3 μ l |

Tabulka 12 – Průběh PCR pro PCR-RFLP dle Ciantar

| Fáze | Teplota, čas | Opakování |
|----------------------|-----------------|-----------|
| Počáteční denaturace | 95 °C, 5 minut | - |
| Denaturace | 94 °C, 1 minuta | |
| Annealing | 54 °C, 1 minuta | 29krát |
| Extenze | 72 °C, 1 minut | |
| Poslední elongace | 72 °C, 5 minut | - |

Po PCR byla provedena elektroforetická detekce. Byl připraven 0,8% agarózový gel (0,64 g agarózy a 80 ml 1x TBE). Do gelu byly přidány 4 μ l ehtidium bromidu. Na gel bylo dávkováno 10 μ l aplikonu a 5 μ l DNA markeru (100-3000 bp). Elektroforéza probíhala při 100 V, po dobu 60 minut v 1x TBE pufru. Gel byl vizualizován pomocí transluminátoru,

kde byl očekávaný amplikon cca 1500 bp. Dále byla připravena reakční směs PCR-RFLP, složení je uvedeno v tabulce 13.

Tabulka 13 – Restrikční směs pro PCR-RFLP dle Ciantar

| Reagencie | Objem jednoho vzorku (25 µl) |
|-------------|------------------------------|
| PCR voda | 19 µl |
| CutSmart | 2,5 µl |
| Amplikon | 3 µl |
| <i>MseI</i> | 0,5 µl |

Takto připravená směs byla v termobloku inkubována při 37 °C po dobu 15 minut a následně byla reakce ukončena při 65 °C po dobu 20 minut. Dále byl připraven 1,5% agarózový gel, do kterého bylo napipetováno 10 µl vzorku s vkládacím pufrem a 5 µl DNA markeru (155-970 bp). Gel byl pomocí UV stanice Biorad vizualizován.

3.6.6 Sérotypizace izolátu *C. canimorsus*

Optimalizace metody:

V prvním kroku byla sérotypizaci podrobena referenční kultura *C. canimorsus* CCM 3709. Tato kultura byla testována na sérotyp A, B, C, D a E. Pozitivní výsledek byl detekován u sérotypu C. V druhém kroku byly testovány lyzáty čistých kultur *C. canimorsus* získané z tlamy psů. U sérotypu A, D, E nebyl patrný žádný PCR produkt a u sérotypu B a C vznikaly nespecifické produkty především v oblasti pod 150 bp. Lyzáty byly proto přečištěny pomocí QIAamp®DNA Mini Kit. Přečištění pomohlo odstranit některé nespecifické produkty, ale nepodařilo se nám získat očekávaný produkt o velikosti 1000 bp.

Dále jsme se pokoušeli optimalizovat objem PCR směsi. Byly zvoleny varianty, které jsou uvedeny v tabulce 14. Byla provedená PCR a elektroforéza. Na výsledném agarózovém gelu byly viditelné produkty pouze v nespecifické oblasti.

Tabulka 14 – Optimalizace PCR směsi pro sérotypizaci

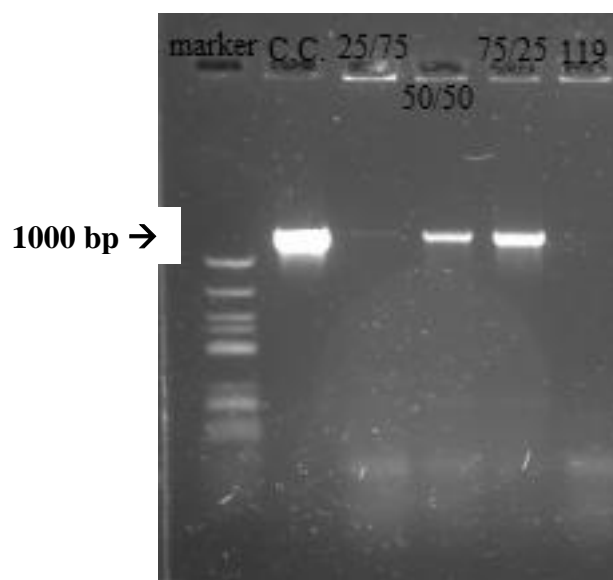
| PCR směs | 1 směs | 2 směs |
|----------------|----------|----------|
| PCR voda | 9,25 µl | 6,25 µl |
| Primer | 0,125 µl | 0,125 µl |
| Primer | 0,125 µl | 0,125 µl |
| PPP Master mix | 12,5 µl | 12,5 µl |
| Vzorek | 3 µl | 6 µl |

Také byly upravovány koncentrace primerů. Počáteční koncentrace primerů byla 100 pmol/μl. Primery byly 2krát, 5krát a 10krát naředěny a koncentrace vzniklá naředěním byla 50 pmol/μl, 20 pmol/μl a 10 pmol/μl. Naředění primerů vedlo k nedostatečné amplifikaci a produkt v elektroforetickém gelu nebyl zaznamenán.

Provedeno bylo také ověření, zda nedochází k interferencím a nespecifickému nasedání primerů. Referenční kultura *C. canimorsus* byla smíchána s izolátem, který poskytoval nespecifické reakce (kmen číslo 119). Jednotlivé poměry směsi jsou uvedeny v tabulce 15 a na obrázku 11 je zobrazen výsledný gel.

Tabulka 15 – Ověření interference u sérotypizace, složení jednotlivých směsí z referenční *C. canimorsus* a kmene 119

| Vzorek | Referenční <i>C. canimorsus</i> | | Kmen 119 | |
|--------|---------------------------------|------------|----------------|------------|
| | Zastoupení (%) | Objem (μl) | Zastoupení (%) | Objem (μl) |
| 1 | 100 | 3 | 0 | 0 |
| 2 | 75 | 2,25 | 25 | 0,75 |
| 3 | 50 | 1,5 | 50 | 1,5 |
| 4 | 25 | 0,75 | 75 | 2,25 |
| 5 | 0 | 0 | 100 | 3 |



Obrázek 11 – Sérotypizace – ověření interference a nespecifického nasedání primerů, marker 155-970 bp, C.C. – *C. canimorsus* (pozitivní kontrola), 25/75 – poměr smíchání vzorků – tabulka 15, vzorek 4, 50/50 – poměr smíchání vzorků – tabulka 15, vzorek 3, 75/25 – poměr smíchání – tabulka 15, vzorek 2, 119 – kmen 119

Výsledky ukazují, že PCR reakci neovlivňuje žádná interferující látka obsažená ve vzorku DNA izolovaného z psí tlamy.

Vlastní postup:

Protokol byl převzat od Hess *et al.*, 2018. Byla připravena PCR směs, která obsahovala PCR vodu, primery SeroA-fw a SeroA-rev a PPP Master Mix. V tabulce 16 je uveden objem jednotlivých složek na přípravu PCR směsi. Dále byla směs vložena do termocykleru, kde byl zvolen program, jehož jednotlivé kroky jsou uvedeny v tabulce 17.

Tabulka 16 – Složení PCR směsi – sérotypizace

| Reagencie | Objem jednoho vzorku (25 μ l) |
|------------------|-----------------------------------|
| PCR voda | 9,25 μ l |
| Primer SeroA-fw | 0,125 μ l |
| Primer SeroA-rev | 0,125 μ l |
| PPP Master mix | 12,5 μ l |
| Buněčný lyzát | 3 μ l |

Tabulka 17 – PCR cyklus sérotypizace

| Fáze | Teplota, čas | Opakování |
|----------------------|------------------|-----------|
| Počáteční denaturace | 95 °C, 4 minut | |
| Denaturace | 95 °C, 30 sekund | |
| Annealing | 52 °C, 45 sekund | 34krát |
| Extenze | 72 °C, 90 sekund | |
| Poslední elongace | 72 °C, 7 minut | |

Po skončení PCR bylo 10 μ l amplikonu a 5 μ l markeru o velikosti 155-970 bp napipetováno na 1,5% agarózový gel. Elektroforéza probíhala 1 hodinu při 100 V a 400 mA v 1 x TBE pufru. Výsledný gel byl vizualizován pomocí transluminátoru.

Ostatní sérotypy (B, C, D, E) byly zjišťovány podle stejného protokolu jako sérotyp A.

3.6.7 Hodnocení tvorby biofilmu Christensenovou metodou

Vlastní postup:

Nejprve byla připravena bakteriální suspenze o denzitě 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice ($1,5 \cdot 10^8$ CFU/ml). Do všech jamek mikrotitrační destičky bylo napipetováno 90 μ l BHI nebo TSB bujónu a následně bylo do každé jamky přidáno 10 μ l připravené buněčné suspenze. Výsledný objem v každé jamce byl 100 μ l. Destička byla inkubována 3 a 7 dní.

Po proběhlé inkubaci byla u destičky proměřena spektrofotometricky absorbance při vlnové délce 595 nm. Obsah destičky byl vyklepnut do odpadu a destička byla 3krát opatrně promyta destilovanou vodou. Následně byla destička 15-30 minut sušena v termostatu. Po vysušení bylo přidáno do každé jamky 100 µl 2% octanu sodného, který zafixovává biofilm. Fixace probíhala 15 minut, potom byl obsah destičky vyklepnut do odpadu. Následovalo napipetování 100 µl krystalové violeti, která působila 15 minut. Obarvená destička byla 5krát opatrně promyta destilovanou vodou a vysušena. Do každé jamky bylo napipetováno 200 µl 96% ethanolu a destička byla 5 minut vortexována. Z původní destičky bylo přeneseno 100 µl do nové mikrotitrační destičky, byla zachována poloha jamek. U nové destičky byla na spektrofotometru proměřena absorbance při vlnové délce 595 nm. Naměřené výsledky byly zpracovány.

3.6.8 Typizace *C. canimorsus* pomocí systému BIOLOG GEN III^{MT}

Jedná se o standardizovanou mikrometodu, která pomocí 94 biochemických testů profiluje a identifikuje bakterie. Identifikace probíhá pomocí fenotypového vzoru GEN III softwarem Biolog Microbial Identification Systems. V tabulce 18 je zobrazeno rozmístění jednotlivých testů. 1.-9. sloupec obsahuje organické sloučeniny, sloužící jako možný zdroj uhlíku pro metabolismus testovaných mikroorganismů ve sloupci 10.-12. se stanovuje citlivost na chemické látky. Podle kompletních výsledků jednotlivých testů se následně stanovuje „fenotypový otisk“ mikroorganismu, který je identifikován.

Vlastní postup:

Nejprve je vybrán protokol, podle typu mikroorganismu, který má být identifikován (např. kvasinky, plísně, anaerobní či aerobní bakterie atd.). Protokoly se mezi sebou liší tím, kolik buněk je odebráno na vytvoření zákalu a v inokulační tekutině, jinak se provádějí stejným způsobem. Pro rod *Capnocytophaga* byl vybrán protokol C2, který je vhodný pro kultivačně náročné, kapnofilní a na kyslík citlivé gram negativní bakterie. Optimální zákal v tomto protokolu je 62-68 %.

Na krevním agaru byla kultivována čistá kultura kapnocytofágy (4-5 dní), která byla poté přenesena do inokulační tekutiny. Byl vytvořen zákal o doporučené hustotě buněk. Zákal byl měřen turbidimetrem. Do každé jamky mikrotitrační destičky GEN III bylo napipetováno 100 µl suspenze inokulační tekutiny. Destička byla inkubována 25 hodin při 37 °C v CO₂ atmosféře. Následně byl mikroorganismus identifikován na základě vyhodnocení souboru biochemických testů pomocí softwaru Biolog Microbial Identification Systems.

Tabulka 18 – Rozmístění biochemických testů na destičce

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|---|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|---------------------|-------------------|
| A | Neg. kontrola | Dextrin | D-maltóza | D-trehalóza | D-celobióza | Gentio-bióza | Sacharóza | D-turanóza | Stachyóza | Poz. kontrola | pH 6 | pH 5 |
| B | D-rafinóza | α -D-laktóza | D-melibióza | β -methyl-D-glukosid | D-salicin | N-acetyl-D-glukosamin | N-acetyl- β -D-mannosamin | N-acetyl-D-galaktosamin | Kys. N-acetylneuraminová | 1% NaCl | 4% NaCl | 8% NaCl |
| C | α -D-glukóza | D-manóza | D-fruktóza | D-galak-tóza | 3-methyl-glukóza | D-fukóza | L-fukóza | L-ramnóza | Inosin | 1% laktát sodný | Kys. fusidová | D-serin |
| D | D-sorbitol | D-manitol | D-arabitol | Myo-inositol | Glycerol | D-glukóza-6-PO ₄ | D-fruktóza-6-PO ₄ | Kys. D-asparágová | D-serin | Troleandomycin | Rifamycin SV | Mino-cyklin |
| E | Želatina | Glycyl-L-prolin | L-alanin | L-arginin | Kys. L-asparágová | Kys. glutamová | L-histidin | Kys. L-pyroglutamová | L-serin | Linkomycin | Guanidin HCl | Niaproof 4 |
| F | Pektin | Kys. D-galakturonová | Lakton kys. L-galaktónové | Kys. D-glukonová | Kys. D-glukuronová | Glukuronamid | Kys. mucinová | Kys. chini-nová | Kys. D-sacharidová | Vankomycin | Tetrazolová fialová | Tetrazoliová modř |
| G | P-hydroxyf enyl-octová kys. | Methyl-pyruvát | Methyl-ester kys. D-mléčné | Kys. L-mléčná | Kys. citrónová | Kys. α -keto-glutarová | Kys. D-jablečná | Kys. L-jablečná | Kys. bromo-sukcinová | Kys. nalidixová | Chlorid lithný | Tellurid draselný |
| H | Tween 40 | Kys. γ -aminobutry-nová | Kys. α -hydroxymáselná | Kys. β -hydroxy-D,L-máselná | Kys. α -keto-máselná | Kys. acetová | Kys. propio-nová | Kys. octová | Kys. mravenčí | Aztreonom | Butyrát sodný | Bromičnan sodný |

Poznámka: Kys. – kyselina

Vyhodnocení:

Během inkubace dochází ke zvýšené respiraci, která způsobuje redukcí terazoliového redoxního barviva a jamka se zbarvuje do fialova. Vyhodnocení se provádí spektrofotometricky.

Ve sloupcích 1-9 se stanovují biochemické testy na využívání uhlíku. Jamka A1 je negativní kontrola. Pokud se jamky podobají jamce A1 (bezbarvé), hodnotí se jako negativní. Pokud jsou jamky fialové, jsou hodnoceny jako pozitivní. Pokud jsou všechny jamky ve sloupcích 1-9 pozitivní, nejspíš byl špatně zvolen protokol nebo bylo nadměrné množství inokula nebo byl špatně nakalibrován turbidimetr. Pokud ale jsou všechny jamky ve sloupcích 1-9 negativní, mikroorganismy jsou extrémně pomalu rostoucí, citlivé na kyslík, dále mohlo dojít k přehřátí inokulační tekutiny nebo byl špatně nakalibrován turbidimetr.

Ve sloupcích 10-12 se stanovuje chemická citlivost bakteriální kultury k vybraným látkám. Pozitivní kontrola se nachází v jamce A10. Ostatní jamky ve sloupcích 10-12 ověřují citlivost na inhibiční chemickou látku či antibiotikum. Pokud mají jamky o polovinu nižší barvu než pozitivní kontrola (A10), je jamka považována za negativní. Jamky, které jsou podobně fialové jako A10, se považují za pozitivní. Dále lze jamky hodnotit jako hraniční, pokud existuje nejistota interpretace.

4 Výsledky a diskuze

Cílem této práce bylo aplikovat typizační metody na potenciálně patogenní izoláty bakterie *C. canimorsus* izolované z psí dutiny ústní. K tomuto účelu byla zavedena a optimalizována PCR-RFLP metoda. Dále jsme se pokusili prostřednictvím PCR určit sérotyp izolátů *C. canimorsus* a ověřit možnou tvorbu biofilmu Christensenovou metodou. Pro tuto práci bylo vybráno 64 kmenů, které byly uskladněny v -80 °C. Seznam je uveden v kapitole 3.5 Použité kmeny a izoláty *Capnocytophaga* spp. Získané výsledky jsou popsány níže.

4.1 Izolace čisté kultury *Capnocytophaga canimorsus* a její identifikace

Pro většinu typizačních metod a identifikaci mikroorganismu je potřeba izolovat čistou kulturu. Pro tento postup bylo použito 6 vzorků výtěrů z dutiny ústní psů uchovávaných v BHI bujónu a zamražených na -80 °C. Izolace byla prováděna na agarových plotnách s krevním agarem a gentamicinem, na který bylo nanášeno 100 µl rozmrazené směsné kultury (získána výtěrem dutiny ústní psů). Vzorky byly na misky nanášeny v triplicátech inkubovány 4-5 dní v prostředí 5% CO₂, při 37 °C. Z Petriho misek byly vybrány typické kolonie pro *Capnocytophaga canimorsus*, které byly odebrány a přeočkovány na další krevní agar. Po 4-5 dnech, kdy přeočkované kolonie vyrostly, bylo provedeno barvení dle Grama a test na přítomnost cytochromoxidázy a katalázy. Pokud byly přítomny kataláza a oxidáza pozitivní gram negativní tyčky typického vzhledu pro *C. canimorsus*, byla izolována jejich DNA a provedena PCR pro průkaz *C. canimorsus* nebo *C. cynodegmi*. Například u vzorku číslo 51 bylo izolováno 5 různých kolonií, výsledky jednotlivých testů u izolovaných kolonií vzorku číslo 51 jsou uvedeny v tabulce 19. Provedená PCR byla negativní na přítomnost *C. canimorsus*. Následně byla provedena PCR, kde byla prokázána přítomnost *C. cynodegmi*.

Tabulka 19 – Výsledky barvení dle Grama a testů na přítomnost katalázy a cytochromoxidázy u vzorku číslo 51

| Vzorek | Barvení dle Grama | Kataláza | Oxidáza |
|--------|----------------------|----------|---------|
| 51a | G – tyčky | + | - |
| 51b | G – tyčky a G + koky | + | - |
| 51c | G – tyčky | + | - |
| 51d | G – tyčky | + | - |
| 51e | G – tyčky | + | - |

Poznámka: „+“ – pozitivní reakce, „-“ – negativní reakce

Dále byly izolovány suspektní kolonie ze vzorku s označením 12, ze kterého bylo izolováno 6 podezřelých kolonií. Výsledky k jednotlivým izolovanými koloniím jsou zaznamenány v tabulce 20.

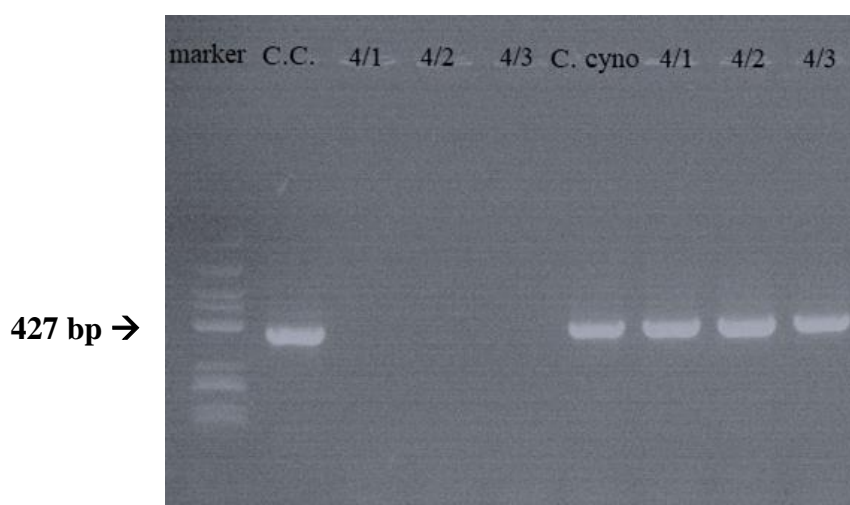
Tabulka 20 – Výsledky barvení dle Grama a testů na přítomnost katalázy a cytochromoxidázy u vzorku číslo 12

| Vzorek | Barvení dle Grama | Kataláza | Oxidáza |
|--------|-------------------|----------|---------|
| 12a | G – tyčky | + | - |
| 12b | G – tyčky | + | - |
| 12c | G + tyčky | + | - |
| 12d | G + tyčky | + | - |
| 12e | G – tyčky | + | - |
| 12f | G – tyčky | + | + |

Poznámka: „+“ – pozitivní reakce, „-“ – negativní reakce

Pouze vzorek 12f, který byl kataláza a oxidáza pozitivní, byl otestován na přítomnosti *C. canimorsus*. Zjištěna byla nepřítomnost DNA *C. canimorsus*. Následně byla provedena PCR pro detekci *Capnocytophaga cynodegmi*, která byla prokázána.

Dále byly izolovány kolonie ze vzorku číslo 4, zde byly získány 3 čisté kolonie (4/1, 4/2, 4/3). Pro typický pohyb na krevním agaru byla rovnou provedena PCR pro *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*. Výsledek je patrný na obrázku 12, kde je prokázána nepřítomnost DNA *C. canimorsus* a přítomnost DNA *C. cynodegmi*.



Obrázek 12 – Identifikace *C. cynodegmi* pomocí PCR, marker 155-970, C.C. – *Capnocytophaga canimorsus* (pozitivní kontrola), *C. cyn.* – *Capnocytophaga cynodegmi* (pozitivní kontrola), 4/1, 4/2, 4/3 – testovaný lyzát

Podle Butler, 2015 je možné vykultivovat a izolovat častěji *C. cynodegmi* než *C. canimorsus*. To potvrzují i naše výsledky, protože z šesti výtěrů dutiny ústní psů se podařilo izolovat suspektní kolonie jen u tří z nich a ty byly prokázány jako *C. cynodegmi*, přestože PCR výtěrů z BHI bujónu potvrdila přítomnost DNA i *C. canimorsus*, kterou se nám vyizolovat nezdařilo.

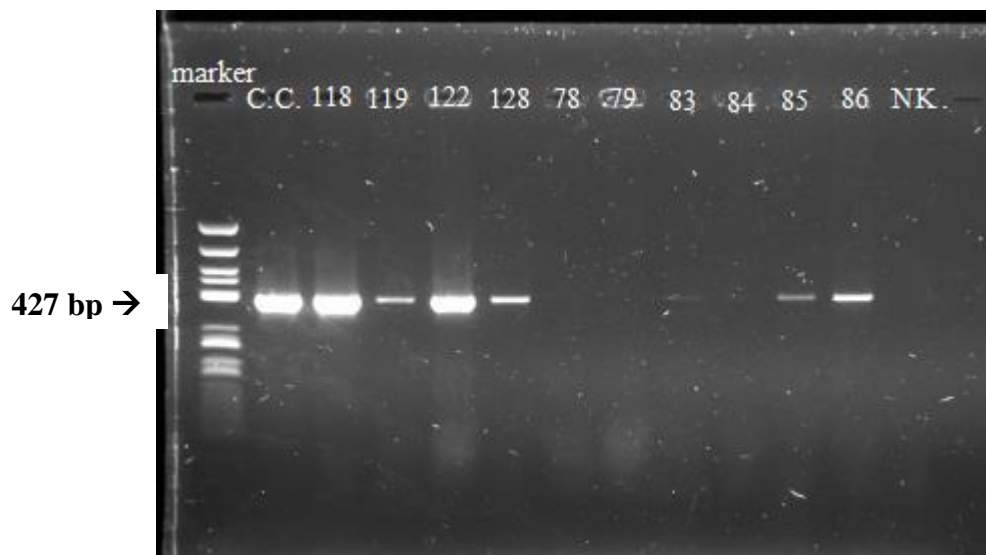
Samostatná kultivace rodu *Capnocytophaga* je náročná a organismus je považován za obtížně kultivovatelný. Důvodem jsou především specifické požadavky na růstové faktory, CO₂ atmosféru a dlouhá inkubační doba růstu. Zároveň významně ovlivňuje růst i přítomnost doprovodné mikroflóry, která může růst rychleji a přerůst *C. canimorsus* nebo může její růst inhibovat. Některé výtěry ze psí tlamy se nezdařilo kultivovat vůbec, zde mohlo být příčinou špatné zamrazení buněčného suspenze, kdy přítomné buňky po rozmrazení byly mrtvé.

4.2 Identifikace *Capnocytophaga canimorsus* pomocí PCR

Tato metoda byla publikována Michio Suzuki a kolegy v roce 2010. Při identifikaci *C. canimorsus* byl detekován gen 16S rRNA. Výsledný amplikon, při přítomnosti DNA *C. canimorsus*, měl velikost 427 bp. Identifikace *C. canimorsus* byla provedena u 29 izolátů, z toho u 16 z nich byla prokázána přítomnost *Capnocytophaga canimorsus*, a u 8 byla detekována přítomnost *C. cynodegmi*. Seznam vzorků je uveden v tabulce 21. Na obrázku 13 je zobrazen agarózový gel, na kterém jsou kmeny, u kterých byla detekována DNA *C. canimorsus*.

Tabulka 21 – Seznam identifikovaných kmenů *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* metodou PCR

| Označení kmene | Identifikace | Označení kmene | Identifikace |
|----------------|----------------------|----------------|----------------------|
| CCM 3709 | <i>C. canimorsus</i> | 4/2 | <i>C. cynodegmi</i> |
| DSM 19736 | <i>C. cynodegmi</i> | 4/3 | <i>C. cynodegmi</i> |
| 118 | <i>C. canimorsus</i> | 7 | <i>C. cynodegmi</i> |
| 119 | <i>C. canimorsus</i> | 12 | <i>C. cynodegmi</i> |
| 122 | <i>C. canimorsus</i> | 158 | Neprokázáno |
| 128 | <i>C. canimorsus</i> | 159 | <i>C. canimorsus</i> |
| 78 | Neprokázáno | 160 | <i>C. canimorsus</i> |
| 79 | Neprokázáno | 161 | <i>C. canimorsus</i> |
| 83 | <i>C. canimorsus</i> | 162 | <i>C. canimorsus</i> |
| 84 | <i>C. canimorsus</i> | 163 | <i>C. canimorsus</i> |
| 85 | <i>C. canimorsus</i> | 164 | Neprokázáno |
| 86 | <i>C. canimorsus</i> | 165 | <i>C. canimorsus</i> |
| 51 | <i>C. cynodegmi</i> | 166 | <i>C. canimorsus</i> |
| 4 | <i>C. cynodegmi</i> | 167 | Neprokázáno |
| 4/1 | <i>C. cynodegmi</i> | | |



Obrázek 13 – Identifikace *C. canimorsus* pomocí PCR, marker o velikosti 155-970 bp, C.C. – referenční kultura *C. canimorsus*, 118, 119, 122, 128, 78, 79, 83, 84, 85, 86 – označení kmenů, NK. – negativní kontrola

Tato metoda identifikace *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* je velmi přesná a spolehlivá, umožní detekovat tyto bakterie i ze vzorků s obsahem konsorcia mikroorganismů, které se velmi obtížně kultivují. Obtížnou kultivovatelnost *C. canimorsus* potvrzujeme i v této diplomové práci. Upuštění od klasických kultivačních technik a využití výše zmíněného postupu najdeme ve studiích Umeda *et al.*, 2014, Nogueira *et al.*, 2021 nebo Knabl *et al.*, 2020.

4.3 PCR-RFLP dle Van Dam *et al.*, 2009

Metoda podle Van Dam z roku 2009 byla vybrána a byla aplikována na *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*. Cílem bylo zjistit, zda *C. canimorsus* je geneticky homogenní nebo heterogenní druh. PCR-RFLP byla úspěšně optimalizována a dále aplikována na kmeny z přirozeného prostředí. Počáteční PCR byla provedena u 45 lyzátů, získaných z bakteriálních kultur *C. canimorsus* izolovaných z psí dutiny ústní. Seznam kmenů a izolátů s výsledkem aplikované metody je uveden v tabulce 22. U 11 vzorků byl detekován amplikon v oblasti 2000 bp. Výsledek PCR je zobrazen na obrázku 14. Následná restrikce pomocí restrikčního enzymu *MseI* je zobrazena na obrázku 15.

Tabulka 22 – Seznam kmenů a izolátů, u kterých byla provedena PCR-RFLP dle Van Dam *et al.*, 2009

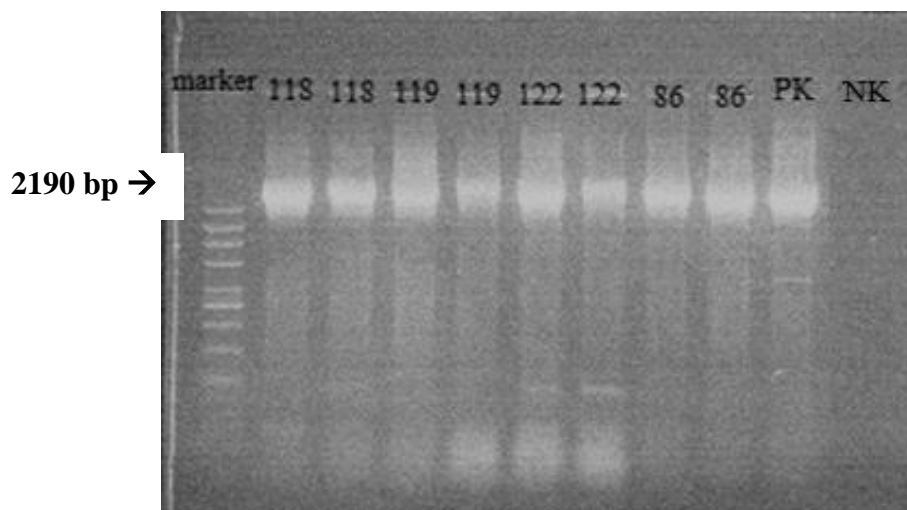
| Označení kmene | PCR-RFLP | Označení kmene | PCR-RFLP |
|----------------|----------|----------------|----------|
| CCM 3709 | + | 76 | - |
| DSM 19736 | - | 77 | - |
| 118 | + | 80 | - |
| 119 | + | 87 | - |
| 122 | + | 88 | - |

Poznámka: „+“ – metoda provedena úspěšně, „-“ – metoda byla provedena neúspěšně

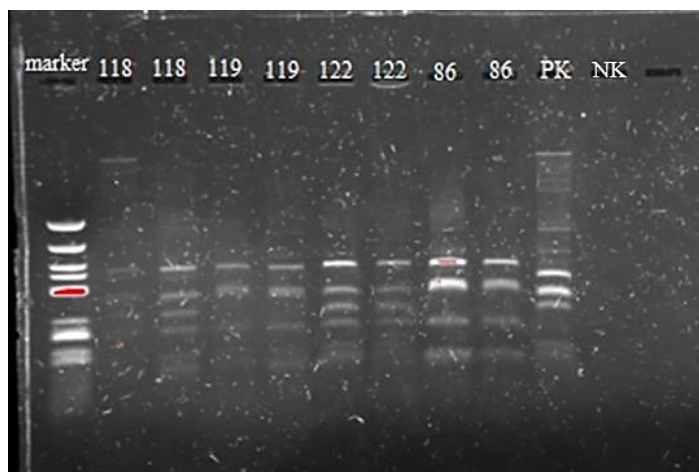
Tabulka 22 – Pokračování – Seznam kmenů a izolátů, u kterých byla provedena PCR-RFLP dle Van Dam et al., 2009

| Označení kmene | PCR-RFLP | Označení kmene | PCR-RFLP |
|----------------|----------|----------------|----------|
| 128 | + | 91 | - |
| 78 | - | 92 | - |
| 79 | + | 96 | - |
| 83 | + | 97 | - |
| 84 | + | 100 | - |
| 85 | - | 101 | - |
| 86 | + | 104 | - |
| 51 | + | 112 | - |
| 12 | - | 119 | - |
| 61 | - | 172 | - |
| 62 | - | 196 | - |
| 66 | - | 197 | - |
| 68 | - | 198 | - |
| 69 | - | 199 | - |
| 72 | - | 200 | - |
| 74 | - | 201 | - |
| 75 | - | | |

Poznámka: „+“ – metoda provedena úspěšně, „-“ – metoda byla provedena neúspěšně

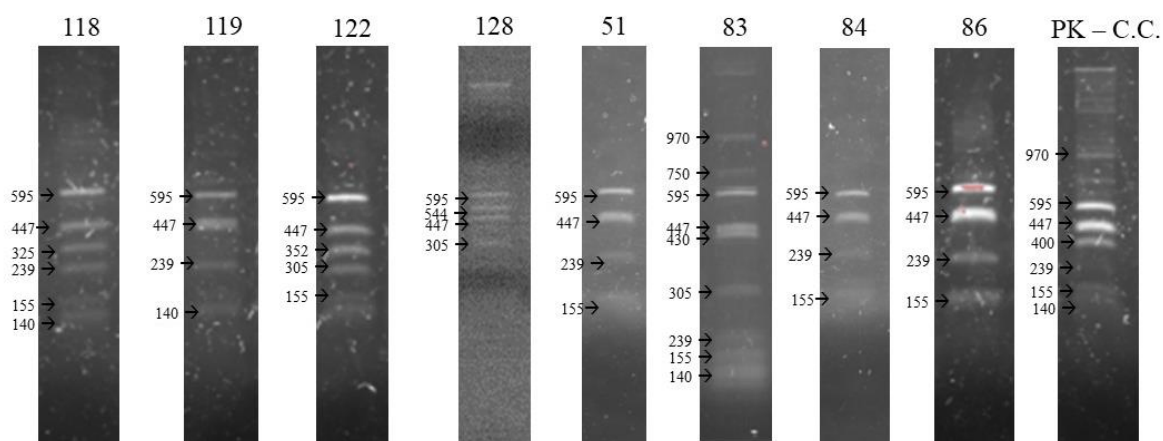


Obrázek 14 – PCR pro vznik amplikonů cca 2000 bp, marker 200-1500 bp, vzorky byly nanášeny v doubletu, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola



Obrázek 15 – Restrikce enzymem *MseI*, marker 155-970 bp, vzorky jsou nanášeny v doubletu, PK – pozitivní kontrola, NK – negativní kontrola

Restrikční profily vytvořené restrikčním enzymem *MseI* jednotlivých kmenů, u kterých jsou určeny velikosti jednotlivých fragmentů jsou zobrazeny na obrázku 16.



Obrázek 16 – Restrikční profil jednotlivých kmenů *C. canimorsus*, jako restrikční endonukleáza byl použit enzym *MseI*

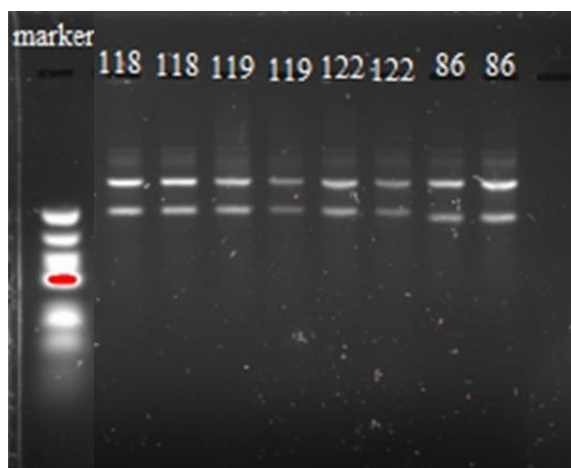
Van Dam a jeho kolektiv ve své studii získali pomocí restrikčního enzymu *MseI* u různých kmenů opakující se 3 různé restrikční profily pro *C. canimorsus* a 2 různé profily pro *C. cynodegmi*. Restrikční profily pro *C. canimorsus* se skládaly z 9 fragmentů. Námi získané kmeny měly v průměru 4-6 fragmentů, pouze kmen 83 měl 9 fragmentů. Tento kmen by se mohl shodovat s některými fragmenty nacházejícími se u restrikčního profilu *C. canimorsus* od Van Dam, 2009. Konkrétně s restrikčním profilem Ccan2 nebo Can3. U Ccan2 se shoduje s fragmenty mezi velikostmi 300-400 bp a u Ccan3 je shoda s fragmenty nacházejícími se mezi velikostmi 100-200 bp.

Referenční kmen *C. canimorsus*, který byl izolován z lidské rány, se shodoval s kmeny z publikace pouze ve fragmentu o velikosti 400 bp. Tento kmen byl naštěpen na 7 fragmentů

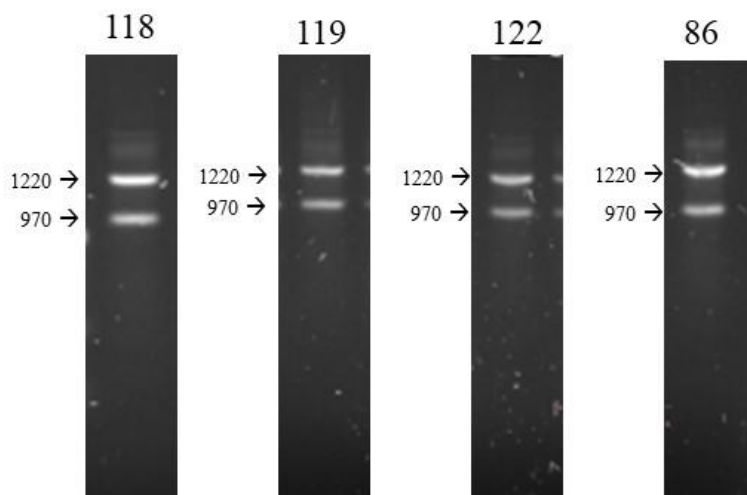
a největší shoda byla s Ccan3. U ostatních kmenů, které byly získané z psí tlamy, nebyla nalezena významná shoda s restrikčními profily z publikace. Lišily se počtem fragmentů a jejich velikostmi. V publikaci byly použity kmeny izolované z lidských ran, naše kmeny byly získány z psí tlamy, to je nejspíše důvod neshody.

Při srovnání restrikčních profilů provedených v této diplomové práci byly nalezeny shody ve velikostech některých fragmentů. Fragmenty, které se objevily u všech kmenů měly velikost 595 bp a 447 bp. Fragment velikosti 239 bp se vyskytl u 6 z 9 kmenů a restrikční štěp o velikosti 155 bp byl přítomen u 7 z 9 kmenů. Porovnání referenčního kmene *C. canimorsus* s ostatními kmeny byly nalezeny shody v některých fragmentech, ale jinak jsou restrikční profily heterogenní.

Na stejné kmeny byl použit restrikční enzym *StyI*-HF®, na obrázku 17 je zobrazena provedená restrikce. Restrikční profily některých kmenů jsou uvedeny na obrázku 18.



Obrázek 17 – PCR-RFLP provedeno restrikčním enzymem *StyI*-HF®, marker 155-970 bp, vzorky nanášeny v doubletu



Obrázek 18 – Restrikční profil kmenů *C. canimorsus* po působení *StyI*-HF®

Námi testované kmeny *C. canimosus* s označením 118, 119, 122, 86 měly stejný restrikční profil. Amplifikovaná DNA našich testovaných izolátů *C. canimosus* byla shodně naštěpena na dva fragmenty o velikostech 970 a 1220 bp. Van Dam a jeho spolupracovníci ve své studii získali pomocí restrikčního enzymu *StyI* z různých kmenů *C. canimosus* tři opakující se restrikční profily. U prvního kmene jim vznikly fragmenty 1127, 756, 169 a 136 bp. U druhého kmene *C. canimosus* byly fragmenty o velikosti 788, 756, 339, 169 a 136 bp. U třetího kmene byla DNA rozštěpena na 892, 788, 339 a 169 bp. Dále prováděli PCR-RFLP u různých kmenů *C. cynodegmi*, při použití enzymu *StyI* jim vznikl restrikční profil, který byl pro všechny *C. cynodegmi* stejný. Restrikční štěpy tohoto profilu měly velikost 1200 a 890 bp. Námi získané restrikční profily jsou spíše podobné restrikčním profilům *C. cynodegmi* od Van Dam *et al.*, 2009 než restrikčním profilům *C. canimosus*. Ale pomocí PCR máme ověřeno, že použité kmeny jsou *C. canimosus*.

V publikaci byly vzorky získány z hemokultur infikovaných pacientů i ze psí tlamy. Naše kmeny byly získané ze psí tlamy a nedošlo ke shodě se vzorky v publikaci. Dále měli v publikaci k dispozici vyzolované čisté kultury a aplikovali metodu na čisté buněčné lyzáty, ale součástí testování byly i směsné kultury odebrané ze psí tlamy. Většina našich negativních lyzátů, u kterých se nevytvořil počáteční amplikon velikosti cca 2000 bp, byly směsné lyzáty, ve kterých byla přítomna *Capnocytophaga canimosus* a jiné komenzální bakterie psí ústní mikroflóry. Metodu se nám nepodařilo aplikovat na směsné lyzáty, i když jsme měli pomocí PCR prokázanou přítomnost *C. canimosus* nebo *C. cynodegmi*.

Podle studie byla metoda aplikována i na kmen *C. cynodegmi*. My jsme PCR-RFLP aplikovali na 3 kmeny *C. cynodegmi*. Amplikon, který se následně štěpí restrikčním enzymem, se vytvořil pouze u 1 kmene (kmen s označením č. 51). U kmene č. 12 a referenčního kmene *C. cynodegmi* nebyl vytvořen amplikon, proto nemohlo dojít k rozštěpení pomocí *MseI* a *StyI*-HF®. Na základě negativních výsledku u některých vzorků byl testován možný vliv interferujících látek, který nebyl prokázán. Pro vyskytující se falešně negativní výsledky byl testován jiný postup PCR-RFLP.

4.4 PCR-RFLP dle Ciantar *et al.*, 2005

Ciantar a jeho kolektiv se ve své studii zabývali identifikací izolátů *Capnocytophaga* spp. pomocí rRNA PCR-RFLP, kdy následně ověřovali metodu sekvenováním 16S rRNA. My jsme na naše kmeny aplikovali pouze rRNA PCR-RFLP a pro tuto metodu byly vybrány vzorky u nichž byla PCR potvrzena přítomnost DNA *C. canimosus*. Seznam vzorků, na které byla metoda aplikována, je uveden v tabulce 23. Z 28 kmenů se u 15 povedlo vytvořit restrikční

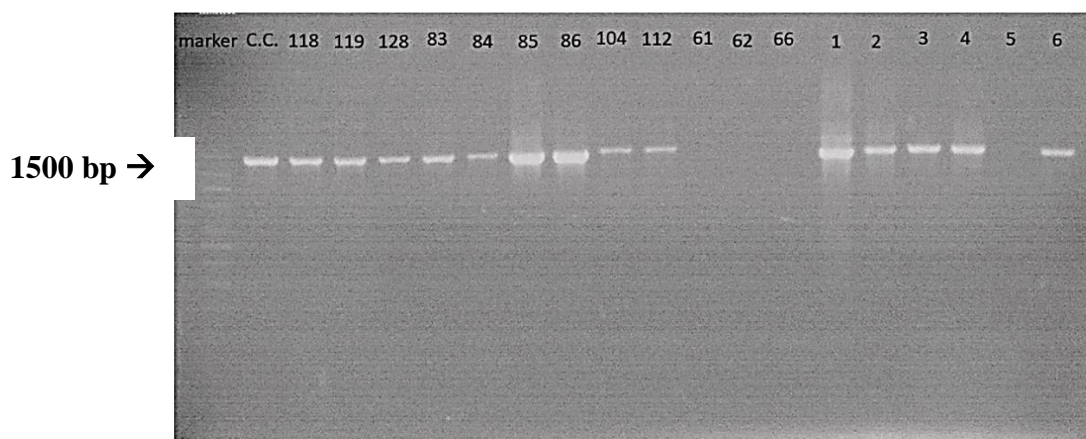
profil, u zbylých 13 nebyl PCR vytvořen amplikon o velikosti cca 1500 bp. Metoda je druhově specifická, proto byly mezi testované vzorky zařazeny i izoláty z lidské dutiny ústní (*C. ochracea* – kmen 1-6) pro porovnání restrikčních profilů a zjištění specificity metody. Jako negativní kontroly byly použity *Bacillus subtilis*, kmen ATCC 6051 a *Pseudomonas aeruginosa*, kmen ATCC 9027.

Tabulka 23 – Seznam kmenů a pro PCR-RFLP dle Ciantar et al., 2005

| Označení kmene | PCR-RFLP | Označení kmene | PCR-RFLP |
|----------------|----------|----------------|----------|
| CCM 3709 | + | 7 | - |
| DSM 19736 | - | 12 | - |
| 118 | + | 104 | + |
| 119 | + | 112 | + |
| 122 | - | 91 | - |
| 128 | + | 92 | - |
| 78 | - | 96 | - |
| 79 | - | 97 | - |
| 83 | + | 1 | + |
| 84 | + | 2 | + |
| 85 | + | 3 | + |
| 86 | + | 4 | + |
| 51 | - | 5 | - |
| 4 | - | 6 | + |

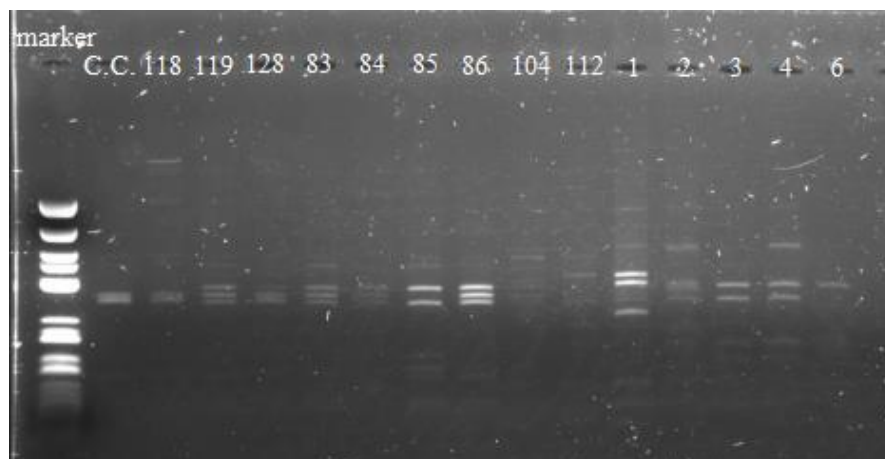
Poznámka: „+“ – metoda provedená se pozitivním výsledkem, „-“ – metoda provedená s negativním výsledkem

Metoda byla po zdařilé optimalizaci aplikována na kmeny z přirozeného prostředí. Nejprve byla provedena PCR, kde došlo k amplifikaci DNA o velikosti 1500 bp. Na obrázku 19 je zobrazen výsledný elektroforetický gel, kde jsou patrné amplikony velikosti cca 1500 bp.

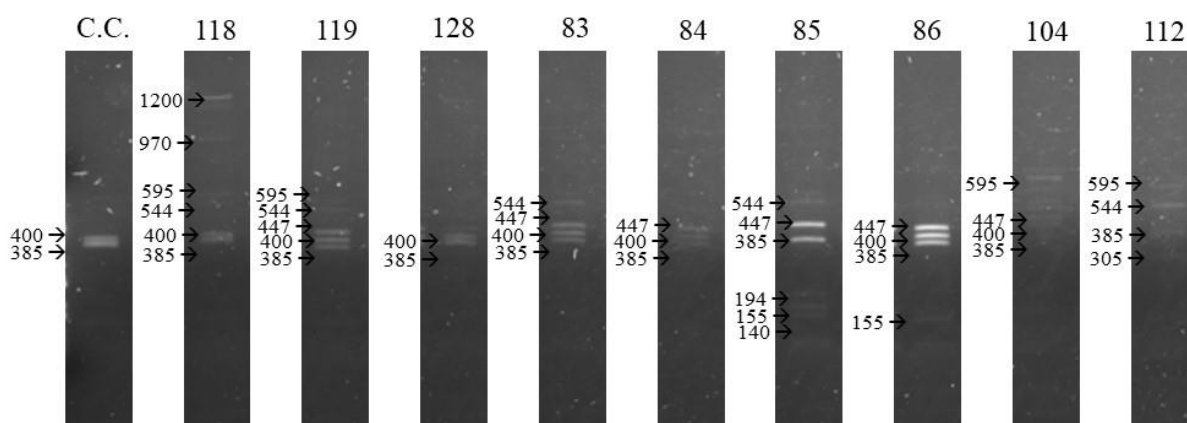


Obrázek 19 – PCR pro vznik amplikonů cca 1500 bp dle Ciantar et al., 2005, marker 200-1500 bp, C.C. – *C. canimorsus*

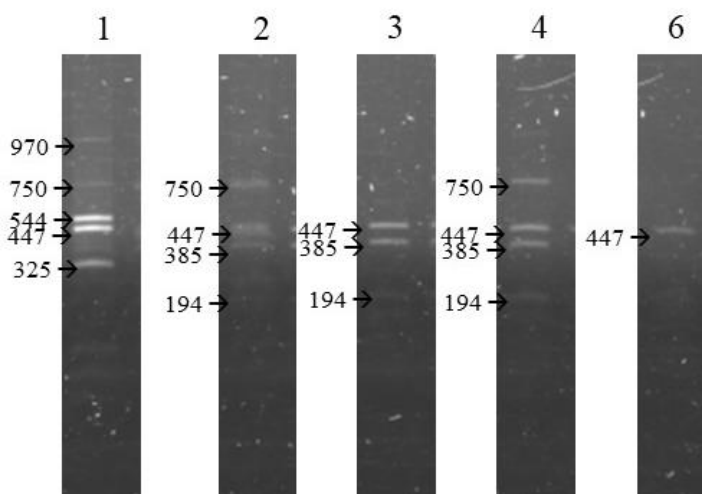
Na restrikci byl použit enzym *MseI*, restrikce DNA *Capnocytophaga* spp. je zobrazena na obrázku 20. Restrikční profil u jednotlivých kmenů je zobrazen na obrázcích 21 a 22.



Obrázek 20 – Restrikce enzymem *MseI* dle Ciantar et al., 2005, marker velikosti 155-970 bp, C.C. – *C. canimorsus*



Obrázek 21 – Restrikční profily testovaných kmenů štěpených enzymem *MseI*, C.C – *C. canimorsus*

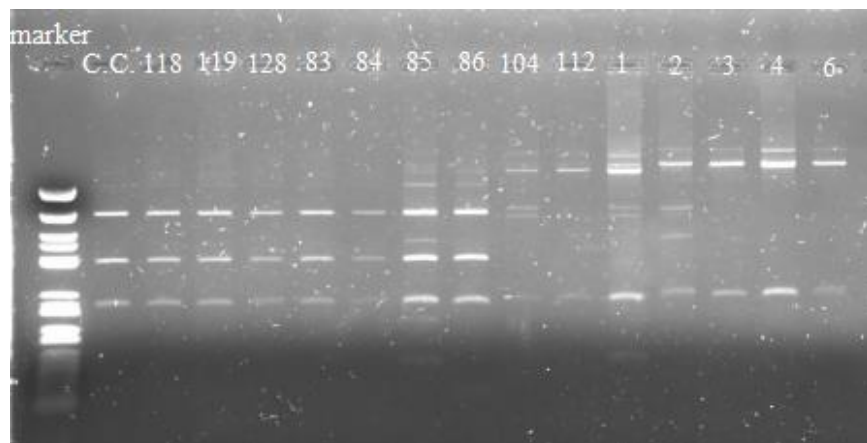


Obrázek 22 – Restrikční profily testovaných kmenů izolovaných z lidské dutiny ústní štěpených enzymem *MseI*

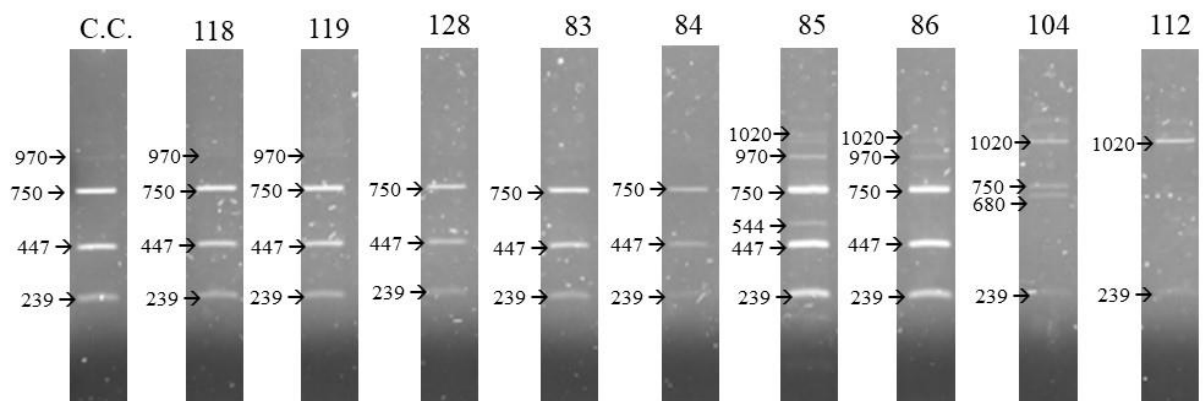
Ciantar a kolegové ve své studii použil pro restrikci enzym *CfoI*, který v době zpracování této diplomové práce nebyl komerčně dostupný, proto byly využity endonukleázy *MseI* a *StyI*.

Restrikční profily naštěpeny enzymem *MseI* u různých kmenů jsou analogické. U izolátů z psí tlamy se shodovaly především fragmenty o velikosti 400 bp. Tento fragment se nacházel u 8 kmenů z 10. Fragment o velikosti 385 bp se nacházel u 9 kmenů z 10. Restrikční štěp velikosti 385 bp se nacházel i u 3 kmenů z 5 získaných z lidské dutiny ústní. Kmeny získané z psí ústní dutiny a z lidské dutiny ústní se liší restrikčními profily. Tyto bakterie jsou sice součástí stejného rodu, ale je u nich patrná genetická diverzita, která je v restrikčním profilu zaznamenána.

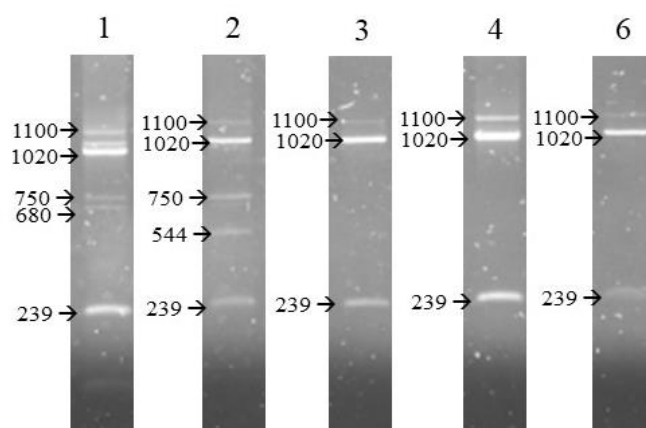
Dále byl použit na restrikci enzym *StyI*-HF®. Výsledky štěpení jsou zobrazeny na obrázku 23. Restrikční profily jednotlivých kmenů jsou detailně zobrazeny na obrázcích 24, 25.



Obrázek 23 – PCR-RFLP s restrikčním enzymem *StyI*-HF®, marker 155-950 bp, C.C. – *C. canimorsus*



Obrázek 24 – Restrikční profily kmenů izolovaných ze psí dutiny ústní, restrikce provedena *StyI*-HF®



Obrázek 25 – Restrikční profily kmenů získaných z lidské dutiny ústní, štěpeno *StyI*-HF®

U restrikčního enzymu *StyI*-HF® jsou si některé profily podobné. Kmeny *C. canimorsus* s číselným označením 118 a 119 mají profily identické. Mají shodné restrikční fragmenty o velikostech 970, 750, 447 a 239 bp. Kmeny číslo 128, 83 a 84 se od referenčního kmene *C. canimorsus* a kmenů č. 118 a 119 liší o jeden fragment, chybí jim restrikční fragment o velikosti 970 bp. Dále jsou si podobné kmeny 85 a 86, mezi sebou se liší pouze v jednom fragmentu o velikosti 544 bp. U další dvojice kmenů 104 a 112 byl získán obdobný profil, jen kmen číslo 104 měl o 2 fragmenty více než kmen 112. Pro 10 kmenů *C. canimorsus* jsme získali 6 restrikčních profilů, kdy se některé restrikční profily liší minimálně. Zde jsou kmeny heterogenní, oproti PCR-RFLP podle Van Dam *et al.*, 2009 při použití restrikčního enzymu *StyI*-HF®, protože zde byl získán pouze jeden restrikční profil.

Kmeny *C. ochracea* získané z dutiny ústní člověka měly společné fragmenty o velikosti 1100, 1020 a 239 bp. Restrikční profily po aplikaci restrikčního enzymu *StyI*-HF® jsou téměř analogické a mezi jednotlivými fragmenty jsou větší rozdíly ve velikosti oproti restrikčnímu profilu *MseI*.

Tato metoda je dle původní studie navržena pro rod *Capnocytophaga* spp. Druhy *C. canimorsus* a *C. ochracea*, poskytovaly restrikční profil zobrazený výše. Stejný postup jsme aplikovali na 4 vzorky *C. cynodegmi* a ani u jednoho nebyl vytvořen amplicon potřebný k následné restrikci. Dále jsme opět měli problém metodu aplikovat na směsné kultury, u kterých byla potvrzena přítomnost *Capnocytophaga canimorsus*. V publikaci byly využity pouze čisté kultury, tento rozdíl mohl vést k neúčinnosti metody na směsných vzorcích, přestože navrhované primery byly specifické k *Capnocytophaga* ssp.

4.5 Sérotypizace izolátů *C. canimorsus*

Metodu sérotypizace pomocí PCR jsme se pokusili zavést u izolátů *C. canimorsus* uvedených v tabulce 24. Jako referenční opět sloužila sbírková kultura CCM 3709. Negativní

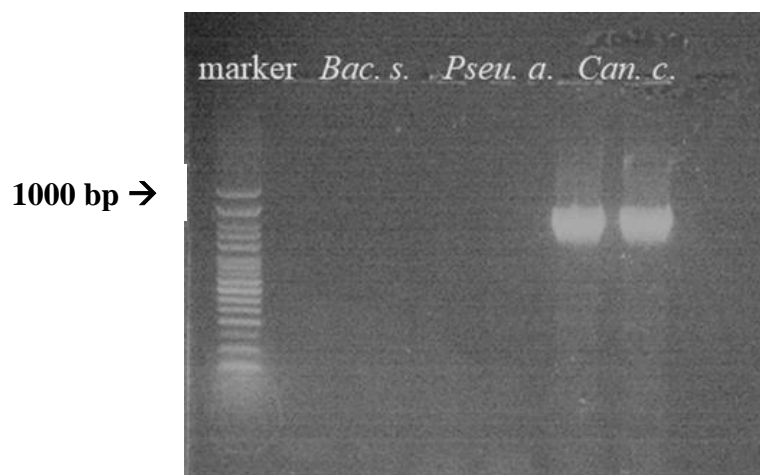
kontrolou byl *Bacillus subtilis*, kmen ATCC 6051 a *Pseudomonas aeruginosa*, kmen ATCC 9027.

Tabulka 24 – Seznam kmenů, u kterých byla provedena sérotypizace A-E

| Označení kmene | sérotyp A | sérotyp B | sérotyp C | sérotyp D | sérotyp E |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| CCM 3709 | - | - | + | - | - |
| 118 | - | - | - | - | - |
| 119 | - | +/- | +/- | - | - |
| 122 | - | - | +/- | - | - |
| 128 | - | - | +/- | - | - |
| 78 | - | - | +/- | - | - |
| 79 | - | - | +/- | - | - |
| 83 | - | - | - | - | - |
| 84 | - | - | - | - | - |
| 85 | - | - | - | - | - |
| 86 | - | - | +/- | - | - |

Poznámka: „+“ – pozitivní, „-“ – negativní, „+/-“ – reakce byla nespecifická

Pokus o sérotypizaci byl proveden u 11 izolátů. Pouze referenční kultura *C. canimorsus*, byla identifikována jako sérotyp C. Tento vzorek je izolovaný z krve člověka. Ostatní izoláty byly izolovány ze psí dutiny ústní. Při stanovení těchto 10 kmenů došlo k tvorbě nespecifických produktů. U žádného z nich velikost amplikonu neodpovídala požadovaným 1000 bp. Příklad pozitivního výsledku je zaznamenán na obrázku 26 u referenčního kmene, příklad nespecifické reakce je patrný na obrázku 27.



Obrázek 26 – Sérotypizace, stanovení sérotypu C, marker 100-3000 bp, *Bac. s.* – *Bacillus subtilis* (negativní kontrola), *Pse. a.* – *Pseudomonas aeruginosa* (negativní kontrola), *Can.c.* – *C. canimorsus* (pozitivní kontrola), vzorky nanášené v doubletu

1000 bp →



Obrázek 27 – Sérotypizace, stanovení sérotypů A, B, C, marker 155-970 bp, stanovený v dubletu, 119A – kmen 119 stanovení sérotypu A, 119 B – kmen 119 stanovení sérotypu B, 119C – kmen 119 stanovení sérotypu C, NK – negativní kontrola, pozitivní kontrola byla provedena na jiném gelu zpracovávaném souběžně, který není v DP znázorněn

Odborné publikace potvrzují, že zjištění sérotypu u izolátů *C. canimorsus* z psí tlamy je obtížné. Hess *et al.*, 2018 potvrzuje, že u 65 % vzorků nebyli schopni sérotyp určit. Naopak u lidských izolátů se jim povedlo sérotypovat 25 z 25 izolátů. Zjišťování sérotypů metodou PCR se zabývala i skupina z Veterinární univerzity v Brně. K dispozici měli 57 vzorků, u kterých byla potvrzena přítomnost *C. canimorsus*. Sérotyp A byl identifikován u čtyřech z nich, sérotyp B neměl žádný z nich a ostatní vzorky se jim podařilo sérotypovat jako sérotyp D/C [Barančková *et al.*, 2022]. Pracoviště bylo kontaktováno s prosbou o dodání informací, jakou metodiku využili, bohužel bez odezvy.

Sérotyp se nám podařilo určit u referenční kultury *C. canimorsus*. Dále sérotypizace byla aplikována výhradně na izoláty *C. canimorsus* získané ze psí dutiny ústní. Výsledky byly nespécifické a nepodařilo se nám získat žádný pozitivní výsledek sérotypu A, B, C, D či E. Na základě této zkušenosti jsme se pokusili kontaktovat pracoviště, která publikovala kazuistiky infekce *C. canimorsus* u lidských pacientů s prosbou o vzorek DNA těchto klinických izolátů. Pracoviště na náš dotaz reagovala, ale bohužel DNA k dispozici neměla.

4.6 Tvorba biofilmu *Capnocytophaga* spp.

Tvorba biofilmu byla testována na mikrotitračních destičkách Christensenovou metodou u kmenů CCM 3709 *C. canimorsus*, 118, 119, 122, 86, a jednoho kmene druhu *C. cynodegmi* s číslem 12. Jako živná média byla použita BHI a TSB. Hodnocení tvorby biofilmu se provádělo podle změřené absorbance, která odpovídá množství vytvořeného bakteriálního biofilmu. Absorbance byla měřena spektrofotometricky při 595 nm. Neinkulovaný BHI bujón měl absorbanci 0,1110 a u neinkulovaného TSB byla změřena absorbance 0,09025. Tyto absorbance jsou v následujících grafech znázorněny vodorovnou

linií. Rozmezí hodnot absorbancí a vyhodnocení tvorby biofilmu je uvedeno v tabulce 25 [Christensen *et al.*, 1985; Stepanović *et al.*, 2000].

Tabulka 25 – Rozmezí hodnot A_{595} a hodnocení tvorby biofilmu

| Rozmezí hodnot absorbance při 595 nm | | Hodnocení |
|--------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------|
| BHI bujón | TSB bujón | |
| $A_{595} < 0,1110$ | $A_{595} < 0,09025$ | Biofilm – negativní |
| $0,1110 < A_{595} \leq 0,2220$ | $0,09025 < A_{595} \leq 0,1805$ | Biofilm – slabě pozitivní |
| $0,2220 < A_{595} \leq 0,444$ | $0,1805 < A_{595} \leq 0,361$ | Biofilm – středně pozitivní |
| $0,444 < A_{595}$ | $0,361 < A_{595}$ | Biofilm – silně pozitivní |

Poznámka: A_{595} – absorbance měřená při 595 nm

Mikrotitrační destičky s BHI bujónem byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře 48 hodin nebo 7 dní. Pro jednotlivé kmeny, které byly inkubovány 48 hodin, jsou výsledky uvedeny v tabulce 26.

Tabulka 26 – Absorbance a tvorba biofilmu bakterií *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* v BHI bujónu

| Testovaný kmen | Kultivace 48 hodin | | Kultivace 7 dní | |
|----------------|-----------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------------|
| | Absorbance při 595 nm | Hodnocení tvorby biofilmu | Absorbance při 595 nm | Hodnocení tvorby biofilmu |
| REF. | 0,1275±0,0035 | Slabě pozitivní | 0,1301±0,0075 | Slabě pozitivní |
| 12 | 0,1309±0,0051 | Slabě pozitivní | 0,1289±0,0072 | Slabě pozitivní |
| 118 | 0,1337±0,0066 | Slabě pozitivní | 0,1289±0,0074 | Slabě pozitivní |
| 119 | 0,1258±0,0041 | Slabě pozitivní | 0,1385±0,0087 | Slabě pozitivní |
| 122 | 0,1253±0,0036 | Slabě pozitivní | 0,1297±0,0099 | Slabě pozitivní |
| 86 | 0,1250±0,0030 | Slabě pozitivní | 0,1240±0,0087 | Slabě pozitivní |

Všechny kmeny tvořily biofilm a podle použitých kritérií byly hodnoceny jako biofilm slabě pozitivní. Hodnoty absorbancí se pohybovaly v rozmezí od 0,1250 do 0,1337 při kultivaci 48 hodin a při kultivaci 7 dní byly hodnoty absorbancí od 0,1240 do 0,1385. Rozdíly mezi jednotlivými kmeny byly minimální, nejvyšší absorbance po 48 hodinách kultivace byla změřena u kmene číslo 118. Nejvyšší absorbance po 7 dnech kultivace byla stanovena u kmene číslo 119. Není možné říci, že by delší kultivace (7 dní) znamenala vyšší tvorbu biofilmu. U poloviny případů došlo ke změření vyšší absorbance než po 48 hodinách a u druhé poloviny byly hodnoty nižší než po 48 hodinách.

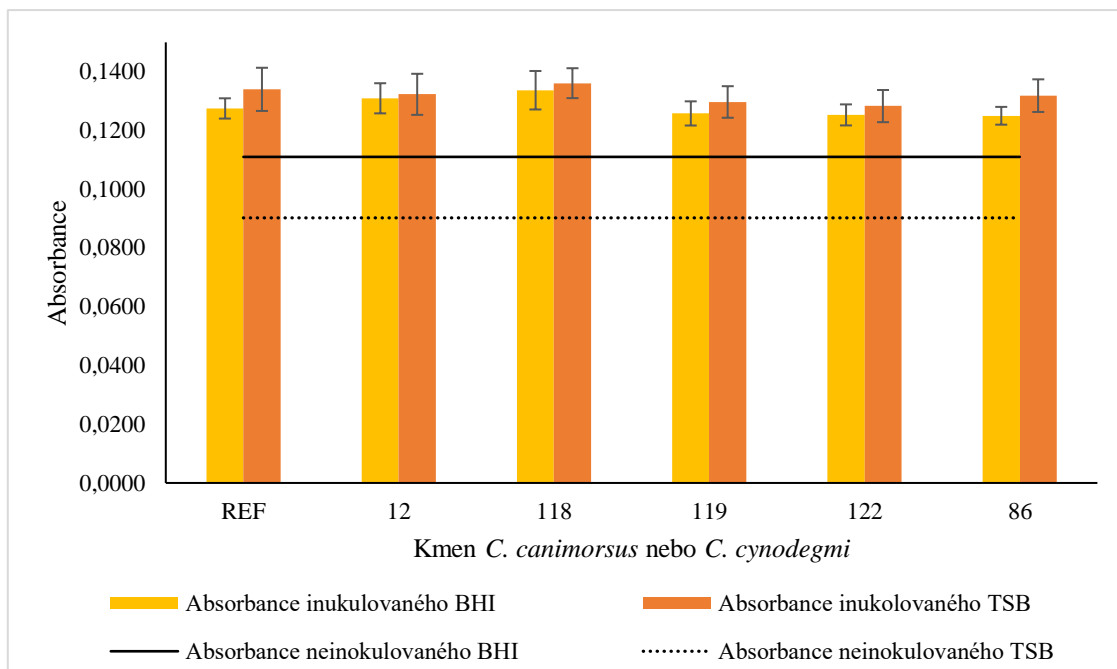
Dále byla hodnocena tvorba biofilmu při použití TSB bujónu. Mikrotitrační destičky byly kultivovány při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře 48 hodin nebo 7 dní. Testovány byly stejné kmeny jako při testování v BHI bujónu. Výsledky získaných absorbancí při 595 nm a hodnocení tvorby biofilmu s použitím TSB bujónu jsou uvedeny v tabulce 27.

Tabulka 27 – Absorbance a tvorba biofilmu bakterií *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* v TSB bujónu

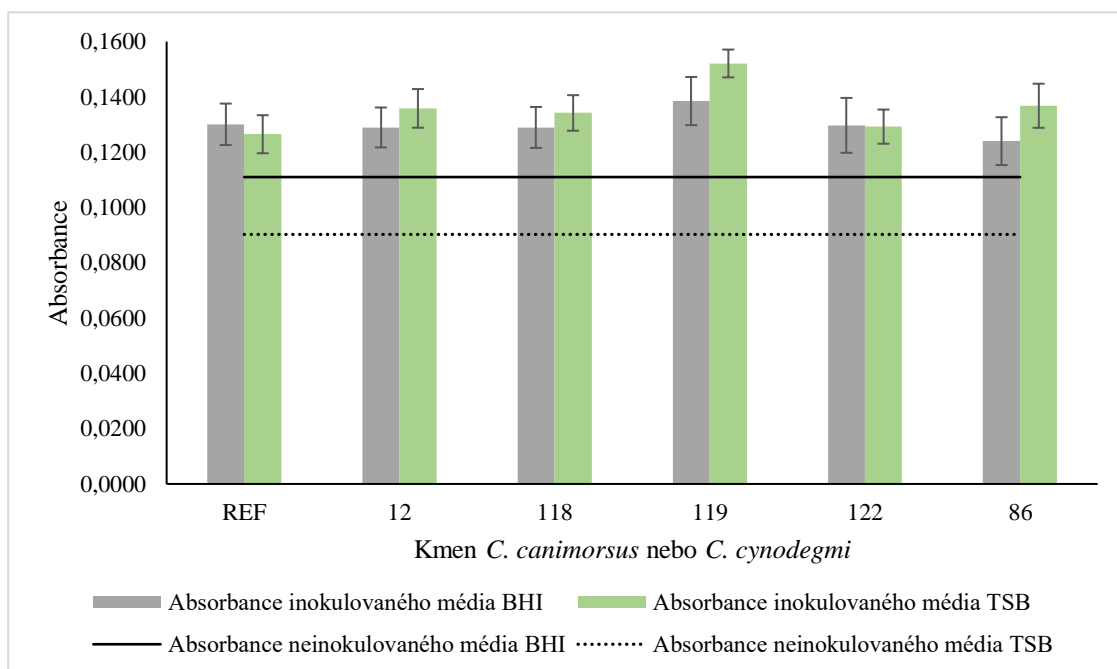
| Testovaný kmen | Expozice 48 hodin | | Expozice 7 dní | |
|----------------|-------------------|-----------------|----------------|-----------------|
| | Absorbance | Hodnocení | Absorbance | Hodnocení |
| | při 595 nm | tvorby biofilmu | při 595 nm | tvorby biofilmu |
| REF. | 0,1340±0,0074 | Slabě pozitivní | 0,1265±0,0069 | Slabě pozitivní |
| 12 | 0,1323±0,0070 | Slabě pozitivní | 0,1359±0,0070 | Slabě pozitivní |
| 118 | 0,1361±0,0051 | Slabě pozitivní | 0,1342±0,0064 | Slabě pozitivní |
| 119 | 0,1297±0,0054 | Slabě pozitivní | 0,1521±0,0050 | Slabě pozitivní |
| 122 | 0,1283±0,0055 | Slabě pozitivní | 0,12925±0,0062 | Slabě pozitivní |
| 86 | 0,1319±0,0056 | Slabě pozitivní | 0,1368±0,0080 | Slabě pozitivní |

Tvorba biofilmu v TSB bujónu byla hodnocena jako slabě pozitivní. Rozmezí hodnot se pohybovalo po 48 hodinách od 0,1283 do 0,1361, po 7 dnech od 0,1265 do 0,1521. Výsledky byly podobné u jednotlivých kmenů. U kmene číslo 119 je velký rozdíl mezi kultivací 48 hodin a 7 dní, na rozdíl od ostatních kmenů, kde rozdíl nebyl nebo byl malý.

Mezi použitými bujóny byl rozdíl ve tvorbě biofilmu. Jelikož absorbance neinokulovaného TSB je nižší než neinokulovaného BHI a naměřená absorbance tvorby biofilmu v těchto bujónech podobná, lze usoudit, že *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* více tvoří biofilm v TSB než v BHI bujónu. Srovnání tvorby biofilmu v BHI a TBS po 48 hodinách kultivace při 37 °C v 5% CO₂ atmosféře je zobrazeno na obrázku 28 a srovnání tvorby biofilmu v BHI a TSB bujónech po 7 dnech kultivace při stejných podmínkách jako při 48 hodinách je zobrazeno na obrázku 29.



Obrázek 28 – Graf – srovnání tvorby biofilmu v BHI a TSB po kultivaci 48 hodin



Obrázek 29 – Graf – Srovnání tvorby biofilmu v BHI a TSB po 7denní kultivaci

Na obrázku 28 je v grafu vidět, že absorbance inokulovaného TSB bujónu je vyšší než absorbance BHI a to u všech kmenů. Proto můžeme BHI bujón hodnotit jako lepší médium pro kmeny *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*, protože poskytuje lepší prostředí a lepší podmínky než TSB bujón, kde tvorba biofilmu je vyšší a bakterie se zde tvorbou biofilmu chrání.

Porovnáním tvorby biofilmu v BHI a TSB bujónu po 7denní kultivaci (obrázek 29) bylo zjištěno, že absorbance inokulovaného TSB bujónu není u všech kmenů vyšší, než absorbance inokulovaného BHI bujónu, jak tomu bylo po kultivaci 48 hodin. U referenčního kmene

C. canimorsus a kmene s označením 122 byla absorbance v TSB nižší než u BHI. Jak už bylo zmíněno výše, u kmene 119 je vidět velký nárůst absorbance při 7denní kultivaci v TSB bujónu. I podle těchto výsledků byl pro vyšší tvorbu biofilmu lepší TSB bujón.

Biofilmem v souvislosti s rodem *Capnocytophaga* se zabývali Fabre *et al.*, 2021 a Piau *et al.*, 2013. Bohužel autoři se zabývali tvorbou biofilmu u rodů izolovaných z lidské dutiny ústní. Dále v kazuistice Jalava-Karvinen s kolektivem (2018) zmiňují, že *C. canimorsus* je schopná tvořit biofilm na protézách. A protože se *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* vyskytuje v dutině ústní u psů a koček, bylo předpokládáno, že se zapojují do tvorby ústního biofilmu. Testováním tvorby biofilmu na *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* jsme dokázali, že tyto bakterie patří k 80 % bakteriální populaci a jsou schopny tvořit biofilm.

4.7 Typizace *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* pomocí systému BIOLOG GEN III^{MT}

Biochemické testy byly provedeny u referenčního kmene *C. canimorsus* CCM 3709, izolátů *C. canimorsus* s číselným označením 118, 119, 122, 86 a *C. cynodegmi* s označením 12. Zákal byl měřen turbidimetricky po 25 hodinách inkubace při 37 °C v CO₂ atmosféře. Podle fenotypového otisku softwarem Biolog Microbial Identification Systems byly určeny vybrané kmeny. Referenční kmen *C. canimorsus* a kmen 86 byly identifikovány jako *Capnocytophaga canimorsus*, což se shodovalo s i našimi výsledky PCR. Kmen 119 a 122 byly vyhodnoceny jako *Capnocytophaga cynodegmi*, která je hodně fenotypově i genotypově podobná *C. canimorsus*, kterou jsme pomocí PCR identifikovali. Kmen 12 byl vyhodnocen jako *C. cynodegmi*, což je shodný výsledek s testováním pomocí PCR. Pouze u kmenu číslo 118 byly výsledky neprůkazné, nebyla prokázána přítomnost *C. canimorsus*, přestože byl kmen 118 identifikován pomocí PCR jako *C. canimorsus*. Jednotlivé testy, podle kterých se hodnotí fenotypový otisk, jsou zapsány v tabulce 28.

Tabulka 28 – Souhrnné vyhodnocení biochemických testů

| | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> |
|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| Biochemický test | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>cynodegmi</i> |
| | REF | 118 | 119 | 122 | 86 | 12 |
| Dextrin | P | P | P | P | P | P |
| D-maltóza | P | P | P | P | P | P |
| D-trehalóza | B | P | N | N | N | B |
| D-celobióza | P | B | B | B | B | B |

Poznámka: „P“ – pozitivní, „N“ – negativní, „B“ – hraniční

Tabulka 28 – Pokračování – Souhrnné vyhodnocení biochemických testů

| Biochemický test | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> |
|---------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>cynodegmi</i> |
| | REF | 118 | 119 | 122 | 86 | 12 |
| Gentiobióza | P | P | P | P | P | P |
| Sacharóza | N | P | P | P | N | P |
| D-turanóza | P | P | P | B | B | B |
| Stachyóza | N | P | P | B | N | B |
| D-rafinóza | N | P | P | P | N | P |
| α -D-laktóza | P | P | P | P | P | P |
| D-melibióza | N | P | N | B | B | B |
| β -methyl-D-glukosid | B | N | N | N | N | N |
| D-salicin | N | N | N | N | N | N |
| N-acetyl-D-glukos-amin | P | P | P | P | B | B |
| N-acetyl- β -D-mannosamin | B | P | P | B | B | N |
| N-acetyl-D-galaktosamin | B | N | B | N | B | B |
| Kys. N-acetylneuraminová | B | B | B | B | N | B |
| α -D-glukóza | P | P | P | P | P | P |
| D-manóza | P | P | P | P | P | P |
| D-fruktóza | N | P | P | P | N | P |
| D-galaktóza | B | B | B | B | B | B |
| 3-methylglukóza | B | N | N | N | N | N |
| D-fukóza | N | B | N | N | N | N |
| L-fukóza | N | P | B | N | B | N |
| L-ramnóza | N | N | N | N | N | N |
| Inosin | N | B | B | N | N | B |
| D-sorbitol | B | N | N | N | N | N |
| D-manitol | N | N | N | N | N | N |
| D-arabitol | B | N | N | N | N | N |
| Myoinositol | B | P | N | N | N | N |

Poznámka: „P“ – pozitivní, „N“ – negativní, „B“ – hraniční

Tabulka 28 – Pokračování – Souhrnné vyhodnocení biochemických testů

| Biochemický test | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> |
|------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>cynodegmi</i> |
| | REF | 118 | 119 | 122 | 86 | 12 |
| Glycerol | N | N | N | N | N | N |
| D-glukóza-6-PO ₄ | B | B | B | B | B | P |
| D-fruktóza-6-PO ₄ | N | B | B | B | B | N |
| Kys. D-asparágová | N | N | N | N | N | N |
| D-serin | N | N | N | N | N | N |
| Želatina | B | N | B | N | N | B |
| Glycyl-L-prolin | B | B | B | B | B | B |
| L-alanin | B | N | N | N | N | N |
| L-arginin | B | N | N | N | N | N |
| Kys. L-asparágová | N | B | B | B | N | N |
| Kys. glutamová | N | N | N | N | P | N |
| L-histidin | N | P | N | N | N | N |
| Kys. L-pyroglytamová | N | N | N | N | N | N |
| L-serin | N | N | N | N | N | N |
| Pektin | N | P | P | P | N | P |
| Kys. D-galakturonová | B | N | N | N | N | N |
| Lakton kys. L-galaktonové | B | B | B | B | B | B |
| Kys. D-glukonová | N | N | N | N | N | N |
| Kys. D-glukuronová | N | P | N | N | N | N |
| Glukuronamid | N | N | N | N | N | N |
| Kys. mucinová | N | N | N | N | N | N |
| Kys. chininová | N | P | N | N | N | N |
| Kys. D-sacharidová | B | N | N | N | N | N |
| P-hydroxyfenyl octová kys. | N | N | N | N | N | N |
| Methylpyruvát | N | N | B | N | N | B |

Poznámka: „P“ – pozitivní, „N“ – negativní, „B“ – hraniční

Tabulka 28 – Pokračování – Souhrnné vyhodnocení biochemických testů

| Biochemický test | C. | C. | C. | C. | C. | C. |
|---------------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>cynodegmi</i> |
| | REF | 118 | 119 | 122 | 86 | 12 |
| Methylester kys. | | | | | | |
| D-mléčné | N | N | N | N | B | N |
| Kys. L-mléčná | N | N | N | N | N | N |
| Kys. citrónová | N | N | B | B | B | B |
| Kys. α -ketoglutarová | N | B | B | B | N | B |
| Kys. D-jablečná | B | N | N | N | N | B |
| Kys.L-jablečná | N | N | B | B | N | B |
| Kys. bromosukcinová | N | N | N | N | N | N |
| Tween 40 | N | N | B | N | N | B |
| Kys. γ -amino butrynová | N | N | N | N | N | N |
| Kys. α -hydroxy máselná | N | N | N | N | N | N |
| Kys. β -hydroxy-D,L- máselná | N | N | N | N | N | N |
| Kys. α -ketomáselná | N | N | B | N | N | B |
| Kys. acetová | B | B | B | B | B | B |
| Kys. propionová | B | N | B | N | N | N |
| Kys. octová | B | P | B | N | N | B |
| Kys. mravenčí | N | N | N | N | N | N |

Poznámka: „P“ – pozitivní, „N“ – negativní, „B“ – hraniční

Rod *Capnocytophaga* podle Gaastra *et* Lipan, 2010 využívá různé sacharidy (glukóza, dextran, glykogen, inulin, škrob), což se námi provedenými testy potvrdilo, protože testované kmeny byly pozitivní na dextrin, D-maltózu, gentiobiózu, sacharózu, D-rafinózu, α -D-laktózu, α -D-glukózu, D-manózu, D-fruktózu, pektin, α -D-laktózu, N-acetyl-D-glukosamin, α -D-glukózu, stachylózu, D-turanózu. Mally a kolektiv v roce 2009 sestavili soubor biochemických testů, kde *C. canimorsus* dávala pozitivní výsledky na sialidázu a negativní na sacharózu a rafinózu. Stejně výsledky, tedy negativní sacharózu a rafinózu, uvádí i Suzuki *et al.*, 2018. V našem případě sacharózu utilizovaly 4 kmeny ze 6 a 2 kmeny sacharózu nevyužívaly. U metabolismu rafinózy bylo zjištěno, že zkvašování probíhá u 4 kmenů

a u 2 kmenů nikoliv. Suzuki *et al.*, 2018 navíc uvádí test na fruktózu a manitol, který byl negativní, dále test na glukózu, laktózu a manózu, ve kterém došlo k utilizaci těchto cukrů. Využívání fruktózy bylo potvrzeno u 4 kmenů a u referenčního kmene *C. canimorsus* a kmene číslo 86 nebyla fruktóza zužitkována. Využívání glukózy a laktózy bylo zjištěno u všech 6 kmenů. Tento výsledek se shoduje s uvedenou publikací. Další shoda byla nalezena u manitolu, kde námi vybrané kmeny neutilizovaly tento cukr. Dále v publikaci od Umeda *et al.*, 2014 byly uvedeny biochemické testy na xylózu, sacharózu a fruktózu, které uvádí, že metabolismus *C. canimorsus* tyto cukry nevyužívá. Tento výsledek se shoduje s uvedenými publikacemi výše. Referenční kmen *C. canimorsus* a kmen číslo 86 se shodovaly s Mally *et al.*, 2009, Suzuki *et al.*, 2018 a Umeda *et al.*, 2014.

Odlišnost divokých kmenů získaných z přirozeného prostředí s referenční *C. canimorsus* nebyla vysoká. Rozdíl byl nalezen u D-celobiózy, β -methyl-D-glukosidu, 3-methylglukózy, D-sorbitolu, D-arabitolu, D-fruktóza-6-PO₄, L-alaninu, L-argininu, kys. D-galakturonové, kys. D-sacharidové a kys. D-jablečné. Naprostá shoda ve výsledcích byla nalezena u 29 biochemických testů, například u testu na dextrin, D-maltózu, D-manózu, L-ramnózu nebo D-manitol. Referenční kultura byla izolována z rány člověka, námi získané kmeny odebrané ze psí dutiny ústní byly ve výsledcích testů převážně shodné. Nejvíce odlišných výsledků v porovnání s ostatními kmeny měl kmen číslo 118. Proto nebyla softwarem Biolog Microbial Identification Systems nalezena *C. canimorsus*, kterou jsme identifikovali pomocí PCR. Odlišnosti biochemických testů mohou být způsobeny vícečetným pasážováním kultur v laboratorním prostředí nebo jinými faktory, které mohou působit stresově na kulturu, protože není ve svém přirozeném prostředí a kultura může ztrácet některé geny.

Jelikož kmen s číselným označením 12 je metodou PCR prokázán jako *C. cynodegmi*, můžeme biochemické odlišnosti či shody porovnat jak s *C. canimorsus*, tak se studiemi o *C. cynodegmi*. *C. cynodegmi* má podle Suzuki *et al.*, 2018 fruktózu, glukózu, maltózu a sacharózu pozitivní. U manitolu a rafinózy nedochází k utilizaci cukrů. U kmene číslo 12 byla metabolizována fruktóza, glukóza, maltóza, manóza, rafinóza, sacharóza, pouze manitol nebyl využíván. Kromě testů na rafinózu a manózu, které vyšly naopak než u Suzuki *et al.*, 2018, se naše výsledky s publikací shodují. S porovnáním s referenční kulturou *C. canimorsus* se kmen 12 *C. cynodegmi* liší v sacharóze, rafinóze a pektinu, kdy všechny tyto látky má *C. canimorsus* negativní a *C. cynodegmi* pozitivní. Shoda výsledků byla zaznamenána u 43 biochemických testů, to potvrzuje, že *C. cynodegmi* a *C. canimorsus* jsou fenotypově velmi podobné.

Kmeny byly testovány na citlivost k chemickým látkám a antibiotikům. Souhrnný seznam výsledků je uveden v tabulce 29.

Tabulka 29 – Souhrnné vyhodnocení testů na citlivost chemických látek

| Test na | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> | <i>C.</i> |
|---------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|
| chemickou | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>canimorsus</i> | <i>cynodegmi</i> |
| citlivost | REF | 118 | 119 | 122 | 86 | 12 |
| pH 6 | B | N | B | N | B | N |
| pH 5 | N | N | N | N | N | N |
| 1% NaCl | N | B | B | B | B | B |
| 4% NaCl | N | N | N | N | N | N |
| 8% NaCl | N | N | N | N | N | N |
| 1% laktát sodný | N | N | N | N | B | N |
| Kys. fusidová | N | N | N | N | N | N |
| D-serin | B | N | B | B | B | B |
| Troleandomycin | B | N | B | B | B | B |
| Rifamycin SV | P | B | B | B | P | B |
| Minocyklin | P | B | B | B | P | B |
| Linkomycin | P | B | B | B | P | P |
| Guanidin HCl | N | N | N | N | N | N |
| Niaproof 4 | N | N | N | N | N | N |
| Vankomycin | B | B | P | P | P | B |
| Tetrazolová fialová | B | B | B | B | B | B |
| Tetrazoliová modř | B | B | B | B | B | B |
| Kys. nalidixová | P | B | P | P | P | B |
| Chlorid lithný | B | P | B | P | P | B |
| Tellurid draselný | B | N | B | B | B | B |
| Aztreonam | P | B | P | P | P | P |
| Butyrát sodný | B | N | B | P | P | B |
| Bromičnan sodný | N | N | N | N | N | N |

Poznámka: „P“ – pozitivní, „N“ – negativní, „B“ – hraniční

Testování citlivosti k chemickým látkám je u *C. canimorsus* obtížné a standardizované metody nejsou dostupné [Sandoe, 2004]. Jako antibiotická terapie se na infekce způsobené *C. canimorsus* používá penicilin. Bakterie jsou citlivé i na imipen, klindamycin,

chloramfenikol, cefalosporiny 3. generace, fluorochinolony, erytromycin, doxycyklin a metranidazol [Gaastra *et* Lipan, 2010]. Dále byla publikována citlivost na erythromycin, vankomycin, chinolony [Sandoe, 2004]. Podle našich testů byla prokázána citlivost na kyselinu fusidovou, guanidin HCl, niaproof 4, tetrazoliovou fialovou, tetrazoliovou modř, bromičnan sodný, D-serin, troleandomycin, tellurid draselný, butyrát sodný, prostředí s pH 5, pH 6, dále prostředí s obsahem 1% NaCl, 4% NaCl, 8% NaCl a 1% laktát sodný. Podle studie Gaastra *et* Lipan, 2010 na *C. canimorsus* nejsou účinné aztreonam, polymyxin, fosfomycin, trimetoprim nebo sulfamethoxazol a aminoglikosidy. Testované kmeny nebyly citlivé k antibiotikům rifamycin SV, minocyklin, linkomycin, vankomycin, kyselina nalidixová, chlorid lithný, butyrát sodný a aztreonam. Naše výsledky u antibiotika aztreonam se shodují s publikací Gaastra *et* Lipan, 2010 i s Oliveira *et al.*, 2021. Provedené testy na citlivost k chemickým látkám se u jednotlivých kmenů neodlišovaly, referenční kultura a izoláty *C. canimorsus* i *C. cynodegmi* poskytovaly obdobné výsledky.

Závěr

Tato diplomová práce se zabývala typizací izolátů *Capnocytophaga canimorsus* získaných ze psí dutiny ústní. Teoretická část je věnována charakteristice bakteriálního rodu *Capnocytophaga* i popisu *C. canimorsus* jakožto hlavního původce zoonotických infekcí. Dále jsou v této části uvedeny typizační metody se zaměřením na molekulární biologii. Experimentální část práce se zabývá jak genotypizací, která zahrnuje PCR a PCR-RFLP, tak fenotypizací, kde byla zkoumána tvorba biofilmu jednotlivých izolátů *C. canimorsus*. Byla testována metabolická aktivita, která byla ověřována souborem biochemických testů a také byla zjišťována citlivost k některým antibiotikům a chemickým látkám.

V této práci bylo různými metodami zkoumáno 64 vzorků stěrů z dutiny ústní psů u nichž byla PCR metodou potvrzena přítomnost *C. canimorsus*. Jako sbírkové kmeny byly využity *C. canimorsus* kmen, CCM 3709 a *C. cynodegmi* kmen, DSM 19736. Pro identifikaci *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* byl použit protokol podle studie Michio Suzuki *et al.*, 2010, protože tato metoda byla optimalizována v předchozí diplomové práci, byl postup pouze převzat a optimalizace se prováděla u následujících postupů.

První z PCR-RFLP byla převzatá z publikace od Van Dam *et al.*, 2009. Tato metoda byla publikována jako specifická k *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*. Nejdříve byla provedena optimalizace, kdy byly upravovány podmínky PCR-RFLP reakce i elektroforetické detekce. Povedlo se nám získat 13 různých restričních profilů, které byly vytvořeny enzymy *MseI* a *StyI*-HF. Touto metodou jsme prokázali ne příliš výraznou genetickou heterogenitu druhu *C. canimorsus* a specifita metody k *C. cynodegmi* potvrzena nebyla.

Další postup PCR-RFLP, který byl úspěšně zaveden a optimalizován, vycházel ze studie Ciantar *et al.*, 2005. Tato metoda byla publikována jako rodově specifická pro rod *Capnocytophaga*. PCR-RFLP byla uplatněna na 26 izolátů, kdy u 15 izolátů byl vytvořen amplikon, který se následně štěpil pomocí restričních enzymů. Při použití restričního enzymu *MseI* bylo získáno 14 restričních profilů, restričním enzymem *StyI*-HF[®] bylo získáno 7 restričních profilů. Tato restriční endonukleáza poskytovala shodné velikosti restričních fragmentů, proto pro další zkoumání je vhodné použít další restriktázy, které štěpí amplifikované sekvence. Potvrdili jsme aplikovatelnost metody na další zástupce rodu *Capnocytophaga*, jako jsou druhy pocházející z lidské dutiny ústní (především *C. ochracea*). Stejně tak jako u předchozího postupu se nám nepodařilo metodu úspěšně aplikovat na *C. cynodegmi*.

Další metoda, která byla zavedena a optimalizována v této práci, byla sérotypizace pomocí PCR. Sérotypizace byla aplikována na 11 vzorků, z nichž byl určen sérotyp pouze u referenční kultury *C. canimorsus*. U některých analyzovaných kmenů byla prokázána nespecifická reakce, kterou jsme potlačili přečištěním DNA, ale daný sérotyp se přesto prokázat nezdařilo. Náš nezdar potvrzují i studie, které se sérotypizací kmenů *C. canimorsus* získané z psí tlamy věnovaly.

Dále byly testovány fenotypové vlastnosti *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*. Byla ověřována tvorba biofilmu Christensenovou metodou. Tato metoda byla aplikována na referenční kulturu *C. canimorsus* a pět dalších kmenů. Bylo potvrzeno, že kmeny biofilm tvoří. Rozdíly mezi použitými kmeny *C. canimorsus* byly minimální. Stejně tak i rozdíly mezi *C. canimorsus* a *C. cynodegmi*, protože tyto druhy jsou si genotypově i fenotypově velmi podobné a vyskytují se ve stejném prostředí. Na závěr byly izoláty *C. canimorsus* a *C. cynodegmi* podrobeny biochemickým testům, kde byla i zjišťována citlivost na vybrané chemické látky.

Z metod uvedených v diplomové práci je patrné, že typizace *C. canimorsus* nám poskytla přehled o genotypových a fenotypových vlastnostech bakteriálních kultur. Cesta k tomuto výsledku není vždy jednoduchá, a proto je někdy nutná volba více metod. V klinické praxi je tato bakterie opomíjena. Důvody mohou být třeba její dlouhá inkubace nebo malá procentuální incidence. Ale kvůli stárnutí populace a zvyšujícímu se počtu domácích mazlíčků se může zvyšovat incidence infekce touto potenciálně patogenní bakterií. I když je mikroorganismus citlivý na mnohá antibiotika, pokud se antibiotika nepodají včas, může dojít k septickému šoku a následné smrti. Proto by měla být infekce touto bakterií při pokousání nebo poškrábání psem či kočkou brána v potaz. Nejvíce ohrožení lidé jsou ti se sníženou imunitou, splenektomií nebo jiným zdravotním omezením, které by mohlo vést k náchylnosti k infekci *C. canimorsus*. Proto by měly být tyto osoby obezřetné a pokud se po kontaktu se psem nebo kočkou objeví horečka, dušnost, malátnost nebo lokalizovaná celulitida v místě kontaktu. Je potřeba na tuto skutečnost upozornit lékaře.

Použitá literatura

ARTIKA, I.M., Y. P. DEWI, I. M. NAINGGOLAN, J. E. SIREGAR a U. ANTONJAYA. Real-Time Polymerase Chain Reaction: Current Techniques, Applications, and Role in COVID-19 Diagnosis. *Genes*. 2022, 13(12). Dostupné z: doi:10.3390/genes13122387

ATOUI, A. a A. EL KHOURY. PCR-RFLP for *Aspergillus* Species. *Mycotoxigenic Fungi*. 2017, New York, s. 313-320. Methods in Molecular Biology. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4939-6707-0_20

BARANČEKOVÁ, M., A. POMPOVÁ a A. ČÍŽEK. Detection of *Capnocytophaga* spp. in dogs – direct PCR versus standard culture procedure. 2022, Brno, Institute of infectious Diseases and Microbiology, VETUNI Brno. 29. kongres Československé společnosti mikrobiologické s mezinárodní účastí.

BEHJATI, S. a P.S. TARPEY. What is next generation sequencing? *Archives of disease in childhood – Education & practice edition*. 2013, 98(6), 236-238. Dostupné z: doi:10.1136/archdischild-2013-304340

BOSSHARD, P. P., S. ABELS, R. ZBINDEN, E. C. BÖTTGER a M. ALTWEGG. Ribosomal DNA Sequencing for Identification of Aerobic Gram-Positive Rods in the Clinical Laboratory (an 18 Month Evaluation). *Journal of Clinical Microbiology*. 2003, 41(9), 4134-4140. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.41.9.4134-4140.2003

BRENNER, D.J., D.G. HOLLIS, G.R. FANNING, R.E. WEAVER. *Capnocytophaga canimorsus* spp. nov. (formerly CDC Group DF-2), a cause of septicemia following dog bite, and *C. cynodegmi* spp. nov., a cause of localized wound infection following dog bite. *J Clin Microbiol*. 1989, 27:231–235.

BUTLER, T. *Capnocytophaga canimorsus*: an emerging cause of sepsis, meningitis, and post-splenectomy infection after dog bites. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 2015, 34(7), 1271-1280. Dostupné z: doi:10.1007/s10096-015-2360-7

CADRE, B., M. A. L. ORAIMI, J. GRINHOLTZ-HADDAD a H. BENKHATAR. “My Dog Deafened Me!”: Case Report of *Capnocytophaga canimorsus* Infection and Literature Review. *The Laryngoscope*. 2019, 129(1). Dostupné z: doi:10.1002/lary.27477

CELIK, M. Ö., D. LABUZ a H. MACHELSKA. Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR for Detection of Opioid Receptors in Immune Cells. *NY: Springer US*, 2021, s. 83-95. *Methods in Molecular Biology*. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-0716-0884-5_8

CIANTAR, M., D.A. SPRATT, H.N. NEWMAN a M. WILSON. Assessment of five culture media for the growth and isolation of *Capnocytophaga* spp. *Clinical Microbiology and Infection*. 2001, 7(3), 158-160. Dostupné z: doi:10.1046/j.1469-0691.2001.00215.x

CIANTAR, M., H. N. NEWMAN, M. WILSON a D. A. SPRATT. Molecular Identification of *Capnocytophaga* spp. via 16S rRNA PCR-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2005, 43(4), 1894-1901. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.43.4.1894-1901.2005

CLARRIDGE, J. E. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clinical Microbiology Reviews*. 2004, 17(4), 840-862. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.17.4.840-862.2004

CROSSLEY, B. M., J. BAI, A. GLASER, R. MAES, E. PORTER, M. L. KILLIAN, T. CLEMENT a K. TOOHEY-KURTH. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 2020, 32(6), 767-775, Dostupné z: doi:10.1177/1040638720905833

EHRMANN, E., A. JOLIVET-GOUGEON, M. BONNAURE-MALLET a T. FOSSE. Antibiotic content of selective culture media for isolation of *Capnocytophaga species* from oral polymicrobial samples. *Letters in Applied Microbiology*. 2013, 57(4), 303-309. Dostupné z: doi:10.1111/lam.12112

ELNIFRO, E. M., A. M. ASHSHI, R. J. COOPER a P. E. KLAPPER. Multiplex PCR: Optimization and Application in Diagnostic Virology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2000, 13(4), 559-570. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.13.4.559

FABRE, S., Y. MALIK, A. VAN DE GUCHTE, et al. Catheter-related bloodstream infection due to biofilm-producing *Capnocytophaga sputigena*. *IDCases*. 2021, 25. Dostupné z: doi:10.1016/j.idcr.2021.e01231

FOXMAN, B., L. ZHANG, J. S KOOPMAN, S. D MANNING a C. F MARRS. Choosing an appropriate bacterial typing technique for epidemiologic studies. *Epidemiologic Perspectives & Innovations*. 2005, 2(1). Dostupné z: doi:10.1186/1742-5573-2-10

- FREIBERGEROVÁ, M., R. PAŘÍZKOVÁ, B. ŽALOUĐÍKOVÁ, T. FREIBERGER, J. JURÁNKOVÁ, I. BURGET a P. HUSA. Sepse vyvolaná bakterií *Capnocytophaga canimorsus*, možnosti diagnostiky a léčby. *Klinická mikrobiologie a infekční lékařství*. 2007, Klinika infekčních chorob, Fakultní nemocnice Brno, Genetická laboratoř, Centrum kardiovaskulární a transplantační chirurgie Brno, Oddělení klinické mikrobiologie FN Brno, 13(3):115-118.
- GAASTRA, W. a L. J.A. LIPMAN. *Capnocytophaga canimorsus*. *Veterinary Microbiology*. 2010, 140(3-4), 339-346. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.040
- GARIBYAN, L. a N. AVASHIA. Polymerase Chain Reaction. *Journal of Investigative Dermatology*. 2013, 133(3), 1-4. Dostupné z: doi:10.1038/jid.2013.1
- GODCHAUX, W a E R LEADBETTER. Unusual sulfonolipids are characteristic of the *Cytophaga-Flexibacter* group. *Journal of Bacteriology*. 1983, 153(3), 1238-1246. Dostupné z: doi:10.1128/jb.153.3.1238-1246.1983
- GONZALEZ, I., T. GARCÍA, S. FERNÁNDEZ a R. MARTÍN. Current Status on Arcobacter Research: An Update on DNA-Based Identification and Typing Methodologies. *Food Analytical Methods*. 2012, 5(5), 956-968
- GREEN, M. R. a J. SAMBROOK. Analysis and Normalization of Real-Time Polymerase Chain Reaction (PCR) Experimental Data. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.top095000
- GREEN, M. R. a J. SAMBROOK. Hot Start Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095125
- GREEN, M. R. a J. SAMBROOK. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018, Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095133
- GRODZICKER, T., J. WILLIAMS, P. SHARP a J. SAMBROOK. Physical Mapping of Temperature-sensitive Mutations of Adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. 1974, 39, 439-446. Dostupné z: doi:10.1101/SQB.1974.039.01.056
- GUPTA, N. DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*. 2019, 36(2). Dostupné z: doi:10.4103/JOC.JOC_110_18

- HANNON, D. M., E. HARKIN, K. DONNACHIE, S. SIBARTIE, M. DOYLE a G. CHAN. A case of *Capnocytophaga canimorsus* meningitis and bacteraemia. *Irish Journal of Medical Science*. 2020, 189(1), 251-252. Dostupné z: doi:10.1007/s11845-019-02045-0
- HEATHER, J. M. a B. CHAIN. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016, 107(1), 1-8. Dostupné z: doi:10.1016/j.ygeno.2015.11.003
- HESS, E., F. RENZI, D. KOUDAD, M. DOL, G.R. CORNELIS a R. PATEL. Identification of Virulent *Capnocytophaga canimorsus* Isolates by Capsular Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017, 55(6), 1902-1914. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00249-17
- HESS, E., F. RENZI, P. KARHUNEN, *et al.* *Capnocytophaga canimorsus* Capsular Serovar and Disease Severity, Helsinki Hospital District, Finland, 2000–2017. *Emerging Infectious Diseases*. 2018, 24(12), 2195-2201. Dostupné z: doi:10.3201/eid2412.172060
- HLOCH, O., D. MOKRA, J. MASOPUST, J. HASA a J. CHARVAT. Antibiotic treatment following a dog bite in an immunocompromized patient in order to prevent *Capnocytophaga canimorsus* infection: a case report. *BMC Research Notes*. 2014, 7(1). Dostupné z: doi:10.1186/1756-0500-7-432
- HUNDERTMARK, M., T. WILLIAMS, A. VOGEL, M. MORITZ, P. BRAMLAGE, N. PAGONAS, O. RITTER a B. SASKO. *Capnocytophaga canimorsus* as Cause of Fatal Sepsis. *Case Reports in Infectious Diseases*. 2019, 1-3. Dostupné z: doi:10.1155/2019/3537507
- CHANQUEO, L. a P. MORALES. *Capnocytophaga canimorsus*. *Revista chilena de infectología*. 2019, 36(2), 219-220. Dostupné z: doi:10.4067/S0716-10182019000200219
- CHESDACHAI, S., D. B. G. TAI, Z. A YETMAR, A. MISRA, N. OUGH a O. ABU SALEH. The Characteristics of *Capnocytophaga* Infection: 10 Years of Experience. *Open Forum Infectious Diseases*. 2021, 8(7). Dostupné z: doi:10.1093/ofid/ofab175
- CHRISTENSEN, G D, W A SIMPSON, J J YOUNGER, L M BADDOUR, F F BARRETT, D M MELTON a E H BEACHEY. Adherence of coagulase-negative *staphylococci* to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *Journal of Clinical Microbiology*. 1985, 22(6), 996-1006. Dostupné z: doi:10.1128/jcm.22.6.996-1006.1985

IDATE, U., K. BHAT, E.D. KULKAMI, V KOSTRASHETTI, M KUGAJI, a V. KUMBAR. Comparison of culture and polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for identification of various *Capnocytophaga* species from subgingival plaque samples of healthy and periodontally diseased individuals. *Journal of oral and maxillofacial pathology*. 2022, 26(2), 287. Dostupné z: doi: 10.4103/jomfp.jomfp_172_21

IDATE, U., K. BHAT, V. KOTRASHETTI, M. KUGAJI a V. KUMBAR. Molecular identification of *Capnocytophaga* species from the oral cavity of patients with chronic periodontitis and healthy individuals. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*. 2020, 24(2). Dostupné z: doi: 10.4103/jomfp.JOMFP_33_20

ITIS: Integrater taxonomic information system – report [online]. 2023 [cit. 2023-02-28].

Dostupné z:

https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=956899#null

JALAVA-KARVINEN, P., J. O. GRÖNROOS, H. TUUNANEN, J. KEMPPAINEN, J. OKSI a U. HOHENTHAL. *Capnocytophaga canimorsus*: a rare case of conservatively treated prosthetic valve endocarditis. *APMIS*. 2018, 126(5), 453-456. Dostupné z: doi:10.1111/apm.12839

JARCHO, J. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis. *Current Protocols in Human Genetics*. 1994, 1(1), 2.7.1-2.7.15. Dostupné z: doi:10.1002/0471142905.hg0207s01

KIM, Y., S-J CHOI a Ch. CHOI. An Efficient PCR-RFLP Method for the Rapid Identification of Korean *Pyropia* Species. *Molecules*. 2017, 22(12). Dostupné z: doi:10.3390/molecules22122182

KNABL, L., M. MANGO, B. STÖGERMÜLLER, L. KIRCHMAIR, W. POSCH, C. LASS-FLÖRL a S. FUCHS. Cluedo – Source identification in a case of septicemia fatality caused by *Capnocytophaga canimorsus*. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 2020, Innsbuck, 24: 7151-7154.

LEADBETTER, E. R., S. C. HOLT a S. S. SOCRANSKY. *Capnocytophaga*: New genus of gram-negative gliding bacteria I. General characteristics, taxonomic considerations and significance. *Archives of Microbiology*. 1979, 122(1), 9-16. Dostupné z: doi:10.1007/BF00408040

LLORET, A., H. EGBERINK, D. ADDIE, et al. *Capnocytophaga Canimorsus* Infection in Cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 2013, 15(7), 588-590. Dostupné z: doi:10.1177/1098612X13489220

LORENZ, T. C. Polymerase Chain Reaction: Basic Protocol Plus Troubleshooting and Optimization Strategies. *Journal of Visualized Experiments*. 2012, (63). Dostupné z: doi:10.3791/3998

LPSN.dsmz.de [online]. International Committee on Systematics of Prokaryotes (ICSP), 2023 [cit. 2023-01-30]. Dostupné z: <https://lpsn.dsmz.de/search?word=Capnocytophaga>

MAHEASWARI, R., J.T. KSHIRSAGAR a N. LAVANYA. Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. *Journal of Indian Society of Periodontology*. 2016. Dostupné z: doi:10.4103/0972-124X.176391

MALLY, M., C. PAROZ, H. SHIN, S. MEYER, L. V. SOUSSOULA, U. SCHMIEDIGER, C. SAILLEN-PAROZ a G. R. CORNELIS. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and occurrence of potential virulence factors. *Microbes and Infection*. 2009, 11(4), 509-514. Dostupné z: doi:10.1016/j.micinf.2009.02.005

MANFREDI, P., F. RENZI a G. R. CORNELIS. Draft Genome Sequences of Three *Capnocytophaga cynodegmi* Strains Isolated from the Oral Cavity of Healthy Dogs. *Genome Announcements*. 2015, 3(3), e00200-15. Dostupné z: doi:10.1128/genomeA.00200-15

NAVARRO, E., G. SERRANO-HERAS, M.J. CASTAÑO a J. SOLERA. Real-time PCR detection chemistry. *Clinica Chimica Acta*. 2015, 439, 231-250. Dostupné z: doi:10.1016/j.cca.2014.10.017

NEW ENGLAND BioLabs Inc.: MseI [online]. Spojené státy americké: New England Biolabs, 2023 [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: www.neb.com/R0525

NEW ENGLAND BioLabs Inc.: StyI-HF ® [online]. Spojené státy americké: New England Biolabs, 2023 [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: www.neb.com/R03500

NOGUEIRA, B. S., A. MARTINI, I. MENEZES, R. L. SOUZA, F. H. MARUYAMA, J. Y. RODRIGUES, L. NAKAZATO a V. DUTRA. Detection of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs with periodontal disease of Brazil. *Research, Society and Development*. 2021, 10(13). Dostupné z: doi:10.33448/rsd-v10i13.21146

- OLIVEIRA, P., M. FIGUEIREDO, V. PAES DE FARIA, G. ABREU aj. RESENDE. Septic Shock Due to *Capnocytophaga canimorsus* Infection in a Splenectomized Patient. *Cureus*. 2021. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.13815
- PAREEK, Ch. S., R. SMOCZYNSKI a A. TRETYN. Sequencing technologies and genome sequencing. *Journal of Applied Genetics*. 2011, 52(4), 413-435. Dostupné z: doi:10.1007/s13353-011-0057-x
- PIAU, C., C. ARVIEUX, M. BONNAURE-MALLET a A. JOLIVET-GOUGEON. *Capnocytophaga* spp. involvement in bone infections: a review. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2013, 41(6), 509-515. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2013.03.001
- PRASIL, P., L. RYSKOVA, S. PLISEK a P. BOSTIK. A rare case of purulent meningitis caused by *Capnocytophaga canimorsus* in the Czech Republic – case report and review of the literature. *BMC Infectious Diseases*. 2020, 20(1). Dostupné z: doi:10.1186/s12879-020-4760-2
- RAMESH R, A. MUNSHI, S.K. PANDA. Polymerase chain reaction. Review, *Natl Med J India*. 1992 May-Jun;5(3):115-9. PMID: 1304285
- RENZI, F., E. HESS, M. DOL, D. KOUDAD, E. CARLIER, M. OHLÉN, E. MOORE a G. R. CORNELIS. Capsular serovars of virulent *Capnocytophaga canimorsus* are shared by the closely related species *C. canis* and *C. cynodegmi*. *Emerging Microbes & Infections*. 2018, 7(1), 1-12. Dostupné z: doi:10.1038/s41426-018-0126-x
- RENZI, F., S.J. ITTIG, I. SADOVSKAYA, et al. Evidence for a LOS and a capsular polysaccharide in *Capnocytophaga canimorsus*. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). Dostupné z: doi:10.1038/srep38914
- RIO, D. C. Reverse Transcription–Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2014, 2014(11). Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot080887
- ROSENZWEIG, N., L. E. HANSON, G. CLARK, G. D. FRANC, W. L. STUMP, Q. W. JIANG, J. STEWART a W. W. KIRK. Use of PCR-RFLP Analysis to Monitor Fungicide Resistance in *Cercospora beticola* Populations from Sugarbeet (*Beta vulgaris*) in Michigan, United States. *Plant Disease*. 2015, 99(3), 355-362. Dostupné z: doi:10.1094/PDIS-03-14-0241-RE

- SANDOE, J. A.T. *Capnocytophaga canimorsus* endocarditis. *Journal of Medical Microbiology*. 2004, 53(3), 245-248. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.05274-0
- SCHADT, E. E., S. TURNER a A. KASARSKIS. A window into third-generation sequencing. *Human Molecular Genetics*. 2010, 19(R2), R227-R240. Dostupné z: doi:10.1093/hmg/ddq416
- STEPANOVIĆ, S., D. VUKOVIĆ, I. DAKIĆ, B. SAVIĆ a M. ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, 40(2), 175-179. Dostupné z: doi:10.1016/S0167-7012(00)00122-6
- SUZUKI, M., K. IMAOKA, Y. HAGA, et al. Characterization of three strains of *Capnocytophaga canis* isolated from patients with sepsis. *Microbiology and Immunology*. 2018, 62(9), 567-573. Dostupné z: doi:10.1111/1348-0421.12642
- SUZUKI, M., M. KIMURA, K. IMAOKA a A. YAMADA. Prevalence of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* in dogs and cats determined by using a newly established species-specific PCR. *Veterinary Microbiology*. 2010, 144(1-2), 172-176. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2010.01.001
- ŠILHA, D., S. SIROTKOVÁ, K. ŠVARCOVÁ, L. HOFMEISTEROVÁ, K. KORYČANOVÁ a L. ŠILHOVÁ. Biofilm Formation Ability of *Arcobacter-like* and *Campylobacter* Strains under Different Conditions and on Food Processing Materials. *Microorganisms*. 2021, 9(10). Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9102017
- TARACH, P. Application of polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) in the analysis of single nucleotide polymorphisms (SNPs). *Acta Universitatis Lodzianae. Folia Biologica et Oecologica*. 2021, 17, 48-53. Dostupné z: doi:10.18778/1730-2366.16.14
- TOLKER-NIELSEN, T., M. GHANNOUM, M. PARSEK, M. WHITELEY a P. MUKHERJEE. Biofilm Development. *Microbiology Spectrum*. 2015, 3(2). Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.MB-0001-2014

TOM, N., F. PARDY, J. KOTAŠKOVÁ, K. PLEVOVÁ a Š. POSPÍŠILOVÁ. *Základní bioinformatické pojmy a postupy využívané pro analýzu DNA pomocí sekvenování nové generace*. Academic Search Complete, 2023. [cit. 2023-03-12]. Dostupné z <https://web.s.ebscohost.com/ehost/detail/detail?vid=0&sid=fd4b9f47-8045-48db-8dd6-f1fb8ac25efd%40redis&bdata=Jmxhbmc9Y3Mmc2l0ZT1laG9zdC1saXZI#AN=135186319&db=a9h>

UMEDA, K., R. HATAKEYAMA, T. ABE, K. TAKAKURA, T. WADA, J. OGASAWARA, S. SANADA a A. HASE. Distribution of *Capnocytophaga canimorsus* in dogs and cats with genetic characterization of isolates. *Veterinary Microbiology*. 2014, 171(1-2), 153-159. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2014.03.023

VÅBENØ, J., B. E. HAUG a M. M. ROSENKILDE. Progress toward rationally designed small-molecule peptide and peptidomimetic CXCR4 antagonists. *Future Medicinal Chemistry*. 2015, 7(10), 1261-1283. Dostupné z: doi:10.4155/fmc.15.64

VALASEK, M. A. a J. J. REPA. The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*. 2005, 29(3), 151-159. Dostupné z: doi:10.1152/advan.00019.2005

VAN BELKUM, A., M. STRUELENS, A. DE VISSER, H. VERBRUGH a M. TIBAYRENC. Role of Genomic Typing in Taxonomy, Evolutionary Genetics, and Microbial Epidemiology. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, 14(3), 547-560. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.14.3.547-560.2001

VAN DAM, A. P., A. VAN WEERT, C. HARMANUS, K. E. HOVIUS, E. C. J. CLAAS a F. A. G. REUBSAET. Molecular Characterization of *Capnocytophaga canimorsus* and Other Canine *Capnocytophaga* spp. and Assessment by PCR of Their Frequencies in Dogs. *Journal of Clinical Microbiology*. 2009, 47(10), 3218-3225. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.01246-09

WAGNER, E. M. Monitoring Gene Expression: Quantitative Real-Time RT-PCR. FREEMAN, Lita A., ed. *Lipoproteins and Cardiovascular Disease*. Totowa, NJ: Humana Press, 2013, s. 19-45. *Methods in Molecular Biology*. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-60327-369-5_2

WEST, S. A., K. WINZER, A. GARDNER a S. P. DIGGLE. *Quorum sensing* and the confusion about diffusion. *Trends in Microbiology*. 2012, 20(12), 586-594. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2012.09.004

- WHITMAN, W. B, F. RAINEY, P. KÄMPFER, M. TRUJILLO, J. CHUN, P. DEVOS, B. HEDLUND a S. DEDYSH, ed. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria*. Wiley, 2015. Dostupné z: doi:10.1002/9781118960608
- WONG, M. L. a J. F. MEDRANO. Real-time PCR for mRNA quantitation. *BioTechniques*. 2005, 39(1), 75-85. Dostupné z: doi:10.2144/05391RV01
- YANG, M C., J. LING a S. MOSAED. *Capnocytophaga canimorsus* blebitis: case report and review of literature. *BMC Ophthalmology*. 2021, 21(1). Dostupné z: doi:10.1186/s12886-021-01823-8
- YANG, W., X. KANG, Q. YANG, Y. LIN a M. FANG. Review on the development of genotyping methods for assessing farm animal diversity. *Journal of Animal Science and Biotechnology*. 2013, 4(1). Dostupné z: doi:10.1186/2049-1891-4-2
- YIN, W., Y. WANG, L. LIU a J. HE. Biofilms: The Microbial “Protective Clothing” in Extreme Environments. *International Journal of Molecular Sciences*. 2019, 20(14). Dostupné z: doi:10.3390/ijms20143423
- ZANGENAH, S. a P. BERGMAN. Rapid killing of *Capnocytophaga canimorsus* and *Capnocytophaga cynodegmi* by human whole blood and serum is mediated via the complement system. *SpringerPlus*. 2015, 4(1), Dostupné z: doi:10.1186/s40064-015-1308-9
- ZANGENAH, S., N. ABBASI, A. F. ANDERSSON a P. BERGMAN. Whole genome sequencing identifies a novel species of the genus *Capnocytophaga* isolated from dog and cat bite wounds in humans. *Scientific Reports*. 2016, 6(1). Dostupné z: doi:10.1038/srep22919