

UNIVERZITA PARDUBICE
FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

DIPLOMOVÁ PRÁCE

2019

Bc. Zuzana Vaňková

UNIVERZITA PARDUBICE

FAKULTA CHEMICKO-TECHNOLOGICKÁ

Izolace bakterií rodu *Arcobacter* z různých vzorků a jejich identifikace

Bc. Zuzana Vaňková

Diplomová práce

2019

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Zuzana Vaňková**
Osobní číslo: **C17490**
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Hodnocení a analýza potravin**
Název tématu: **Izolace bakterií rodu *Arcobacter* z různých vzorků a jejich identifikace**
Zadávající katedra: **Katedra analytické chemie**

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

Teoretická část:

1. Seznamte se s literárními prameny v dané oblasti a vypracujte rešerši vztahující se k zadanému tématu. V úvodu práce se věnujte shrnutí informací o bakteriích rodu *Arcobacter* a jejich vlastnostech.
2. Literární rešerši zaměřte zejména na poslední výsledky výzkumu, "nové" zdroje těchto bakterií, aj.

Experimentální část:

1. Shromážděte vzorky pro možnost izolace a následné identifikace arkobakterů.
2. Vhodným způsobem se pokuste izolovat bakterie rodu *Arcobacter* a následně jednotlivé kmeny identifikujte pomocí multiplexní polymerázové řetězové reakce. U vybraných kmenů ověřte účinek antibiotik.
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 9/2012 Univerzity Pardubice a dále ve znění Dodatku č. 1 ke Směrnicí č. 9/2012 "Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravou".

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

Vedoucí diplomové práce:

Ing. David Šilha, Ph.D.

Katedra biologických a biochemických věd

Datum zadání diplomové práce:

5. února 2019

Termín odevzdání diplomové práce:

9. května 2019



prof. Ing. Petr Kalenda, CSc.
děkan

L.S.



prof. Ing. Karel Ventura, CSc.
vedoucí katedry

V Pardubicích dne 20. února 2019

Prohlašuji:

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

Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., 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. 9/2012 Pravidla pro zveřejňování závěrečných prací a jejich základní jednotnou formální úpravu, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna v Univerzitní knihovně a prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice

V Pardubicích dne 24. 4. 2019

Bc. Zuzana Vaňková

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph.D. za odborné vedení diplomové práce, věcné připomínky a rady při konzultacích. Dále bych chtěla poděkovat rodině a blízkým za podporu během celé doby mého studia.

ANOTACE

Diplomová práce se zabývá patogenními bakteriemi *Arcobacter* spp. Práce shrnuje základní informace o těchto bakteriích, jejich výskyt, možnosti izolace a identifikace. Cílem práce bylo izolovat tyto bakterie z různých vzorků a následně je identifikovat pomocí metody multiplex-PCR. Vybrané bakterie byly testovány z hlediska citlivost/rezistenci k antibiotikům. Práce je souhrnem problematiky výskytu, izolace a identifikace bakterií *Arcobacter* spp. v různých vzorcích.

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter spp., výskyt, izolace, identifikace, rezistence na antibiotika, polymerázová řetězová reakce

TITLE

Isolation of bacteria of the genus *Arcobacter* from various samples and their identification

ANNOTATION

The master thesis deals with pathogenic bacteria *Arcobacter* spp. The thesis summarizes basic information about these bacteria, their occurrence, possibilities of isolation and identification. The goal of this study was isolation of these bacteria from various samples and their identification by the multiplex-PCR method. Then selected bacteria were tested for antibiotic susceptibility/resistance. This thesis is summary about occurrence, isolation and identification of *Arcobacter* spp. from various samples.

KEYWORDS

Arcobacter spp., occurrence, isolation, identification, antibiotic resistance, polymerase chain reaction

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	12
0. ÚVOD	13
1. TEORETICKÁ ČÁST	14
1.1. <i>Arcobacter</i> spp.	14
1.1.1. Historie vzniku a taxonomie rodu <i>Arcobacter</i>	14
1.1.2. Morfologie a vlastnosti arkobakterů	16
1.1.3. Výskyt arkobakterů	17
1.1.4. Patogenita a projevy onemocnění způsobené arkobaktery	22
1.2. Izolace rodu <i>Arcobacter</i>	25
1.2.1. Kultivační média	25
1.2.2. Postupy izolace arkobakterů ze vzorků potravin	27
1.3. Možnosti identifikace bakterií rodu <i>Arcobacter</i>	30
1.3.1. Fenotypová identifikace	30
1.3.2. Genotypová identifikace	32
1.3.3. Analytická identifikace	33
1.4. Citlivost arkobakterů k antibiotikům	34
1.4.1. Testování citlivosti na antibiotika	34
1.4.2. Rezistence bakterií <i>Arcobacter</i> spp. na antibiotika	36
2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1. Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky	38
2.1.1. Chemikálie a standardní látky	38
2.1.2. Reagencie a potřeby pro PCR	38
2.1.3. Používaná antibiotika	41
2.1.4. Mikrobiologická média a roztoky	42

2.1.5.	Sbírkové bakteriální kmeny	44
2.1.6.	Přístroje, zařízení, pomůcky	45
2.2.	Vzorky	46
2.3.	Pracovní postupy	47
2.3.1.	Izolace <i>Arcobacter</i> spp. ze vzorků živočišného původu.....	47
2.3.2.	Identifikace <i>Arcobacter</i> spp. pomocí multiplex-PCR.....	48
2.3.3.	Příprava bakteriální suspenze	48
2.3.4.	Vliv antibiotik na <i>Arcobacter</i> spp.....	49
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE	50
3.1.	Izolace <i>Arcobacter</i> spp. ze vzorků	50
3.2.	Identifikace izolovaných kmenů	51
3.3.	Prevalence <i>Arcobacter</i> spp. ve vzorcích živočišného původu	54
3.4.	Citlivost na antibiotika	60
4.	ZÁVĚR	68
5.	POUŽITÁ LITERATURA	70
6.	PŘÍLOHY	82

SEZNAM ILUSTRACÍ, TABULEK A GRAFŮ

Obrázek 1 Fylogenetické postavení jednotlivých druhů <i>Arcobacter</i> spp. (Pérez-Cataluña et al., 2018)	15
Obrázek 2 Buňky <i>Arcobacter faecis</i> v elektronovém mikroskopu (Whiteduck-Léveillé et al., 2016)	16
Obrázek 3 Způsob přenosu a mechanismus virulence bakterií <i>Arcobacter</i> spp. (Ramees et al., 2017)	23
Obrázek 4 Princip metody MALDI-TOF-MS (Singhal et al., 2015).....	33
Obrázek 5 Testování citlivosti na antibiotika – disková difuzní metoda (Espinel–Ingroff, 2006)	35
Obrázek 6 Testování citlivosti na antibiotika - metoda – E–test (Brook et al., 2013).....	36
Obrázek 7 Růst bakterií <i>Arcobacter cryaerophilus</i> (vlevo) a <i>Arcobacter butzleri</i> (vpravo) na neselektivním TSA agaru (foto autor)	51
Obrázek 8 Vzorový záznam identifikace bakterií <i>Arcobacter</i> spp.	53
Obrázek 9 Antibiogram – <i>A. butzleri</i> , vzorek V69 (foto autor).....	62
Tabulka 1 Přehled první izolace jednotlivých bakterií rodu <i>Arcobacter</i> (Ramees et al., 2017)	18
Tabulka 2 Biochemické testy pro odlišení <i>Arcobacter</i> spp. (Collado a Figueras, 2011)	30
Tabulka 3 Přehled vzorků pozitivních na přítomnost <i>Arcobacter</i> spp. (m–PCR identifikace)	52
Tabulka 4 Prevalence <i>Arcobacter</i> spp. ve vzorcích živočišného původu.....	54
Tabulka 5 Zařazení vybraných antibiotik do příslušných skupin	60
Tabulka 6 Vybrané izolované kmeny arkobakterů pro testování rezistence/citlivosti k antibiotikům	61
Tabulka 7 Breakpointy vybraných antibiotik	63
Tabulka 8 Mikrobiální citlivost <i>Arcobacter butzleri</i> a <i>Arcobacter cryaerophilus</i>	65
Tabulka 9 Multirezistence arkobakterů k antibiotikům	67

Graf 1 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost <i>Arcobacter</i> spp. – vzorky drůbežího masa	55
Graf 2 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost <i>Arcobacter</i> spp. – vzorky ryb a mořských plodů	57
Graf 3 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost <i>Arcobacter</i> spp. – ostatní vzorky.....	58

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

A.	<i>Arcobacter</i>
AFLP	polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (amplified fragment length polymorphism)
AK	amikacin
AMC	amoxycilin/klavulanová kyselina
AMP	ampicilin
ASM médium	<i>Arcobacter</i> selektivní polotuhé médium (<i>Arcobacter</i> selective medium)
ATB	antibiotika
ATM	aztreonam
BHI bujon	bujon z mozko–srdcové infuze (brain–heart infusion)
C	chloramphenicol
CASA agar	<i>Campylobacter</i> selektivní agar
CAT suplement	cefoperazon–amphotericin–teicoplanin suplement
CCDA agar	deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem (modified charcoal-cefoperazone-deoxycholate agar)
CIN agar	cefsulodin–irgasan–novobiocin agar
CIP	ciprofloxacin
CN	gentamycin
CVA agar	cephalothin–vancomycin–amphotericin agar
DA	clindamycin
DO	doxycyklin
DGGE	denaturační gradientová gelová elektroforéza (denaturing gradient gel electrophoresis)
EMJH médium	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris médium
E	erythromycin
ENR	enrofloxacin
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (fluorescence <i>in situ</i> hybridization)
GC	plynová chromatografie (gas chromatography)

HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
I	intermediární
ICMSF	The International Commission on Microbiological Specifications for Foods
JM bujon	Johnson–Murano bujon
KF	cephalotin
LB médium	Luria–Bertani médium
MALDI	laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (matrix-assisted laser desorption/ionization)
MBC	minimální baktericidní koncentrace (minimum bactericidal concentration)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration)
MR test	test s methylenovou červení (methyl red test)
MS	hmotnostní spektrometrie (mass spectrometry)
NA	kyselina nalidixová
OX	oxacillin
P	penicillin G
PFGE	pulsní gelová elektroforéza (pulse-field gel electrophoresis)
PCR	polymerázová řetězová reakce (polymerase chain reaction)
R	rezistentní
RFLP	polymorfismus délky restrikčních fragmentů (restriction fragment length polymorphism)
S	citlivý
ST	streptomycin
spp.	subspecies
TE	tetracyklin
TSA agar	trypton–sojový agar (trypticase soy agar)
TSB bujon	trypton–sojový bujon (trypticase soy broth)
TSI agar	triple–sugar–iron agar
TOB	tobramycin
TOF	analyzátor doby letu (time-of-fly analyzer)
VP	Voges-Proskauer test

0. ÚVOD

V dnešní době je stále větší důraz kladen na kvalitní a zdravé potraviny. S tím souvisí i jejich mikrobiologická nezávadnost. Vlivem nesprávné hygieny prostředí nebo pracovníků dochází k přenosu patogenních mikroorganismů do potravin, proto je důležitá jejich mikrobiologická kontrola. Jedním z těchto mikroorganismů je i *Arcobacter* spp., na jehož přítomnost v potravinách není doposud kladena velká pozornost. Tyto bakterie se vyskytují převážně v mase nebo ve vodě, mohou se však nacházet i v zelenině. Nákaza arkobakteriózou se projevuje onemocněním gastrointestinálního traktu a je velmi podobná kampylobakterióze nebo listerióze a může znamenat vážné riziko pro lidské zdraví. Průběh onemocnění není příliš vážný, ale existují případy, kdy je nutné nasadit léčbu antibiotiky.

Antibiotika byla poprvé objevena na počátku 20. století Alexandrem Flemingem. Od té doby se začala používat při léčbě bakteriálních infekcí. Postupem času si vlivem jejich nesprávného podávání začaly bakterie tvořit rezistenci, která se ukazuje jako stále zvětšující se celosvětový problém. Velký vliv na rezistenci má jak hospodářství, kde se antibiotika podávají v mnoha případech při léčení infekcí nebo jako preventivní opatření, tak i u lidí, kdy bývají antibiotika mnohdy nadužívána, i když to není zapotřebí nebo není dodržována správná délka užívání. Bakterie si tak tvoří stále nové rezistence a tím se stává léčení infekčních onemocnění složitější. Existuje tedy teorie, že bude léčba nemocí, způsobených patogenními bakteriemi, do budoucna velmi obtížná.

Teoretická část této diplomové práce byla zaměřena na charakteristiku bakterií rodu *Arcobacter*, jejich patogenitu, výskyt nejen v potravinách a na možnosti jejich izolace a identifikace. Cílem praktické části bylo izolovat tyto bakterie z různých vzorků potravin a následně je identifikovat za pomoci metody polymerázové řetězové reakce. U vybraných vyizolovaných kmenů bylo dále provedeno testování jejich citlivosti na antibiotika.

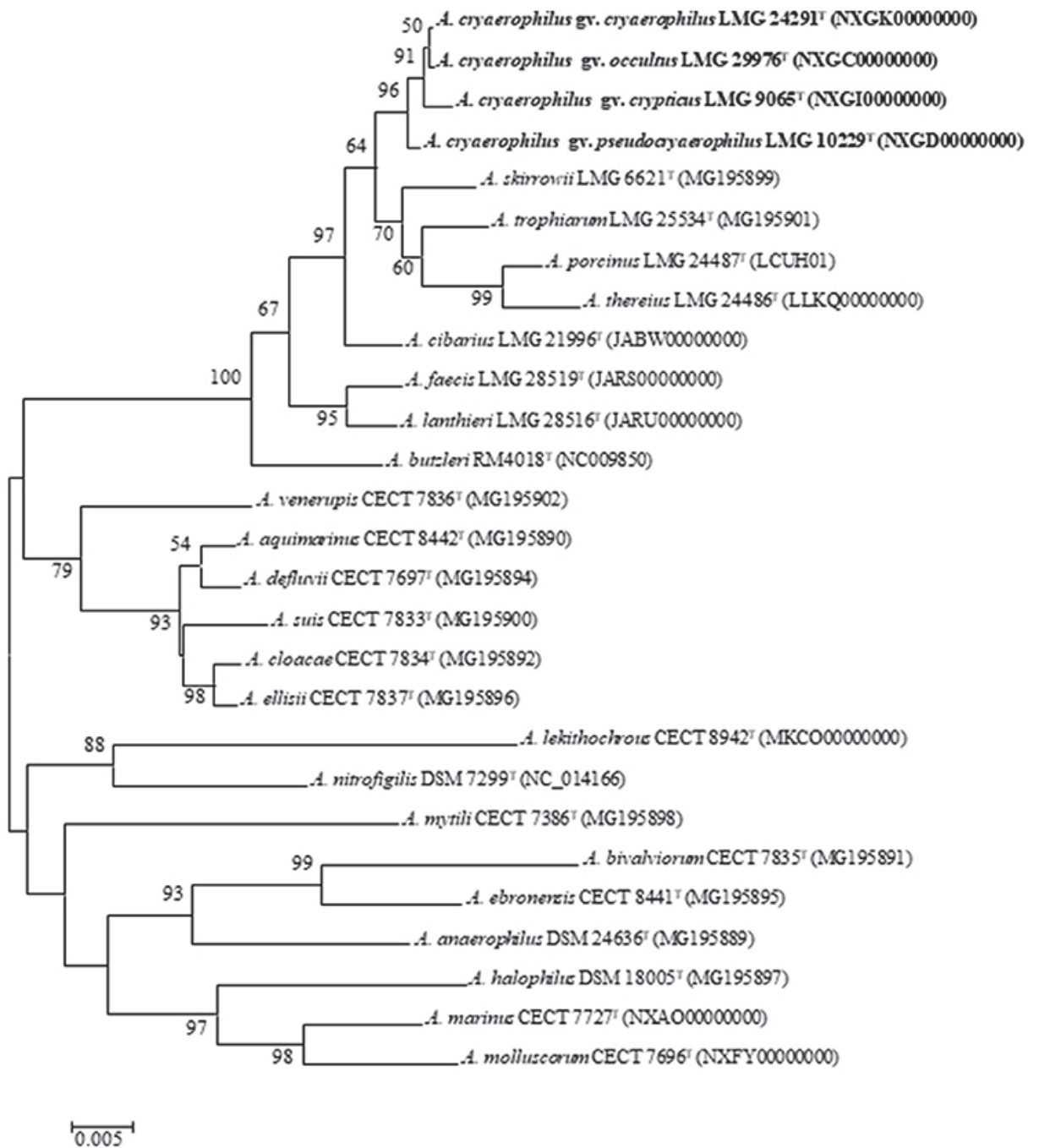
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. *Arcobacter* spp.

Bakterie rodu *Arcobacter* patří do čeledi *Campylobacteraceae*. Tato čeleď kromě rodu *Arcobacter* zahrnuje dále rody *Campylobacter* a *Sulfurospirillum* (Vicente-Martins et al., 2018).

1.1.1. Historie vzniku a taxonomie rodu *Arcobacter*

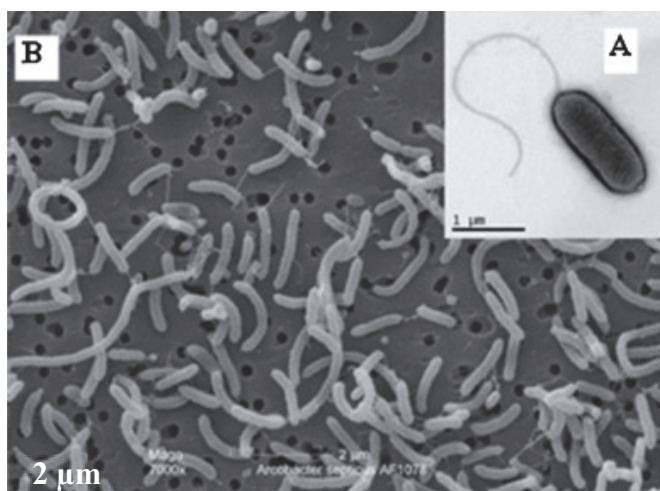
Roku 1977 byly poprvé popsány mikroaerofilní zakřivené tyčinky, nacházející se v abortech dobytka, prasat a ovcí (Ellis et al., 1977), ale nový rod byl navržen o několik let později Vandammem a De Layem (1991). Tyto bakterie byly nejprve pojmenovány jako „aerotolerantní kampylobaktery“, kam spadaly 2 druhy vyčleněné z rodu *Campylobacter* – *Campylobacter cryaerophila* (nyní *Arcobacter cryaerophilus*) a *Campylobacter nitrofigilis* (nyní *Arcobacter nitrofigilis*). *Arcobacter cryaerophilus* byl poprvé izolován z abortů hospodářských zvířat, *Arcobacter nitrofigilis* z kořenů rostliny *Spartina alterniflora* (Ho et al., 2006). V roce 1992 byl rod dále rozšířen o další dva druhy – *Arcobacter butzleri* a *Arcobacter skirrowii* (Collado a Figueras, 2011). Díky zavedení molekulární identifikace se počet druhů neustále zvyšuje a i do budoucna se očekává další nárůst (Banting et al., 2018). V současné době rod zahrnuje 26 uznaných druhů – *A. cryaerophilus*, *A. nitrofigilis*, *A. butzleri*, *A. skirrowii*, *A. cibarius*, *A. halophilus*, *A. mytili*, *A. thereius*, *A. marinus*, *A. trophiarum*, *A. defluvii*, *A. molluscorum*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum*, *A. venerupius*, *A. anaerophilus*, *A. cloacae*, *A. suis*, *A. ebronensis*, *A. aquimarinus*, *A. lanthieri*, *A. pacificus*, *A. faecis*, *A. acticola*, *A. porcinius* a *A. lekithochrous* (Vicente-Martins et al., 2018). Taxonomie tohoto rodu je založena na analýze 16S rRNA genů (Pérez-Cataluña et al., 2018). Na Obrázku 1 je znázorněno fylogenetické postavení rodu *Arcobacter*, které je založeno na sekvenaci 16S rRNA.



Obrázek 1 Fylogenetické postavení jednotlivých druhů *Arcobacter* spp. (Pérez-Cataluña et al., 2018)

1.1.2. Morfologie a vlastnosti arkobakterů

Rod *Arcobacter* se svou morfologií a vlastnostmi příliš neliší od rodu *Campylobacter*. *Arcobacter* spp. jsou gram-negativní, spirálovité nebo esovitě zakřivené tyčinky, které netvoří spory a jsou dlouhé 0,5–3 μm a široké 0,2–0,9 μm (Yesilmen et al., 2014). Díky polárnímu bičíku na jednom nebo obou koncích tyčinky jsou schopny vývrtkovitého pohybu (Ho et al., 2006; Motarjemi a Adams, 2006). Na Obrázku 2 je znázorněna morfologie buněk *Arcobacter faecis* pomocí transmisní (A) a skenovací elektronové mikroskopie (B).



Obrázek 2 Buňky *Arcobacter faecis* v elektronovém mikroskopu (Whiteduck-Léveillé et al., 2016)

Tyto bakterie jsou oxidáza–pozitivní, většina kmenů hydrolyzuje indoxyl acetát a nehydrolyzují hyppurát, kasein, lecitin, želatinu ani škrob, netvoří indol ani ureázu (Houf et al., 2005; Arias et al., 2011; Vandamme et al., 1991; Levican et al., 2012). VP (Voges-Proskauer) a MR (methyl red) test mají negativní (Vandamme et al., 1991). *A. cryaerophilus* je silně kataláza pozitivní, *A. butzleri* ale projevuje jen slabou reakci (Chinivasagam et al., 2007). Na TSI (triple-sugar iron) agaru netvoří H_2S a na krevním agaru netvoří hemolýzu (Levican et al., 2012). Na TSA agaru (trypton sojový agar) rostou tyto bakterie v drobných, většinou nepigmentovaných, béžových nebo našedivělých koloniích (Levican et al., 2016).

Arcobacter spp. roste v širokém rozmezí teplot od 15–42 $^{\circ}\text{C}$ (Yesilmen et al., 2014). Tyto bakterie jsou schopné přežít chladničkové teploty (4 $^{\circ}\text{C}$) a mohou se při těchto teplotách i množit (Badilla-Ramírez et al., 2016). Některé kmeny přežijí i mrazničkové teploty (-20 $^{\circ}\text{C}$), kdy dochází během prvních 24 hodin k prudkému poklesu počtu životaschopných buněk, s postupem času se však už jejich počet příliš nemění (Hilton et al., 2001). Optimální teplota

pro růst v přítomnosti atmosférického kyslíku je 30 °C (Zenetti et al., 1996). Některé kmeny, na rozdíl od rodu *Campylobacter*, přežívají jak při anaerobních, tak i aerobních podmínkách. Jejich optimální růst nastává při mikroaerofilních podmínkách za přítomnost 3-10 % kyslíku (Ho et al., 2006). Výjimkou je *A. anaerophilus*, který k růstu vyžaduje striktně anaerobní prostředí (Banting et al., 2018). Arkobaktery rostou v 2–4 % NaCl (Houf et al., 2005), optimální koncentrace NaCl pro *A. cryaerophilus* je 0,5–1 % do 24 hodin a po až 2 % 96 hodinách. U *A. butzleri* je pak optimální koncentrace NaCl 0,09-0,5 % po 96 hodinách (D'Sa a Harrison, 2005). *A. halophilus* vyžaduje k růstu až 2 % NaCl (Banting et al., 2018). Tyto bakterie přežívají v rozmezí pH 5,5–8, přičemž optimální pH pro *A. butzleri* je 6–7 a pro *A. cryaerophilus* 7–7,5 (D'Sa a Harrison, 2005).

1.1.3. Výskyt arkobakterů

První izolace *Arcobacter* spp. proběhla v roce 1977 z potracených plodů krav, prasat a ovcí (Barboza et al., 2017). Avšak v dnešní době jsou tyto bakterie izolovány i z dalších zdrojů. Vedle hospodářských zvířat se *Arcobacter* spp. může vyskytovat u drůbeže, mořských živočichů, domácích mazlíčků, ale i v přírodě. K přenosu na člověka dochází při konzumaci nebo manipulaci s kontaminovanými potravinami nebo vodou, ale může k němu docházet i pouhým kontaktem s nakaženým zvířetem (Whiteduck-Léveillé et al., 2015). Nejčastěji izolovanými druhy jsou *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* (Atabay et al., 2006). V Tabulce 1 jsou popsány zdroje první izolace jednotlivých zástupců rodu *Arcobacter*.

Tabulka 1 Přehled první izolace jednotlivých bakterií rodu *Arcobacter* (Ramees et al., 2017)

Druh <i>Arcobacter</i>	První izolace	Druh <i>Arcobacter</i>	První izolace
<i>A. nitrofigilis</i>	kořeny <i>Spartina alterniflora</i> (1983)	<i>A. ellisii</i>	měkkýši a korýši (2011)
<i>A. cryearophilus</i>	abort hovězího dobytka (1985)	<i>A. venerupis</i>	měkkýši a korýši (2012)
<i>A. butzleri</i>	lidské výkaly (1991)	<i>A. bivalviorum</i>	měkkýši a korýši (2012)
<i>A. skirrowii</i>	ovčí výkaly (1992)	<i>A. cloacae</i>	kanalizace (2013)
<i>A. cibarius</i>	kuřecí maso (2003)	<i>A. suis</i>	vepřové maso (2013)
<i>A. halophilus</i>	slaná laguna (2005)	<i>A. anaerophilus</i>	sediment (2013)
<i>A. mytili</i>	mušle (2009)	<i>A. ebronensis</i>	mušle (2015)
<i>A. thereius</i>	abort vepřového (2009)	<i>A. aquimarinus</i>	mořská voda (2015)
<i>A. marinus</i>	mořská voda, mořské řasy a hvězdice (2010)	<i>A. lanthieri</i>	dobytek a hnůj (2015)
<i>A. trophiarium</i>	prasečí výkaly (2011)	<i>A. pacificus</i>	mořská voda (2016)
<i>A. defluvii</i>	odpadní voda (2011)	<i>A. acticola</i>	mořská voda (2016)
<i>A. molluscorum</i>	měkkýši a korýši (2011)	<i>A. lekithochrous</i>	hřebenatky a mořská voda (2017)

Proběhla studie, při které byly bakterie *Arcobacter* spp. izolovány z různých zdrojů jako je kuřecí maso, krocan, výtěry z kloaky a rekta hospodářských zvířat, výkaly, mleté hovězí maso, hovězí žlučník a pitná voda. Arkobaktery byly vyizolovány z 12 % vzorků a ve vzorcích se nejčastěji vyskytoval *A. butzleri* (Aydin et al., 2007). Další studie prokázaly prevalenci bakterie *Arcobacter* spp. v různých vzorcích 11 % (Kabeya et al., 2004), 6,6 % (Mohan et al., 2014) a 39,4 % (Fernandez et al., 2015). Z výsledků studií provedených v různých zemích však nelze vyvodit definitivní závěr o prevalenci, protože to může ovlivnit řada faktorů, jako je velikost vzorku a izolační postupy (Aydin et al., 2007). Při přímé izolaci dochází k nižšímu zachytu, proto se často zařazuje krok pomnožení. Studie porovnávající tyto dvě metody zjistila prevalenci 8 % při přímé identifikaci, při zařazení pomnožovacího kroku byla prevalence až 68 % (Gude et al., 2005). Další studie zjistila prevalenci 47 % oproti 74 % (Levican et al., 2016). Při studii vzorků odebraných u koní je zjištěna prevalence 0 % oproti 15 %, z prasat 28 % oproti 44 % a ovcí 5 % oproti 16 % (Ho et al., 2006). Některé druhy jsou také velmi citlivé na antimikrobiální látky obsažené v pomnožovacím médiu. Detekci *Arcobacter* spp. může ovlivnit i přítomnost střevních bakterií, proto se při izolaci často zahrnuje krok membránové filtrace, aby se jejich výskyt eliminoval (Ho et al., 2006).

Výskyt u zvířat

Častým rezervoárem *Arcobacter* spp. jsou živočichové. Mohou se vyskytovat u hospodářských zvířat (krav, prasat, ovcí a koní), u drůbeže (slepice, kachen, hus a krůt), u králíků, domácích mazlíčků, ale i u sladkovodních a mořských ryb a dalších mořských živočichů. Byl zaznamenán výskyt arkobakterů u nemocných, ale i u zdravých jedinců. Běžně se vyskytují ve střevním traktu a ve stolici zvířat (Laishram et al., 2016). Onemocnění se projevuje převážně mastitidami, aborty a průjmem, u většiny jedinců se ale přítomnost této bakterie neprojevuje (Ho et al., 2006). *A. butzleri* je spojován s enteritidou a průjmem u prasat, skotu a koní, *A. skirrowii* s průjmem a hemoragickou kolitidou ovcí a skotu. Maso kuřat, krůt, kachen a hus je velmi často kontaminováno arkobaktery, i když zvíře nejeví známky onemocnění, a proto je drůbež považována za potenciální rezervoár bakterií rodu *Arcobacter* (Collado a Figueras, 2011). Dále byly u hospodářských zvířat nalezeny *A. cibarius*, *A. thereius* a *A. trophiarum* (Doudah et al., 2012). Díky kontaminaci vody dochází k přenosu *Arcobacter* spp. na ryby a další vodní živočichy (Laishram et al., 2016). Spousta nových druhů arkobakterů bylo izolováno z mořské vody nebo z mořských ryb a měkkýšů (Salas-Massó et al., 2016). Dále byl *Arcobacter* spp. izolován z domácích

mazlíčků – psů a koček (Pejchalová et al., 2016), primátů – makaků rhesus a goril (Simmons a Gibbson, 2012; Banting et al., 2018), divoce žijících ptáků – holubů (Giacometti et al., 2017), mývalů, nosorožců, gazel, ptáků nandu, alpak, želv (Collado a Figueras, 2011), hadů a ještěřů (Banting et al., 2018).

Výskyt v potravinách

Velmi častým rezervoárem *Arcobacter* spp. jsou potraviny živočišného původu, přičemž nejvyšší výskyt byl hlášen u drůbeže, poté následně vepřového masa a hovězího masa. Původ kontaminace drůbežního masa je stále nejasný a často diskutován, ale u hovězího a vepřového masa je považován za hlavní zdroj kontaminace kontakt s fekáliemi během porážky (Doudah et al., 2012). V drůbežím mase se nejhojněji nachází *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* (Atabay et al., 2006). *Arcobacter* spp. byl nalezen i v kravském mléce. Ke kontaminaci dochází nejspíš sekundární kontaminací, která může být způsobena nedostatečnou hygienou prostor a pracovníků nebo znečištěním struků fekáliemi (Wesley a Baetz, 1999). *Arcobacter* spp. je dokonce schopný přežít i technologický proces při výrobě mozzarely, čerstvého sýru a ricotty (Banting et al., 2018). I přes přítomnost *Arcobacter* spp. ve vejcovodu a střevním traktu nosnic, nebyly tyto bakterie nalezeny ve vejcích (Banting et al., 2018). Ve studii probíhající v Indii byla zjištěna prevalence v kuřecím mase 16,6 % a v kachním mase 10,0 % (Sekhar et al., 2017). Studie z roku 2018 zkoumala přítomnost arkobakterů ve vzorcích kuřecího masa, kde byla zjištěna celková prevalence 18,3 % (Oliviera et al., 2018). V další studii byly testovány vzorky masa, mléka, stěrů z povrchů a odpadní vody odcházející z jatek. Bakterie *Arcobacter* spp. byly izolovány ze 40 % vzorků stěrů z povrchu desek na krájení masa a z nožů, z 29 % vzorků vody, z 24 % vzorků mraženého kroceního masa, z 24 % vzorků mléka a ze 7 % vzorků mletého hovězího masa. Mezi identifikované druhy patřily *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii* (Elmali a Can, 2017).

Bakterií *Arcobacter* spp. je kontaminován velký počet sladkovodních měkkýšů a ryb, žijících v blízkosti odpadních vod a díky vypouštění této vody do moří a oceánů jsou kontaminovány ryby žijící ve slaných vodách i měkkýši (Banting et al., 2018). Mořské plody jsou možným zdrojem nákazy člověka, a to hlavně díky tomu, že se často konzumují syrové nebo nedostatečně tepelně upravené. Tyto bakterie byly také nalezeny v krevetách, slávkách, ústřicích a srdcovkách (Collado a Figueras, 2011). Nejčastěji se ve vzorcích vyskytují *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. Ze slávek byly dále izolovány druhy *A. venerupis*,

A. ebronensis, *A. ellisii*, *A. bivalviorum* a *A. mytili*, z ústřic *A. marinus*, *A. halophilus* a *A. mytili* (Banting et al., 2018). Ve studii z oblasti Jadranu bylo zkoumáno celkem 162 vzorků měkkýšů. Celková prevalence bakterie *Arcobacter* spp. byla 30 %. Bylo zjištěno, že *A. butzleri* se mnohem častěji izoluje ze vzorků odebraných v zimním a jarním období (29 %) než v letním a podzimním (8 %). Dále bylo popsáno, že *A. butzleri* se mnohem častěji objevuje ve vzorcích pozitivních na přítomnost bakterie *Escherichia coli*. *E. coli* je tedy možným indikátorem výskytu *Arcobacter* spp. (Leoni et al., 2017).

Arcobacter spp. se může vyskytovat také v zelenině (Mottola et al, 2016). Vzhledem k tomu, že se zelenina konzumuje převážně syrová, může dojít k přenosu bakterií na člověka. V Indii byly zkoumány vzorky zeleniny z maloobchodu (mrkev, řepa, zelí, rajče, koriandr a okurka) a celková prevalence bakterie *Arcobacter* spp. v zelenině byla 13,7 % (Ramees et al., 2018).

Výskyt v životním prostředí a tvorba biofilmu

Zástupci rodu *Arcobacter* se vyskytují zejména ve vodách povrchových, podzemních, odpadních, mořských i ve vodách pitných (Laishram et al., 2016). *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* a *A. skirrowii* se velmi často nacházejí ve vodách kontaminovaných fekáliemi. Tyto bakterie se mohou snadno dostat, jako součást fekální kontaminace, do různých vodních zdrojů. Takto kontaminovaná voda je považována za pravděpodobnou cestu přenosu bakterie *Arcobacter* spp. na člověka a zvířata (Banting et al., 2018). Studie probíhající v Thajsku zkoumala výskyt *Arcobacter* spp. v přírodních vodách, kde bylo 23 % vzorků pozitivních na tuto bakterii a v kanalizaci, kde všechny zkoumané vzorky vykazovaly přítomnost této bakterie (Snelling et al., 2006).

Z prostředí slaných vod byly izolovány druhy *A. marinus* a *A. halophilus* (Lastovica et al., 2014). Dalšími zástupci bakterie *Arcobacter* spp. vyskytující se pouze ve slaných vodách jsou *A. aquimarinus*, *A. bivalviorum*, *A. ebronensis*, *A. ellisii*, *A. mytili*, *A. molluscorum* a *A. venerupis* (Levican et al, 2015; Levican et al., 2012, Carlstrom et al., 2013; Banting et al., 2018). Tyto bakterie jsou na rozdíl od rodu *Campylobacter* spp. schopny přežít i ve vyšších koncentracích NaCl, za nižších teplotních podmínek a za přítomnosti vzdušného kyslíku (Collado et al., 2008). V Indii probíhala studie zaměřená na výskyt *Arcobacter* spp. v mořské vodě, kdy celková prevalence byla 60 %. Byl zde potvrzen výskyt bakterií *A. butzleri* a *A. mytili* (Rathlavath et al., 2017).

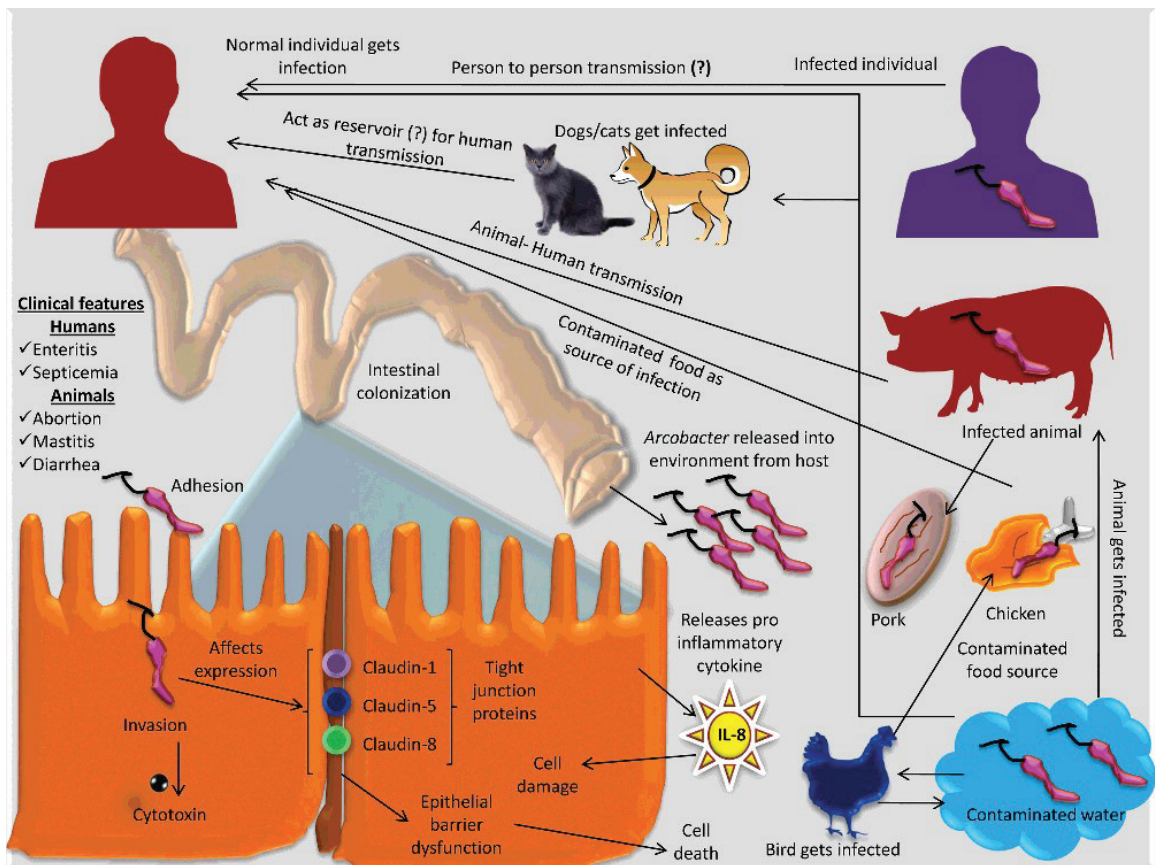
Bylo prokázáno, že *Arcobacter* spp. tvoří biofilm a díky tomu je schopný přilnout k vodovodnímu potrubí (Banting et al., 2018). Řada studií ukázala, že chlorace pitné vody je vhodný zásah pro odstranění *Arcobacter* spp. z pitné vody (Shrestha et al., 2018; Collado et al., 2010). *A. butzleri* je na chlor dokonce velmi citlivý (Červenka, 2008). Přestože byla prokázána citlivost *A. butzleri* na chlor, není doposud jistota, zda konvenční postupy pro úpravu pitné vody mohou účinně odstranit tuto bakterii (Collado a Figueras, 2011).

Arcobacter butzleri je schopný přežít a rozmnožovat se v prostředí jatek díky schopnosti tvořit biofilm za nízkých teplot (Ferreira et al., 2013). Tento biofilm může vznikat na nerezové oceli, mědi i plastu (Kjeldgaard et al., 2009).

Arcobacter spp. se vyskytuje i v půdě a to nejspíše díky hnojení, zalévání kontaminovanou vodou nebo vypouštění odpadních vody do životního prostředí (Banting et al., 2018). *A. nitrofigilis* byl poprvé objeven na kořenech rostliny *Spartina alterniflora* (Ramees et al., 2017).

1.1.4. Patogenita a projevy onemocnění způsobené arkobaktery

Významným zdrojem přenosu bakterie *Arcobacter* spp. na člověka je konzumace syrového nebo tepelně nedostatečně upraveného masa (Banting et al., 2018) a prostřednictvím kontaminované vody (Van Den Abeele et al., 2014). Arkobakteriáza u lidí je převážně spojena s druhy *Arcobacter butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. V roce 2014 byl ve vzorku lidské stolice poprvé popsán *A. thereius* (Banting et al., 2018). Mechanismus virulence doposud není zcela znám, z dosavadních prací však vyplývá, že *Arcobacter* spp. má schopnost adheze (napadá tělní buňky, včetně lidských střevních epitelových buněk), invaze a působí tak cytotoxicky (Banting et al., 2018, Ramees et al., 2017). Způsob přenosu a mechanismy virulence jsou zobrazeny na Obrázku 3.



Obrázek 3 Způsob přenosu a mechanismus virulence bakterií *Arcobacter* spp. (Ramees et al., 2017)

Klinické projevy onemocnění jsou velmi podobné nákaze *Campylobacter jejuni* (Collado a Figueras, 2011). Ve srovnání s kamylobaktery je velmi málo informací o genech arkobakterů podílejících se na virulenci. Bylo zjištěno, že některé virulentní determinanty identifikované u *C. jejuni* mají homology v *A. butzleri* (Šilha et al., 2018). Patří mezi ně *ciaB* *Campylobacter jejuni* invazní antigen B, *mviN* integrální membránový protein potřebný pro biosyntézu peptidoglykanu, *pldA* protein aktivující fosfolipázu A, spojenou s lýzou erytrocytů, *tlyA* protein aktivující hemolyzinový gen, *cadF* a *cjl349* kódují proteiny vázající fibronektin, který podporuje vazbu bakterií na střevní buňky, *hecA* filamentární hemaglutinin, *hecB*, který kóduje aktivační protein hemolyzinu a *irgA* vnější membránový protein (Sekhar et al., 2017).

A. butzleri, *A. skirrowii*, *A. cryaerophilus* a *A. cibarus* jsou považovány za potenciální lidské patogeny (Laishram et al., 2016). Tyto bakterie byly spojeny s gastrointestinálním onemocněním a bakteriemií u člověka a rovněž s aborty, mastitidami a průjmy u zvířat (Salas-Massó et al., 2016). První případy onemocnění člověka pocházejí z roku 1992, kdy bylo

v italské škole popsáno onemocnění mnoha lidí projevující se recidivujícími břišními křečemi spojenými s *Arcobacter butzleri* (Banting et al., 2018). U člověka byly dále pozorovány případy endokarditidy a peritonitidy (Laishram et al., 2016). Onemocnění způsobené *A. butzleri* se projevuje bolestí břicha spojené s průjmem, nauzeou, zvracením nebo horečkou (Vandenberg et al., 2004). *A. cryaerophilus* byl nalezen i u jedinců bez jakýchkoliv projevů onemocnění (De Smet et al., 2011). Příznaky onemocnění mohou být pozorovány až 3 dny po požití kontaminované potravin (Banting et al., 2018). Onemocnění vyvolané rodem *Arcobacter* je často nedostatečně zaznamenáváno, protože se nápadně podobá projevům kamylobakteriázy a listeriázy a testy na přítomnost *Arcobacter* spp. v klinických materiálech se téměř neprovádějí (Motarjemi a Adams, 2006). Při vyšetření stolice se většina laboratoří zabývá převážně bakteriemi *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli* a pro odhalení rodu *Arcobacter* nejsou zpravidla ani použity vhodné kultivační metody a podmínky (Van Den Abeele et al., 2014). V roce 2002 byl *A. butzleri* komisí ICMSF (The International Commission on Microbiological Specifications for Foods) zařazen do seznamu mikroorganismů představující vážné riziko pro lidské zdraví (Šilha et al., 2018).

1.2. Izolace rodu *Arcobacter*

Arkobaktery jsou často chybně identifikovány jako atypické bakterie *Campylobacter* spp. a nesprávné určení může vést k podhodnocení jejich výskytu v potravinách (González et al., 2007). Možností, jak tyto bakterie odlišit, je použití různých růstových podmínek kultivace.

1.2.1. Kultivační média

Pro izolaci *Arcobacter* spp. byla použita řada metod, jak modifikované techniky pro stanovení rodu *Campylobacter* a *Leptospira*, tak i techniky specifické pro izolaci bakterií rodu *Arcobacter*. Při první izolaci v roce 1977 z abortů skotu bylo použito polotuhé médium pro izolaci rodu *Leptospira*. Jednalo se o Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris (EMJH) médium doplněné o 5-fluorouracil a králičí sérum (Merga et al., 2011, Driessche et al., 2003).

Pro pomnožení se dříve používal Prestonův bujon a Boltonův bujon, které se běžně používají pro *Campylobacter* spp. Později navrhli Atabay a Corry (1998) obohacovací bujon *Arcobacter* s CAT (cefoperazon, amphotericin B a teicoplaninem) suplementem, který byl účinnější než dva předchozí bujony. Johnson a Murano (1999) popsali JM bujon s obsahem cefoperazonu, 5-fluorouracilu, aktivního uhlí, žlučových soli a Houf et al. (2001) popsali postup používající *Arcobacter* médium s přidavkem 5 antibiotik (cefoperazon, amphotericin B, 5-fluorouracil, novobiocin, trimethoprim). Tuto metodu později modifikovali Van Driessche et al. (2003) přidáním cykloheximidu a zvýšením koncentrace novobiocinu. Další možností je použití EMJH s polysorbátem 80, Brucella bujonu, trypton-sojového bujonu (TSB) nebo BHI bujonu (bujon z mozko–srdcové infuze) (Houf et al., 2001; Merga et al., 2011, Rafath a Balamurugan, 2013).

Arcobacter selektivní polotuhé médium (ASM), obsahující cefoperazon, piperacillin, trimethoprim a cykloheximid, se často používá pro izolaci *Arcobacter* spp. z potravin (Collado a Figueras, 2011). Pro izolaci nejen z potravin jsou vhodné i CAT agar, obsahující cefoperazon, amphotericin B a teicoplanin, Johnson a Murano agar (JM agar), který obsahuje cefoperazon, 5-fluorouracil, aktivní uhlí a žlučové soli a CVA (cephalothin, vancomycin a amphotericin B) agar (Ramees et al., 2016; Hamill et al., 2008; Collins et al., 1996). Dále je možné použití neselektivního TSA (trypton sojový agar), BHI (brain heart infusion) agaru, krevního agaru nebo Mueller-Hinton agaru (Collins et al., 1996; van den Abeele et al., 2016; Rafath a Balamurugan, 2013; Collado a Figueras, 2011). Mueller-Hinton agar se také

velmi často používá k zjišťování citlivosti *Arcobacter* spp. na antibiotika (Van den Abeele et al., 2016). Na krevním agaru roste *Arcobacter* spp. v malých bílých až naředlých koloniích bez pigmentace a hemolýzy (Motarjemi a Adams, 2006).

Pro izolaci lze volit média, která se využívají především pro kultivaci jiných bakteriálních rodů. Může být použit modifikovaný CCDA (deoxycholátový agar s aktivním uhlím a cefoperazonem), agar Karmali, krevní agar Columbia a chromogenní selektivní agar CASA, které se primárně používají pro kultivaci *Campylobacter* spp. (Ramees et al., 2017; Wybo et al., 2004; Šilha et al., 2015). *Arcobacter* spp. roste na tomto médiu (CASA) v červeně zbarvených koloniích (Šilha et al., 2015). *Arcobacter* spp. se může inokulovat na CIN (cefsulodin, irgasan, novobiocin) agaru, který je primárně určen pro izolaci rodu *Yersinia* (Ramees et al., 2017). Tato média bývají často doplňována CAT suplementem.

Některé arkobaktery potřebují ke svému růstu zvláštní podmínky. *A. halophilus* je striktní halofil, který vyžaduje, přítomnost alespoň 2 % chloridu sodného. *A. halophilus* a *A. marinus*, kteří bývají izolováni z mořské vody, se pomnoží v *Arcobacter*-CAT bujónu doplněného o 2,5 % NaCl a následně se kultivují na mořském agaru. Díky zavedení tohoto protokolu je možné identifikovat až o 40 % více arkobakterů ve vzorcích mořských vod a živočichů, než zajišťuje konvenční metoda bez přídavku soli (Banting et al., 2018).

1.2.2. Postupy izolace arkobakterů ze vzorků potravin

Doposud neexistuje standardní metoda pro izolaci *Arcobacter* spp., platí však obecný postup. Ten zahrnuje pomnožení v tekutém médiu za přítomnosti antibiotik po dobu 48 hodin a následné vyočkování na tuhé médium a kultivaci 48 až 72 hodin (Collado a Figueras, 2011). Jednou z možných technik inokulace na agarové médium je membránová filtrace. Na povrch membránového filtru s velikostí pórů 0,45 μm a o průměru 47 mm, přiloženého na agarovou půdu se pipetuje 200 μl bakteriální suspenze a nechá se pasivně filtrovat po dobu 30 minut při 37 °C. Poté se filtr odstraní a půdy se dále kultivují za aerobních podmínek (Levican et al., 2016). Další možnou inokulací je přímé pipetování 100 μl bakteriální suspenze na Petriho misky s tuhým kultivačním médiem a roztěr L-hokejkou (Van Driessche a Houf, 2008).

Ellis et al. (1977), vytvořili metodu pro stanovení *Arcobacter* spp. ve vzorku abortu ovčívho plodu. Bylo použito EMJH médium s obsahem 5-fluoracilu, které bylo inkubováno při 30 °C za mikroaerofilních podmínek po dobu 48-72 hodin. Po inkubaci tekutého média byla provedena pasivní filtrace přes membránový filtr přiložený na krevním agaru. Kultivační médium bylo dále inkubováno za mikroaerofilních podmínek při 30 °C po dobu 48-72 hodin (Collado a Figueras, 2011). Jedna z nejvíce používaných metod izolace je metoda podle Atabayeho a Corryho (1997), která zahrnuje použití obohacovacího *Arcobacter* bujonu s CAT suplementem. Bujon se vzorkem se kultivuje za mikroaerofilních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí inkubační doby se provede pasivní filtrace na krevní agar přes membránový filtr s póry o velikosti 0,45 μm na krevní agar. Kultivační médium se dále inkubuje za aerobních podmínek při 30 °C po dobu až 7 dní. Johnson a Murano (1999) popsali nové obohacovací médium JM bujon, které se inkubuje za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Po inkubaci se vzorek inokuluje na JM agar a probíhá inkubace za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Díky tomuto navrženému bujonu došlo k silné inhibici doprovodné mikroflóry (Collado a Figueras, 2011). Metoda podle Houf et al. (2001) zahrnuje pomnožení v selektivním *Arcobacter* bujonu s přidavkem antibiotik. Pomnožení probíhá při mikroaerofilních podmínkách za teploty 28 °C po dobu 48 hodin. Po pomnožení se provede pasivní filtrace přes membránový filtr na *Arcobacter* medium s přidavkem stejných antibiotik jako v případě bujonu. Inkubace se provádí při mikroaerofilních podmínkách za teploty 30 °C po dobu 24 až 72 hodin. Problémem této metody je možné paradoxní potlačení přítomnosti bakterií *Arcobacter* spp. (Houf et al., 2001).

V následujících podkapitolách jsou uvedeny příklady konkrétních postupů izolace arko-bakterů z různých typů vzorků.

Vzorky masa, ryb a mořských plodů

Vzorky masa nebo mořských plodů (10 g) jsou homogenizovány se 100 ml obohacovacího média *Arcobacter* bujon se suplementy CAT. Po aerobní kultivaci při 30 °C po dobu 48 hodin se 200 µl vzorku pasivně filtruje na krevní agar a znovu inkubuje (Collado et al., 2009).

Vzorky mléka a mléčných výrobků

Vzorky mléka se často inokulují přímo na krevní agar s 10 % defibrinované beraní krve nebo na MacConkey agar. Tyto půdy se nechají kultivovat aerobně při 30 °C po dobu 24–48 hodin. Po inkubaci se provedou potvrzující testy. Dále je možné inokulovat 1 ml mléka do 9 ml EMJH bujonu a inkubovat ho při 25–30 °C až 6 dní za aerobních podmínek. Poté se nanese 1 kapka zaočkovaného EMJH bujonu na membránový filtr s velikostí pórů 0,45 µm, který je přiložen na krevní agar s 10 % defibrinované beraní krve. Pasivní filtrace probíhá 30 minut. Po odstranění filtru se agar inkubuje při 30 °C po dobu 2 dnů za aerobních podmínek a po ukončení se provedou potvrzující testy (Pianta et al., 2007). Jako další obohacovací médium je možné použít i *Arcobacter* bujon se suplementy - s 5 % koňské krve, cefoperazonem, amphotericinem B, 5-fluorouracilem, novobiocinem a trimethoprimem (Giacometti et al., 2015). Při izolaci *Arcobacter* spp. z čerstvých sýrů se 25 g vzorku vloží do homogenizačního sáčku, smíchá s 225 ml *Arcobacter* bujonu s CAT suplementy a homogenizuje v peristaltickém homogenizátoru po dobu 5 minut. Poté se 1 ml homogenitu inokuluje do zkumavky s 9 ml *Arcobacter* bujonu a nechá inkubovat při 30 °C po dobu 48 hodin za mikroaerofilních podmínek. Po inkubaci se 200 µl vzorku filtruje přes membránový filtr o velikosti 47 mm a póry 0,45 µm na krevní agar s 5 % defibrinované beraní krve. Membránová filtrace probíhá 1 hodinu a po odstranění filtrů se vzorek inkubuje při 30 °C po dobu 5–7 dnů za mikroaerofilních podmínek (Yesilmen et al., 2014).

Vzorky vajec

U vajec se odebere 1 ml vaječné suspenze a smíchá se s 9 ml obohacovacího média. Obohacovacím médiem může být *Arcobacter* bujon s CAT suplementy. Po inkubaci při 30 °C po dobu 48 hodin za mikroaerofilních podmínek následuje pasivní filtrace na krevní agar s 5 % koňské krve a CAT suplementy. Filtrace probíhá 1 hodinu při 30 °C na vzduchu a následuje inkubace při 30 °C po dobu 48 hodin za mikroaerofilních podmínek (Lipman et al., 2008).

Vzorky zeleniny

Ze vzorků zeleniny se odeberou 2 g a smíchají se s 10 ml fyziologického roztoku s fosfátovým pufrem. Dále se 1 ml homogenizátu inokuluje do 9 ml obohacovacího média se 7 % beraní krve a CAT suplementy. Probíhá inkubace za mikroaerofilních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Poté se obohacený vzorek přefiltruje přes filtr s póry o velikosti 0,45 µm na krevní agar se 7 % beraní krve. Inkubace probíhá za mikroaerobních podmínek při 30 °C po dobu 48–72 hodin (Ramees et al., 2018).

Vzorky vody

U vzorků vody se nejčastěji volí metoda membránové filtrace, kdy se 200 ml vody přefiltruje přes membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm. Po ukončení filtrace se filtr vloží do zkumavky s 9 ml *Arcobacter* bujonu se CAT suplementy a probíhá inkubace za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Po obohacení se provede pasivní filtrace na krevní agar. Po 30 minutách se filtr odstraní a agar se aerobně inkubuje při 30 °C po dobu 48–72 hodin (Collado et al., 2010).

1.3. Možnosti identifikace bakterií rodu *Arcobacter*

1.3.1. Fenotypová identifikace

Mezi *Arcobacter* spp. a rodem *Campylobacter* existuje mnoho morfologických podobností, proto může docházet k jejich snadné záměně. Nicméně je možné tyto dva rody odlišit díky schopnosti růstu v různých atmosférických podmínkách a za různých teplot. *Arcobacter* spp. roste za aerobních a anaerobních podmínek v širokém teplotním rozmezí (15-37 °C), ale optimální růst nastává za mikroaerobních podmínek (3-10 % O₂). *Campylobacter* spp. roste pouze při mikroaerofilních podmínkách za přítomnosti 5 % O₂ a 10 % CO₂ a za optimální teploty 42 °C (Hilbert et al., 2010). *Arcobacter* spp. není schopný růstu při 42 °C (Batt a Tortorello, 2014). Je možné použití i biochemických testů, které jsou ovšem často s negativním nebo variabilním výsledkem (Nachamkin et al., 2008). Tabulka 2 ukazuje některé vhodné testy pro rozlišení druhu *Arcobacter* spp. Tyto testy slouží pouze k předběžné identifikaci arko-bakterů (Collado a Figueras, 2011).

Tabulka 2 Biochemické testy pro odlišení *Arcobacter* spp. (Collado a Figueras, 2011)

Charakteristika	<i>A. nitrofigilis</i>	<i>A. cryaerophilus</i>	<i>A. butzleri</i>	<i>A. skirrowii</i>	<i>A. cibarius</i>	<i>A. halophilus</i>
Enzymatická aktivita						
Kataláza	+	+	V	+	V	-
Ureáza	+	-	-	-	-	-
Redukce nitrátu	+	+	+	+	-	+
Hydrolýza indoxyl-acetátu	+	+	+	+	+	+
Podmínky růstu						
Aerobně při 37 °C	V	V	+	+	-	-
Mikroaerofilně při 37 °C	-	V	+	+	+	+
Prostředí 1 % glycerinu	-	-	-	-	-	+
Prostředí 4 % NaCl	+	-	-	+	-	+
Růst na MacConkey agaru	-	V	+	-	+	-
Rezistence na cefoperazon	-	+	+	+	+	-

+...pozitivní výsledek; -... negativní výsledek; V...variabilní výsledek

Tabulka 2 - pokračování Biochemické testy pro odlišení *Arcobacter* spp. (Collado a Figueras, 2011)

Charakteristika	<i>A. mitili</i>	<i>A. thereius</i>	<i>A. marinus</i>	<i>A. trophiarum</i>	<i>A. defluvii</i>	<i>A. molluscorum</i>
Enzymatická aktivita						
□ Kataláza	+	+	-	+	+	+
Ureáza	-	-	-	-	+	-
Redukce nitrátu	+	+	+	-	+	+
Hydrolyza indoxyl-acetátu	-	+	+	+	+	-
Podmínky růstu						
Aerobně při 37 °C	+	-	+	-	+	+
Mikroaerofilně při 37 °C	+	-	+	-	+	+
Prostředí 1 % glycerinu	+	+	+	V	-	-
Prostředí 4 % NaCl	+	-	+	-	-	+
Růst na MacConkey agaru	+	V	-	V	+	+
Rezistence na cefoperazon	-	+	-	+	V	+

+...pozitivní výsledek; -...negativní výsledek; V...variabilní výsledek

1.3.2. Genotypová identifikace

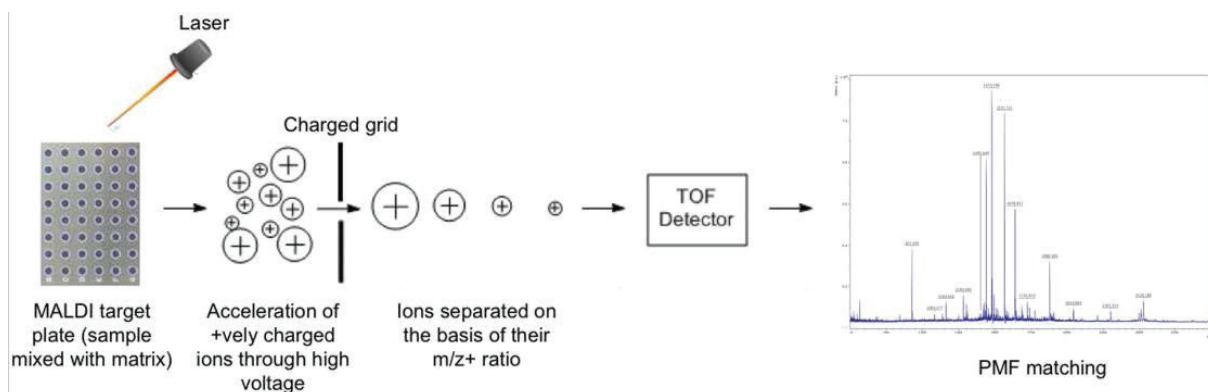
Identifikace rodu *Arcobacter* spp. běžnými kultivačními metodami v kombinaci s biochemickou identifikací je velmi časově náročná. Tento postup vyžaduje 3-4 dny a nemusí být zcela spolehlivý, protože některé kmeny jsou biochemicky inertní a morfologicky jsou velice podobné kampylobakterům (Ongor et al., 2004). Vhodnou alternativou k biochemické identifikaci se stala metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) díky svým rychlým výsledkům a citlivosti (Houf et al., 2000). Základem této metody je replikace DNA a mnohonásobná amplifikace specifického úseku DNA v *in vitro* podmínkách. Metoda zredukovala počet falešně pozitivních výsledků způsobených záměnou s jinými bakteriemi čeledi *Campylobacteraceae*. Multiplex-PCR kombinuje primery specifické pro jednotlivé druhy arkobakterů a probíhá identifikace např. *A. cryaerophilus*, *A. butzleri* a *A. skirrowii* při jediné analýze. Díky tomu se stala možná identifikace arkobakterů ještě rychlejší (Ongor et al., 2004). Možnou komplikací při užití PCR může být přítomnost DNA mrtvých buněk, což vede k falešně pozitivnímu výsledku (Moreno et al., 2003). Falešně negativní reakci mohou způsobovat inhibiční látky přítomné ve vzorku nebo v pomnožovacích médiích (Rahimi et al., 2012).

Další využívanou metodou je FISH (fluorescenční *in situ* hybridizace) se specifickou fluorescenčně značenou oligonukleotidovou sondou. Tato metoda je rychlá, citlivá a specifická a umožňuje určit morfologii mikroorganismů, velikost buněk a obsah buněčné rRNA (Moreno et al., 2003; Fera et al., 2009). Výhodou metody FISH je větší stabilita proti inhibitorům přítomným ve vzorku. Metoda funguje nezávisle na jakýchkoliv enzymatických reakcích. Pro analýzu není nutné získání DNA z bakterie, a proto mohou být pozitivní výsledky získány rovnou při analýze vzorků potravin (Fera et al., 2009). Rovněž umožňuje detekci životaschopných buněk, které však nejsou schopné kultivace. Metoda FISH nedává falešně pozitivní výsledky za přítomnosti mrtvých buněk (Moreno et al., 2003) na rozdíl od PCR.

Dalšími používanými molekulárními metodami jsou pulsní gelová elektroforéza (PFGE), denaturační gradientová gelová elektroforéza (DGGE), polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP), polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP), *dot blot* hybridizace, Western blot, aj. (Gobbi et al., 2018; Doudah et al., 2012; Collado et al. 2011; Bagalakote et al., 2014). Tyto metody jsou často kombinovány s metodou PCR.

1.3.3. Analytická identifikace

MALDI-TOF-MS (hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpčí a ionizací za účasti matrice s průletovým analyzátozem) je analytická metoda, která je vysoce přesná a má široké spektrum aplikací např. pro identifikace mikroorganismů a ve srovnání s ostatními metodami je mnohem rychlejší. Metoda je schopná rozlišit bakterie i jiné mikroorganismy na rodové, druhové a velmi často i kmenové úrovni (Huong et al., 2014). Příprava vzorku spočívá v nanesení bakteriální kultury na terčík MALDI destičky a přidání matrice. Po zaschnutí je vzorek analyzován pomocí laserového paprsku a vznikají protonované ionty. Tyto ionty jsou urychleny a dělí se v poměru hmotnosti k náboji a jsou detekovány pomocí analyzátoru doby letu (Singhal et al., 2015). Princip této metody je znázorněn na Obrázku 4. Vytvoření knihovny spekter učinilo tuto metodu spolehlivou pro rozlišení rodu *Arcobacter* a *Helicobacter* od fenotypově podobného rodu *Campylobacter* (Alispahic et al., 2010). Výsledkem identifikace je možná shoda nebo neshoda spektra z knihovny se spektrem zkoumaného mikroorganismu. Možnými příčinami neshody může být kontaminace vzorku jinými mikroorganismy nebo nesprávná kultivace (Huong et al., 2014).



Obrázek 4 Princip metody MALDI-TOF-MS (Singhal et al., 2015)

Metody HPLC-MS a GC-MS se používají pro analýzu fosfolipidů a mastných kyselin získaných z bakterií *Arcobacter*. Při HPLC-MS jsou porovnávány rozdíly fosfolipidů, GC-MS poskytuje kompletní složení mastných kyselin. Tyto informace umožní taxonomickou identifikaci každého druhu (Jelínek et al., 2006).

1.4. Citlivost arkobakterů k antibiotikům

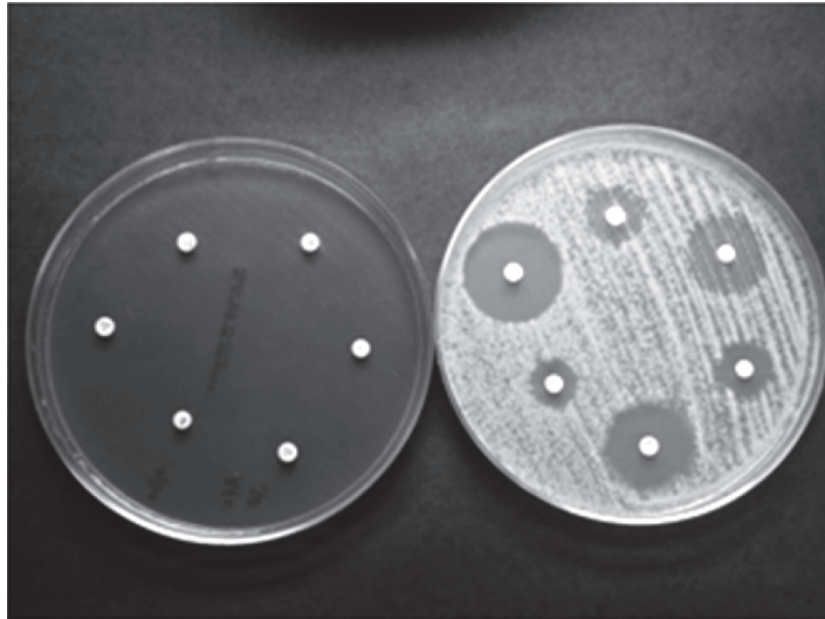
Antibiotika (ATB) jsou chemoterapeutické látky využívané k léčbě a prevenci infekčních onemocnění. Tyto látky vznikají převážně mikrobiologickou produkcí bakteriemi a plísněmi. V dnešní době se ale setkáváme i s antibiotiky chemicky modifikovanými nebo se synteticky vyráběnými (Sengupta et al., 2013). Mají bakteriocidní nebo bakteriostatické účinky na růst bakterií, nesmí však působit toxicky na organismus. Mezi bakteriocidní ATB patří aminoglykosidy, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a peniciliny. Tato skupina působí ireverzibilně a mají letální účinek na bakterie. Mezi bakteriostatická antibiotika se řadí amfenikoly, nitrofurany, oxazolidinony, sulfonamidy a tetracykliny. Tyto látky zastavují růst a množení cílových bakterií. Do skupiny antibiotik mající jak bakteriostatické tak i bakteriocidní účinky patří skupina fluorochinolonů. Antibiotika můžeme dále rozdělit podle spektra působení na širokospektrá, která působí proti více kmenům, nebo úzkospektrá, působící pouze proti omezenému množství kmenů. Dále se ATB mohou dělit dle mechanismu jejich působení, mezi které patří inhibice syntézy buněčné stěny, inhibice syntézy bílkovin, inhibice syntézy nukleových kyselin, inhibice metabolismu a porušení funkce cytoplazmatické membrány.

Existuje celá řada antibiotik, které se liší svou strukturou, proto se dělí do několika skupin. Mezi skupinu β -laktamových antibiotik jsou zařazeny peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy. Peniciliny (produkty plísně *Penicillium chrysogenum*) patří mezi první objevená antibiotika, které mají antimikrobiální účinek vůči gram-pozitivním i gram-negativním bakteriím (Martín et al., 2011). Dalšími skupinami antibiotik jsou tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, cyklické peptidy a streptograminy (Guimaraes et al., 2010).

1.4.1. Testování citlivosti na antibiotika

Metody zkoumání citlivosti bakterií na antibiotika lze dělit do dvou skupin. První skupinou jsou kvalitativní metody, do kterých patří **difuzní disková metoda**. Při této metodě se na půdu Mueller-Hilton, hustě zaočkovanou zkoumaným mikroorganismem, přiloží disky naimpregnované známou koncentrací antibiotika. Během inkubace dochází k difuzi antibiotika do agaru. Pokud je mikroorganismus citlivý na antibiotikum, vytvoří se inhibiční zóna. Po vhodné inkubační době se změní velikost inhibiční zóny od středu po její okraj

a mikroorganismus se označí buď za citlivý, intermediální nebo rezistentní na dané antibiotikum (Urbášková, 1998). Výsledný antibiogram je znázorněn na Obrázku 5.

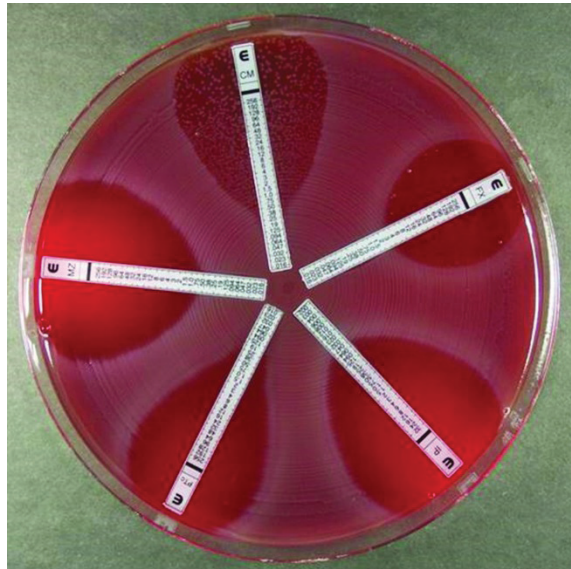


Obrázek 5 Testování citlivosti na antibiotika – disková difuzní metoda (Espinel–Ingroff, 2006)

Druhou skupinu jsou kvantitativní stanovení, kterým lze určit **minimální inhibiční koncentraci** (MIC). Hodnota MIC udává nejnižší množství, které viditelně inhibuje růst mikroorganismů. V některých případech lze stanovovat i **minimální baktericidní koncentraci** (MBC), která vyjadřuje nejnižší koncentraci, která je schopna bakteriální kmen usmrtit (Urbášková et al., 1985). Mezi kvantitativní stanovení patří **agarová diluční metoda**, která je považována za referenční metodu. Na každou miskou s Mueller–Hilton agarem a danou koncentrací antibiotika se zaočkuje testovaný kmen. Po inkubaci se odečte koncentrace odpovídající MIC (Urbášková, 1998).

Další kvantitativní metodou je **bujonová diluční metoda**, která se provádí ve zkumavkách nebo jamkách mikrotitrační destičky naplněných Mueller-Hilton bujonem. Každá zkumavka/jamka obsahuje jinou koncentraci antibiotika. Do bujonu se inokuluje testovaný kmen a nechá se inkubovat. Po inkubaci se odečte hodnota MIC, která odpovídá zkumavce/jamce s nejnižší koncentrací antibiotika, kde nebyl patrný růst MO (Urbášková, 1998).

Mezi kvantitativní metody se řadí i **E–test**, který kombinuje diskovou difuzní metodu s diluční metodou. Na Mueller-Hilton agar, který je naočkovaný zkoumaným bakteriálním kmenem, se přiloží plastový proužek, který obsahuje exponenciální gradient koncentrací antimikrobiální látky. Po inkubaci se odečítá MIC (Letournel-Glomaud et al., 2003). Výsledný antibiogram je znázorněn na Obrázku 6.



Obrázek 6 Testování citlivosti na antibiotika - metoda – E–test (Brook et al., 2013)

1.4.2. Rezistence bakterií *Arcobacter* spp. na antibiotika

Rezistence je schopnost mikroorganismu odolávat účinkům působení antimikrobiálních látek. Pro bakterie je tato vlastnost přirozená, nebo si ji může vybudovat během svého vývoje. Sekundární rezistence vzniká mutací genomu, kdy se vytvoří genetická informace kódující rezistenci a antibiotikum přestane na bakterii působit obvyklým způsobem. Takto vzniklá mutace se pak přenáší na dceřiné buňky pomocí plasmidů, transpozonů nebo genových kazet (Cohen et al., 1972). Mezi mechanismy rezistence patří změna cílového místa působení ATB, zhoršení možnosti průniku ATB do buňky, odčerpání antibiotika pryč z buňky a vytvoření enzymů, které mohou ATB v buňce rozložit.

Při zkoumání citlivosti byla zjištěna celá řada antibiotik, běžně se vyskytujících v lékařské nebo veterinární praxi, na která byly bakterie *Arcobacter* spp. odolné. Při léčbě gastrointestinálního onemocnění způsobených arkobaktery se běžně používají chinolony, tetracykliny, makrolidy nebo beta-laktamy (Ferreira et al., 2019). Mezi antibiotika, na která se potvrdila u arkobakterů rezistence, patří fluorochinony, makrolidy, aminoglykosidy, amfenikoly, peniciliny a tetracykliny (Houf et al., 2001; Kabeya et al., 2004; Son et al., 2007). Vysoká prevalence antimikrobiální rezistence může být způsobena nedodržením zásad užívání antibiotik jak u živočichů, tak i u lidí (Ferreira et al., 2019). Byla rovněž potvrzena rozdílná rezistence na odlišné druhy antibiotik v rámci několika kmenů téhož druhu (Atabay a Aydın, 2001). V mnoha studiích se objevuje i multirezistence vůči více než třem antibiotikům (Rathlavath et al., 2017; Šilha et al., 2017; Vicente–Martins et al., 2018). Malou výhodou rezistence může být její využití při izolování arkobakterů, kdy se dané antibiotikum použije pro potlačení doprovodné mikroflóry (Snelling et al., 2006).

V současné době stoupá úroveň rezistence bakterií na antibiotika ve všech částech světa. Objevují se nové mechanismy rezistence a tím se zvyšuje problém léčení běžných infekčních nemocí. Rezistence je navíc urychlena zneužíváním a nadužíváním antibiotik. (World Health Organisation, 2018).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité chemikálie, živné půdy, přístroje a pomůcky

2.1.1. Chemikálie a standardní látky

Agarosa	(Serva, Německo)
EDTA (0,5 mol/l; pH 8,0)	(Sigma–Aldrich, Německo)
Ethidium bromid (10 mg/ml)	(Top–Bio, ČR)
Chlorid sodný p.a.	(Penta Chrudim, ČR)
Kyselina boritá p.a.	(Sigma–Aldrich, Německo)
Kyselina chlorovodíková	(Penta Chrudim, ČR)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan	(Sigma–Aldrich, Německo)

2.1.2. Reagencie a potřeby pro PCR

25 mmol/l MgCl ₂	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
10x PCR pufr	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
dNTP mix	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
DNA taq polymeráza TM	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
Vkládací pufr ^{TB}	(Top–Bio, ČR)
DNA marker 155–970 coloured	(Top–Bio, ČR)

Primery pro PCR (Generi Biotech, ČR)

ARCO (*672 D8)	5'–CGT–ATT–CAC–CGT–AGC–ATA–GC–3'
BUTZ (*672 D7)	5'–CCT–GGA–CCT–GAC–ATA–AGA–ATG–3'
CRY1 (*672 E1)	5'–TGC–TGG–AGC–GGA–TAG–AGG–TA–3'
CRY2 (*672 E0)	5'–AAC–AAC–CTA–CGT–CCT–TCG–AC–3'
SKIR (*672 D9)	5'–GGC–GAT–TTA–CTG–GAA–CAC–A–3'

1 M TRIS-HCl

Tris(hydroxymethyl)aminomethan ($\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$) byl rozpuštěn v 958 ml destilované vody a následně byla přidána 36 % HCl. Po vychladnutí bylo upraveno pH na hodnotu 8,0 pomocí NaOH (5 mol/l). Vzniklá směs byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut.

10x Tris–EDTA pufr (TE pufr)

Veškeré chemikálie byly smíchány s 880 ml destilované vody.

Složení:	EDTA 0,5 mol/l (pH 8,0)	100 ml
	Tris–HCl 1 mol/l (pH 8,0)	20 ml

10x Tris–Borát–EDTA pufr (TBE pufr)

Veškeré chemikálie byly smíchány s 960 ml destilované vody.

Složení:	$\text{H}_2\text{NC}(\text{CH}_2\text{OH})_3$	108,0 g
	Kyselina boritá	55,0 g
	EDTA	5,84 g

1x Tris–Borát–EDTA pufr (TBE pufr)

100 ml 10x TBE pufru bylo smícháno s 900 ml destilované vody.

1,5% agarosový gel s ethidium bromidem

Agarosa byla smísena s 1x TBE pufrem a přivedena k varu. Po ochlazení byly přidány 4 μ l ethidium bromidu.

Složení:	agarosa	1,2 g
	1x TBE pufr	80 ml
	Ethidium bromid	4,0 μ l

2.1.3. Používaná antibiotika

Amikacin	30 µg	(OXOID, UK)
Amoxicillin/klavulanová kyselina	30 µg	(OXOID, UK)
Ampicillin	10 µg	(OXOID, UK)
Aztreonam	30 µg	(OXOID, UK)
Cephalotin	30 µg	(OXOID, UK)
Chloramphenicol	30 µg	(OXOID, UK)
Ciprofloxacin	5 µg	(OXOID, UK)
Clindamycin	2 µg	(OXOID, UK)
Doxycyklin	30 µg	(OXOID, UK)
Enrofloxacin	5 µg	(OXOID, UK)
Erytromycin	15 µg	(OXOID, UK)
Gentamycin	10 µg	(OXOID, UK)
Kyselina nalidixová	30 µg	(OXOID, UK)
Oxacilin	1 µg	(OXOID, UK)
Penicillin G	10 UI	(OXOID, UK)
Streptomycin	10 µg	(OXOID, UK)
Tetracyklin	30 µg	(OXOID, UK)
Tobramycin	10 µg	(OXOID, UK)

2.1.4. Mikrobiologická média a roztoky

Arcobacter bujon (OXOID, Spojené království)

Pro přípravu *Arcobacter* bujonu bylo naváženo 24 g komerčně dostupné práškové směsi živného média. Toto množství bylo smícháno s 1000 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení:	pepton	18,0 g/l
	kvasničný extrakt	1,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l

pH při 25 °C: $7,2 \pm 0,2$

BHI bujon – Brain Heart Infusion (HIMEDIA, Indie)

Pro přípravu BHI bujonu bylo naváženo 37 g komerčně dodávané práškové směsi živného média. Toto množství bylo smícháno s 1000 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení:	infuze z telecího mozku	12,5 g/l
	infuze z hovězího srdce	5,0 g/l
	proteázový pepton	10,0 g/l
	dextrosa	2,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	fosforečnan disodný	2,5 g/l

pH při 25 °C: $7,4 \pm 0,2$

Fyziologický roztok

Pro přípravu fyziologického roztoku bylo naváženo 8,5 g chloridu sodného. Toto množství bylo smícháno s 1000 ml vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Krevní agar - Blood agar base No. 2 (Himedia, Indie)

Pro přípravu báze krevního agaru bylo naváženo 21,25 g komerčně dodávané práškové směsi živného média. Toto množství bylo smícháno s 500 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po vychladnutí báze na 40 – 50 °C bylo asepticky přidáno 5 % v/v sterilní defibrinované beraní krve.

Složení:	proteázový pepton	15,0 g/l
	jaterní extrakt	15,0 g/l
	kvasničný extrakt	2,5 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	agar	15,0 g/l

pH při 25 °C: $7,4 \pm 0,2$

LB médium – Luria–Bertani bujon (Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

Pro přípravu LB média bylo naváženo 20 g komerčně dodávané práškové směsi živného média. Toto množství bylo smícháno s 1000 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení:	trypton	10,0 g/l
	kvasničný extrakt	5,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l

pH při 25 °C: $7,2 \pm 0,2$

TSA agar – Trypton Soya Agar (HIMEDIA, Indie)

Pro přípravu TSA agaru bylo naváženo 40 g komerčně dodávané práškové směsi živného média. Toto množství bylo smícháno s 1000 ml destilované vody a sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut.

Složení	trypton	15,0 g/l
	sojový pepton	5,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	agar	15,0 g/l

pH při 25 °C: 7,3 ± 0,2

2.1.5. Sbírkové bakteriální kmeny

Jako pozitivní kontroly v PCR bylo použito několik kmenů bakterií rodu *Arcobacter*. Jako negativní kontrola byl použit sbírkový kmen *Escherichia coli*. Tyto kmeny pocházely z České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM), ze Sbírký mikroorganismů univerzity Göteborg ve Švédsku (CCUG), z Belgické sbírky mikroorganismů při Univerzitě v Ghenu (LMG) a z interní sbírky mikroorganismů Univerzity Pardubice (UPa).

<i>Arcobacter butzleri</i>	CCUG 30484
<i>Arcobacter butzleri</i>	UPa 2012 /3 (ČOV)
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	CCM 7050
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	CCM 3933
<i>Arcobacter cryaerophilus</i>	UPa 2013/13
<i>Arcobacter skirrowii</i>	LMG 6621
<i>Escherichia coli</i>	CCM 3954

2.1.6. Přístroje, zařízení, pomůcky

Autokláv PS 20A	(BMT, ČR)
Biologický termostat BT120M	(Lab. přístroje Praha, ČR)
Centrifuga MPW–15 mini	(Stuart®, UK)
Denzitometr McFarland DEN–1	(Biosan, ČR)
Diskový dávkovač na antibiotika	(OXOID, Indie)
Elektroforetická vana OWL EASYCAST B1A	(Sigma, USA)
Elektroforetický zdroj MP–300V	(Major Science, USA)
Homogenizační sáčky s bočním filtrem BBAG–03	(BRAG, USA)
Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104	(BMT, ČR)
Chladnička Zanussi ZRA40100WA	(Zanussi, Itálie)
Chladnička Gorenje RK6201BW	(Gorenje, Slovinsko)
Laminární box Hotte MSC 9 Standatd	(Jouan, Francie)
Membránový filtr 0,45 µm (ø 47 mm)	(Millipore, USA)
Mikropipety automatické	(BioHit Proline, Finsko)
Mikropipety automatické	(Discovery, Německo)
Mikrovlnná trouba LG	(LG, Korea)
Mraznička Whirlpool	(Whirlpool, USA)
Petrístaltický homogenizátor	(IUL Instr., Španělsko)
pH metr Cyber Scan oH/ion 51	(Eutech Instr., Singapur)
Předvážky laboratorní ES1001	(Bel Engeneering, Itálie)
Termoblok SBH130DC	(Stuart®, UK)

Termocykler Biometra TProfessional Gradient	(Biometra, Německo)
UV dekontaminační box (UVC/T-AR)	(Biosan, Litva)
UV transluminátor Vilber Lourmot	(Chemos, ČR)
Vortex MS 1	(IKA Works, USA)
Běžné laboratorní skleněné, plastové, kovové a pryžové pomůcky	

2.2. Vzorčky

Pro účely této diplomové práce bylo shromážděno celkem 235 vzorků živočišného původu pocházejících z České republiky. Vzorčky byly získány z maloobchodní i velkoobchodní sítě a z domácího chovu. Získané vzorčky byly ihned zpracovány v laboratoři, případně byly uchovány při chladničkové (4 °C) či mrazničkové (-20 °C) teplotě a následně byly podrobeny mikrobiologické analýze. Vzorčky uchovávané při mrazničkové teplotě byly postupně rozmrazované v lednici při 4 °C. Vzorčky byly rozděleny do několika skupin na vzorčky drůbeže, ryb a mořských živočichů a vzorčky ostatní (vepřové maso, hovězí maso, králičí maso). Všechny shromážděné vzorčky jsou uvedeny v Příloze A, B a C.

2.3. Pracovní postupy

2.3.1. Izolace *Arcobacter* spp. ze vzorků živočišného původu

Pro izolaci *Arcobacter* spp. ze vzorků živočišného původu byla použita metoda podle Houf et al. (2001), která je popsána v kapitole 1.2.2. Tato metoda byla pro účely laboratorní praxe částečně modifikována.

Nejprve byl optimalizován pracovní postup pro izolaci arkobakterů ze vzorku. Optimalizace byla provedena z důvodu zvýšení záchytnosti arkobakterů při pomnožovacím kroku. Vzorky byly pomnožovány v pomnožovacím médiu *Arcobacter* bujonu po dobu 24, 48 a 72 hodin. Jako ideální doba pro pomožení bylo vybráno 48 hodin, kdy již dochází k obnovení subletálně poškozených buněk a jejich rozmnožení a doprovodná mikroflóra je stále na úrovni, která zcela nepotlačuje růst arkobakterů. Výsledný optimalizovaný postup je popsán v následujícím odstavci.

Do homogenizačního sáčku bylo naváženo 25 g reprezentativního vzorku masa a smícháno s 225 ml *Arcobacter* bujonu. Obsah homogenizačního sáčku byl homogenizován pomocí peristaltického homogenizátoru po dobu 2 minut. Pomnožení proběhlo při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin a následně byl proveden krok pasivní filtrace. Objem 100 µl pomnožené bakteriální suspenze byl nanesen v několika kapkách na membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm (ø 47 mm, Millipore, Billerica, MA, USA) přiložený na povrch kultivačního média TSA. Pasivní filtrace probíhala při 30 °C po dobu 30 minut, poté byl filtr odstraněn. Následná kultivace Petriho misek probíhala při 30 °C po dobu 24–48 hodin, v případě negativního nárůstu až po dobu 7 dní. Suspektní kolonie (bezbarvé až nažloutlé) byly přeočkovány izolací čárkováním na TSA médium a konfirmovány pomocí barvení podle Grama. Získané suspektní izoláty byly dále podrobeny molekulárně–biologické identifikaci pomocí PCR.

2.3.2. Identifikace *Arcobacter* spp. pomocí multiplex-PCR

Pro účel identifikace *Arcobacter* spp. byla převzata metoda multiplex-PCR podle studie Houf et al. (2001).

Potenciální izolované kmeny arkobakterů byly zaočkovány do 200 μ l 10 \times Tris- EDTA pufru a podrobeny lýze buněk a izolaci DNA při 110 $^{\circ}$ C po dobu 15 minut. Multiplex-PCR (Houf et al., 2000) byla provedena ve 25 ml reakční směsi obsahující 2 μ l lyzátu DNA; 3 mM MgCl₂; 2,5 μ l 10 \times PCR pufru; 0,2 mM dNTP mixu; 0,75 U DNA Taq polymerázyTM (TaKaRa Biomedicals, Japonsko) a PCR primery (Generi Biotech, Česká republika): 2 μ M ARCO (5'-CGT-ATT-CAC-CGT-AGC-ATA-GC-3'), 2 μ M BUTZ (5'-CCT-GGA-CCT-GAC-ATA-AGA-ATG-3'), 2 μ M CRY1(5'-TGC-TGG-AGC-GGA-TAG-AGG-TA-3'), 2 μ M CRY2 (5'-AAC-AAC-CTA-CGT-CCT-TCG-AC-3') a 2 μ M SKIR (5'-GGC-GAT-TTA-CTG-GAA-CAC-A-3'). Tyto primery amplifikují 401-bp fragmenty 16S rRNA *A. butzleri*, 257-bp fragmenty 23S rRNA *A. cryaerophilus* a 641-bp fragmenty 16SrRNA *A. skirrowii*. Reakce byla provedena v termocykleru Biometra TProfessional Gradient (Biometra, Německo) a zahrnovala následující kroky – počáteční denaturaci (94 $^{\circ}$ C, 2 min); 32 cyklů denaturace (94 $^{\circ}$ C, 45 s), annealing primerů (65 $^{\circ}$ C, 45 s) a extenzi řetězce (72 $^{\circ}$ C, 30 s); závěrečnou DNA extenzi (72 $^{\circ}$ C, 4 min). Stejným postupem byly připraveny i pozitivní a negativní kontroly.

Takto získaný produkt (10 μ l) byl smíchán s vkladacím pufrům a následně separován gelovou elektroforézou (100 V, 40 min) na 1,5% agarosovém gelu s 10 mg/l ethidium bromidu (Top Bio, Japonsko) v prostředí 1 \times TBE pufru. Jako standard byl použit 155 – 970 DNA marker (Top Bio, Japonsko) a vizualizace proběhla pomocí Vilber Lourmat UV transluminátoru (Chemos, Česká republika)

2.3.3. Příprava bakteriální suspenze

Vyizolované kmeny byly nejprve vyočkovány na TSA agaru a kultivovány při teplotě 30 $^{\circ}$ C po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby kultivace byla připravena bakteriální suspenze o denzitě buněk odpovídající stupni 0,5 McFrlandovy zákalové stupnice (měřeno na denzitometru) smícháním narostlých kolonií s fyziologickým roztokem. Takto vzniklá suspenze buněk byla naředěna desítkovým ředěním a následně bylo skutečné množství buněk ověřeno kultivačně vyočkováním na TSA agar.

2.3.4. Vliv antibiotik na *Arcobacter* spp.

Vliv antibiotik na arkobaktery byl testován pomocí difuzní diskové metody. Připravená bakteriální suspenze o denzitě odpovídající stupni 0,5 Mc Fralandovy zákalové stupnice byla nanášena za pomoci sterilního vatového tamponu na celý povrch krevního agaru s 5 % beraní krve. Následně byly na naočkované půdy aplikovány pomocí raznice s disky celkem osmnácti vybraných antibiotik (amikacin, amoxicillin/klavulanová kyselina, ampicillin, aztreonam, cephalotin, chloramphenicol, ciprofloxacin, clindamycin, doxycylin, enrofloxacin, erythromycin, gentamycin, kyselina nalidixová, oxacillin, penicillin G, streptomycin, tetracyklin a tobramycin). Petriho misky byly spolu s disky inkubovány za aerobních podmínek při 30 °C po dobu 48 hodin. Po uplynutí doby inkubace byly pomocí měřítka změřeny průměry vzniklých inhibičních zón. Celý tento postup byl dvakrát opakován a z výsledků byl vypočten aritmetický průměr. Hodnoty aritmetických průměrů byly srovnány s hodnotami breakpointů antibiotik a zkoumané kmeny byly označeny jako citlivé, intermediální nebo rezistentní k vybraným antibiotikům. Pro bakterie *Arcobacter* spp. doposud neexistují breakpointy, proto byly v této práci převzaty breakpointy popsané pro rod *Campylobacter* a pro čeleď *Enterobacteriaceae*.

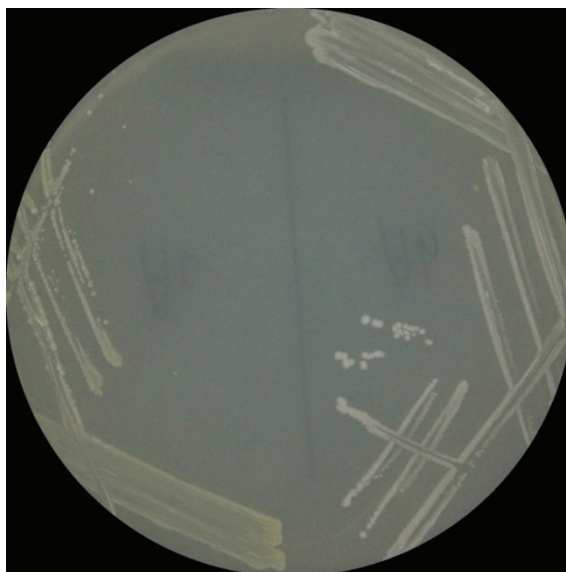
3. VÝSLEDKY A DISKUZE

V rámci praktické části diplomové práce proběhla nejprve izolace bakterií rodu *Arcobacter* spp. z různých vzorků. Následně proběhla identifikace získaných izolátů pomocí metody multiplex-PCR a vybrané identifikované kmeny byly testovány z hlediska citlivosti/rezistence k antibiotikům. V této části jsou popsány konkrétní výsledky výskytu arkobakterů ve zkoumaných vzorcích, které jsou porovnávány s ostatními výzkumy. Dále je zde popsána citlivost/rezistence bakterií *Arcobacter* spp. v případě 18 antibiotik, které se využívají při léčbě bakteriálních onemocnění.

3.1. Izolace *Arcobacter* spp. ze vzorků

V rámci diplomové práce byla optimalizována doba pomnožení v pomnožovacím médiu *Arcobacter* bujon. Při použití doby pomnožení 24 hodin a následné pasivní filtraci a kultivaci (48 hodin) nejevily Petriho misky žádný nárůst arkobakterů, při použití doby pomnožení 48 hodin byl již na agaru znatelný růst těchto bakterií. V případě použití doby nad 72 hodin, byly misky nadměrně porostlé doprovodnou mikroflórou, která spolu s arkobaktery prostoupila přes membránový filtr. Jako optimální se tedy jevila doba pomnožení 48 hodin. Tato doba byla dále aplikována na všechny vzorky testované v této diplomové práci.

Pro prokazování přítomnosti *Arcobacter* spp. ve vzorcích potravin živočišného původu byla použita metoda popsaná v kapitole 2.3.1., která zahrnovala stupeň pomnožení, pasivní filtraci a následnou kultivaci na neselektivním médiu. Jako neselektivní médium bylo použito TSA (Trypton Soya agar), na němž rostly bakterie rodu *Arcobacter* ve velice drobných bezbarvých až nažloutlých koloniích. Růst *Arcobacter* spp. na neselektivním TSA agaru je znázorněn na Obrázku 7.



Obrázek 7 Růst bakterií *Arcobacter cryaerophilus* (vlevo) a *Arcobacter butzleri* (vpravo) na neselektivním TSA agaru (foto autor)

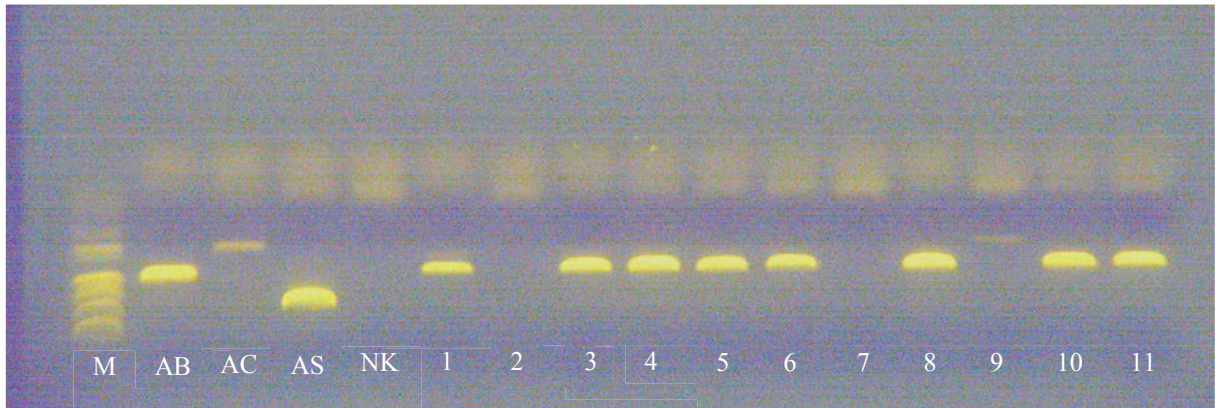
3.2. Identifikace izolovaných kmenů

Izolované kmeny suspektních arkobakterů z 235 vzorků byly nejprve zkoumány dle makroskopických vlastností a pomocí Gramova barvení. Z tohoto počtu bylo vybráno 54 *Arcobacter*-presumptivních vzorků. Pro jejich identifikaci a zařazení do druhu byla použita metoda multiplex-PCR s primery k identifikaci tří nejčastěji se vyskytujících druhů, (*A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*). Ze všech 54 *Arcobacter*-presumptivních vzorků, bylo identifikováno 24 vzorků pozitivní na přítomnost bakterie *A. butzleri* a/nebo *A. cryaerophilus*. V žádném vzorku nebyl zaznamenán výskyt druhu *A. skirrowii*. Výčet vzorků, u kterých byla pozitivní izolace *Arcobacter* spp., je znázorněn v Tabulce 3. Nelze však vyloučit výskyt některého z dalších arkobakterů v některých vzorcích, jelikož použitá metoda byla zaměřena na nejčastěji se vyskytující druhy arkobakterů.

Tabulka 3 Přehled vzorků pozitivních na přítomnost *Arcobacter* spp. (m-PCR identifikace)

Číslo vzorku	Označení vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Kuřecí maso					
8	V30	21. 10. 2018	Prsní řízek	Řeznictví Třebovle Kolín	<i>A. butzleri</i>
15	V43	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
16	V44	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>
18	V46	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
20	V48	27. 10. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
21	V49	27. 10. 2018	Prsní řízek	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
30	V65	8. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
38	V83	19. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Olomouc	<i>A. cryaerophilus</i>
44	V89	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
48	V93	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
49	V94	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
59	V107	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
Kachní maso					
5	V69	11. 11. 2018	Trtol	Řeznictví Třebovle, Kolín	<i>A. butzleri</i>
6	V70	11. 11. 2018	Trtol	Řeznictví Třebovle, Kolín	<i>A. butzleri</i>
Husí maso					
1	V26	21. 10. 2018	Srdce	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>
Sladkovodní ryby					
1	V24	21. 10. 2018	Pstruh	Rybník Zálší	<i>A. butzleri</i>
21	V132	30. 11. 2018	Sumeček	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
28	V160	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
29	V161	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Plody moře					
2	V130	30. 11. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	<i>A. cryaerophilus</i>
4	V134	30. 11. 2018	Slávka	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Mořské ryby					
7	V138	4. 12. 2018	Makrela	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
8	V141	5. 12. 2018	Losos	Kaufland, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Vepřové maso					
10	V37	20. 10. 2018	Kýta	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>

Vzorový záznam identifikace *Arcobacter* spp. pomocí metody m-PCR je znázorněn na Obrázku 8.



Obrázek 8 Vzorový záznam identifikace bakterií *Arcobacter* spp.

M... DNA marker (155–970 bp), AB... pozitivní kontrola *Arcobacter butzleri* CCUG 30484, AC... pozitivní kontrola *Arcobacter cryaerophilus* CCM 7050, AS... pozitivní kontrola *Arcobacter skirrowii* LMG 6621, N... negativní kontrola *Escherichia coli* CCM 3954 . 1-10... vzorky. 1 *A. butzleri*, 2... negativní vzorek, 3... *A. butzleri*, 4... *A. butzleri*, 5... *A. butzleri*, 6... *A. butzleri*, 7... negativní vzorek, 8... *A. butzleri*, 9... *A. cryaerophilus*, 10... *A. butzleri*, 11... *A. butzleri* (foto autor)

3.3. Prevalence *Arcobacter* spp. ve vzorcích živočišného původu

Potraviny živočišného původu jsou považovány za nejčastější rezervoár bakterií *Arcobacter* spp. Nejčastější výskyt těchto bakterií je v mase a masných výrobcích, kdy je nejvyšší prevalence popsána u drůbežního masa, masných výrobků a vnitřnostech drůbeže. Dalším hojným rezervoárem těchto bakterií je vepřové a hovězí maso, dále ryby a mořské plody.

V rámci této diplomové práce bylo zpracováno celkem 235 vzorků, které zahrnovaly hlavně vzorky drůbežního masa, ryb a mořských plodů a v menším počtu také vzorky vepřového, hověžního a králičího masa. Tabulky se všemi vzorky včetně doby a místa odběru jsou umístěny v Příloze A, B a C. Tyto vzorky byly zpracovány a identifikovány na základě postupů uvedených v kapitolách 2.3.1 a 0. Z celkového počtu 235 zpracovaných vzorků byla zjištěna přítomnost bakterie *Arcobacter* spp. u 24 vzorků, tj. 10,2 %. Celková prevalence *A. butzleri* byla 9,4 % a *A. cryaerophilus* 1,2 %. V jednom ze vzorků se nacházely oba tyto kmeny (vzorek V44, kuřecí maso, Vodňanské kuře). Prevalence bakterií *A. butzleri* a *A. cryerophilus* ve zpracovaných vzorcích je popsána v Tabulce 4.

Tabulka 4 Prevalence *Arcobacter* spp. ve vzorcích živočišného původu

Vzorky	Počet vzorků	<i>Arcobacter</i> spp.	<i>A. butzleri</i>	<i>A. cryaerophilus</i>
Drůbeží	98	16 (16,3 %)	14 (14,3 %)	2 (2,0 %)
Ryby a mořské plody	104	8 (7,7 %)	7 (6,7 %)	1 (1,0 %)
Ostatní (hovězí, vepřové, králík)	33	1 (3,0 %)	1 (3,0 %)	0 (0,0 %)
Celkem	235	25 (10,6 %)	22 (9,4 %)	3 (1,2 %)

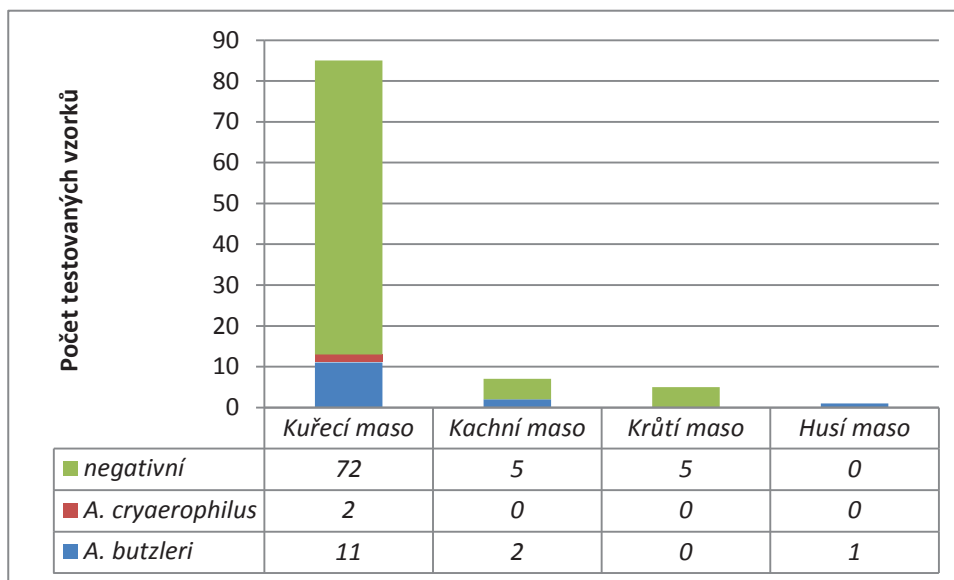
Obecně platí, že největším rezervoárem bakterie *Arcobacter* spp. je drůbeží maso. Kontaminace tohoto druhu masa je doposud nejasná. Jedním možným zdrojem výskytu arkobakterů v drůbežích vnitřnostech je jejich přítomnost v gastrointestinálním traktu. Nelze však ani vyloučit sekundární kontaminaci způsobenou nedostatečnou hygienou. V menším počtu se pak tyto bakterie nacházejí v hovězím a vepřovém mase. Ke kontaminaci masa dochází nejspíše nedostatečnou hygienou pracovníků a pracovních prostor nebo kontaktu masa s fekáliemi. Velkou míru prevalence *Arcobacter* spp. (40 %) popisuje studie, která zkoumala vzorky odebrané z povrchů desek na krájení masa a z nožů (Elmali a Can, 2017). Dalším stále zvětšujícím se rezervoárem těchto bakterií jsou ryby a mořské plody. Velmi

často bývají kontaminovány sladkovodní ryby žijící v blízkosti výpustí znečištěné vody. Tato voda bývá vypouštěna i do moře a tím dochází k přenosu bakterií na mořské ryby a mořské plody. Díky konzumaci syrových nebo nedostatečně tepelně upravených ryb mohou být *Arcobacter* spp. přeneseny na člověka.

Prevalence v drůbežím mase

Pro účely diplomové práce bylo odebráno celkem 98 vzorků drůbežního masa. Největší podíl tvořilo maso kuřecí (n=89), dále kachní (n=7), krůtí (n=5) a husí (n=1). Ze vzorku byly vyizolovány druhy *A. butzleri* (n=14) a *A. cryaerophilus* (n=2). Jeden vzorek obsahoval oba tyto druhy (vzorek V44, kuřecí maso, Vodňanské kuře). Celková prevalence v drůbežím mase byla 16,3 %, v kuřecím mase pak 15,3 %, v kachním mase 28,6 %, jediný zpracovaný husí vzorek byl pozitivní a v krůtím mase nebyl *Arcobacter* spp. nalezen vůbec, avšak nutno podotknout, že vzorků z těchto kategorií nebylo zpracováno mnoho. Výskyt druhů *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* v drůbežím mase je znázorněn v Grafu 1, který rovněž poukazuje na zastoupení pozitivních i negativních vzorků v jednotlivých podskupinách.

Graf 1 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost *Arcobacter* spp. – vzorky drůbežního masa

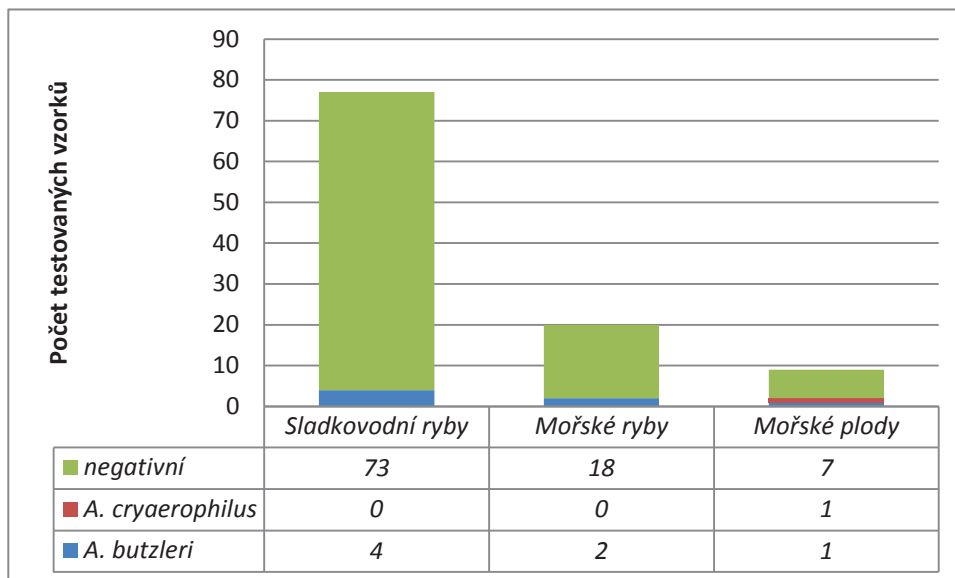


Ve studii z roku 2004, kde bylo použito pomnožovací médium *Arcobacter* bujon s CAT suplementem bylo dosaženo celkové prevalence v kuřecím mase 73 % (Rivas et al., 2004). Nicméně v jiné studii z roku 2018, kde bylo použito stejné pomnožovací médium s CAT suplementy, byla zaznamenána prevalence arkobakterů u 14,3 % testovaných vzorků (Di Noto et al., 2018). Ve studii probíhající v Indii, kde byl použit *Arcobacter* bujon bez suplementu (stejně jako v této studii), byla zjištěna prevalence v kuřecím mase 16,6 % a v kachním mase 10,0 % (Sekhar et al., 2017). Další studie z roku 2018 uvádí prevalenci *Arcobacter* spp. v 18,3 % kuřecího masa (Oliveira et al., 2018). Z porovnání těchto studií tedy vyplývá, že by nemělo mít použití CAT suplementu při pomnožovacím kroku příliš velký vliv na izolaci a identifikaci arkobakterů.

Prevalence v rybách a mořských plodech

V případě ryb a mořských plodů bylo odebráno celkem 104 vzorků. Nejvíce vzorků tvořily sladkovodní ryby (n=77), následně mořské ryby (n=20) a mořské plody (n=9). Ve vzorcích byly nalezeny a identifikovány kmeny *A. butzleri* (n=7) a *A. cryaerophilus* (n=1). Celková prevalence u ryb a mořských plodů byla 7,7 %, u sladkovodních ryb se *Arcobacter* spp. vyskytoval pouze u 5,2 % vzorků, u mořských ryb byla prevalence 10,0 % a u mořských plodů 22,2 %. Jediný kmen *A. cryaerophilus* byl izolován z mořských plodů, konkrétně ze vzorku krevety. Studie se také zaměřovala na výskyt arkobakterů u kaprů v rámci „předvánočního screeningu“ této komodity. Žádný ze vzorků kaprů (n=48) nebyl zkoumanými bakteriemi kontaminován. Výskyt bakterií *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* ve vzorcích ryb a mořských plodů je znázorněn v Grafu 2, který rovněž poukazuje na zastoupení pozitivních i negativních vzorků v jednotlivých podskupinách.

Graf 2 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost *Arcobacter* spp. – vzorky ryb a mořských plodů



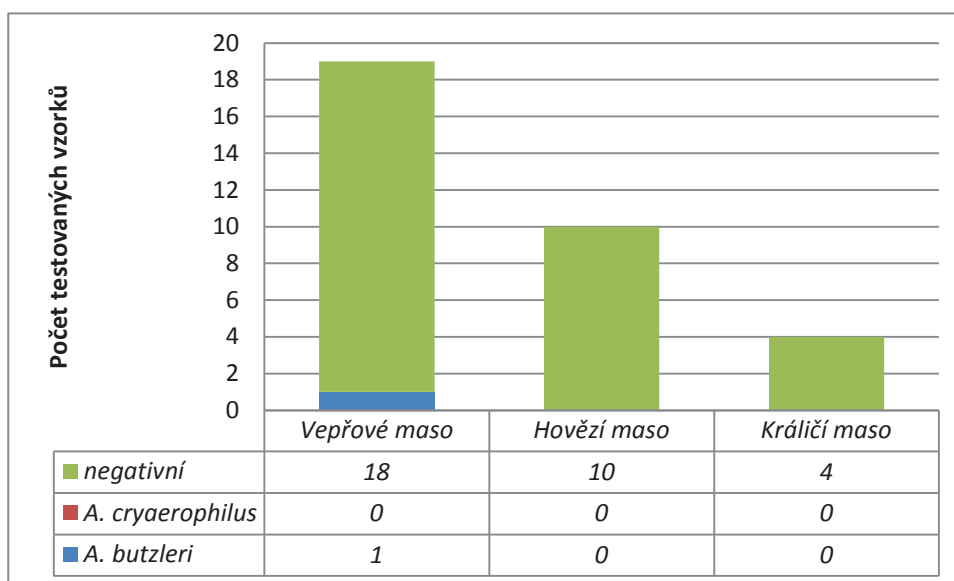
Nejčastěji vyskytující se arkobaktery v rybách a v jiných mořských živočiších jsou *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. V posledních letech ale přibývají další nové, například *A. venerupis*, *A. ebronensis*, *A. ellisii*, *A. bivalviorum* a *A. mytili*, *A. marinus*, *A. halophilus*, atd.

V této studii bylo možné ve vzorcích sladkovodních a mořských ryb a mořských plodech identifikovat pouze druhy *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* a jejich celková prevalence byla 7,7 %. Prevalence u sladkovodních ryb může být způsobena trusem ptáků žijících v blízkosti těchto vod. To se však u vzorků kaprů (zjištěná prevalence 0 %), žijících v rybnících, kde se běžně vyskytuje divoké ptactvo, nepotvrdilo. Nízká prevalence ve vzorcích mořských ryb a živočichů se ale nepotvrdila ve studii z Jordánska a Německa, které se také zabývaly výskytem tří nejčastěji vyskytujících se druhů. Studie z Jordánska popisuje prevalenci arkobakterů ve 30 % vzorků (Leoni et al., 2017), v Německu pak byla prevalence u rybího masa 34 % (Lehmann et al., 2015). Jelikož není Česká republika přímořský stát, dochází k výběru testovaných vzorků náhodně, zatímco u přímořských států mohly výzkumné týmy záměrně volit lokalitu, kde se dala předpokládat vyšší pravděpodobnost výskytu arkobakterů. Proto mohla být prevalence v jejich studiích daleko vyšší, než je v této studii.

Prevalence v ostatních vzorcích

Mezi skupinu vzorků označenou jako Ostatní bylo zařazeno 33 zpracovaných vzorků vepřového (n=19), hovězího (n=10) a králičího (n=4) masa. Jediným izolovaným kmenem byl *A. butzleri*, který se nacházel ve vepřovém masa. Celková prevalence těchto vzorků byla pouze 3 %, u vepřového pak 5,3 %. Výskyt bakterií *A. butzleri* a *A. cryaerophilus* ve vzorcích hovězího, vepřového a králičího masa je znázorněn v Grafu 3, který rovněž poukazuje na zastoupení pozitivních i negativních vzorků v jednotlivých skupinách.

Graf 3 Poměrové zastoupení pozitivních a negativních vzorků na přítomnost *Arcobacter* spp. – ostatní vzorky



Tyto výsledky se neshodují s výsledky studie z roku 2006, kdy byla zjištěna prevalence v hovězím masa 35 % a ve vepřovém 34 % (Scullion et al, 2006). Podobné výsledky má i studie z roku 2012, kde byla celková prevalence *Arcobacter* spp. 30,2 % (Shah et al., 2012). Jelikož dochází ke kontaminaci hovězího a vepřového masa hlavně sekundárně, je tedy možné uvažovat, že při zpracování většiny vzorků vepřového a hovězího masa, použitých v této práci, došlo k lepšímu dodržení hygienických podmínek, popřípadě bylo lépe zabráněno křížové kontaminaci s jinými druhy masa. Nízký výskyt arkobakterů v králičím masa potvrdila studie z roku 2009, kdy byla celková prevalence 10 % (Collado et al., 2009).

Z výsledků různých provedených studií však nelze vyvodit zcela definitivní závěr o prevalenci arkobakterů, protože to může ovlivnit řada faktorů, jako jsou velikost vzorku, metodika izolačních postupů a následná rozdílná metoda identifikace. Získané izoláty byly podrobeny testování z hlediska citlivosti/rezistence k antibiotikům.

3.4. Citlivost na antibiotika

Rezistence na antibiotika se stává stále větším celosvětovým problémem. Pro zkoumání citlivosti bakterií *Arcobacter* spp. bylo vybráno 18 antibiotik, které se používají v humánní či veterinární medicíně. Konkrétně se jednalo o amikacin (30 mg), amoxicillin/klavulanovou kyselinu (30 mg), ampicilin (10 mg), aztreonam (30 mg), cephalotin (30 mg), chloramphenicol (30 mg), ciprofloxacin (5 mg), clindamycin (2 mg), doxycylin (30 mg), enrofloxacin (5 mg), erythromycin (15 mg), gentamycin (10 mg), kyselinu nalidixovou (30 mg), oxacillin (1 mg), penicillin G (10 UI), streptomycin (10 mg), tetracyklin (30 mg) a tobramycin (10 mg). Veškerá použitá antibiotika jsou zařazena do skupin v Tabulce 5.

Tabulka 5 Zařazení vybraných antibiotik do příslušných skupin

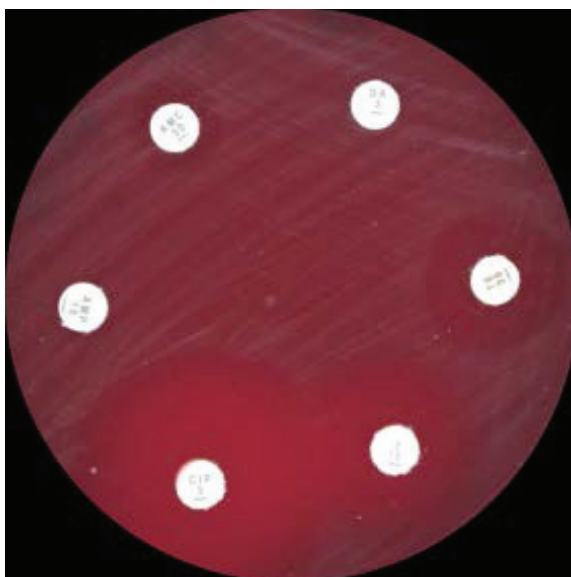
Skupina antibiotik	Jednotlivá antibiotika
β-laktamy	Ampicillin Amoxicillin/klavulanová kyselina Penicillin Oxacillin Cephalosporin Aztreonam
Linkosamidy	Clindamycin
Makrolidy	Erythromycin
Chinolony a fluorochinolony	Ciprofloxacin Kyselina nalidixová Enrofloxacin
Aminoglykosidy	Amikacin Gentamycin Streptomycin Tobramycin
Tetracykliny	Doxycylin Tetracyklin
Amfenikoly	Chloramphenicol

Pro účely diplomové práce bylo testováno 20 izolovaných kmenů bakterií *Arcobacter* z potravin (18 *A. butzleri* a 2 *A. cryaerophilus*). Tyto kmény zastupovaly izoláty z drůbežního masa (n=11), ryb a mořských plodů (n=8) a ze skupiny ostatních vzorků byl vybrán izolát z vepřového masa (n=1). Všechny použité kmény jsou znázorněny v Tabulce 6.

Tabulka 6 Vybrané izolované kmény arko-bakterií pro testování rezistence/citlivosti k antibiotikům

Číslo vzorku	Označení vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor, místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Kuřecí maso					
8	V30	21. 10. 2018	Prsní řízek	Řeznictví Třebovle Kolín	<i>A. butzleri</i>
18	V46	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
20	V48	27. 10. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
21	V49	27. 10. 2018	Prsní řízek	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
30	V65	8. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
38	V83	19. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Olomouc	<i>A. cryaerophilus</i>
44	V89	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
49	V94	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
59	V107	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
Kachní maso					
5	V69	11. 11. 2018	Trtol	Řeznictví Třebovle, Kolín	<i>A. butzleri</i>
Husí maso					
1	V26	21. 10. 2018	Srdce	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>
Sladkovodní ryby					
1	V24	21. 10. 2018	Pstruh	Rybník Zálší	<i>A. butzleri</i>
21	V132	30. 11. 2018	Sumeček	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
28	V160	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
29	V161	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Plody moře					
2	V130	30. 11. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	<i>A. cryaerophilus</i>
4	V134	30. 11. 2018	Slávka	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Mořské ryby					
7	V138	4. 12. 2018	Makrela	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
8	V141	5. 12. 2018	Losos	Kaufland, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
Vepřové maso					
10	V37	20. 10. 2018	Kýta	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>

Testování proběhlo podle metodiky popsané v kapitole 2.3.4. I přesto, že byl rod *Arcobacter* spp. popsán již v roce 1977, neexistuje doposud žádný standardizovaný postup pro zjištění citlivosti arkobakterů na antibiotika. Nejsou pro ně dostupná ani žádná kritéria pro označení testovaných kmenů za citlivé, intermediální nebo rezistentní, proto byly v této práci převzaty breakpointy popsané pro rod *Campylobacter* (pro erytromycin a ciprofloxacin) a pro čeleď *Enterobacteriaceae* (pro ostatní antibiotika kromě penicillinu G a oxacillinu). Účinek penicillinu G a oxacillinu nelze u arkobakterů hodnotit, jelikož se nejedná o antibiotika, která se používají k léčbě infekcí způsobených gram–negativními bakteriemi. Hodnoty použitých breakpointů jsou zaznamenány v Tabulce 7. Ukázka antibiogramu jsou znázorněny na Obrázku 9.



Obrázek 9 Antibiogram –*A. butzleri*, vzorek V69 (foto autor)

AMP... ampicilin, AMC... amoxicilin/klavulanová kyselina, DA... clindamycin, TE... tetracyklin, E... erythromycin, CIP... ciprofloxacin

Tabulka 7 Breakpointy vybraných antibiotik

ATB	S \geq	R<
Amikacin	15	13
Amoxicillin/klavulanová kyselina	18	13
Aztreonam	22	15
Ampicillin	17	16
Cephalotin	18	14
Ciprofloxacin	26	25
Clindamycin	31	25
Doxycyklin	14	10
Enrofloxacin	23	16
Erythromycin	19	20
Gentamycin	15	12
Chloramphenicol	18	12
Kyselina nalidixová	19	13
Oxacillin	-	-
Penicillin G	-	-
Streptomycin	15	11
Tetracyklin	30	29
Tobramycin	15	12

ATB... antibiotikum, S... citlivý, R... rezistentní, -... hodnoty nelze hodnotit. Hodnoty vyjadřují průměr inhibiční zóny a jsou vyjádřeny v mm.

Výsledky testování mikrobiální citlivosti *Arcobacter butzleri* a *Arcobacter cryaerophilus* jsou uvedeny v Tabulce 7. Všechny testované vzorky byly rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku. Nejvyšší počet *Arcobacter*-rezistentních kmenů byl zaznamenán ke clindamycinu (100,0 %). Vysoká rezistence na toto antibiotikum byla popsána již ve studii z roku 2007, kdy byla zjištěna rezistence u 88,5 % testovaných kmenů arkobakterů (Son et al., 2007). V roce 2016 pak byla zjištěna rezistence u 92,6 % kmenů (Shirzad Aski et al., 2016). Podobně vysoká rezistence byla zaznamenána u antibiotika aztreonamu (95,0 %). Tento výsledek koresponduje s výsledky z roku 2001, kdy bylo prokázáno 100 % rezistentních kmenů arkobakterů (Atabay a Aydin, 2001). Další antibiotikum, ke kterému byly arkobaktery rezistentní ve velké míře byla kyselina nalidixová (90,0 %). Výzkum z roku 2007 (Son et al., 2007) však popisuje daleko nižší výskyt rezistence, která byla zaznamenána pouze u 23,6 %

kmenů. Studie v roce 2014 popisuje rezistenci již u 77,8 % (Collado et al., 2014). Je tedy patrné, že se rezistence na antibiotika s postupem času zvyšuje. Vysokou míru rezistence vykazovaly arkobaktery i k tetracyklinu (85,0 %).

Cephalotin se běžně používá při izolaci arkobakterů ze vzorků pro potlačení růstu doprovodné mikroflóry. Existují ovšem studie, které poukazují na citlivost arkobakterů na toto antibiotikum. Je tedy možnost, že může dojít k potlačení arkobakterů při pomnožovacím kroku. Kabeya et al. (2004) popsali 81,1 % citlivých kmenů, Rathlavath et al. (2017) dokonce 100 %. Tyto výsledky se ale v této práci nepotvrdily. Citlivost na cephalotin byla potvrzena pouze u dvou kmenů (10 %) z 25 testovaných a u dvou kmenů byl pak výsledek intermediární.

Jen dva testované kmeny (10 %) byly rezistentní na ciprofloxacin. Většina testovaných kmenů byla citlivá k erythromycinu (95 %), pouze jediný kmen byl intermediární. Obě tato antibiotika se hojně používají při léčbě kampylobakteriózy a arkobakterií. Proto je rezistence na tato antibiotika častým předmětem výzkumů (Whiteduck-Léveillé et al., 2016; Ferreira et al., 2017; Sousa et al., 2019). Tyto studie ukazují stále zvyšující se rezistenci arkobakterů k antibiotikům. Avšak infekce způsobené rodem *Arcobacter* nemá tolik závažné klinické projevy jako u kampylobakterií a často nejsou antibiotika při léčbě vyžadována (Shirzad Aski et al., 2016).

Dalšími alternativními antibiotiky k potenciální léčbě jsou tetracyklin, doxycyklin a gentamycin (Houf et al., 2004). V této práci bylo mezi testovanými kmeny arkobakterů celkem 15 % citlivých k tetracyklinu, 70 % citlivých k doxycyklinu a 65 % ke gentamycinu. Vysokou míru citlivosti vykazovaly testované kmeny k antibiotikům tobramycin (100 %), amikacin (100 %) a streptomycin (100 %). Tyto výsledky jsou srovnatelné s výsledky publikovanými již dříve (Atabay a Aydin, 2001; Šilha et al., 2017).

Tabulka 8 Mikrobiální citlivost *Arcobacter butzleri* a *Arcobacter cryaerophilus*

ATB	<i>A. butzleri</i>									<i>A. cryaerophilus</i>					
	Drůbeží (n=10)			Ryby, mořské plody (n=7)			Ostatní (n=1)			Drůbeží (n=1)			Ryby, mořské plody (n=1)		
	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S	R	I	S
AMP	6	0	4	6	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
AMC	1	3	6	1	4	2	0	1	0	0	0	1	0	0	1
DA	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
TE	9	0	1	6	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1
E	0	1	9	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1
CIP	1	0	9	1	0	6	0	0	1	0	0	1	0	0	1
CN	0	0	10	7	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
C	5	3	2	5	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1
NA	9	1	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1
ENR	0	6	4	0	4	3	0	1	0	0	0	1	0	0	1
P	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
ST	0	0	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1
DO	0	2	8	0	3	4	0	1	0	0	0	1	0	0	1
AK	0	0	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1
ATM	9	0	1	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
KF	9	0	1	5	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0
OX	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
TOB	0	0	10	0	0	7	0	0	1	0	0	1	0	0	1

ATB... antibiotikum, R... rezistentní, I... intermediární, S... citlivý, AMP... ampicilin, AMC... amoxicilin/klavulanová kyselina, DA... clindamycin, TE... tetracyklin, E... erythromycin, CIP... ciprofloxacin, CN... gentamycin, C... chloramphenicol, NA... kyselina nalidixová, ENR... enrofloxacin, P... penicillin G, ST... streptomycin, DO... doxycyklin, AK... amikacin, ATM... aztreonam, KF... cephalotin, OX... oxacillin, TOB... tobramycin

Nejvíce kmenů bylo rezistentních na lynkosamidy, konkrétně se jednalo o clindamycin (100 %). Další skupinou, na kterou byla zjištěna vysoká rezistence u arkobakterů jsou β-laktamová antibiotika, kdy byla zjištěna jejich rezistence k aztreonamu (95,0 %), cephalotinu (80,0 %), ampicillinu (65,0 %) a amoxicilin/klavulanové kyselině (10,0 %). Aminoglykosidy, tj. amikacin, tobramycin a streptomycin se ukázaly jako nejefektivnější. U tetracyklinů bylo k tetracyklinu rezistentních 85 % kmenů. Oproti tomu bylo 60 % testovaných kmenů citlivých na doxycyklin. Na amfenikoly, konkrétně na chloramphenicol, bylo rezistentních 55 % kmenů. 95 % kmenů bylo citlivých k makrolidům (erythromycin). Jako účinná antibiotika z řady chinolonů a florochoolonů se dají považovat ciprofloxacin a enrofloxacin. Naopak na kyselinu nalidixovou bylo rezistentních 90 % kmenů arkobakterů. Veškeré testované kmeny *A. butzleri* byly citlivé na streptomycin, amikacin a tobramycin.

Oba testované kmeny *A. cryaerophilus* byly citlivé k ampicilinu, amoxycillin/klavulanové kyselině, erythromycinu, ciprofloxacinu, gentamycinu, chloramphenicolu, enrofloxacinu, streptomycinu, doxycyklinu, amikacinu a tobramycinu.

U většiny testovaných kmenů arkobakterů byla zjištěna rezistence na více než 3 antibiotika (bez penicilinu a oxacilinu). Počet multirezistentních kmenů je shrnut v Tabulce 9. Multirezistence byla zjištěna u 94 % kmenů *A. butzleri* a u 100 % kmenů *A. cryaerophilus*. Nejvíce kmenů arkobakterů (30 %) bylo rezistentních na 7 antibiotik (ampicilin, clindamycin, tetracyklin, chloramphenicol, kyselina nalidixová, aztreonam a cefalotin). Kmeny, které byly rezistentní na nejvíce antibiotik (n=8) pocházely z kuřecího masa. Šilha et al. (2017) ve své studii zkoumal stejné spektrum antibiotik. V jeho studii byla popsána multirezistence u 93,8 % *A. butzleri* a 70 % *A. cryaerophilus*. Nejvíce kmenů arkobakterů (15 %) bylo rezistentních na 6 antibiotik (ampicilin, clindamycin, chloramphenicol, kyselina nalidixová, aztreonam a cefalotin). Kmeny, které byly rezistentní na nejvíce antibiotik (n=9) pocházely z drůbežního masa (n=3) a odpadních vod (n=1). Vicente–Martins et al. (2018) popisují rezistenci na více než 3 antibiotiku u 85,7 % vzorků. Podobné výsledky měli ve své studii Rathlavath et al. (2017), kde se multirezistence objevila u 81,4 % kmenů izolovaných z ryb a u 65,3 % kmenů izolovaných z plodů moře.

Tabulka 9 Multirezistence arko bakterů k antibiotikům

Počet	Antibiotika	<i>A. butzleri</i>			<i>A. cryaerophilus</i>	
		Drůbeží (n=10)	Ryby, mořské plody (n=7)	Ostatní (n=1)	Drůbeží	Ryby, mořské plody
3	DA, ATM, KF		1			
3	DA, NA, ATM					1
4	DA, TE, ATM, KF				1	
5	DA, TE, NA, ATM, KF	2				
5	AMP, DA, TE, NA, ATM		1			
6	AMP, DA, TE, C, NA, ATM		1			
6	AMP, DA, TE, NA, ATM, KF	1				
6	DA, TE, C, NA, ATM, KF	1				
7	AMP, DA, TE, C, NA, ATM, KF	3	2	1		
8	AMP, AMC, DA, TE, C, NA, ATM, KF	1	1			
8	AMP, DA, TE, CIP, C, NA, ATM, KF	1	1			

AMP... ampicilin, AMC... amoxycilin/klavulanová kyselina, DA... clindamycin, TE... tetracyklin,
CIP... ciprofloxacin, C... chloramphenicol, NA... kyselina nalidixová, ATM... aztreonam, KF... cephalotin,

4. ZÁVĚR

Tato diplomová práce pojednává o bakteriích *Arcobacter* spp. a jejich výskytu ve velkoobchodní a maloobchodní síti a domácích chovech. Další část práce je dále zaměřena na vliv antibiotik na tyto bakterie.

V rámci diplomové práce bylo testováno 235 vzorků na přítomnost tří nejběžnějších druhů arkobakterů ve vzorcích živočišného původu, které byly rozděleny do skupin podle původu na vzorky drůbežního masa, ryb a mořských plodů a skupinu, do které byly zařazeny vzorky vepřového, hovězího a králičího masa. Nejprve proběhla optimalizace doby pomnožení v pomnožovacím médiu *Arcobacter* bujon. Ukázalo se, že nejvhodnější doba pomnožení je 48 hodin, protože za tuto dobu již dochází k obnovení subletálně poškozených buněk a jejich rozmnožování a doprovodná mikroflóra je stále na úrovni, která zcela nepotlačuje arkobaktery.

Všechny *Arcobacter*-suspektní izoláty byly identifikovány pomocí metody multiplex-PCR. Celkově byly nalezeny 2 druhy v případě 24 pozitivních vzorků na *Arcobacter* spp. (prevalence 10,6 %), konkrétně *Arcobacter butzleri* (n=22) a *Arcobacter cryaerophilus* (n=3). V jednu vzorku se vyskytovaly oba tyto druhy. Nejvyšší výskyt (prevalence 16,3 %, n=16) těchto bakterií byl potvrzen v drůbežím mase, což se potvrdilo i v jiných studiích. Nové studie ukazují na stále se zvyšující prevalenci ve vzorcích ryb a mořských plodů. V rámci této diplomové práce byla prevalence potvrzena u 7,7 % (n=8). Velmi malý záchyt byl zaznamenán ve vepřovém mase (n=1), v hovězím mase nebyl zaznamenán výskyt arkobakterů vůbec. Tento výsledek se s ostatními studii příliš neshoduje, což však může naznačovat dodržení hygienických podmínek při bourání a následném zpracování masa. Srovnávání výsledků s ostatními pracemi je však velmi obtížné, jelikož není pro arkobaktery standardizovaná metoda izolace a identifikace a každá ze studií použila rozdílné postupy.

Další částí diplomové práce bylo testování vybraných kmenů arkobakterů (n=20) z hlediska citlivost/rezistence k antibiotikům. Pro testování bylo vybráno 18 antibiotik používajících se v humánní či veterinární medicíně. Ukázalo se, že všechny testované kmeny byly rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána na antibiotikum clindamycin (100 %). Podobně vysoká rezistence byla popsána i u aztreonamu (95 %) a kyseliny nalidixové (90 %). Obecně byla nejvyšší rezistence na linkosamidy a β -laktamová antibiotika, což potvrdila i celá řada jiných studií.

Naopak nejvíce citlivých kmenů bylo na antibiotika z řady makrolidů (95 %). Dále byla zjištěna multirezistence alespoň na 3 antibiotika u 19 testovaných kmenů (95 %).

Z výsledků diplomové práce vyplývá, že jsou arkobaktery přítomny v široké škále potravin živočišného původu. I přesto, že byl *Arcobacter* spp. poprvé objeven již v roce 1977, je zkoumání přítomnosti tohoto patogena v potravinách v praxi stále zanedbáváno. Existuje mnoho nejasností, například přenos bakterií na maso nebo mechanismy virulence, které by mohly být předmětem dalšího zkoumání. Do budoucna je tedy vhodné pokračovat ve studiích zkoumání vlastností arkobakterů a jejich výskytu, pokusit se sjednotit metodiky odběru a zpracování vzorků, navrhnout jednotná kultivační média a takovou metodu identifikace, která by identifikovala všechny kmeny a byla by dostupná pro všechny laboratoře. Tyto kroky by vedly k zpřesnění výsledků výzkumů a následně by mohly vést k zpřísnění legislativy a kontroly potravin.

5. POUŽITÁ LITERATURA

Alispahic, M., Hummel, K., Janderski-Cetkovic, D., Nobauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M., Hess, C. Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 2010, 59(3), s. 295-301

Arias, M. L., Cid, A., Fernández, H. *Arcobacter butzleri*: first isolation report from chicken carcasses in costa rica. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011, 42(2), s. 703-706

Atabay, H. I., Aydin, F. Susceptibility of *Arcobacter butzleri* isolates to 23 antimicrobial agentr. *Lett. Appl. Microbiol.* 2001, 33, s. 430-433

Atabay, H. I., Corry, J. E. L. Evaluation of a new *Arcobacter* enrichment medium and comparison with two media developed for enrichment of *Campylobacter* spp. *Int. J. Food Microbiol.* 1998, 41, s. 53-58.

Atabay, H. I., Waino, M., Madsen, M. Detection and diversity of various *Arcobacter* species in Danish poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 2006, 109(1-2), s. 139-145

Aydin, F., Gumussoy, K. S., Atabay, H. I., Ica, T., Abay, S. Prevalence and distribution of *Arcobacter* species in various sources in Turkey and molecular analysis of isolated strains by ERIC-PCR. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 103(1), s. 27-35

Badilla-Ramírez, Y., Fallas-Padilla, K. L., Fernández-Jaramillo, H., Arias-Echandi, M. L. Survival capacity of *Arcobacter butzleri* inoculated in poultry meat at two different refrigeration temperatures. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2016, s. 58

Bagalakote, P. S., Rathore, R. S., Ramees, T. P., Mohan, H. V., Sumankumar, M., Agarwal, R. K., Kumar, A., Dhama, K. Molecular Characterization of *Arcobacter* Isolates Using Randomly Amplified Polymorphic DNA-Polymerase Chain Reaction (RAPD-PCR). *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2014, 9(9), s. 543-555

- Banting, G., Figueras Salvat, M. J., Pruden, A., Ashbolt, N., Miller, J.** *Arcobacter. Global Water Pathogen Project* [online]. Michigan State University, 2018 [cit. 2018-10-28]. Dostupné z: <http://www.waterpathogens.org/book/arcobacter>
- Barboza, K., Cubillo, Z., Castro, E., Redondo-Solano, M., Fernández-Jaramillo, H., Echandi, M. L. A.** First isolation report of *Arcobacter cryaerophilus* from a human diarrhea sample in Costa Rica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 2017, 59
- Batt, C. A., Tortorello, M. L.** *Encyclopedia of food microbiology*. 2nd ed. Amsterdam: Elsevier, 2014. ISBN 9780123847300.
- Brook, I., Wexler, H. M., Goldstein, E. J. C.** Antianaerobic Antimicrobials: Spectrum and Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 2013, 26(3), s. 526-546
- Cohen, S. N., Hsu, L., Chang, A. C. Y.** Nonchromosomal Antibiotic Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *Escherichia coli* by R-Factor DNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1972, 60(8), s. 2110-2114.
- Collado, L., Figueras, M. J.** Taxonomy, Epidemiology, and Clinical Relevance of the Genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 2011, 24(1), s. 174-192
- Collado, L., Guarro, J., Figueras, M. J.** Prevalence of *Arcobacter* in Meat and Shellfish. *Journal of Food Protection*. 2009, 72(5), s. 1102-1106.
- Collado, L., Jara, R., Vásquez, N., Telsaint, C.** Antimicrobial resistance and virulence genes of *Arcobacter* isolates recovered from edible bivalve molluscs. *Food Control*. 2014, 46, s. 508-512
- Collado, L., Kasimir, G., Perez, U., Bosch, A., Pinto, R., Saucedo, G., Huguet, J. M., Figueras, M. J.** Occurrence and diversity of *Arcobacter* spp. along the Llobregat River catchment, at sewage effluents and in a drinking water treatment plant. *Water Research*. 2010, 44(12), s. 3696-3702
- Collins, C. I., Wesley, I. V., Murano, E. A.** Detection of *Arcobacter* spp. in Ground Pork by Modified Plating Methods. *Journal of Food Protection*. 1996, 59(5), s. 448-452
- Červenka, L.** Survival and Inactivation of *Arcobacter* spp., a Current Status and Future Prospect. *Critical Reviews in Microbiology*. 2008, 33(2), s. 101-108

- De Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudah, L., Houf, K.** *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2011, 61(2), s. 356-361
- Di Noto, A. M., Sciortino, S., Cardamone, C., Ciravolo, C., Napoli, C., Alio, V., Arculeo, P., Oliveri, G., Costa, A.** Detection of *Arcobacter* spp. in food products collected from Sicilia region: A preliminary study. *Italian Journal of Food Safety*. 2018, 7(2)
- Doudah, L., de Zutter, L., Baré, J., de Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., Van den Abeelle, A. M., Houf, K.** Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 2012, 50(3), s. 735-741
- D'Sa, E. M., Harrison, M. A.** Effect of pH, NaCl Content, and Temperature on Growth and Survival of *Arcobacter* spp. *Journal of Food Protection*. 2005, 68(1), s. 18-25.
- Ellis, W., Neill, S., O'Brien, J., Ferguson, H., Hanna, J.** Isolation of *Spirillum/Vibrio*-like organisms from bovine fetuses. *Veterinary Record*. 1977, 100, s. 451-452.
- Elmali, M., Can, H. Y.** Occurrence and antimicrobial resistance of *Arcobacter* species in food and slaughterhouse samples. *Food Science and Technology*. 2017, 37(2), s. 280-285
- Espinel-Inhroff, A.** Comparison of Three Commercial Assays and a Modified Disk Diffusion Assay with Two Broth Microdilution Reference Assays for Testing *Zygomycetes*, *Aspergillus* spp., *Candida* spp., and *Cryptococcus neoformans* with Posaconazole and Amphotericin B. *Journal of Clinical Microbiology*. 2006, 44(10), s. 3616-3622
- Fernandez, H., Villanueva, M. P., Mansilla, I., Gonzalez, M., Latif, F.** *Arcobacter butzleri* and *A. cryaerophilus* in human, animals and food sources, in southern Chile. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015, 46(1), s. 145-147
- Ferreira, S., Fraqueza, J. M., Queiroz, J. A., Domingues, F. C., Oleastro, M.** Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, 162(1), s. 82-88

- Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F. C.** Occurrence, genetic diversity and antibiotic resistance of *Arcobacter* sp. in a dairy plant. *Journal of Applied Microbiology*. 2017, 123(4), s. 1019-1026
- Ferreira, S., Luís, A., Oleastro, M., Pereira, L., Domingues, F. C.** A meta-analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2019, 16, s. 130-139
- Giacometti, F., Lucchi, A., Di Francesco, A., Delogu, M., Grilli, E., Guarniero, I., Stancampiano, L., Manfreda, G., Merialdi, G., Serraino, A.** *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* Circulation in a Dairy Farm and Sources of Milk Contamination. *Applied and Environmental Microbiology*. 2015, 81(15), s. 5055-5063
- Gobbi, D. D. S., Spindola, G. M., Moreno, L. Z., Matajira, C. E. C., Oliveira M. G. X., Paixao, R., Ferreira, T. S. P., Moreno, A. M.** Isolation and molecular characterization of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* from the pork production chain in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2018, 38(3), s. 393-399
- González, A., Botella, S., Montes, M. R., Moreno, Y., Ferrús, M. A.** Detection and Identification of *Arcobacter* Species by Multiplex PCR in Chicken and Wastewater Samples from Spain. *Journal of Food Protection*. 2007, 70(2), s. 341-347
- Gude, A., Hullman, T. J., Helps, C. R., Allen, V. M., Corry, J. E. L.** Ecology of *Arcobacter* species in chicken rearing and processing. *Letters in Applied Microbiology*. 2005, 41(1), s. 82-87
- Guimaraes, D. O., Momesso, L. S., Pupo, M. T.** Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quím. Nova*. 2010, 33(3), s. 667-679.
- Hilbert, F., Scherwitzel, M., Paulsen, P., Szostak, M. P.** Survival of *Campylobacter jejuni* under Conditions of Atmospheric Oxygen Tension with the Support of *Pseudomonas* spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, 76(17), s. 5911-5917

- Hilton, C. L., Mackey, B. M., Hergreaves, A. J., Forsythe, S. J.** The recovery of *Arcobacter butzleri* NCTC 12481 from various temperature treatments. *Journal of Applied Microbiology*. 2001, 91(5), s. 929-932
- Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W.** *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent. *Veterinary microbiology*. 2006, 115 (1-3), s. 1-13 ISBN 0378-1135.
- Houf, K., On, S. L., Coenye, T., Mast, J., Van Hoof, J., Vandamme, P.** *Arcobacter cibarius* sp. nov., isolated from broiler carcasses. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2005, 55(2), s. 713-717
- Houf, K., Devriese, L. A., Haesebrouck, F., Vandenberg, O., Butzler, J. P., Van Hoof, J., Vandamme, P.** Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* Strains Isolated from Humans and Broilers. *Microbial Drug Resistance*. 2004, 10(3), s. 243-247
- Houf, K., Devriese, L. A., Zutter, L. D., Van Hoof, J., Vandamme, P.** Susceptibility of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus*, and *Arcobacter skirrowii* to Antimicrobial Agents Used in Selective Media. *Journal of Clinical Microbiology*. 2001, 39(4), s. 1654-1656
- Houf, K., Tutenel, A., De Zutter, L., Van Hoof, J., Vandamme, P.** Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000, 193(1), s. 89-94
- Huong, T. T., Komínková, M., Guráň, R., Ruttkay-Nedecký, B., Kopel, P., Trnková, L., Zítka, O., Adam, V., Kizek, R.** Identifikace mikroorganismů pomocí MALDI-TOF-MS. *Journal of Metallomics and Nanotechnologies*. 2014, 1(2), s. 64-66
- Chinivasagam, H. N., Corney, B. G., Weight, L. L., Diallo, I. S., Blackall, P. J.** Detection of *Arcobacter* spp. in piggery effluent and effluent-irrigated soils in southeast Queensland. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, 103(2), s. 418-426
- Jelínek, D., Miketová, P., Khailová, L., Schram, K. H., Moore, I. M., Vytřasová, J.** Identification of *Arcobacter* species using phospholipid and total fatty acid profiles. *Folia Microbiologica*. 2006, 51(4), 329-336

- Johnson, L. G., Murano, E. A.** Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. *J. Food Prot.* 1999, 62, s. 456-462
- Kabeya, H., Maruyama, Y., Morita, Y., Ohsugam T., Ozawa, S., Kobayashi, Y., Abe, M., Katsube, Y., Mikami, T.** Prevalence of *Arcobacter* species in retail meats and antimicrobial susceptibility of the isolates in Japan. *International Journal of Food Microbiology.* 2004, 90(3), s. 303-308
- Kjeldgaard, J., Jorgensen, K., Ingmer, H.** Growth and survival at chiller temperatures of *Arcobacter butzleri*. *International Journal of Food Microbiology.* 2009, 131(2-3), s. 256-259
- Laishram, M., Rathlavath, S., Lekshmi, M., Kumar, S., Nayak, B. B.** Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology.* 2016, 232, s. 87-89
- Leoni, F., Chierichetti, S., Santarelli, S., Talevi, G., Masini, L., Bartolini, C., Rocchegiani, E., Naceur Haouet, M., Ottaviani, D.** Occurrence of *Arcobacter* spp. and correlation with the bacterial indicator of faecal contamination *Escherichia coli* in bivalve molluscs from the Central Adriatic, Italy. *International Journal of Food Microbiology.* 2017, 245, s. 6-12
- Lehmann, D., Alter, T., Lehmann, L., Uherkova, S., Seidler, T., Golz, G.** Prevalence, virulence gene distribution and genetic diversity of *Arcobacter* in food samples in Germany. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2015, 128, s. 163–168
- Letournel-Glomaud, C., Houssaye, S., Milhaiha, L., Ghnassia, J. C.** E-test antibiotics susceptibility of strict anaerobic bacteria. *Anaerobe.* 2003, 9 (6), s. 281-284.
- Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., Figueras, M. J.** *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and Applied Microbiology.* 2012, 35(3), s. 133-138
- Levican, A., Collado, L., Figueras, M. J.** The Use of Two Culturing Methods in Parallel Reveals a High Prevalence and Diversity of *Arcobacter* spp. in a Wastewater Treatment Plant. *BioMed Research International.* 2016, 2016, s. 1-9

- Levican, A., Rubio-Arcos, S., Martinez-Murcia, A., Collado, L. Figueras, M. J.** *Arcobacter ebronensis* sp. nov. and *Arcobacter aquimarinus* sp. nov., two new species isolated from marine environment. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015, 38(1), s. 30-35 [cit. 2019-02-06].
- Lipman, L., Ho, H., Gaastra, W.** The Presence of *Arcobacter* Species in Breeding Hens and Eggs from These Hens. *Poultry Science*. 2008, 87(11), s. 2404-2407
- Martín, J., García-Estrada, C., Rumbero, Á., Recio, E., Albillos, S. M., Ullán, R. V., Martín, J. F.** Characterization of an Autoinducer of *Penicillin Biosynthesis* in *Penicillium chrysogenum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(16), s. 5688-5696
- Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J.** Comparison of *Arcobacter* Isolation Methods, and Diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, 77(5), s. 1646-1650
- Mohan, H. V., Rathore, R. S., Dhama, K., Ramees, T. P., Patya, A., Bagalko, P. S., Wani, M. Y., Bhilegaonkar, K. N., Kumar, A.** Prevalence of *Arcobacter* spp. in Humans, Animals and Foods of Animal Origin in India Based on Cultural Isolation, Antibiogram, PCR and Multiplex PCR Detection. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2014, 9(8), s. 452-466
- Motarjemi, Y., Adams, M.** *Emerging foodboorne pathogens*. Woodhead Publishing, 2006. ISBN 9781855739635.
- Mottola, A., Bonerba, E., Bozzo, G., Marchetti, P., Celano, G. V., Colao, V., Tantillo, G., Figueras, M. J., Di Pinta, A.** Occurrence of emerging food-borne pathogenic *Arcobacter* spp. isolated from pre-cut (ready-to-eat) vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 236, s. 33-37
- Nachamkin, I., Szymanski, C. M., Blaser, M. J., Podkowik, M., Bania, J.** *Campylobacter, Third Edition*. American Society of Microbiology, 2008, 18(1), s. 3-25. ISBN: 978-1-55581-437-3

- Oliveira, M. G. X., Gomes, V. T. M., Cunha, M. P. V., Moreno, L. Z., Moreno, A. M., Knobl, T.** Genotypic Characterization of *Arcobacter* spp. isolated from Chicken Meat in Brazil. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2018, 15(5), s. 293-299
- Ongor, H., Cetinkaya, B., Acik, M. N., Atabay, H. I.** Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*. 2004, 38(4), s. 339-344
- Pejchalová, M., Žabčíková, S., Šilková, L., Šilha, D., Brožková, I., Haslová, M.** Presence of *Arcobacter* species in pet cats and dogs in the Czech Republic. *Veterinární Medicína*. 2017, 61(8), s. 449-455
- Pérez-Cataluña, A., Collado, L., Salgado, O., Lediñanco, V., Figueras, M. J.** A Polyphasic and Taxogenomic Evaluation Uncovers *Arcobacter cryaerophilus* as a Species Complex That Embraces Four Genomovars. *Frontiers in Microbiology*. 2018, 9
- Pianta, C., Passos, D. T. Hepp, D., Oliveira, S. J.** Isolation of *Arcobacter* spp. from the milk of dairy cows in Brazil. *Ciência Rural*. 2007, 37(1), s. 171-174
- Rafath, A., Balamurufan, S.** Evaluation of three *Arcobacter* selective agars for selective enumeration of *Arcobacter butzleri* in beef. *Food Research International*. 2013, 52(2), s. 522-525
- Rahimi, E., Hormozipoor, H., Gholami Ahangaran, M., Yazdi, F.** Prevalence of *Arcobacter* species on chicken carcasses during processing in Iran. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2012, 21(2), s. 407-412
- Ramees, T. P., Rathore R. S., Kumar A.** Phylogenetic analysis of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter skirrowii* isolates and their detection from contaminated vegetables by multiplex PCR. *Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences*. 2018, 6(2), s. 307-314
- Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K.** *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control – a comprehensive review. *Veterinary Quarterly*. 2017, 37(1), s. 136-161

- Rathlavath, S., Kumar, S., Nayak, B. B.** Comparative isolation and genetic diversity of *Arcobacter* sp. from fish and the coastal environment. *Letters in Applied Microbiology*. 2017, 65(1), s. 42-49
- Rathlavath, S., Kohli, V., Singh, A. S., Lekshmi, M., Tropathi, G., Kumar, S., Nayak, B. B.** Virulence genotypes and antimicrobial susceptibility patterns of *Arcobacter butzleri* isolated from seafood and its environment. *International Journal of Food Microbiology*. 2017, 263, s. 32-37
- Rivas, L., Fegan, N., Vanderlinde, P.** Isolation and characterisation of *Arcobacter butzleri* from meat. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, 91(1), s 31-41
- Salas-Massó, N., Andree, K. B., Furones, M. D., Figueras, M. J.** Enhanced recovery of *Arcobacter* spp. using NaCl in culture media and re-assessment of the traits of *Arcobacter marinus* and *Arcobacter halophilus* isolated from marine water and shellfish. *International Journal of Food Microbiology*. 2016, 232, s. 87-89
- Scullion, R., Harrington R. H., Madden, R. H.** Prevalence of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Meats in Northern Ireland. *Journal of Food Protection*. 2006, 69(8), s. 1986-1990.
- Sekhar, M. S., Tumati, S. R., Chinnam, B. K., Kothapalli, V. S., Sharif, N. M.** Virulence gene profiles of *Arcobacter* species isolated from animals, foods of animal origin, and humans in Andhra Pradesh, India. *Veterinary World*. 2017, 10(6), s. 716-720
- Sengupta, S., Chattopadhyaya, M. K., Grossart, H. P.** The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in Microbiology*. 2013, 4
- Shah, A. H., Saleha, A. A., Murugaiyah, M., Zunita, Z., Memon, A. A.** Prevalence and Distribution of *Arcobacter* spp. in Raw Milk and Retail Raw Beef. *Journal of Food Protection*. 2012, 75(8), s. 1474-1478.
- Shirzad Aski, H., Tabatabaei, M., Khoshbakht, R., Raeisi, M.** Occurrence and antimicrobial resistance of emergent *Arcobacter* spp. isolated from cattle and sheep in Iran. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016, 44, s. 37-40

- Shrestha, R. G., Tanaka, Y., Malla, B., Tandukar, S., Bhandari, D., Inoue, D., Sei, K., Sherchand, J. B., Haramoto, E.** Development of a Quantitative PCR Assay for *Arcobacter* spp. and its Application to Environmental Water Samples. *Microbes and Environments*. 2018, 33(3), s. 309-316
- Simmons, J., Gibson, S.** *Bacterial and Mycotic Diseases of Nonhuman Primates*. Nonhuman Primates in Biomedical Research, 2012, s. 105-172, ISBN 9780123813664.
- Singhal, N., Kumar, M., Kanaujia, P. K., Viridi, J. S.** MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Frontiers in Microbiology*. 2015, 6
- Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E. Dooley, J. S. G.** Under the Microscope: *Arcobacter*. *Letters in Applied Microbiology*. 2006, 42(1), s. 7-14
- Son, I., Englen, M. D., Berrang, M. E., Fedorka-Cray, P. J., Harrison, M. A.** Antimicrobial resistance of *Arcobacter* and *Campylobacter* from broiler carcasses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2007, 29(4), s. 451-455
- Šilha, D., Šilhová-Hrušková, L., Vytrásová, J.** Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiologica*. 2015, 60(6), s. 515-521
- Šilha, D., Pejchalová, M., Šilhová, L.** Susceptibility to 18 drugs and multidrug resistance of *Arcobacter* isolates from different sources within the Czech Republic. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 2017, 9(1), s. 74-77.
- Šilha, D., Vacková, B., Šilhová, L.** Occurrence of virulence-associated genes in *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* isolates from foodstuff, water, and clinical samples within the Czech Republic. *Folia Microbiologica*. 2018, 64(1), s. 25-31.
- Urbášková, P.** Rezistence bakterií k antibiotikům-vybrané metody. Praha: Trios, 1998.
- Urbášková, P., Schindler, J., Ticháček, J., Potužík, V.** Vyšetření pro antimikrobiální terapii, Avicenum. 1985, s. 19 – 31.
- Vandamme, P., De Lay, J.** Proposal for a new family *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1991, 41, s. 451–455.

- Vandenberg, O., Dediste, A., Houf, K., Ibekwem, S., Souayah, H., Cadranel, S., Douat, N., Zissis, G., Butzler, J. P., Vandamme, P.** *Arcobacter* Species in Humans. *Emerging Infectious Diseases*. 2004, 10(10), s. 1863-1867
- Van den Abeele, A. M. Vogelaers, D., Van Hende, J., Houf, K.** Prevalence of *Arcobacter* Species among Humans, Belgium, 2008–2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2014, 20(10), s. 1746-1749
- Van den Abeele, A. M., Vogelaers, D., Vanlaere, E., Houf, K.** Antimicrobial susceptibility testing of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* strains isolated from Belgian patients. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2016, 71(5), s. 1241-1244
- Van Driessche, E., Houf, K.** Survival capacity in water of *Arcobacter* species under different temperature conditions. *Journal of Applied Microbiology*. 2008, 105(2), s. 443-451
- Van Driessche, E., Houf, K., Hoof, J., Zutter, L., Vandamme, P.** Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiology Letters*. 2003, 229(2), s. 243-248
- Vicente-Martins, S., Oleastro, M., Dominigues, F. C., Ferreira, S.** *Arcobacter* spp. at retail food from Portugal: Prevalence, genotyping and antibiotics resistance. *Food Control*. 2018, 85, 107-112
- Whiteduck-Léveillée, J, Lapen, D. R., Whiteduck-Léveillée, K.** *Arcobacter lanthieri* sp. nov., isolated from pig and dairy cattle manure. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2015, 65(8), s. 2709-2716
- Whiteduck-Léveillée, K., Whiteduck-Léveillée, J., Cloutier, M.** Identification, characterization and description of *Arcobacter faecis* sp. nov., isolated from a human waste septic tank. *Systematic and Applied Microbiology*. 2016, 39(2), s. 93-99
- WORLD HEALTH ORGANISATION.** *Antimicrobial resistance: Fact sheet*. 2018 [online]. [cit. 2019-04-09]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- Wybo, I., Breynaert, J., Lauwers, S., Lindenburg, F., Houf, K.** Isolation of *Arcobacter skirrowii* from a Patient with Chronic Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42(4), s. 1851-1852

Yesilmen, S., Vural, A., Erkan, M. E., Yildirim, I. H. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Arcobacter* species in cow milk, water buffalo milk and fresh village cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, 188, s, 11-14

6. PŘÍLOHY

Příloha A Kompletní seznam vzorků drůbežího masa zařazených do studie	83
Příloha B Kompletní seznam vzorků ryb a mořských plodů zařazených do studie	86
Příloha C Kompletní seznam ostatních vzorků zařazených do studie	90
Příloha D Citlivost/rezistence izolovaných bakterií <i>Arcobacter</i> spp. na antibiotika ampicilin, amoxycilin/klavulanovou kyselinu, clindamycin, tetracyklin, erythromycin a ciprofloxacin .	91
Příloha E Citlivost/rezistence izolovaných bakterií <i>Arcobacter</i> spp. na antibiotika gentamycin, chloramphenicol, kyselinu nalidixovou, enrofloxacin, penicillin G a streptomycin	92
Příloha F Citlivost/rezistence izolovaných bakterií <i>Arcobacter</i> spp. na antibiotika doxycyklin, amikacin, aztreonam, cephalotin, oxacillin a tobramycin	93

Příloha A Kompletní seznam vzorků drůbežního masa zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Kuřecí maso					
1	V7	7.10.2018	Prsní řízky	Drůbeží závody Klatovy	-
2	V12	9. 10. 2018	Prsní řízky	Kaufland, Pardubice	-
3	V13	9. 10. 2018	Prsní řízky	Kaufland, Pardubice	-
4	V17	13. 10. 2018	Játra	Krásno Dubňany	-
5	V18	13. 10. 2018	Prsní řízky	Krásno Dubňany	-
6	V27	20. 10. 2018	Prsní řízek	Drůbeží závody Klatovy	-
7	V29	21. 10. 2018	Stehenní řízek	řeznictví Třebovle Kolín	-
8	V30	21. 10. 2018	prsní řízek	řeznictví Třebovle Kolín	<i>A. butzleri</i>
9	V31	23. 10. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	-
10	V32	23. 10. 2018	prsní řízek	Vodňanské kuře	-
11	V33	23. 10. 2018	Stehenní řízek	Vodňanské kuře	-
12	V34	23. 10. 2018	Stehenní řízek	Vodňanské kuře	-
13	V35	27. 10. 2018	Prsní řízek	Lidl hodonín	-
14	V36	27. 10. 2018	Prsní řízek	Lidl Hodonín	-
15	V43	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
16	V44	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i> , <i>A. cryaerophilus</i>
17	V45	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	-
18	V46	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
19	V47	26. 10. 2018	Zadní čtvrtky	Vodňanské kuře	-
20	V48	27. 10. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
21	V49	27. 10. 2018	Prsní řízky	Krásno Dubňany	<i>A. butzleri</i>
22	V54	5. 11. 2018	Stehno spodní	RABBIT Trhový štěpánov a.s.	-
23	V55	5. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Olomouc	-
24	V56	5. 11. 2018	Prsní řízek	Lidl Olomouc	-
25	V57	5. 11. 2018	Prsní řízek	Lidl Olomouc	-
26	V59	5. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Pardubice	neg.
27	V61	5. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Pardubice	neg.
28	V62	5. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Pardubice	neg.
29	V63	8. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	neg.
30	V65	8. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
31	V67	8. 11. 2018	Stehenní řízek	Klatovy	neg.
32	V72	11. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
33	V73	11. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
34	V74	18. 11. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	-
35	V75	18. 11. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	-

neg... negativní výsledek PCR, - ... negativní vzorek

Příloha A - pokračování Kompletní seznam vzorků drůbežního masa zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Kuřecí maso					
36	V76	18. 11. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	-
37	V77	18. 11. 2018	Stehno	Krásno Dubňany	-
38	V83	19. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Olomouc	<i>A. cryaerophilus</i>
39	V84	19. 11. 2018	Prsní řízek	Globus Olomouc	-
40	V85	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	-
41	V86	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	-
42	V87	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	neg.
43	V88	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	-
44	V89	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
45	V90	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	neg.
46	V91	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	neg.
47	V92	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	-
48	V93	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
49	V94	16. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	<i>A. butzleri</i>
50	V95	17. 11. 2018	Játra	Domácí chov, Zálší	-
51	V98	17. 11. 2018	Prsní řízek	Domácí chov, Zálší	-
52	V99	24. 11. 2018	Prsní řízek	Domácí chov, Zálší	-
53	V100	24. 11. 2018	Prsní řízek	Vodňanské kuře	neg.
54	V102	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
55	V103	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
56	V104	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
57	V105	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
58	V106	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
59	V107	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	<i>A. butzleri</i>
60	V108	25. 11. 2018	Prsní řízek	Tesco Uničov	-
61	V110	25. 11. 2018	Žaludek	Vodňanské kuře	-
62	V135	4. 12. 2018	Prsní řízek	Lidl, Brno	-
63	V136	4. 12. 2018	Prsní řízek	Tesco, Pardubice	-
64	V139	4. 12. 2018	Prsní řízek	Lidl, Brno	neg.
65	V190	6. 2. 2019	Prsní řízek	Tesco, Uničov	neg.
66	V191	6. 2. 2019	Prsní řízek	Globus, Olomouc	neg.
67	V192	6. 2. 2019	Prsní řízek	Tesco, Uničov	-
68	V195	6. 2. 2019	Stehenní řízek	Albert, Uničov	-
69	V196	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-
70	V197	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-
71	V198	6. 2. 2019	Stehenní řízek	Albert, Uničov	-
72	V199	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-
73	V200	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-

neg... negativní výsledek PCR, - ... negativní vzorek

Příloha A - pokračování Kompletní seznam vzorků drůbežího masa zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Kuřecí maso					
74	V201	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
75	V202	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
76	V203	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
77	V204	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
78	V205	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
79	V206	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
80	V207	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	neg.
81	V208	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-
82	V209	6. 2. 2019	Prsní řízek	Albert, Uničov	-
83	V210	6. 2. 2019	Stehenní řízek	Albert, Uničov	-
84	V232	6. 2. 2019	Stehno	Albert, Pardubice	-
85	V235	6. 2. 2019	Slepice	Domácí chov, Zálší	-
Krůtí maso					
1	V14	13. 10. 2018	Krk	Krásno Dubňany	-
2	V52	27. 10. 2018	Maso	Krásno Dubňany	-
3	V66	8. 11. 2018	Mleté	Klatovy	-
4	V68	8. 11. 2018	Mleté	Tesco Pardubice	-
5	V96	17. 11. 2018	Stehno	Domácí chov, Zálší	-
Kachní maso					
1	V15	13. 10. 2018	Kůže	Kaufland/Hodonín	-
2	V22	13. 10. 2018	Kůže	Kaufland/Hodonín	neg.
3	V23	13. 10. 2018	Játra	Krásno Dubňany	-
4	V25	21. 10. 2018	Maso	Domácí chov, Zálší	-
5	V69	11. 11. 2018	Trtol	řeznictví Třebovle, Kolín	<i>A. butzleri</i>
6	V70	11. 11. 2018	Trtol	řeznictví Třebovle, Kolín	<i>A. butzleri</i>
7	V193	6. 1. 2019	Maso (Zmr.)	Kaufland, Zábřeh	-
Husí maso					
1	V26	21. 10. 2018	Srdce	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>

neg. ... negativní výsledek PCR, - ...negativní vzorek

Příloha B Kompletní seznam vzorků ryb a mořských plodů zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Sladkovodní ryby					
1	V24	21. 10. 2018	Pstruh	Rybník Zálší	<i>A. butzleri</i>
2	V39	26. 10. 2018	Kapr	rybník Šumvald	-
3	V40	26. 10. 2018	Kapr	rybník Šumvald	-
4	V41	26. 10. 2018	Kapr	rybník Šumvald	-
5	V42	26. 10. 2018	Kapr	rybník Šumvald	-
6	V111	25. 11. 2018	pstruh, ocas	Lidl, Pardubice	-
7	V112	25. 11. 2018	pstruh, ocas	Lidl, Pardubice	neg.
8	V113	25. 11. 2018	pstruh, ocas	Lidl, Pardubice	neg.
9	V114	25. 11. 2018	pstruh, ocas	Lidl, Pardubice	-
10	V115	25. 11. 2018	pstruh, ocas	Lidl, Pardubice	-
11	V116	25. 11. 2018	pstruh, hlava	Lidl, Pardubice	neg.
12	V117	25. 11. 2018	pstruh, hlava	Lidl, Pardubice	-
13	V118	25. 11. 2018	pstruh, hlava	Lidl, Pardubice	-
14	V119	25. 11. 2018	pstruh, hlava	Lidl, Pardubice	-
15	V120	25. 11. 2018	pstruh, hlava	Lidl, Pardubice	-
16	V121	30. 11. 2018	Kapr, vnitřnosti	Globus, Pardubice	-
17	V122	30. 11. 2018	Kapr, vnitřnosti	Globus, Pardubice	-
18	V125	30. 11. 2018	Okoun	Globus, Pardubice	-
19	V126	30. 11. 2018	Candát	Globus, Pardubice	-
20	V127	30. 11. 2018	Tilápie	Globus, Pardubice	-
21	V132	30. 11. 2018	Sumeček	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
22	V133	30. 11. 2018	Sumeček	Globus, Pardubice	-
23	V140	5. 12. 2018	Kapr	Globus, Pardubice	-
24	V156	10. 12. 2018	Kapr	Globus, Pardubice	-
25	V157	10. 12. 2018	Kapr	Globus, Pardubice	-
26	V158	10. 12. 2018	Kapr	Globus, Pardubice	-
27	V159	10. 12. 2018	Kapr	Globus, Pardubice	-
28	V160	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
29	V161	10. 12. 2018	Pstruh	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
30	V162	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
31	V163	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
32	V164	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
33	V165	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
34	V166	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Tesco, Uničov	-

neg. ... negativní výsledek PCR, - ... negativní vzorek

Příloha B – pokračování Kompletní seznam vzorků ryb a mořských plodů zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Sladkovodní ryby					
35	V167	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
36	V168	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
37	V169	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
38	V170	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
39	V171	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
40	V172	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
41	V173	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
42	V174	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
43	V175	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
44	V176	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Tesco, Uničov	-
45	V177	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
46	V178	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
47	V179	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
48	V180	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
49	V181	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
50	V182	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Tesco, Uničov	-
51	V183	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Tesco, Uničov	-
52	V184	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
53	V185	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
54	V186	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Globus, Olomouc	-
55	V187	5. 2. 2019	Kapr	Pohořelice, Tesco, Uničov	-
56	V188	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
57	V189	5. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
58	V211	6. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
59	V212	6. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
60	V213	6. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
61	V214	6. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
62	V215	6. 2. 2019	Kapr	Tovačov	-
63	V216	6. 2. 2019	Kapr	Písečné, Hodonín	-
64	V217	6. 2. 2019	Kapr	Písečné, Hodonín	-

neg. ... negativní výsledek PCR, - ...negativní vzorek

Příloha B – pokračování Kompletní seznam vzorků ryb a mořských plodů zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Sladkovodní ryby					
65	V218	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
66	V219	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
67	V220	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
68	V221	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
69	V222	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
70	V223	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
71	V224	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
72	V225	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
73	V226	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
74	V227	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
75	V228	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
76	V229	6. 2. 2019	Kapr	Šumvald	-
77	V231	6. 2. 2019	Kapr	Litomyšl	-
Plody moře					
1	V50	22. 10. 2018	Kreveta	Makro/Olomouc	-
2	V130	30. 11. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	<i>A. cryaerophilus</i>
3	V131	30. 11. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	neg.
4	V134	30. 11. 2018	Slávka	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
5	V142	10. 12. 2018	Hřebenatka	Globus, Pardubice	-
6	V154	10. 12. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	neg.
7	V155	10. 12. 2018	Kreveta	Globus, Pardubice	-
Mořské ryby					
1	V53	24. 10. 2018	Treska	Kaufland/Pardubice	-
2	V123	30. 11. 2018	Losos	Globus, Pardubice	-
3	V124	30. 11. 2018	Treska obecná	Globus, Pardubice	-
4	V128	30. 11. 2018	Treska tmavá	Globus, Pardubice	-
5	V129	30. 11. 2018	Tuňák	Globus, Pardubice	-
6	V137	4. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	neg.
7	V138	4. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
8	V141	5. 12. 2018	Losos	Kaufland, Pardubice	<i>A. butzleri</i>
9	V143	10. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	-
10	V144	10. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	-
11	V145	10. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	-
12	V146	10. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	-
13	V147	10. 12. 2018	Makrela obecná	Globus, Pardubice	-
14	V148	10. 12. 2018	Losos	Globus, Pardubice	-
15	V149	10. 12. 2018	Losos	Globus, Pardubice	-

neg. ... negativní výsledek PCR, - ...negativní vzorek

Příloha B – pokračování Kompletní seznam vzorků ryb a mořských plodů zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Mořské ryby					
16	V150	10. 12. 2018	Losos	Globus, Pardubice	-
17	V151	10. 12. 2018	Losos	Globus, Pardubice	-
18	V152	10. 12. 2018	Treska	Globus, Pardubice	-
19	V153	10. 12. 2018	Treska	Globus, Pardubice	neg.
20	V234	6. 2. 2018	Treska	Nowaco, Zálší	-

neg. ... negativní výsledek PCR, - ...negativní vzorek

Příloha C Kompletní seznam ostatních vzorků zařazených do studie

číslo vzorku	Označní vzorku	Datum odběru	Specifikace vzorku	Distributor/místo odběru	<i>Arcobacter</i> spp.
Vepřové maso					
1	V2	7. 10. 2018	Krkovice	Jatka Janovice	-
2	V5	7. 10. 2018	Kotleta	Jatka Janovice	-
3	V6	7. 10. 2018	Bok	jatka Janovice	-
4	V8	7. 10. 2018	Krkovice	Jatka Janovice	-
5	V9	7. 10. 2018	Kýta	Jatka Janovice	-
6	V10	7. 10. 2018	Plec	Jatka Janovice	-
7	V11	7. 10. 2018	Krkovice	Jatka Janovice	-
8	V16	13. 10. 2018	Játra	Krásno Dubňany	neg.
9	V19	13. 10. 2018	Plec	Krásno Dubňany	-
10	V37	20. 10. 2018	Kýta	Domácí chov, Zálší	<i>A. butzleri</i>
11	V51	20. 10. 2018	Krkovice	Kaufland, Zábřeh	-
12	V64	8. 11. 2018	Pečeně	Tesco, Pardubice	-
13	V71	11. 11. 2018	Plec	řeznictví Třebovle, Kolín	-
14	V80	18. 11. 2018	Plec	Krásno Dubňany	-
15	V82	18. 11. 2018	Plec	Krásno Dubňany	-
16	V101	24. 11. 2018	Bůček	Domácí chov, Zálší	-
17	V109	24. 11. 2018	Kýta	Tesco, Uničov	-
18	V194	6. 2. 2019	Pečeně	Albert, Uničov	neg.
19	V233	6. 2. 2019	Krkovice	Albert, Uničov	-
Hovězí maso					
1	V1	7. 10. 2018	Přední	Jatka Janovice	-
2	V3	7. 10. 2018	Kližka	Jatka Janovice	-
3	V4	7. 10. 2018	Zadní	Jatka Janovice	-
4	V20	13. 10. 2018	Telecí kýta	Krásno Dubňany	-
5	V21	13. 10. 2018	Hrudí	Krásno Dubňany	-
6	V28	20. 10. 2018	Zadní	Řeznictví Třebovle, Kolín	-
7	V58	4. 11. 2018	Kližka	Domácí chov, Zálší	-
8	V78	18. 11. 2018	Zadní	Krásno Dubňany	-
9	V79	18. 11. 2018	Kýta	Krásno Dubňany	-
10	V81	18. 11. 2018	Telecí kýta	Krásno Dubňany	neg.
Králičí maso					
1	V38	28. 10. 2018	Plíce	Domácí chov, Zálší	-
2	V60	4. 11. 2018	Stehno	Domácí chov, Uničov	-
3	V97	18. 11. 2018	Noha	Domácí chov, Zálší	-
4	V230	6. 2. 2018	Stehno	Domácí chov, Uničov	-

neg. ... negativní výsledek PCR, - ...negativní vzorek

Příloha D Citlivost/rezistence izolovaných bakterií *Arcobacter* spp. na antibiotika ampicilin, amoxicilin/klavulanovou kyselinu, clindamycin, tetracyklin, erythromycin a ciprofloxacin

Vzorek	AMP		AMC		DA		TE		E		CIP	
	Průměr	Reakce	Průměr	Reakce	Průměr	Reakce	Průměr	Reakce	Průměr	Reakce	Průměr	Reakce
VZ30	50	S	50	S	6,3	R	33,5	S	28	S	45	S
VZ65	6,3	R	15	I	6,3	R	17,5	R	21,5	S	38	S
VZ26	36	S	41,5	S	6,3	R	23,5	R	30	S	40	S
VZ49	35	S	41	S	6,3	R	26	R	28,5	S	42	S
VZ83	30,5	S	37	S	6,3	R	26,5	R	30,5	S	38	S
VZ24	6,3	R	13,5	I	6,3	R	20,5	R	25	S	38,5	S
VZ130	36	S	43	S	6,3	R	36,5	S	31	S	45	S
VZ132	6,3	R	11	R	6,3	R	18,5	R	25	S	38	S
VZ138	26,5	S	42	S	6,3	R	32	S	28	S	37	S
VZ141	13	R	21,5	S	6,3	R	21,5	R	24	S	36	S
VZ160	6,3	R	13,5	I	6,3	R	14,5	R	21,5	S	37	S
VZ134	10,5	R	17,5	I	6,3	R	27	R	31	S	18	R
VZ161	6,3	R	14,5	I	6,3	R	16,5	R	26	S	34,5	S
VZ94	13	R	22	S	6,3	R	28	R	29	S	41,5	S
VZ69	6,3	R	10	R	6,3	R	16	R	19,5	I	34	S
VZ89	6,3	R	14,5	I	6,3	R	18,5	R	31,5	S	34	S
V107	13	R	20,5	S	6,3	R	26,6	R	33,5	S	19	R
VZ48	6,3	R	13,5	I	6,3	R	25	R	28	S	37,5	S
VZ37	6,3	R	13,5	I	6,3	R	16	R	23	S	34,5	S
VZ46	27,5	S	38	S	6,3	R	19,5	R	28	S	37	S

S... citlivý, I... intermediární, R... rezistentní, AMP... ampicilin, AMC... amoxicilin/klavulanová kyselina, DA... clindamycin, TE... tetracyklin, E... erythromycin, CIP... ciprofloxacin. Hodnoty vyjadřují průměr inhibiční zóny a jsou vyjádřeny v mm.

Příloha E Citlivost/rezistence izolovaných bakterií *Arcobacter* spp. na antibiotika gentamycin, chloramphenicol, kyselina nalidixovou, enrofloxacin, penicillin G a streptomycin

Vzorek	CN		C		NA		ENR		P		ST	
VZ30	33,5	S	19,5	S	17	I	36,5	S	32	R	31,5	S
VZ65	33,5	S	6,3	R	6,3	R	20	I	6,3	R	32	S
VZ26	34	S	19	S	6,3	R	30,5	S	17	R	31	S
VZ49	33	S	12	I	6,3	R	29,5	S	19,5	R	28,5	S
VZ83	27,5	S	23	S	12	R	29,5	S	6,3	R	24,5	S
VZ24	29,5	S	11	R	6,3	R	22,5	I	6,3	R	29	S
VZ130	32,5	S	30	S	20	S	41	S	6,3	R	28,5	S
VZ132	30	S	6,3	R	6,3	R	20	I	6,3	R	25,5	S
VZ138	32	S	20,5	S	10,5	R	28	S	20	R	23	S
VZ141	29	S	12	I	6,3	R	23	S	6,3	R	25,5	S
VZ160	29,5	S	6,3	R	6,3	R	16,5	I	6,3	R	30	S
VZ134	36,5	S	6,3	R	6,3	R	33,5	S	6,3	R	28,5	S
VZ161	32	S	6,3	R	6,3	R	17	I	6,3	R	27	S
VZ94	31,5	S	12,5	I	6,3	R	29,5	S	6,3	R	27,5	S
VZ69	27,5	S	6,3	R	6,3	R	19,5	I	6,3	R	24	S
VZ89	30	S	6,3	R	6,3	R	17,5	I	6,3	R	24,5	S
V107	35	S	6,3	R	6,3	R	29	S	6,3	R	29	S
VZ48	35	S	11	R	6,3	R	24	S	6,3	R	26	S
VZ37	27	S	6,3	R	6,3	R	18	I	6,3	R	29	S
VZ46	30	S	6,3	R	6,3	R	24	I	6,3	R	23,5	S

S... citlivý, I... intermediární, R... rezistentní, CN... gentamycin, C... chloramphenicol, NA... kyselina nalidixová, ENR... enrofloxacin, P... penicillin G, ST... streptomycin. Hodnoty vyjadřují průměr inhibiční zóny a jsou vyjádřeny v mm.

Příloha F Citlivost/rezistence izolovaných bakterií *Arcobacter* spp. na antibiotika doxycyklin, amikacin, aztreonam, cephalotin, oxacillin a tobramycin

Vzorek	DO		AK		ATM		KF		OX		TOB	
	Průměr	Stav	Průměr	Stav	Průměr	Stav	Průměr	Stav	Průměr	Stav	Průměr	Stav
VZ30	28,5	S	34,5	S	26,5	S	33	S	6,3	R	32	S
VZ65	12,5	I	37,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	34,5	S
VZ26	19	S	32	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	32,5	S
VZ49	16,5	S	35,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	31,5	S
VZ83	20	S	29,5	S	10	R	15,6	I	6,3	R	28,5	S
VZ24	14	S	31	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	29	S
VZ130	28,5	S	39,5	S	12	R	13	R	6,3	R	35,5	S
VZ132	12,5	I	32,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	30	S
VZ138	25	S	31	S	6,3	R	22	S	6,3	R	28,5	S
VZ141	18,5	S	29,5	S	6,3	R	14,5	I	6,3	R	28,5	S
VZ160	11,5	I	30	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	29,5	S
VZ134	21,5	S	34	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	32,5	S
VZ161	13	I	35	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	32	S
VZ94	22,5	S	33,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	30,5	S
VZ69	13	I	29	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	26,5	S
VZ89	15,5	S	33,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	31	S
V107	24	S	37,5	S	6,3	R	11	R	6,3	R	33	S
VZ48	18,5	S	32,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	27	S
VZ37	12,5	I	31,5	S	6,3	R	6,3	R	6,3	R	26,5	S
VZ46	18,5	S	29	S	6,3	R	12,5	R	6,3	R	28	S

S... citlivý, I... intermediární, R... rezistentní, DO... doxycyklin, AK... amikacin, ATM... aztreonam, KF... cephalotin, OX... oxacillin, TOB... tobramycin. Hodnoty vyjadřují průměr inhibiční zóny a jsou vyjádřeny v mm.