

Univerzita Pardubice
Fakulta chemicko-technologická

Profil mastných kyselin v typizaci *Arcobacter*-like species
Diplomová práce

2023

Bc. Eliška Kutáková

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

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Eliška Kutáková**
Osobní číslo: **C21454**
Studijní program: **N0914P360001 Bioanalytická laboratorní diagnostika ve zdravotnictví**
Téma práce: **Profil mastných kyselin v typizaci *Arcobacter*-like species**
Téma práce anglicky: **Fatty acid profile in *Arcobacter*-like typing**
Zadávací katedra: **Katedra biologických a biochemických věd**

Zásady pro vypracování

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 základních informací o bakteriích čeledi *Arcobacteraceae*.
2. Zpracujte literární rešerši o možnostech bakteriální typizace, zejména se zaměřením na analýzu profilu mastných kyselin a molekulárně-biologické metodiky.

Experimentální část:

1. Zaveďte a optimalizujte metodu plynové chromatografie s hmotnostní detekcí (GC/MS) jako možný nástroj identifikace kmenů "*Arcobacter*-like species" v prostředí laboratoří katedry.
2. Identifikujte předložené izoláty "*Arcobacter*-like species" molekulárně-biologickými metodikami. Výsledky srovnajte se zjištěným profilem MK. Všímejte si případných rozdílů v profilu mastných kyselin jednotlivých bakteriálních druhů, popř. kmenů.
3. Získané výsledky vhodným způsobem interpretujte.
4. Diplomovou práci zpracujte v souladu se Směrnicí č. 7/2019 Univerzity Pardubice "Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací" ve znění navazujících dodatků.

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

Seznam doporučené literatury:

Vedoucí diplomové práce: **Ing. David Šilha, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Konzultanti diplomové práce: **prof. Mgr. Roman Kandár, Ph.D.**
Katedra biologických a biochemických věd
Ing. Leona Hofmeisterová
Katedra biologických a biochemických věd
Datum zadání diplomové práce: **23. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **5. května 2023**

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

L.S.

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

V Pardubicích dne 28. února 2023

Prohlašuji: Práci s názvem „Profil mastných kyselin v typizaci *Arcobacter-like species*“ jsem vypracoval samostatně. Veškeré literární prameny a informace, které jsem v práci využil, jsou uvedeny v seznamu použité literatury.

Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon), ve znění pozdějších předpisů, zejména se skutečností, že Univerzita Pardubice má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona, a s tím, že pokud dojde k užití této práce mnou nebo bude poskytnuta licence o užití jinému subjektu, je Univerzita Pardubice oprávněna ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložila, a to podle okolností až do jejich skutečné výše.

Beru na vědomí, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a směrnicí Univerzity Pardubice č. 7/2019 Pravidla pro odevzdávání, zveřejňování a formální úpravu závěrečných prací, ve znění pozdějších dodatků, bude práce zveřejněna prostřednictvím Digitální knihovny Univerzity Pardubice.

V Pardubicích dne 4. 5. 2023

Bc. Eliška Kutáková v.r.

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat panu Ing. Davidu Šilhovi, Ph. D. za odborné vedení mé práce a poskytnutí cenných rad a informací. Dále bych chtěla poděkovat prof. Mgr. Romanu Kandárovi, Ph. D. a Ing. Leoně Hofmeisterové za vstřícnost a ochotu během spolupráce. Na závěr bych chtěla vyjádřit poděkování své rodině, která mi byla podporou po celou dobu studia.

ANOTACE

Diplomová práce pojednává o bakteriích *Arcobacter*-like species. Jsou zde zahrnuty základní informace o jejich taxonomii, výskytu, patogenitě, možnostech izolace a identifikace. Experimenty studie jsou zaměřené na problematiku identifikace bakterií *Arcobacter*-like species z různých vzorků. Cílem studie je zavedení a optimalizace metody plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) jako možného nástroje pro identifikaci kmenů *Arcobacter*-like species. Jednotlivé kmeny arkobakterů byly identifikovány také pomocí několika protokolů molekulárně-biologických metod (mPCR, 16S rRNA PCR-RFLP).

KLÍČOVÁ SLOVA

Arcobacter-like species, bakterie, identifikace, mastné kyseliny, methylester, plynová chromatografie, profil mastných kyselin, typizace

TITLE

Fatty acid profile in *Arcobacter*-like typing

ANNOTATION

The master thesis deals with *Arcobacter*-like species. Basic information in their taxonomy, occurrence, pathogenicity, isolation and identification possibilities are included. The experiments of the study are focused on the problem of identification of *Arcobacter*-like species from different samples. The aim of the study is the introduction and optimization of the gas chromatography-flame ionization detector (GC-FID) method as possible tool for the identification of *Arcobacter*-like species strains. Individual *Arcobacter* strains were also identified using several molecular biology protocols (mPCR, 16S rRNA PCR-RFLP).

KEYWORDS

Arcobacter-likes species, bacteria, identification, fatty acid, methyl ester, gas chromatography, fatty acid profil, typing

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK	10
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK.....	12
0. ÚVOD	15
1. TEORETICKÁ ČÁST.....	16
1.1. <i>Arcobacter</i> -like species	16
1.1.1. Historie a historické souvislosti	16
1.1.2. Výskyt <i>Arcobacter</i> -like species.....	17
1.1.3. Patogenita <i>Arcobacter</i> -like species	18
1.1.4. Faktory virulence.....	20
1.1.5. Rezistence k antibiotikům.....	22
1.1.5.1. Vyšetření citlivosti na antibiotika	22
1.1.6. Izolace <i>Arcobacter</i> -like species.....	24
1.1.7. Fenotypové metody identifikace	25
1.1.8. Genotypové metody identifikace.....	26
1.1.8.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace	26
1.1.8.2. Polymorfismus délky restričních fragmentů (RFLP).....	28
1.1.8.3. Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP).....	29
1.1.8.4. Multilokusová sekvenční analýza (MLST)	30
1.1.9. Další metody identifikace	31
1.1.9.1. MALDI-TOF MS.....	31
1.2. Plynová chromatografie.....	33
1.2.1. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií.....	34
1.2.2. Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem	35
1.2.3. Využití plynové chromatografie v mikrobiologii.....	35
1.2.3.1. Extrakce mastných kyselin	36

1.2.3.2.	Příprava methylesterů mastných kyselin.....	36
2.	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	38
2.1.	Použité chemikálie a standardní látky	38
2.2.	Přístrojové vybavení a pomůcky.....	38
2.3.	Kultivační média a pracovní roztoky	40
2.4.	Reagencie pro <i>m</i> PCR.....	40
2.5.	Reagencie pro 16S <i>r</i> RNA-RFLP.....	41
2.6.	Mikrobiální kmeny.....	42
2.7.	Pracovní postup.....	43
2.7.1.	Izolace <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků.....	43
2.7.2.	Identifikace arkobakterů metodou <i>m</i> PCR dle Houf <i>et al.</i> (2000).....	44
2.7.3.	Identifikace kmenů metodou <i>m</i> PCR dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	45
2.7.4.	Identifikace metodou 16S <i>r</i> RNA PCR-RFLP	46
2.7.5.	Typizace arkobakterů na základě stanovení mastných kyselin	47
2.7.5.1.	Optimalizace přípravy methylesterů mastných kyselin	47
2.7.5.2.	Příprava methylesterů mastných kyselin.....	47
2.7.5.3.	Stanovení profilu mastných kyselin plynovou chromatografií.....	48
3.	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	51
3.1.	Izolace <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků	51
3.2.	Identifikace izolovaných kmenů metodou <i>m</i> PCR dle Houf <i>et al.</i> (2000)	52
3.3.	Identifikace izolovaných kmenů metodou <i>m</i> PCR dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	55
3.4.	Identifikace kmenů metodou 16S <i>r</i> RNA PCR-RFLP	58
3.5.	Typizace arkobakterů na základě profilu mastných kyselin.....	62
3.5.1.	Optimalizace metody stanovení profilu mastných kyselin	62
3.5.2.	Určení profilu mastných kyselin <i>Arcobacter</i> -like species	65
4.	ZÁVĚR.....	76
5.	POUŽITÁ LITERATURA	78

6. PŘÍLOHY	90
------------------	----

SEZNAM ILUSTRACÍ A TABULEK

Obrázek 1 Schéma šíření arkobakterů při zpracování potravin (Ferreira <i>et al.</i> , 2019).....	18
Obrázek 2 Schéma patogenních mechanismů při infekci způsobené bakteriemi <i>Arcobacter</i> -like species (Ramees <i>et al.</i> , 2017).	20
Obrázek 3 Vyhodnocení testování citlivosti/rezistence na antibiotika diskovou difúzní metodou (Tenover, 2009).	23
Obrázek 4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) diuční mikrometodou (Tenover, 2009).....	24
Obrázek 5 E-test ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (Tenover, 2009).	24
Obrázek 6 <i>M. halophilus</i> , snímek z transmisního elektronového mikroskopu (Donachie <i>et al.</i> , 2005).....	26
Obrázek 7 Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce (Santos <i>et al.</i> , 2004).	27
Obrázek 8 Schéma navrhovaného pořadí restričních štěpení při identifikaci <i>Arcobacter</i> -like species (Figueras <i>et al.</i> , 2012).....	29
Obrázek 9 Schéma MALDI-TOF MS procesu a využití v mikrobiologii (Hou <i>et al.</i> , 2019).	31
Obrázek 10 Schéma hlavních součástí plynového chromatografu (Stauffer <i>et al.</i> , 2008).	34
Obrázek 11 Schéma plynového chromatografu s hmotnostní spektrometrií (Sparkman <i>et al.</i> , 2011).....	34
Obrázek 12 Elektroforetický záznam separace produktů <i>mPCR</i> dle Houf <i>et al.</i> (2000).	52
Obrázek 13 Elektroforetický záznam separace produktů sbírkových kmenů <i>Arcobacter</i> spp. <i>mPCR</i> dle Houf <i>et al.</i> (2000).....	54
Obrázek 14 Elektroforetický záznam separace produktů sbírkových kmenů <i>Arcobacter</i> spp. <i>mPCR</i> dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	55
Obrázek 15 Elektroforetický záznam PCR produktů o velikosti 1026 bp.	58
Obrázek 16 Elektroforetický záznam RFLP profilů po štěpení restriční endonukleázou <i>MseI</i>	59
Obrázek 17 Elektroforetický záznam RFLP profilů po štěpení restriční endonukleázou <i>MnII</i>	59
Tabulka 1 Přehled bakteriálních kmenů zařazených do studie.....	42
Tabulka 2 Seznam všech vzorků pro izolaci <i>Arcobacter</i> -like species v období listopadu 2022 – února 2023.....	43
Tabulka 3 Primery použité pro identifikaci pomocí <i>mPCR</i> dle Houf <i>et al.</i> (2000).	44
Tabulka 4 Optimální podmínky průběhu <i>mPCR</i> dle Houf <i>et al.</i> (2000).	44

Tabulka 5 Primery použité pro identifikaci pomocí <i>m</i> PCR dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	45
Tabulka 6 Optimální podmínky průběhu <i>m</i> PCR dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	45
Tabulka 7 Primery použité pro identifikaci pomocí 16S <i>r</i> RNA PCR-RFLP dle Figueras <i>et al.</i> (2008) a Figueras <i>et al.</i> (2012).....	46
Tabulka 8 Optimální podmínky průběhu 16S <i>r</i> RNA PCR-RFLP dle Figueras <i>et al.</i> (2008) a Figueras <i>et al.</i> (2012).....	46
Tabulka 9 Teplotní gradient GC-MS.	49
Tabulka 10 Teplotní gradient GC-FID.....	49
Tabulka 11 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou <i>m</i> PCR dle Houf <i>et al.</i> (2000).....	53
Tabulka 12 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou <i>m</i> PCR dle Doudah <i>et al.</i> (2010).....	56
Tabulka 13 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou 16S <i>r</i> RNA PCR-RFLP.	60
Tabulka 14 Porovnání profilu mastných kyselin u vybraných sbírkových kmenů <i>Arcobacter</i> -like species při extrakci směsí chloroformu s methanolem a hexanu s methanolem, n=3.....	63
Tabulka 15 Porovnání výsledků stanovení profilu mastných kyselin s přidáním přídavkem a bez přídavku butylovaného hydroxytoluenu do extrakčního činidla směsi, n=3.....	64
Tabulka 16 Výsledky určení profilu mastných kyselin sbírkových kmenů <i>Arcobacter</i> -like species metodou GC-FID, n=3.	67
Tabulka 17 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků (UPa 2022/1 – UPa 2022/3b) metodou GC-FID, n=3.....	68
Tabulka 18 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků (UPa 2022/3c – UPa 2022/3f, UPa 2013/13, UPa 201/13) metodou GC-FID, n=3.....	69
Tabulka 19 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků (UPa KK, UPa 2021/1 – UPa 2021/9) metodou GC-FID, n=3.....	70
Tabulka 20 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků (UPa 2021/10 – UPa 2021/15, UPa 2023/1) metodou GC-FID, n=3.....	71
Tabulka 21 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů <i>Arcobacter</i> -like species z různých vzorků (UPa 2023/2 – UPa 2023/11) metodou GC-FID, n=3.....	72

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

<i>A.</i>	<i>Arcobacter</i>
<i>Al.</i>	<i>Aliarcobacter</i>
AFLP	Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (Amplified Fragment Length Polymorphism)
ASB	<i>Arcobacter</i> selektivní bujón (<i>Arcobacter</i> Selective Broth)
ASIA	Selektivní agar pro izolaci arkobakterů (<i>Arcobacter</i> Selective Isolation Agar)
ASIB	Selektivní bujón pro izolaci arkobakterů (<i>Arcobacter</i> Selective Isolation Broth)
ASM médium	<i>Arcobacter</i> selektivní polotuhé médium (<i>Arcobacter</i> Selective Medium)
BHT	Butylovaný hydroxytoulén
<i>C.</i>	<i>Campylobacter</i>
CAT suplement	Suplement s obsahem cefoperazonu, amphotericinu a teicoplaninu
CCM	Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně
CCUG	Sbírka mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (Culture Collection University of Gothenburg)
DGGE	Denaturační gradientová gelová elektroforéza (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
<i>dsDNA</i>	Dvouvláknová DNA (double-stranded DNA)
EMJH médium	Ellinghausen-McCullough-Johnson-Harris médium
FAME	Methylester mastných kyselin (Fatty Acid Methyl Ester)
FBS	Fetální bovinní sérum
FID	Plamenově-ionizační detektor (Flame Ionization Detector)
FRET	Nezářivý přenos energie (Fluorescence Resonance Energy Transfer)
GC	Plynová chromatografie (Gas Chromatography)

GLC	Plynová rozdělovací chromatografie (Gas-Liquid Chromatography)
GSC	Plynová adsorpční chromatografie (Gas-Solid Chromatography)
<i>H.</i>	<i>Haloarcobacter</i>
ICMSF	Mezinárodní komise pro mikrobiální specifikace potravin (International Commission on Microbiological Specification for Foods)
JM bujon	Johnson-Murano bujón
LMG	Sbírka mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (Laboratory of Microbiology of Ghent University)
<i>M.</i>	<i>Malacobacter</i>
mPCR	Multiplexní polymerázová řetězová reakce (Multiplex Polymerase Chain Reaction)
MALDI-TOF	Laserová desorpce a ionizace za účasti matrice (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
MIC	Minimální inhibiční koncentrace (Minimum Inhibitory Concentration)
MLST	Multilokusová sekvenční analýza (Multilocus Sequence Typing)
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus Aureus</i>)
MS	Hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry)
<i>P.</i>	<i>Pseudoarcobacter</i>
PBS	Fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCR	Polymerázová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction)
PUFA	Polynenasycené mastné kyseliny (PolyUnsaturated Fatty Acid)
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce (Quantitative Polymerase Chain Reaction)
RFLP	Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (Restriction Fragment Length Polymorphism)

SDS-PAGE	Elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsírany sodného (Sodium Dodecyl Sulphate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
SFE	Superkritická fluidní extrakce
ssDNA	Jednovláknová DNA (single-stranded DNA)
ssp.	Subspecies
UPa	Univerzita Pardubice
VBNC	Živé, ale nekultivovatelné buňky (Viable But Non-Culturable cells)

0. ÚVOD

Arcobacter-like species jsou Gramnegativní spirálovité tyčinky schopné růstu v teplotním rozmezí 15–37 °C. Dosud popsanych 27 druhů je taxonomicky zařazeno do 7 rodů třídy *Campylobacterota* (Pérez-Cataluña *et al.*, 2018). Izolace druhů *Arcobacter*-like species ze vzorků humánního, animálního i environmentálního původu potvrzuje rozsáhlý výskyt těchto bakterií v různém prostředí. Některé druhy arkobakterů jsou charakterizovány jako nově se objevující patogeny. Mezinárodní komise pro mikrobiální specifikace potravin (ICMSF) zařadila v roce 2002 druh *Al. butzleri* na seznam mikroorganismů představující vážné riziko pro lidské zdraví (Ramees *et al.*, 2017). Enteritida, bakteriémie a dlouhodobější vodnaté průjmy patří mezi hlavní projevy infekce způsobené patogenními druhy *Arcobacter*-like species u člověka. Je tedy kladen důraz na izolaci a identifikaci *Arcobacter*-like species z různých vzorků. Dosud bylo popsáno několik protokolů pro izolaci a identifikaci arkobakterů. Některé metody ale nejsou zcela přesné pro identifikaci všech popsanych druhů *Arcobacter*-like species (Collado a Figueras, 2011).

Stanovení profilu mastných kyselin je jeden ze způsobů pro identifikaci a typizaci bakterií. Analýza bakteriálních mastných kyselin pomocí plynové chromatografie s hmotnostním nebo plamenově-ionizačním detektorem je metoda velmi citlivá a rychlá. Bylo popsáno mnoho studií zabývajících se identifikací mikroorganismů na základě určení profilu mastných kyselin plynovou chromatografií (Jelínek *et al.*, 2006).

Cílem této diplomové práce bylo zavedení a optimalizování protokolu plynové chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem (GC-FID) jako možného nástroje identifikace kmenů *Arcobacter*-like species. Všechny kmeny byly zároveň identifikovány několika protokoly molekulárně-biologických metod (*m*PCR, 16S *r*RNA PCR-RFLP).

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. *Arcobacter*-like species

1.1.1. Historie a historické souvislosti

Arcobacter-like species byly poprvé izolovány v roce 1970 z abortů hospodářských zvířat, mléka krav trpících mastitidou i ze zvířecích výkalů. Tyto kmeny byly popsány jako nový taxon rodu *Campylobacter* (Vandamme *et al.*, 1992). V roce 1988 došlo k rozdělení dosud známých druhů rodu *Campylobacter* do tří homologických skupin porovnáním sekvencí 16S *rRNA*. Aerobní druh *C. cryaerophila* způsoboval aborty převážně u prasat a příležitostně byl izolovaný z klinických vzorků. *C. nitrofigilis* byl izolován z kořenů bažinných trav *Spartina alterniflora* a jedná se mikroaerofilně aerobní druh (Snelling *et al.*, 2006; Thompson *et al.*, 1988).

Samostatný rod *Arcobacter* byl popsán v roce 1991 ve studii zabývající se revizí taxonomie rodů *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Wolinella* profesorem P. Vandammem s jeho vědeckým týmem. Pro odlišení samostatného rodu *Arcobacter* byla provedena identifikace více než 70 kmenů *Campylobacter* spp. s využitím radioaktivně značené 23S *rRNA* při DNA-*rRNA* hybridizaci a imunofenotypizace. Výsledky hybridizace vedly k zařazení rodu *Arcobacter* do samostatné fylogenetické větve, která byla rozdělena do tří hlavních homologních klastrů. V klastru I byly zařazeny termofilní enteropatogenní druhy (*C. coli*), komenzální druhy člověka a zvířata (*C. fetus* a *C. consicus*) a kmeny dříve zahrnuté do *Wolinella*. Původně označované bakterie jako „aerotolerantní kampylobaktery“ (*A. nitrofigilis* a *A. cryaerophilus*), byly zařazeny do klastru II rodu *Arcobacter*. Do klastru III byly zařazeny druhy čtyř rodů, a to *Helicobacter*, *Wolinella*, *Flexispira* a zbylé druhy *Campylobacter* (Vandamme *et al.*, 1991; Vandamme a de Ley, 1991). Z předešlých výsledků DNA-*rRNA* hybridizace vyplývala úzká genetická příbuznost mezi rody *Campylobacter* a *Arcobacter*. Z tohoto důvodu byla navržena nová čeleď *Campylobacteraceae* zahrnující rody *Campylobacter* a *Arcobacter* (Houf *et al.*, 2001; Vandamme a de Ley, 1991).

V dalších letech byly studovány taxonomické vztahy nově objevených a referenčních kmenů metodami SDS-PAGE, hybridizačními metodami, analýzou FAME plynovou chromatografií a fenotypovými testy. Ze získaných výsledků byl identifikován nový druh *A. skirrowii* a druh *C. butzleri* byl přesunut do rodu *Arcobacter* jako druh *A. butzleri*. Klinický význam a patogenita však tehdy zůstaly u obou nových druhů neprokázány (Collado a Figueras, 2011; Vandamme *et al.*, 1992).

S rozvojem sekvenačních technologií a vysokého počtu již osekvenovaných bakteriálních genomů došlo v roce 2017 k dalším změnám v taxonomii. Srovnávací genomickou analýzou třídy *Epsilonproteobacteria* byla navržena reklasifikace na třídu *Campylobacterota*. Byla navržena nová čeleď *Arcobacteraceae*, do které byl rod *Arcobacter* zařazen (Chieffi *et al.*, 2020; Waite *et al.*, 2017, Waite *et al.*, 2018). V roce 2018 bylo ve studii Péreze-Cataluña *et al.* (2018) cílem přezkoumat taxonomii rodu *Arcobacter*. Různými metodami bylo identifikováno celkem 39 kmenů reprezentujících všech 27 dosud známých druhů arkobakterů a dalších 13 kmenů, které představovaly potencionálně nové druhy. Na základě získaných výsledků byl rod *Arcobacter* rozdělen do sedmi rodů, které byly pojmenovány jako *Arcobacter*, *Aliarcobacter*, *Pseudoarcobacter*, *Haloarcobacter*, *Malacobacter*, *Poseidonibacter* a *Arcomarinus* (Chieffi *et al.*, 2020, Péreze-Cataluña *et al.*, 2018). Toto rozdělení rodu *Arcobacter* bylo následně zpochybněno ve studii On *et al.* (2020), ovšem tyto výsledky je nutno dále ověřit v dalších studiích.

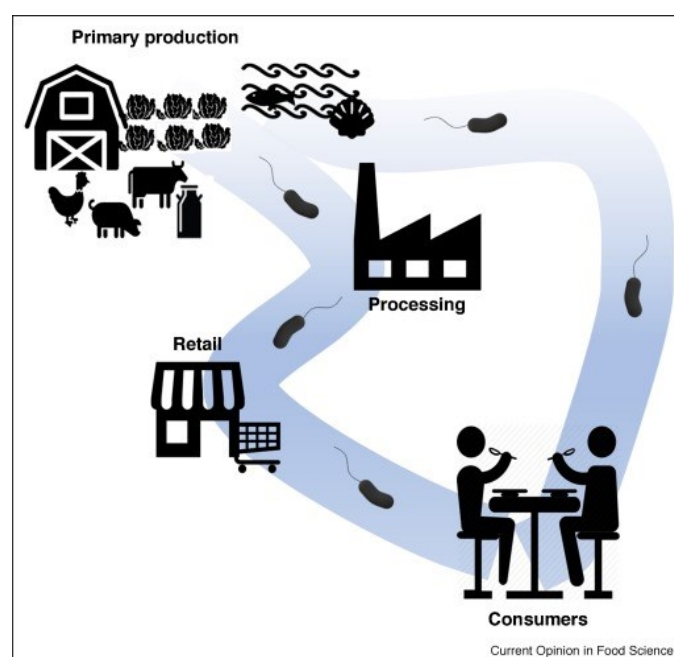
1.1.2. Výskyt *Arcobacter*-like species

Hospodářská zvířata a drůbež se řadí mezi jeden z možných rezervoárů *Arcobacter*-like species. Arkobaktery mohou být přítomny v zažívacím traktu, a to bez patologického působení na svého hostitele. U jednoho hostitele může dojít ke kolonizaci více než jedním druhem nebo geneticky odlišným kmenem arkobakterů. V průběhu let byl zaznamenán nárůst případů izolace této bakterie ze syrových masných výrobků, a to převážně z kuřecího masa. Kontaminaci farem arkobaktery lze přisoudit výskytu patogenních druhů arkobakterů ve vzorcích původem z hospodářských zvířat či drůbeže (Ho *et al.*, 2006; Lehner *et al.*, 2005; van Driessche *et al.*, 2005).

Různé typy vodních zdrojů jsou dalším rezervoárem *Arcobacter*-like species. Jedná se o vody podzemní, povrchové, mořské, ale i surové odpadní vody. Přírozenost výskytu ve vodním prostředí a také u některých druhů vodních měkkýšů byla potvrzena např. u druhů *M. marinus*, *M. halophilus* a *M. mytili*. Ovšem při izolaci druhů *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii* a *P. defluvii* ze vzorků odpadních vod byly vyhodnoceny závěry, že se jedná o fekální kontaminaci. Schopnost adheze a tvorba biofilmu těchto bakterií je problémem a potencionálním zdrojem arkobakterů v zařízeních pro pitnou vodu (Assanta *et al.*, 2002; Fera *et al.*, 2004; Mottola *et al.*, 2016).

Závažným problémem výskytu arkobakterů je rozšíření patogenních druhů v celém potravinovém řetězci. Rozsáhlá analýza potravin během fáze zpracování prokázala výskyt

patogenních druhů. Ke křížové kontaminaci může docházet infikovanými hospodářskými zvířaty nebo stykem s kontaminovanou vodou. Nejčastějším přenosem arkobakterů během zpracování masa na jatkách a nedodržení dostatečných hygienických podmínek. Arkobaktery byly dále izolovány ze vzorků mléka, mléčných výrobků nebo ze syrové zeleniny. Arkobaktery mají také vysokou míru perzistence ve zpracovatelském prostředí a při skladování potravin (Ferreira *et al.*, 2019; Pejchalová *et al.*, 2008). Kontaminací mořského prostředí přibývá případů izolace známých patogenních druhů arkobakterů ze vzorků mořských plodů. Jedná se tak o značné riziko infekce pro člověka vzhledem k časté konzumaci těchto výrobků v jejich syrovém stavu (Laishram *et al.*, 2016).



Obrázek 1 Schéma šíření arkobakterů při zpracování potravin (Ferreira *et al.*, 2019).

1.1.3. Patogenita *Arcobacter*-like species

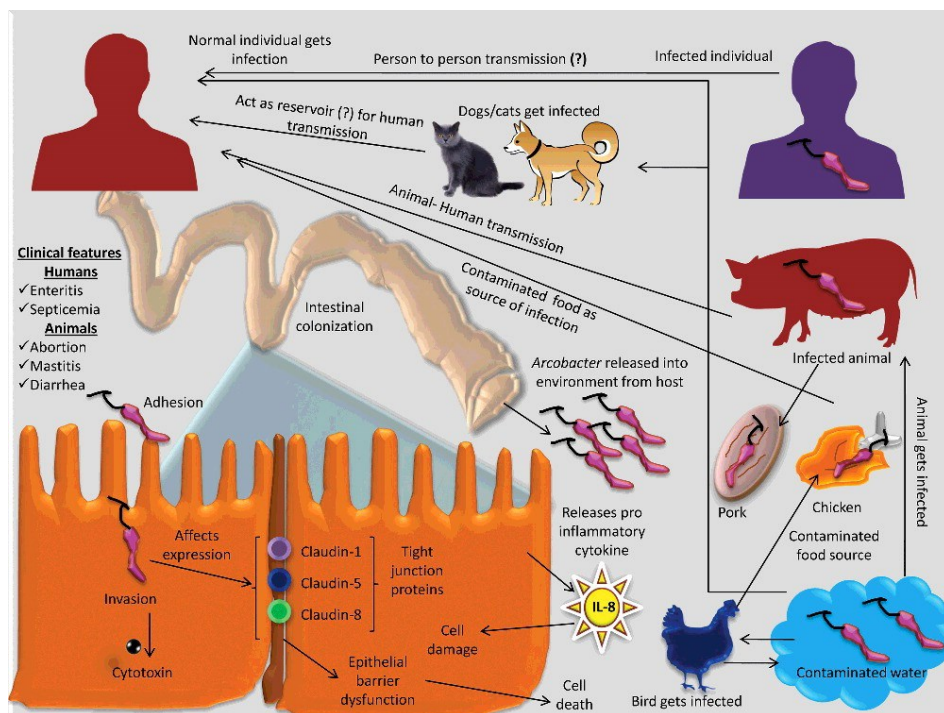
Infekce vyvolané bakteriemi *Arcobacter*-like species mohou u zvířat probíhat jak asymptomaticky, tak s určitými klinickými projevy. U skotu trpícího mastitidou a enteritidou byly nejčastěji izolovány druhy *Al. butzleri* a *Al. skirrowii*. Poruchy reprodukce, opakující se potraty plodu a problémy v chovu stáda byly nejčastěji spojeny s izolací druhu *Al. cryaerophilus*. Kromě domestikovaných zvířat byly na přítomnost arkobakterů analyzovány také vzorky od divokých zvířat a exotických zvířat chovaných v zoologických zahradách. Mechanismy patogenity arkobakterů u zvířat je nutné ještě přesněji objasnit na různých zvířecích modelech a v klinických experimentech zahrnujících studie *in vitro* a *in vivo* (Higgins *et al.*, 1999; Houf *et al.*, 2009; Shah *et al.*, 2011).

Druhy *Al. butzleri* a *Al. cryaerophilus* převládají při izolaci arkobakterů ze vzorků lidské stolice a krve. Enteritida, bakteriémie a dlouhodobější vodnaté průjmy jsou hlavními projevy infekce způsobené arkobaktery u člověka. Na základě závažnosti a délce příznaků onemocnění je nasazována antibiotická léčba (Ferreira *et al.*, 2016). Byly popsány případy pozitivní izolace arkobakterů od pacientů hospitalizovaných v nemocnici. První případ peritonitidy způsobené arkobaktery byl popsán v roce 2013. Pacientka s katétrem pro peritoneální dialýzu byla pravděpodobně nakažena alimentární cestou, avšak bez gastrointestinálních projevů. Dalším případem byla 86letá pacientka hospitalizovaná pro výměnu kyčelního kloubu. U pacientky byl proveden screening na kolonizaci multirezistentními mikroorganismy. Po aerobní inkubaci při teplotě 37 °C a 24 hodinách byly pozorovány průsvitné, kulaté kolonie, které byly identifikovány metodou MALDI-TOF MS jako druh *Al. butzleri*. U pacientky však nebyly zaznamenány žádné klinické příznaky spojené s infekcí arkobaktery, a tak nebyla nasazena ani antibiotická léčba. Přítomnost *Al. butzleri* byla následně vyhodnocena jako humánní kolonizace (Jiménez-Guerra *et al.*, 2020). První popsáný případ bakteriémie u člověka způsobené druhem *M. mytili* je z roku 2019. Na urgentní příjem byl přijat 65letý muž s celkovou slabostí a zimnicí. Uvedl, že měl na dlaních oteklé bolestivé rány během manipulace se živými kraby. Ve výsledcích laboratorního vyšetření byla zaznamenána leukocytóza s převahou neutrofilů a na základě těchto výsledků byla odebrána sada hemokultur. Po provedení kultivace s následnou izolací arkobakterů byl sekvenováním prvních 500 bp 16S *r*RNA identifikován druh *M. mytili*. U tohoto pacienta tak došlo k expozici bakterií přímo do krevního oběhu, a to během manipulace s kraby (Vasiljevic *et al.*, 2019).

K odhalení mechanismů vyvolávajících infekce způsobené arkobaktery byly použity modely *in vitro* a *in vivo*. Testy na lidských a zvířecích buněčných kulturách *in vitro* prokázaly, že několik druhů arkobakterů má schopnost adherovat k hostitelským buňkám, následně je napadat a produkovat toxiny (Ferreira *et al.*, 2016). První studie zabývající se objasněním mechanismu průjmového onemocnění vyvolaného *Al. butzleri* byla provedena na lidských buňkách HT-29/B6 epiteliální monovrstvy tlustého střeva. Výsledky prokázaly, že arkobaktery vyvolávají poškození epiteliální bariérové funkce tlustého střeva. Způsobují změny v proteinech těsných spojů a indukují epiteliální apoptózu (Bücker *et al.*, 2009; Karadas *et al.*, 2016). Vzhledem ke klíčové roli buněk vrozeného imunitního systému během bakteriální infekce byl dále studován dopad *Al. butzleri* na lidské makrofágy. Výsledky prokázaly vyvolání prozánětlivé odpovědi v makrofázích odvozených od THP-1 a schopnost intracelulárního přežití po dobu až 22 hodin. U studovaných kmenů byla zjištěna schopnost invaze,

intracelulárního přežití a pohyblivosti. Z těchto výsledků a z výsledků studie schopnosti adheze a invaze *Al. butzleri* k buněčné linii Caco-2 se zdůrazňuje role tohoto druhu arkobakterů jako lidského patogenu. Za klinické rozdíly u infikovaných lidí a zvířat jsou pravděpodobně zodpovědné rozdíly ve fenotypu virulence jednotlivých kmenů (Bruegge *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2014).

Produkce toxinů je dalším mechanismem virulence k vyvolání onemocnění. Toxiny mohou přímo zvyšovat epiteliální sekreci, poškozovat epiteliální buňky nebo funkci střevní bariéry a aktivovat mediátory zánětu. Nejnovější výsledky studií cytotoxických účinků patogenních druhů arkobakterů naznačují střední až vysokou úroveň cytotoxicity u *Al. butzleri*. Kromě sekrece enterotoxinu se předpokládá produkce vakuolizujícího faktoru podobného toxinu. U druhu *Al. lanthieri* byl také hodnocen vysoký stupeň cytotoxicity. U *Al. cryaerophilus* byl tento mechanismus prokázán poměrně vzácně (Brückner *et al.*, 2020).



Obrázek 2 Schéma patogenních mechanismů při infekci způsobené bakteriemi *Arcobacter*-like species (Ramees *et al.*, 2017).

1.1.4. Faktory virulence

Druhy *Al. butzleri* a *Al. cryaerophilus* jsou považovány za zoonotické patogeny s vysokým rizikem nákazy pro člověka. Údaje o konkrétních faktorech virulence jsou však stále omezené (Collado a Figueras, 2011). Byla zkoumána přítomnost genů, které jsou homologické s geny faktorů virulence u *C. jejuni* a dalších patogenů. Gen *mviN* je nezbytný pro protein biosyntézy peptidoglykanů, ale virulentní schopnost nebyla prokázána. Geny *cadF* a *cj1349*

kódují proteiny vnější membrány podporující adhezi bakterií na střevní epiteliální buňky. K invazi a kolonizaci hostitelské buňky pomocí sekrečního systému přispívá invazivní antigen B (*ciaB*). Filamentární hemaglutinin je virulenní faktor kódovaný genem *hecA* a zajišťuje adhezi a agregaci bakteriálních buněk k hostitelským buňkám. Do lýzy erytrocytů jsou zapojovány geny *pldA* (kódující fosfolipázu vnější membrány), *hecB* (kódující hemolysinový aktivační protein) a *tlyA* (kódující hemolysin). Pro vznik a zajištění průběhu bakteriální infekce jsou potřebné geny systému získávání železa *irgA* a *iroE*. Gen *irgA* kóduje regulaci železa membránových proteinů a gen *iroE* zajišťuje získávání železa (Chieffi *et al.*, 2020; Uljanovas *et al.*, 2021). Při testování izolátu *Al. butzleri* ze vzorků lidské stolice, z potravinářských výrobků a filtrů mléčných výroben bylo během studií nejčastěji identifikováno šest genů faktorů virulence (*ciaB*, *mviN*, *pldA*, *tlyA*, *cj1349* a *cadF*). Obecně nejnižší míru výskytu vykazoval gen *irgA* (Uljanovas *et al.*, 2021).

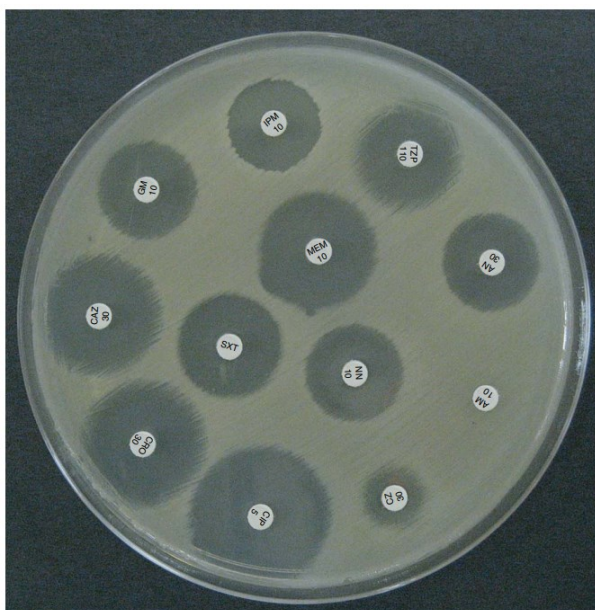
Dalším prokázaným faktorem virulence je pohyblivost bakterií pomocí polárního bičíku. Analýzou genů kódujících bičíkové proteiny bylo objeveno 20 a 8 genů seskupených do dvou genomových lokusů. Mimo tyto oblasti bylo nalezeno dalších šest genů podílejících se na kódování hlavní a vedlejší podjednotky flagelinu (Isidro *et al.*, 2020). Vedle schopnosti pohybu mají arkobaktery prokázanou schopnost adheze k různým povrchům a za příznivých podmínek jsou schopny tvořit biofilm. Schopnost tvorby biofilmu byla u arkobakterů zkoumána detekcí genů asociovaných s tvorbou biofilmů a také fenotypovými *in vitro* testy (Martinez-Malaxetxebarria *et al.*, 2022). Výsledky jednotlivých studií zabývajících se tvorbou biofilmu naznačují, že schopnost přilnout k povrchu se může u jednotlivých druhů arkobakterů odlišovat. Zároveň dochází též k ovlivnění vnějšími faktory jako je teplota, přísun živin, povrch pro přilnutí a atmosféra. U studovaného kmene *P. defluvii* byla také pozorována vysoká schopnost tvorby biofilmu. Schopnost tvorby biofilmu se zvyšovala exponenciálně s teplotou. U kmene *Al. butzleri* byla naopak nejvyšší aktivita tvorby při nižší teplotě (Šilha *et al.*, 2019). Ve studii zabývající se vlivem materiálu na adhezivní schopnost byla sledována schopnost izolátu přilnout k borosilikátovým povrchům, nerezové oceli a polystyrenu. Všechny studované izoláty byly porovnáním výsledků schopny přilnout k nerezové oceli a většina i k borosilikátovým povrchům. Schopnost tvorby biofilmu adherentních izolátů na polystyrénové povrchy byla klasifikována spíše jako slabá (Martinez-Malaxetxebarria *et al.*, 2022).

1.1.5. Rezistence k antibiotikům

U kmenů *Arcobacter*-like species environmentálního, animálního a humánního původu byla dokumentována různě vysoká míra rezistence k antibiotikům. Rezistence je nejčastěji přisuzována nadměrné expozici běžně používaných antibiotických látek v živočišné výrobě a humánní medicíně. Některé studie uvádějí vysokou míru antimikrobiální rezistence arkobakterů, což vede ke komplikacím nebo až k selhání léčby infekcí. Pro testování antimikrobiální citlivosti arkobakterů nebyly dosud vytvořeny referenční protokoly a standardní interpretační kritéria. Několik autorů však v posledních letech stanovilo citlivost arkobakterů izolovaných vůči několika antibiotikům pomocí difúzní diskové metody s odkazem na standardy pro *Enterobacteriaceae* a *Campylobacter* spp. Do skupiny antibiotik pro léčbu infekce způsobené arkobaktery jsou zařazeny zejména fluorochinolony, kanamycin a streptomycin. Nejrozšířenější druh *Al. butzleri* vykazoval při testování vysokou míru citlivosti na tato antibiotika. Naopak byla zaznamenána vysoká míra rezistence vůči tetracyklinu, ciprofloxacinu, erytromycinu či ampicilinu. Rezistence vůči některým antibiotickým látkám je přisuzována nepropustnost zevní membrány u Gramnegativních bakterií. U *Al. butzleri* byla také popsána přítomnost genetických determinant rezistence (Ferreira *et al.*, 2019; Cheffi *et al.*, 2020).

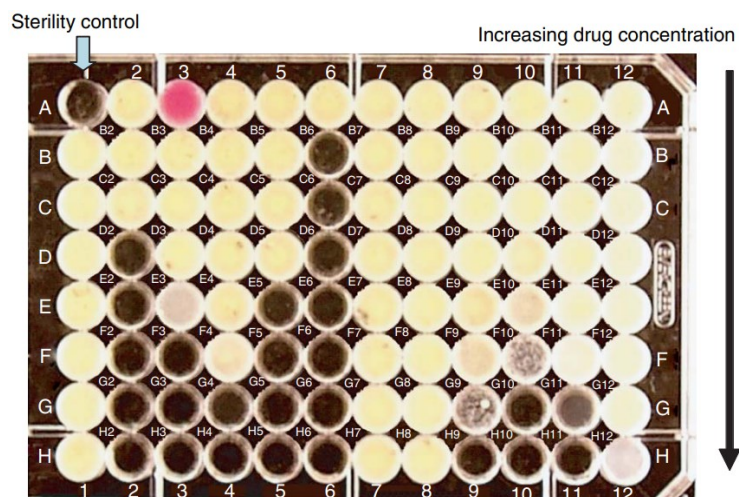
1.1.5.1. Vyšetření citlivosti na antibiotika

Mezi kvalitativní metody stanovení citlivosti na antibiotika patří disková difúzní metoda. Papírové disky nasycené známými koncentracemi antimikrobiálních látek jsou umístěny na Mueller-Hinton agar hustě naočkovaný studovaným mikroorganismem. Po dobu inkubace difunduje antimikrobiální látka z disku horizontálně do okolního agarového média. Je-li vyšetřovaný bakteriální kmen citlivý na danou antimikrobiální látku, vytvoří se kolem disku inhibiční zóna (viz **obrázek 3**). Odečet je prováděn nejčastěji po kultivaci změřením průměru inhibiční zóny kolem disků. Pro změření inhibičních zón se na některých laboratorních pracovištích používají plně automatizované analyzátory s použitím kamer pro urychlení odečítání. Zároveň mohou tyto přístroje transformovat průměr zóny na přibližné hodnoty MIC a kvantifikovat výsledky (Tenover, 2009).



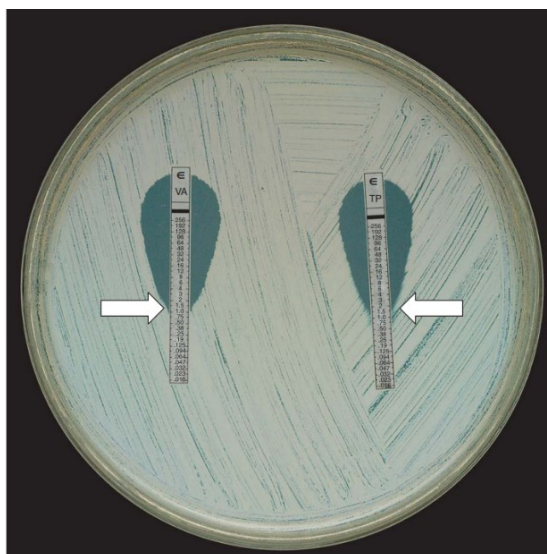
Obrázek 3 Vyhodnocení testování citlivosti/rezistence na antibiotika diskovou difúzní metodou (Tenover, 2009).

Kvantitativním stanovením lze určit minimální inhibiční koncentraci (MIC) zkoumané antimikrobiální látky, která inhibuje viditelný růst testované bakterie. Jako referenční metoda je považována agarová diluční metoda. Na povrch Mueller-Hilton agaru obohaceného o testovanou antimikrobiální látku jsou aplikovány mikrobiální inokula. MIC je hodnocena jako nejnižší koncentrace testované látky, která způsobuje inhibici růstu zkoumaného mikroorganismu po kultivaci za vhodných podmínek. Diluční mikrometoda zahrnuje přípravu dvojnásobného ředění antimikrobiální látky v tekutém růstovém médiu dávkaném do 96 jamkové mikrotitrační destičky. Poté je každá jamka zaočkována mikrobiálním inokulem. Po kultivaci je stanovena hodnota MIC, která odpovídá jamce s nejnižší koncentrací antimikrobiální látky bez patrného růstu testovaného mikroorganismu. Tento fakt naznačují tmavě zbarvené jamky mikrotitrační destičky **obrázku 4** (Balouiri *et al*, 2016; Tenover, 2009).



Obrázek 4 Stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC) diuční mikrometodou (Tenover, 2009).

E-test je kvantitativní metoda kombinující princip diluční agarové metody s principem difúzních metod. Stanovuje se MIC po vytvoření koncentračního gradientu testované antimikrobiální látky. Mueller-Hilton agar je předem naočkovaný testovaným mikroorganismem. Na povrch agaru je následně nanesen testovací strip napuštěný s gradientem vyšetřované antimikrobiální látky. Hodnota MIC je odečtena z průsečíku stripu a elipsy inhibiční zóny, což je možné vidět na **obrázku 5** (Balouiri *et al*, 2016; Tenover, 2009).



Obrázek 5 E-test ke stanovení minimální inhibiční koncentrace (Tenover, 2009).

1.1.6. Izolace *Arcobacter*-like species

K izolaci bakterií *Arcobacter*-like species nebyl dosud navržen standardní protokol. Pro lepší izolaci je nutné zařadit krok předchozího pomnožení. To vede k časové náročnosti vyžadující nejméně 72 až 96 hodin. Při izolaci na syntetických médiích se mohou některé bakterie dostat

do stavu životaschopnosti, ale nekultivovatelnosti (tzv. VBNC formy) v důsledku nedostatečného živin a růstových faktorů (Rahman *et al.*, 2020).

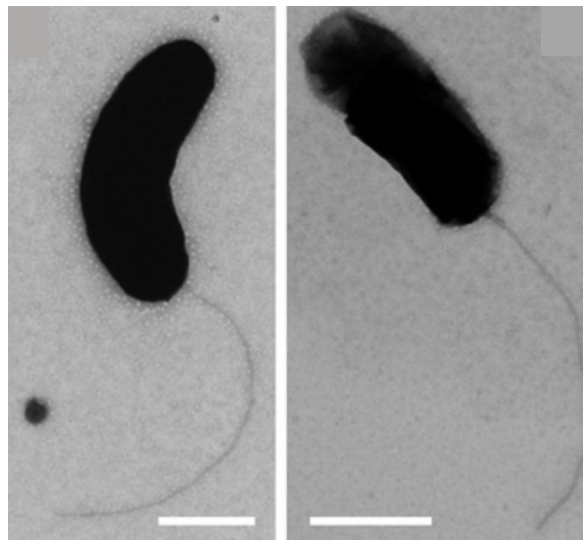
Jeden z nejčastěji používaných protokolů pro izolaci arkobakterů byl založen na použití obohaceného bujónu CAT s následnou pasivní filtrací přes membránový filtr. Později byl navržen nový obohacující JM bujón a izolační médium s obsahem cefoperazonu a 5-fluorouracilu k selekci arkobakterů a inhibici jiných bakterií. Médium složené z bazální směsi živin v kombinaci s 0,05% kyselinou thioglykolovou, 0,05 % pyruvátu sodného a 5% ovčí krve bylo nejúčinnější pro růst *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus* a *A. nitrofigilis*, a to při aerobní inkubaci při teplotě 30 °C (Johnson a Murano, 1999; Merga *et al.*, 2011). Houf *et al.* (2001) navrhli metodu přímé izolace s kroky pomnožení s maximálním potlačením doprovodné flóry. Popsali protokol k usnadnění izolace s nově vyvinutým selektivním doplňkem, který zahrnoval pět antibiotik (amfotericin, cefoperazon, 5-fluorouracil, novobiocin a trimethoprim). Tento protokol byl následně ověřen ve studii van Driessche *et al.* (2003), ve které byl modifikován přidáním cykloheximidu a zvýšením koncentrace novobiocinu. Dále byla navržena další média, a to *Arcobacter* selektivní izolační bujón (ASIB) a *Arcobacter* selektivní izolační agar (ASIA) pro izolaci arkobakterů (Houf *et al.*, 2001; van Driessche *et al.*, 2003).

Izolace arkobakterů z masných výrobků zahrnuje krok pomnožení v *Arcobacter* selektivním bujónu (ASB) a následnou izolaci na polotuhém selektivním médiu *Arcobacter* (ASM) při 24 °C za aerobních podmínek (De Boer *et al.*, 1996). Pro izolaci arkobakterů z environmentálních vodních zdrojů jsou vhodné *Arcobacter* bujóny se selektivním doplňkem cefoperazon, amfotericin a teikoplanin (CAT). Pro izolaci a regeneraci ze vzorků mořské vody nebo měkkýšů se využívá *Arcobacter* bujón doplněný o 2,5 % NaCl s následnou subkultivací na mořském agaru (Çelik a Ünver, 2015; Salas-Massó *et al.*, 2016). U pacientů trpících enteritidou byla provedena izolace ze vzorků stolice v trypton sójovém bujónu doplněném 5 % koňské krve a CAT suplementem (při 35 °C inkubaci v mikroaerobní atmosféře po dobu 24 hodin). Následně byl proveden krok pasivní filtrace přes polykarbonátový filtr umístěný na krevní agar při teplotě 35 °C po dobu 1 hodiny v atmosféře 5% CO₂. Po odstranění filtru byly vzorky inkubovány do vytvoření suspektních kolonií (Kerkhof *et al.*, 2021).

1.1.7. Fenotypové metody identifikace

Arcobacter-like species vykazují morfologické charakteristiky podobné druhům rodu *Campylobacter*. Arkobaktery lze odlišit od kampylobakterů jejich schopností růstu za aerobních a anaerobních podmínek při teplotním rozmezí od 15 do 37 °C. Zatímco pro kultivaci

Campylobacter spp. je ideální teplota přibližně od 42 do 43 °C při mikroaerobních podmínkách s obsahem 10 % CO₂ (Snelling *et al.*, 2006). Identifikace arkobakterů pomocí klasických fenotypových testů je poměrně obtížná a časově náročná. Vzhledem k tomu, že jsou arkobaktery biochemicky inertní, nemusí být výsledky použitých testů vždy prokazatelné. Enzymatická aktivita a kultivační nároky jsou základními biochemickými testy pro rozlišení arkobakterů. Tyto testy se používají ve spojení s molekulárně-biologickými metodami pro přesnou identifikaci a komplexní charakterizaci těchto bakterií (Collado *et al.*, 2009; Levican *et al.*, 2013; Öngör *et al.*, 2004).



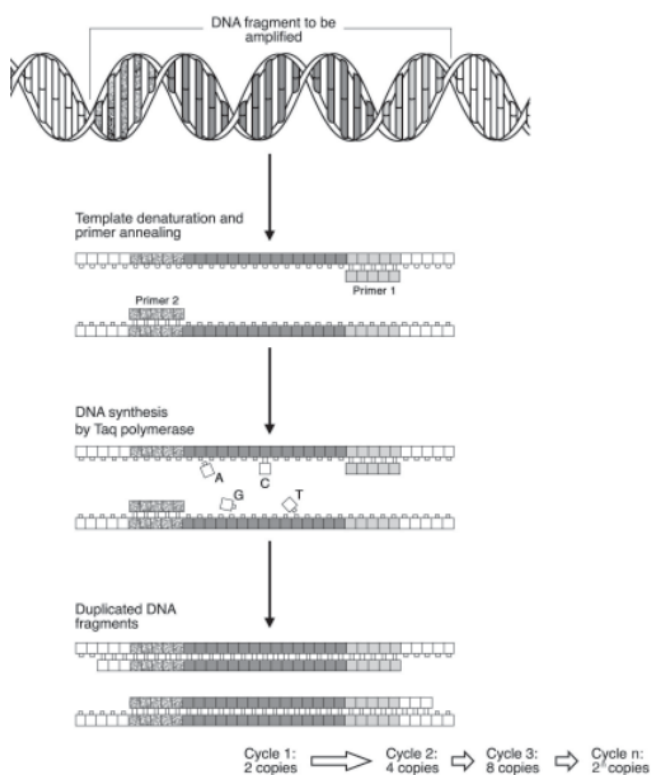
Obrázek 6 *M. halophilus*, snímek z transmisního elektronového mikroskopu (Donachie *et al.*, 2005).

1.1.8. Genotypové metody identifikace

1.1.8.1. Polymerázová řetězová reakce (PCR) a její modifikace

S vývojem molekulárně-biologických metod došlo k revoluci v identifikaci a charakterizaci mikroorganismů. Polymerázová řetězová reakce (PCR) je široce používaná technika, která umožňuje amplifikaci a identifikaci specifických sekvencí DNA ze vzorku. Základním principem PCR je působení vysokých teplot, které má vliv na rozdělení sledované DNA na jednotlivá vlákna. Následně jsou použity syntetické verze cílové sekvence jako „primery“ k amplifikaci cílové DNA. Během prvního kroku denaturace se vzorek zahřívá, aby se dvouřetězcová DNA rozdělila na jednotlivá vlákna. Primery se vážou v druhém kroku hybridizace na jednořetězcovou DNA, kde slouží jako výchozí bod pro krok prodlužování. Během posledního kroku prodlužování zvaném „annealing“ je teplota snížena. To umožňuje enzymu *Taq* polymeráza napojovat nukleotidy na konce primerů a syntetizovat nové komplementární vlákno DNA k původní cílové sekvenci. Tento proces lze opakovat několikrát, přičemž v každém cyklu se exponenciálně zvyšuje množství cílové DNA (Rajalakshmi, 2017;

Valones *et al.*, 2009). Jako vhodná alternativa k identifikaci arkobakterů bylo navrženo několik specifických protokolů PCR metody a její modifikace (Collado a Figueras, 2011; Rajalakshmi, 2017; Valones *et al.*, 2009).



Obrázek 7 Schéma průběhu polymerázové řetězové reakce (Santos *et al.*, 2004).

Jedna z často používaných modifikací PCR je multiplexní PCR (*mPCR*), která umožňuje amplifikaci více fragmentů DNA v jedné reakci. V mikrobiologii se používá k druhové identifikaci několika zástupců rodu během jedné analýzy. Princip je podobný standardní PCR. Během amplifikace je použito v jedné reakci více párů primerů, z nichž každý je specifický pro jinou cílovou část DNA. Pro úspěšnost konkrétní *mPCR* je třeba upravit koncentrace primerů, reakčních činidel, a teploty s časy průběhu jednotlivých cyklů (Markoulatos *et al.*, 2002). Pro rychlou identifikaci tří druhů arkobakterů byl popsán protokol *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) s pěti primery zaměřenými na geny 16S a 23S *rRNA*. Použité primery amplifikují fragment 257 bp u *Al. cryaerophilus*, 401 bp u *Al. butzleri* a 641 bp u *Al. skirrowii*. Pro identifikaci pěti druhů arkobakterů v rámci jedné analýzy byl popsán protokol *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010) se sedmi páry primerů. Primery zaměřeny na gen 23S *rRNA* amplifikují fragment 2061 bp u *Al. butzleri*, 1590 bp u *Al. thereuis*, 1125 bp u *Al. cibarius*, 198 bp u *Al. skirrowii* a fragment 395 bp u *Al. cryaerophilus*. Výhodou těchto metod je jejich

jednoduchost, rychlost a navíc se jedná o specifické metody pro rozlišení často se vyskytujících druhů arkobakterů (Čelik a Otlů, 2020).

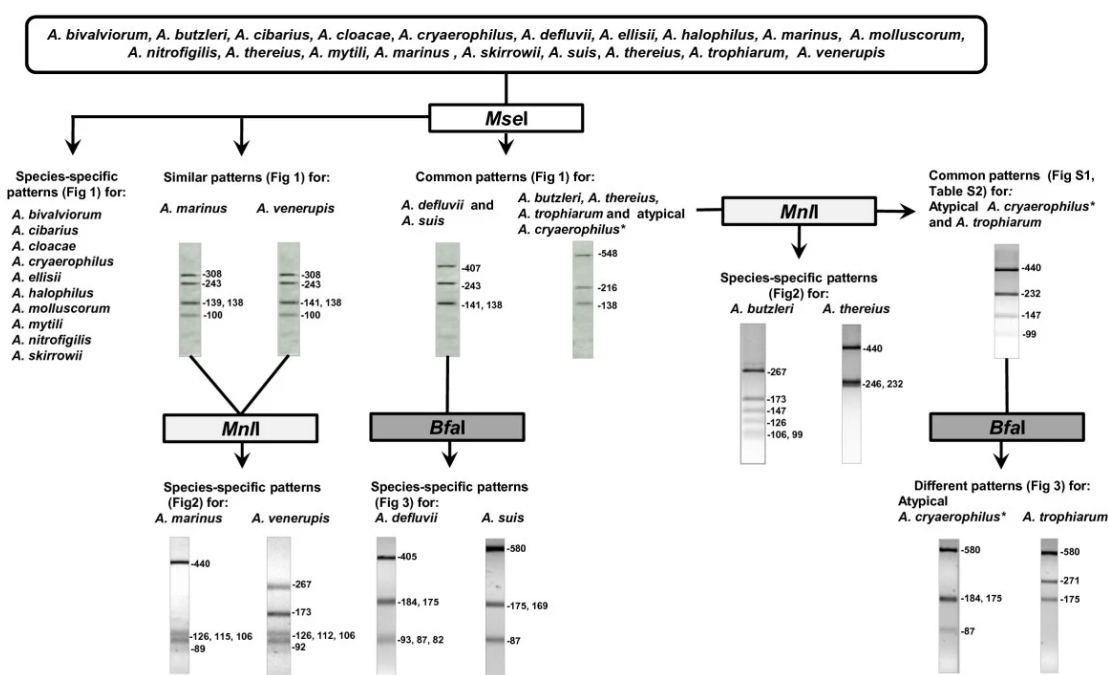
Kvantifikaci DNA ze vzorku v umožňuje laboratorní metoda kvantitativní PCR (*qPCR*), neboli také PCR v reálném čase. Charakteristickým rysem *qPCR* je měření koncentrace sledovaného fragmentu DNA v reálném čase (Espy *et al.*, 2006). V případě identifikace *Arcobacter*-like species se *qPCR* používá k amplifikaci specifických sekvencí DNA, které jsou pro cílový druh jedinečné. K identifikaci nejčastěji se vyskytujících druhů byly popsány specifické protokoly *qPCR* obsahující směs dvakrát značených sond TaqMan (Brightwell *et al.*, 2007). Metoda *qPCR* pro identifikaci *Arcobacter*-like species je vysoce citlivá a specifická, což z ní činí ideální nástroj pro detekci patogenů v nízké koncentraci ve vzorcích potravin anebo v životním prostředí (Abdelbaqi *et al.*, 2007).

Metoda PCR-DGGE je molekulárně-biologická metoda používaná k analýze komplexních mikrobiálních vzorků. Po prvním kroku extrakce DNA z bakteriálního vzorku se metodou PCR amplifikuje specifický fragment DNA. Produkty PCR se nanesou na polyakrylamidový gel obsahující gradient denaturantů, kterými jsou nejčastěji močovina a formamid. Denuranty v gelu vytvářejí gradient teplot tání, což způsobuje denaturaci dvouřetězcových molekul DNA v různých polohách podél celého gradientu. Výsledkem je oddělení produktů PCR na základě jejich hodnot teplot tání. Na gelu se zobrazí jako pásy, které představují různé sekvence DNA mikroorganismů ve vzorku. Porovnáním profilů DGGE z různých vzorků je možné identifikovat změny ve složení mikrobiálního společenstva (Ercolini, 2004) Protokol PCR-DGGE byl popsán pro identifikaci druhů rodu *Campylobacter*, *Helicobacter* a *Arcobacter*. Byly také navrženy primery pro amplifikaci úseku genů 16S *rRNA*. Při „nested“ PCR (vnořené PCR) byly použity dva páry primerů. Produkty prvního kola amplifikace PCR sloužily jako templát pro druhé kolo amplifikace. Účelem použití vnořené PCR bylo zvýšení citlivosti amflifikační metody. Denaturační gradientová gelová elektroforéza byla provedena na 9% polyakrylamidovém gelu. Všechny výsledné DGGE profily byly použity k vytvoření databáze v BioNumerics (Petersen *et al.*, 2007).

1.1.8.2. Polymorfismus délky restrikčních fragmentů (RFLP)

Metoda RFLP využívá enzymy (tzv. restrikční endonukleázy) ke specifickému štěpení testované DNA na fragmenty definované délky. Na základě přítomnosti záporného náboje a rozdílné délky fragmentů je lze oddělit elektroforeticky. Výsledkem jsou pásy, které jsou vizualizovány pomocí luminiscenčních barviv tak, aby se zjistil polymorfismus ve vzorcích

(Marwal *et al.*, 2014). Pro rychlou identifikaci všech druhů arko-bakterů byla popsána metoda PCR-RFLP genů 16S *rRNA*. V prvním kroku během PCR jsou získány amplikony o stejné velikosti pro všechny identifikované druhy. Následné štěpení těchto PCR produktů restriktivní endonukleázou *MseI* poskytne odlišné RFLP profily pro určité druhy arko-bakterů. Zbývající druhy arko-bakterů mají společný nebo podobný RFLP profil. Proto jsou podrobeny druhému štěpení restriktivní endonukleázou *MnII*. Restriktivní endonukleáza *BfaI* je využita ve třetím štěpení, pokud nedojde k vytvoření druhově specifických RFLP profilů. Postupné restriktivní štěpení endonukleázami při identifikaci arko-bakterů je znázorněno na obrázku 8 (Figueras *et al.*, 2008, Figueras *et al.* 2012).



* Atypical *A. cryaerophilus* strains are those that show microheterogeneities in the 16S *rRNA* gene

Obrázek 8 Schéma navrhovaného pořadí restriktivních štěpení při identifikaci *Arcobacter*-like species (Figueras *et al.*, 2012)

1.1.8.3. Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů (AFLP)

Pro studium biologické rozmanitosti a taxonomie mikroorganismů poskytuje metoda AFLP několik výhod. Není totiž potřeba předešlé znalosti sekvence genomu zkoumaného mikroorganismu a jedná se o metodu citlivou pro detekci polymorfismu. Obecný postup analýzy AFLP je štěpení vyšetřované DNA restriktivními endonukleázami, ligování konců fragmentů speciálně navrženými oligonukleotidovými adaptéry a amplifikaci PCR metodou. V první preamplifikační PCR se používají AFLP primery s jedním selektivním nukleotidem.

Vzniklé produkty vstupují po naředění jako templát pro selektivní amplifikaci s použitím dvou AFLP primerů se třemi selektivními nukleotidy (Bertani *et al.*, 2019; Marwal *et al.*, 2014).

Pro charakterizaci druhů *Arcobacter*-like species se začalo vycházet z AFLP metody, která byla poprvé vyvinuta pro typizaci *Campylobacter jejuni* a *Campylobacter coli*. Celobuněčná DNA byla extrahována z bakteriálních buněk a následně štěpena restričními endonukléázami *Bgl*III a *cSP*6I (Kokotovic a On, 1999; On *et al.*, 2003). Ve studii Gobbi *et al.* (2018), zabývající se molekulární charakterizací *Al. butzleri* a *Al. cryaerophilus*, byla použita jednoenzymová AFLP. Pro štěpení extrahované DNA byla použita restriční endonukleáza *Hind*III. Ke vzniklým fragmentům byly po inkubaci přidány adaptérové oligonukleotidy. Po provedení PCR byly kmeny identifikovány elektroforézou na základě vytvoření specifických AFLP profilů (Gobbi *et al.*, 2018).

1.1.8.4. Multilokusová sekvenční analýza (MLST)

Princip této metody je založený na analýze nukleotidové odlišnosti v sekvencích housekeeping genů kódujících základní metabolické funkce v různých částech genomu. Nejčastěji je zvoleno 7 genů, jejichž sekvence jsou amplifikovány pomocí PCR a následně jsou podrobeny sekvenačním metodám. Celogenomová MLST se používá pro analýzu genomu mikroorganismů, ke studiu mikrobiální diverzity nebo pro přesnější diagnostiku infekčních chorob. Přesnější analýzu mikrobiální populace umožňuje cgMLST, která využívá geny konzervovaných oblastí genomu (Maiden *et al.*, 2013).

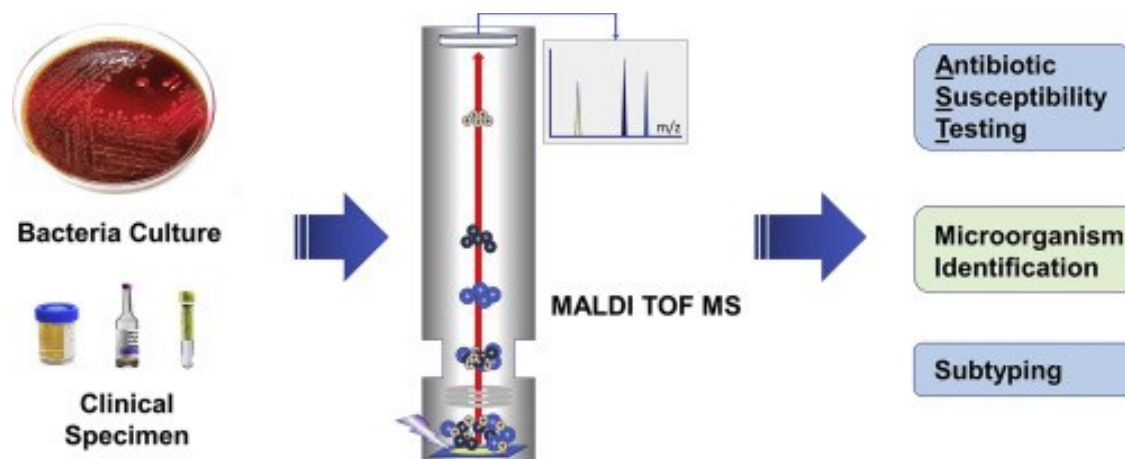
První schéma MLST pro identifikaci druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii*, *Al. cibarius*, *Al. thereius*) bylo navrženo ve studii Miller *et al.* (2009). Vycházelo se z MLST metody prvotně vyvinuté pro kampylobaktery. Návrh MLST pro optimalizaci k mezidruhovému a mezirodovému srovnání byl zaměřen na čtyři geny (*atp(unca)*, *glnA*, *glyA* a *tkt*). Pro identifikaci získaných alel každého druhu byla vytvořena on-line databáze pubMLST. Ve studii Alonso *et al.* (2014) bylo vyhodnoceno, že izoláty *Al. butzleri* tvoří rozmanitější populaci, než byla dosud popsána. U MLST analýzy kmenů arkobakterů ve studii Pérez-Cataluña *et al.* (2017) byly prokázány obdobné výsledky. Pouze jeden z identifikovaných typů sekvence byl přítomen v databázi a dalších 27 představovalo typy sekvencí. Vysokou rozmanitostí nových alel nebo novou kombinací známých alel je dokázána vysoká rozmanitost mezi kmeny. Proto je zapotřebí další studie k objasnění těchto vztahů (Pérez-Cataluña *et al.*, 2017).

1.1.9. Další metody identifikace

1.1.9.1. MALDI-TOF MS

Hmotnostní spektrometrie s laserovou desorpcí a ionizací za účasti matrice je technika, která se dnes řadí mezi uznávanou a nedílnou součást pracovních postupů v laboratořích klinické a průmyslové mikrobiologie. Umožňuje rychlou a přesnou identifikaci na základě charakteristického proteinového profilu, který je porovnán s rozsáhlou a aktualizovanou databází (Hou *et al.*, 2019; Welker *et al.*, 2019).

Princip je založen na jedinečném proteinovém profilu jednotlivých mikrobiálních druhů a jejich detekci použitím měkké desorpce a ionizace UV laserem bakteriálního vzorku smíchaného s organickou matricí. Energie laseru přemění směs na plynnou fázi bez přílišné fragmentace. Lze tak detekovat i ribozomální proteiny. Sekvence a velikost ribozomálních proteinů jsou vysoce specifické pro bakteriální druhy (Oviaño a Rodríguez-Sánchez, 2021). U některých bakteriálních druhů se provádí extrakce proteinů před zahájením MALDI-TOF MS analýzy. Pro rozrušení buněčné stěny se nejčastěji používá 70 % kyselina mravenčí a acetonitril k následné extrakci proteinů. Takto připravený vzorek se společně s matricí (α -kyano-4-hydroxyskořicové v 50% acetonitrilu) umístí na bodový terč 96místné destičky z leštěné oceli (Giacometti *et al.*, 2018).



Obrázek 9 Schéma MALDI-TOF MS procesu a využití v mikrobiologii (Hou *et al.*, 2019).

Pro identifikaci na úrovni druhu je obecně používán rozsah velikostí mezi 2 a 20 kDa. Je velmi stabilní a má silný poměr signálu k šumu. Zároveň v tomto velikostním rozmezí ribozomální proteiny dobře ionizují a poskytují přesná spektra. Výsledek je počítačovým softwarem automaticky porovnáván s referenční databází. Kromě porovnání software generuje hodnotu skóre na základě podobnosti mezi identifikovaným a studovaným kmenem (Wieser *et al.*, 2012). Referenční databáze MALDI Biotyper byla vytvořena pro rychlou identifikaci druhů

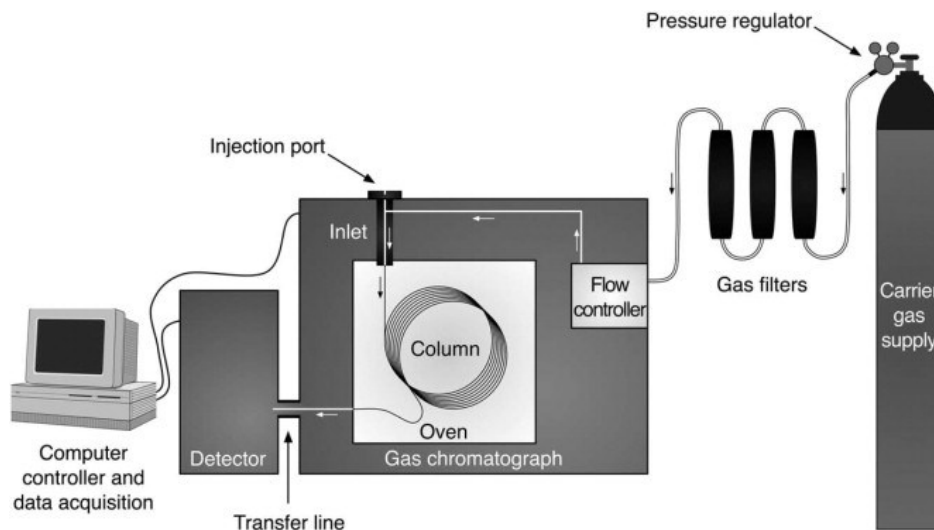
rodu *Arcobacter* a *Helicobacter* a k jejich odlišení od fenotypově podobných kampylobakterů. Pro identifikaci potenciálních izolátů arkobakterů zpravidla nebyla nutná předešlá extrakce kyselinou mravenčí (Alispahic *et al.*, 2010; Šilha *et al.*, 2015)

1.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC) je analytická separační metoda, která využívá dělení složek směsi mezi stacionární a mobilní fází za neustálé obnovy rovnováhy. Mobilní fází je nosný plyn inertní vůči stacionární fází a analytu. Stacionární fází je buď aktivní pevná látka (GSC) nebo kapalina (GLC). Z důvodu schopnosti vysokého rozlišení, selektivity a citlivosti se plynová chromatografie rutinně využívá ve výzkumných a průmyslových laboratořích (Robards a Ryan, 2022).

Přístrojové vybavení plynové chromatografie má přesně definované součásti. Mezi hlavní části plynového chromatografu patří zdroj plynu, injektor, chromatografická kolona, termostat, detektor a vyhodnocovací PC zařízení. Pro analýzu jsou vhodné zejména organické těkavé látky. U analýzy netěkavých sloučenin se musí předem provést úprava vzorku pro zvýšení těkavosti a možnosti jejich zachycení touto metodou. Dávkování vzorků je jeden ze zásadních kroků celé analýzy. Vstupní systém musí přijmout správné množství vzorku a nesmí dojít k překročení kapacity kolony nebo rozsahu detektoru. K dávkování se využívá automatická injekční mikrostříkačka. Vzorek je nadávkován u odpařovacího typu dávkovače do vyhřívané skleněné vložky na jednom konci opatřené silikonovým septem. Zde je nastavena teplota od 25 do 50 °C nad maximem teploty v teplotním programu, a tak dochází k okamžitému odpaření. Testovaná látka je unášena nosným plynem na kolonu se stacionární fází (Robards a Ryan, 2022).

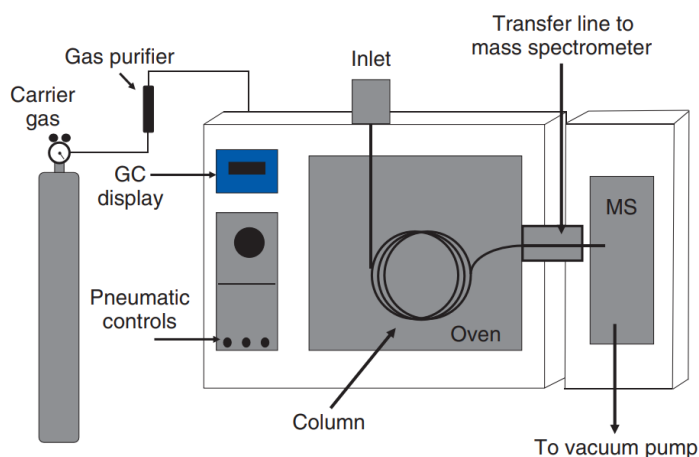
Pro analýzu plynovou chromatografií se dříve používaly náplňové kolony z mědi, hliníku nebo ze skla plněné stacionární fází. Později byly zavedeny účinnější kapilární kolony vyrobené z taveného oxidu křemičitého s polyimidovou vrstvou. Kapilární kolony (o délce 10 až 100 metrů a průměru 0,05 až 0,5 mm) jsou navinuty do tvaru cívky a umístěny v termostatu. Pro účinnou eluci látek je během analýzy řízena teplota kolony teplotním programem. Změnou teploty lze ovlivnit, aby se ze stacionární fáze postupně eluovaly silněji zadržované látky. Detektory generují signál analyzovaných látek eluovaných z kolony. Nadále dochází k dalšímu zdokonalování v oblasti manipulace se vzorky, detektorů nebo vývoji miniaturních a přenosných chromatografických přístrojů (Kenkel, 2003; Sparkman *et al.*, 2011).



Obrázek 10 Schéma hlavních součástí plynového chromatografu (Stauffer *et al.*, 2008).

1.2.1. Plynová chromatografie s hmotnostní spektrometrií

Spojení plynové chromatografie s hmotnostní spektrometrií se využívá jako výkonná analytická metoda k identifikaci a kvantifikaci složek komplexních vzorků. Jednotlivé složky vzorku jsou separovány plynovou chromatografií. Hmotnostní spektrometrie (MS) se používá pro následnou identifikaci a kvantifikaci sloučenin. Látky eluované z chromatografické kolony jsou v hmotnostním spektrometru ionizovány a vzniklé ionty dále separovány. Následně jsou zaznamenány detektorem jako poměr hmotnosti a náboje iontů. Výsledné hmotnostní spektrum poskytuje jedinečný „otisk“ každé složky analyzované látky (Skoog *et al.*, 2007).



Obrázek 11 Schéma plynového chromatografu s hmotnostní spektrometrií (Sparkman *et al.*, 2011).

1.2.2. Plynová chromatografie s plamenově-ionizačním detektorem

Plamenově-ionizační detektor je vhodný pro stanovení látek s relativně nízkou koncentrací. Eluovaná látka je z kolony přiváděna do plamene, kde dochází k jejímu spálení za vzniku kladně nabitých iontů. Ty jsou následně přitahovány k záporně nabitě sběrné elektrodě umístěné nad plamenem a elektrony proudí ke kladně nabitě elektrodě. Záporně nabitá sběrná elektroda a kladně nabitá elektroda jsou součástí elektrického obvodu. Při spalování eluované látky dochází ke změně velikosti proudu, což je zaznamenáno jako pík na chromatogramu (Kenkel, 2003).

1.2.3. Využití plynové chromatografie v mikrobiologii

Plynová chromatografie je široce využívá v mikrobiologii k separaci, identifikaci a kvantifikaci těkavých metabolitů a dalších sloučenin produkovaných mikroorganismy. Dále se tato metoda používá v kombinaci s dalšími analytickými metodami pro získání podrobnějších informací o chemickém složení mikroorganismů (Larsson, 1994).

Jednou ze specifických aplikací plynové chromatografie v mikrobiologii je identifikace mikroorganismů profilem mastných kyselin. Mastné kyseliny se v buňkách vyskytují jako volné nebo jako součást lipidů pocházejících z exogenních zdrojů a *de novo* syntézy. Mastné kyseliny jsou složkou fosfolipidů, které jsou součástí buněčných membrán. Dále hrají klíčovou úlohu v metabolismu a růstu mikroorganismů. Asi 5–10 % sušiny bakterií jsou lipidy s vázanými mastnými kyselinami o velikosti řetězce 9–20 atomů uhlíku. Profil mastných kyselin bakteriálních buněk je unikátní, protože jejich zastoupení se u jednotlivých bakteriálních druhů liší (v délce uhlovodíkového řetězce, pozici dvojně vazby, substituované skupině, atp.). Specifické zastoupení mastných kyselin může být ovlivněno také kultivačními podmínkami. Pokud jsou ale podmínky pro růst buněk standardizovány (složení kultivačního média, teplota a doba kultivace, fáze růstu, atp.), jsou profily mastných kyselin reprodukovatelné a zvyšuje se i přesnost možné identifikace mikroorganismů (De Carvalho a Caramujo, 2018).

Příprava vzorku je při stanovení mastných kyselin plynovou chromatografií zcela zásadní. Vyšetřovaný materiál je odebírán a skladován za vhodných podmínek tak, aby se zachovala jeho kvalita a zabránilo se případné kontaminaci. Mastné kyseliny v buňkách bakterií jsou často součástí složitých lipidových struktur, které mohou ovlivnit určení profilu mastných kyselin plynovou chromatografií. Extrakce mastných kyselin z buněk bakterií vede k částečné

hydrolyze lipidů, izolaci volných mastných kyselin a odstranění kontaminujících látek (De Carvalho a Caramujo, 2018).

1.2.3.1. Extrakce mastných kyselin

Mastné kyseliny se extrahují z buněk bakterií vhodnou extrakční metodou. Zvolená metoda by měla být co nejvíce účinná a zároveň šetrná. Folchova metoda extrakce je jednou z nejstarších metod používaných pro extrakci lipidů a mastných kyselin z biologických vzorků, včetně buněk bakterií. Metoda využívá k extrakci směs organických rozpouštědel chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v). Extrahované lipidy a mastné kyseliny jsou obsaženy v organické fázi (Folch, 1957). Extrakční metoda podle Bligha a Dyer je také široce používanou a účinnou metodou pro extrakci mastných kyselin z buněk bakterií. Postup je podobný metodě podle Folche, jen poměr chloroformu a methanolu je 1:2 (v/v) s přidavkem vody. Modifikací této metody lze zvýšit rychlost a účinnost extrakce (Bligh a Dyer, 1959; Haira, 1974; Jensen, 2008; Politz *et al.*, 2013). Pro některé kmeny bakterií se používají extrakční protokoly s předchozím krokem mechanické homogenizace buněk bakterií. Prvním takovým příkladem jsou kovové kuličky přidané do zkumavek s extrakčním činidlem a vzorkem. Dále byly testovány a popsány další metody mechanické homogenizace, např. ultrazvukem (Maddi, 2019). Jako náhrada toxického chloroformu byly testovány další extrakční činidla, například směs hexanu a 2-propanolu, heptanu a ethanolu (Undeland *et al.*, 1998). Extrakce konvenčními metodami jsou často pracné a časově náročné, a to zejména v případě analýzy většího počtu vzorků. Z tohoto důvodu byly popsány protokoly rychlé jednokrokové extrakce, k dispozici jsou komerčně dostupné soupravy (Axelsson a Gentill, 2014). Lze použít také Soxhletův extraktor, případně superkritickou fluidní extrakci (SFE) (Manirakiza *et al.*, 2001; Perretti *et al.*, 2006).

1.2.3.2. Příprava methylesterů mastných kyselin

Detekce mastných kyselin plynovou chromatografií může být obtížná z důvodu jejich nízké těkavosti. Z tohoto důvodu jsou mastné kyseliny převedeny na vhodné deriváty. Jednou z běžných derivatizačních metod je esterifikace mastných kyselin. Mastné kyseliny reagují s derivatizačním činidlem za vzniku methylesterů mastných kyselin (FAME). Esterifikace zahrnuje kondenzaci karboxylové skupiny kyseliny a hydroxylové skupiny alkoholu v přítomnosti katalyzátoru (Jelinek *et al.*, 2006). Kyselí katalyzovaná esterifikaci probíhá nejčastěji za přítomnosti katalyzátoru fluoridu boritého nebo kyseliny chlorovodíkové v methanolu. Mezi další možné katalyzátory pro kyselí katalyzovanou esterifikaci patří acetylchlorid, chlorid boritý a kyselina sírová v methanolu. Pro zamezení oxidace

polynenasycených mastných kyselin je přidáváno antioxidační činidlo, např. butylovaný hydroxytoulén. Bazicky katalyzovaná esterifikace probíhá za přítomnosti katalyzátoru methanolátu sodného, hydroxidu draselného nebo hydroxidu sodného. V tomto případě není nutné přidávat antioxidační činidlo, protože prakticky nedochází k oxidaci polynenasycených mastných kyselin. Přítomnost vody v reakční směsi snižuje výtěžnost esterifikace (Ichihara a Fukubayashi, 2010; Wei a Zeng, 2011). FAME jsou z reakční směsi extrahovány a organické rozpouštědlo je odpařeno v atmosféře dusíku. Odparek je před nástřikem do plynového chromatografu rozpuštěn ve vhodném organickém rozpouštědle (Wei a Zeng, 2011).

2. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1. Použité chemikálie a standardní látky

Acetylchlorid, CH ₃ COCl (78,49 g/mol)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Agarosa	(VWR Chemicals, Španělsko)
Butylovaný hydroxytoluen, C ₁₅ H ₂₄ O (220,35 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Dihydrogen fosforečnan draselný p.a., KH ₂ PO ₄ (136,086 g/mol)	(LACHEMA, Česká republika)
Dichlormethan, CH ₂ Cl ₂ (84,93 g/mol)	(Honeywell, USA)
EDTA (0,5 mol/l; pH 8,0), C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₈ (292,2438 g/mol)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Hexan, C ₆ H ₁₄ (86,18 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Hydrogenfosforečnan disodný dodekahydrát p.a., Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (358,14 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Chlorid draselný p.a., KCl (74,5513 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Chlorid sodný p.a., NaCl (58,44 g/mol)	(Lach-Ner, Česká republika)
Chloroform stabilizovaný ethanolem p.a., CHCl ₃ (119,38 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Kyselina boritá p.a., H ₃ BO ₃ (61,83 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Methanol hypergrade pro LC-MS, CH ₃ OH (32,04 g/mol)	(Sigma-Aldrich, Německo)
Methanol p.a., CH ₃ OH (32,04 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)
Supelco 37 FAME Mix v dichlormethanu	(Sigma-Aldrich, Německo)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan, C ₄ H ₁₁ NO ₃ (121,14 g/mol)	(Serva, Německo)
Uhličitan draselný, K ₂ CO ₃ (138,205 g/mol)	(Penta Chrudim, Česká republika)

2.2. Přístrojové vybavení a pomůcky

Běžné laboratorní kovové, skleněné a plastové pomůcky

Kahan

Blok zahřívací s mícháním Reacti-Therm	(Thermo Fisher Scientific, USA)
Centrifuga LMC-4200R	(Biosan, Lotyšsko)
Denzitometr McFarland DEN-1	(Biosan, ČR)
Elektroforetická vana OWL EASYCAST B1A	(Sigma, USA)
Elektroforetický zdroj PowerPRO 300	(Clever Scientific, UK)
Homogenizační sáček s bočním filtrem	(VWR, USA)

Horkovzdušný sterilizátor STERIMAT 5104	(BMT, ČR)
Chladnička s mrazákem AEG Santo 70	(AEG, Švédsko)
Chladnička Gorenje RK6201BW	(Gorenje, Slovinsko)
Chladnička Zanussi ZRA40100WA	(Zanussi, Itálie)
Inkubátor ELITE Dry Bath	(Major Science, Thajsko)
Koncentrátor vzorků Termovap TV 10	(ECOM, ČR)
Laboratorní digestoř	(MERCIT [®] , ČR)
Laminární box Hotte MSC 9 Standart	(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 Bosch GSN33VWEP	(Bosch, Německo)
Plynový chromatograf GC-2010 Plus	(Shimadzu, Japonsko)
Plynový chromatograf GCMS-QP2010	(Shimadzu, Japonsko)
Předvážky laboratorní ES1001	(Bel Engineering, Itálie)
Termoblok SBH130DC	(Stuart [®] , UK)
Termocycler Biometra TAdvanced Twin 48 G	(Biometra, Německo)
Termocycler Biometra TProfessional Gradient	(Biometra, Německo)
Termostat ST 3 COMF/S	(POL-ECO, Polsko)
Třepačka PTR-35	(Grant Instruments, UK)
Třepačka Reax Multi	(Heidolph, Německo)
Ultrazvuková lázeň K3L	(Kraintek, ČR)
Váhy přesné AV212C, 210 g/10 mg	(Ohaus, ČR)
UV dekontaminační box (UVC/T-AR)	(Biosan, Litva)
UV transluminátor Vilber Lourmot	(Chemos, ČR)
Vortex MS 1	(IKA Works, USA)
Zařízení na úpravu vody Smart2pure	(TKA, Niederelbert, Německo)

2.3. Kultivační média a pracovní roztoky

Arcobacter bujón (OXOID, Anglie)

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

Konečné pH (25 °C): 7,2 ± 0,2

Navážka 24 g byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Kultivační médium bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

TSA agar – Trypton Soya Agar (HIMEDIA, Indie)

Složení:	trypton	10,0 g/l
	sójový pepton	5,0 g/l
	chlorid sodný	5,0 g/l
	agar	15,0 g/l

Konečné pH (25 °C): 7,3 ± 0,2

Navážka 40 g byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Kultivační médium bylo sterilizováno v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Fosfátový pufr

Navážka 8 g chloridu sodného, 0,2 g chloridu draselného, 0,2 g dihydrogenfosforečnanu draselného a 2,9 g dodekahydrátu hydrogenfosforečnanu disodného byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

Fyziologický roztok

Navážka 8,5 g chloridu sodného byla rozpuštěna ve 1000 ml destilované vody. Roztok byl sterilizován v autoklávu při 121 °C po dobu 15 min.

2.4. Reagencie pro mPCR

25 mmol/l MgCl ₂	(Top-Bio, Česká republika)
10× PCR pufr	(Top-Bio, Česká republika)
dNTP mix	(TaKaRa Biomedicals, Japonsko)
DNA <i>Taq</i> polymeráza	(Top-Bio, Česká republika)

Ethidium bromid (10 mg/ml)	(Top-Bio, Česká republika)
DNA Marker 155-970 bp	(Top-Bio, Česká republika)
DNA Marker 100 bp	(Biotechrabbit, Německo)
PCR voda	(Top-Bio, Česká republika)
PCR vkládací pufr	(Biotechrabbit, Německo)
PCR primery o sekvencích viz tabulky 2, 4	(Generi biotech, Česká republika)

10× Tris-Borát-EDTA pufr (TBE pufr)

Složení:	H ₂ NC(CH ₂ OH) ₃	108,0 g
	kyselina boritá	55,0 g
	EDTA	5,84 g

Veškeré chemikálie byly smíchány s 1000 ml destilované vody.

1× Tris-Borát-EDTA pufr (TBE pufr)

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

1,5% agarózový gel s ethidium bromidem

Složení:	agaróza	1,2 g
	1× TBE pufr	80 ml
	ethidium bromid	4 µl

Agaróza byla po navážení a smíchání s 1× TBE pufrem přivedena k varu. Po ochlazení byly přidány 4 µl ethidium bromidu.

2% agarózový gel s ethidium bromidem

Složení:	agaróza	1,6 g
	1× TBE pufr	80 ml
	ethidium bromid	4 µl

Agaróza byla po navážení a smíchání s 1× TBE pufrem přivedena k varu. Po ochlazení bylo přidáno 4 µl ethidium bromidu.

2.5. Reagencie pro 16S rRNA-RFLP

PCR primery o sekvencích viz tabulka 6	(Generi biotech, Česká republika)
Restrikční pufr	(BioLabs, Nová Anglie)

Restrikční endonukleáza <i>MseI</i> (10 U/μl)	(BioLabs, Nová Anglie)
Restrikční endonukleáza <i>MnII</i> (10 U/μl)	(BioLabs, Nová Anglie)
Restrikční endonukleáza <i>BfaI</i> (10 U/μl)	(BioLabs, Nová Anglie)
DNA marker 50 bp	(Biotechrabbits, Německo)

3% agarózový gel s ethidium bromidem

Složení:	agaróza	2,4 g
	1× TBE pufr	80 ml
	ethidium bromid	4 μl

Agaróza byla po navážení a smíchání s 1× TBE pufrům přivedena k varu. Po ochlazení bylo přidáno 4 μl ethidium bromidu.

2.6. Mikrobiální kmeny

Pro jednotlivé experimenty popsané v experimentální části této diplomové části bylo použito 31 kmenů bakterií rodu *Arcobacter*. Tyto kmeny pocházely ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii (LMG), ze Sbírký mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku (CCUG), České sbírky mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně (CCM). Část sbírkových kmenů pocházela z předešlého výzkumu na Univerzitě Pardubice (UPa). Přehled všech použitých sbírkových bakteriálních kmenů je uveden v **Tabulce 1**.

Tabulka 1 Přehled bakteriálních kmenů zařazených do studie.

Označení sbírkového kmene	Sbírkové kmeny
LMG	<i>Ab</i> LMG 10828; <i>Al</i> LMG 28517; <i>As</i> LMG 6621; <i>At</i> LMG 24488
CCM	<i>Ac</i> CMM 3933; <i>Ac</i> CCM 7050
CCUG	<i>Ab</i> CCUG 30484
UPa	UPa <i>Ab</i> KK; UPa 2022/1a; UPa 2022/1b; UPa 2022/1c; UPa 2022/1d; UPa 2022/3a; UPa 2022/3b; UPa 2022/3c; UPa 2022/3d; UPa 2022/3e; UPa 2022/3f; UPa 2013/30; UPa 2013/13; UPa 2021/1; UPa 2021/3; UPa 2021/4; UPa 2021/5; UPa 2021/7; UPa 2021/9; UPa 2021/10; UPa 2021/11; UPa 2021/12; UPa 2021/13; UPa 2021/15; UPa 2023/1; UPa 2023/2; UPa 2023/4; UPa 2023/6; UPa 2023/7; UPa 2023/10; UPa 2023/11; UPa 2023/12

Pozn.: *Ab* – *Al. butzleri*; *Al* – *Al. lanthieri*; *As* – *Al. skirrowii*; *At* – *Al. thereius*; *Ac* – *Al. cryaerophilus*; LMG – Sbirka mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity Brno; CCUG – Sbirka mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku; UPa – Univerzita Pardubice;

2.7. Pracovní postup

2.7.1. Izolace *Arcobacter*-like species z různých vzorků

Pro účely experimentální části diplomové práce bylo shromážděno 21 vzorků potravin živočišného původu. Vzorky byly získány z velkoobchodních řetězců a maloobchodního prodeje v období listopadu 2022 – února 2023. Seznam všech do studie zařazených vzorků je uveden v **Tabulce 2**.

Tabulka 2 Seznam všech vzorků pro izolaci *Arcobacter*-like species v období listopadu 2022 – února 2023.

Označení vzorku	Datum odběru	Popis vzorku	Prodejce
UPa 2023/1	20.11.2022	Kuřecí prsní řízek (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha
UPa 2023/2	20.11.2022	Kuřecí prsní řízek (vakuově baleno)	Tesco, nám. Hrdinů, Praha
UPa 2023/3	20.11.2022	Kuřecí prsní řízek (vakuově baleno)	Lidl, Olbrachtova, Praha
UPa 2023/4	28.02.2023	Kuřecí krky (volný prodej)	Maso uzeniny Pankrác, Praha
UPa 2023/5	28.02.2023	Kuřecí prsní filet (volný prodej)	Řeznictví, uzenářství Jas, Praha
UPa 2023/6	28.02.2023	Kuřecí prsní řízek (vakuově baleno)	Vodňanské kuře
UPa 2023/7	28.02.2023	Kuřecí horní stehna (vakuově baleno)	Tesco, Novodvorská, Praha
UPa 2023/8	28.02.2023	Kuřecí dolní stehna (vakuově baleno)	Tesco, Novodvorská, Praha
UPa 2023/9	28.02.2023	Kuřecí horní stehna (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha
UPa 2023/10	28.02.2023	Kuřecí dolní stehna (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha
UPa 2023/11	28.02.2023	Kuřecí krky (volný prodej)	Masojiko, Nuselská, Praha
UPa 2023/12	28.02.2023	Kuřecí skelety (volný prodej)	Můj řezník, Nádražní, Praha
UPa 2023/13	28.02.2023	Kuřecí paličky (volný prodej)	Můj řezník, Nádražní, Praha
UPa 2023/14	28.02.2023	Kuřecí krky (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha
UPa 2023/15	28.02.2023	Kuřecí paličky (vakuově baleno)	Tesco, Novodvorská, Praha
UPa 2023/16	28.02.2023	Kuřecí paličky (vakuově baleno)	Globus, Sárská, Praha
UPa 2023/17	28.02.2023	Kuřecí prsní řízek (volný prodej)	Globus, Sárská, Praha
UPa 2023/18	28.02.2023	Selská kuřecí stehna (volný prodej)	Globus, Sárská, Praha
UPa 2023/19	28.02.2023	Kuřecí prsní řízek (volný prodej)	Řeznictví MÚÚÚ, Nádražní, Praha
UPa 2023/20	28.02.2023	Kuřecí medailonky (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha
UPa 2023/21	28.02.2023	Kuřecí paličky (vakuově baleno)	Albert, Na Pankráci, Praha

Pozn.: UPa – Univerzita Pardubice.

Vzorky byly odebrány do sterilních plastových zkumavek a skladovány při teplotě 4 °C (max. 24 h). Následně bylo odebráno přibližně 25 g vzorku a asepticky přeneseno do homogenizačního sáčku s membránou s přísádkem 100 ml *Arcobacter* bujónu. Směs v sáčku byla mechanicky homogenizována po dobu 2 min. Po pomnožení (30 °C, 24 h) byla provedena tzv. pasivní filtrace, a to nadávkováním 100 µl pomnožené bakteriální suspenze v několika kapkách na membránový filtr o velikosti pórů 0,45 µm přiložený na TSA agar. Pasivní filtrace probíhala při 30 °C po dobu 30 min. Po odstranění filtru z agaru probíhala kultivace při 30 °C po dobu 24–48 h. Suspektní kolonie (drobné, bezbarvé až nažloutlé) byly přeočkovány

na TSA agar a kultivovány po dobu 24–48 h (Šilha *et al.*, 2015). Získané izoláty byly podrobeny identifikaci pomocí některého protokolů *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) a Doudah *et al.* (2010) a 16S *rRNA*–RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012).

2.7.2. Identifikace arkobakterů metodou *mPCR* dle Houf *et al.* (2000)

Izolované suspektní kolonie byly zaočkovány do 100 μ l destilované vody. Následně byly podrobeny lýze a izolaci DNA při 110 °C po dobu 10 min. Reakční směs byla složena z 2 μ l lyzátu; 3 μ l 25 mM MgCl₂; 2,5 μ l 10 \times PCR pufru; 2 μ l dNTP mixu; 0,5 μ l primeru ARCO; 0,5 μ l primeru BUTZ; 0,5 μ l primeru CRY1; 0,5 μ l primeru CRY2; 0,25 μ l primeru SKIR; 0,15 μ l *Taq* polymerázy. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **Tabulce 3**. Směs byla doplněna PCR vodou na konečný objem 25 μ l. Podmínky průběhu *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) jsou uvedeny v **Tabulce 4**.

Tabulka 3 Primery použité pro identifikaci pomocí *mPCR* dle Houf *et al.* (2000).

Primer	Sekvence primeru
ARCO	5'-CGTATTCACCGTAGCATAGC-3'
SKIR	5'-GGCGATTTACTGGAACACA-3'
BUTZ	5'-CCTGGACTTGACATAGTAAGAATGA-3'
CRY1	5'-TGCTGGAGCGGATAGAAGTA-3'
CRY2	5'-AACCAACCTACGTCCTTCGAC-3'

Tabulka 4 Optimální podmínky průběhu *mPCR* dle Houf *et al.* (2000).

	Teplota [°C]	Čas [min]	
Počáteční denaturace	94	2	
Denaturace	94	45 s	} 32 \times
Annealing	65	45 s	
Syntéza	72	30 s	
Závěrečná syntéza	72	4	

Po skončení PCR reakce byla provedena separace a identifikace PCR produktů. Byl připraven 1,5% agarózový gel z 1 \times TBE pufru, a do gelu byl přidán ethidium bromid (10 mg/ml). PCR produkt byl dávkován do gelu společně s vkladacím pufrem. Současně byl v rámci každé elektroforetické separace zařazen i velikostní standard (DNA marker 155–970 bp). Elektroforetická separace probíhala vždy 50 min v prostředí 1 \times TBE pufru a při 100 V.

2.7.3. Identifikace kmenů metodou *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010)

Izolované suspektní kolonie byly zaočkovány do 100 μ l destilované vody. Následně byly podrobeny lýze a izolaci DNA při 110 °C po dobu 10 min. Reakční směs byla složena z 2 μ l lyzátu; 2 μ l 25 mM MgCl₂; 2,5 μ l 10 \times PCR pufru; 2 μ l dNTP mixu; 0,5 μ l primeru ButR; 0,5 μ l primeru SkiR; 0,5 μ l primeru TherR; 0,5 μ l primeru CibR; 0,5 μ l primeru ArcoF; 0,5 μ l primeru GyraF; 0,5 μ l primeru GyraR; 0,25 μ l *Taq* polymerázy. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **Tabulce 5**. Směs byla doplněna PCR vodou na konečný objem 25 μ l. Podmínky průběhu *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010) jsou uvedeny v **Tabulce 6**.

Tabulka 5 Primery použité pro identifikaci pomocí *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010).

Primer	Sekvence primeru
ButR	5'-TCCTGATACAAGATAATTGTACG-3 '
TheR	5'-GCAACCTCTTTGGCTTACGAA-3 '
CibR	5'-CGAACAGGATTCTCACCTGT-3 '
SkiR	5'-TCAGGATACCATTAAAGTTATTGATG-3 '
ArcoF	5'-GCYAGAGGAAGAGAAATCAA-3 '
GyraF	5'-AGAACATCACTAAATGAGTTCTCT-3 '
GyraR	5'-CCAACAATATTTCCAGTYTTTGGT-3 '

Tabulka 6 Optimální podmínky průběhu *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010).

	Teplota [°C]	Čas [min]	
Počáteční denaturace	94	3	
Denaturace	94	45 s	} 30 \times
Annealing	58	45 s	
Syntéza	72	2	
Závěrečná syntéza	72	5	

Po skončení PCR reakce byla provedena separace a identifikace PCR produktů. Byl připraven 2% agarózový gel z 0,5 \times TBE pufru a do gelu byl přidán ethidium bromid (10 mg/ml). PCR produkt byl dávkován do gelu společně s vkladacím pufrem. Současně byl v rámci každé elektroforetické separace zařazen i velikostní standard (DNA marker 100 bp). Elektroforetická separace probíhala vždy 120 min v prostředí 0,5 \times TBE pufru a při 120 V.

2.7.4. Identifikace metodou 16S rRNA PCR-RFLP

Identifikace *Arcobacter*-like species metodou 16S rRNA PCR-RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012) se skládá ze dvou hlavních kroků. V prvním kroku je PCR metodou vytvořen amplikon o velikosti 1026 bp, a to v případě všech identifikovaných druhů. Tento amplikon je v následujícím kroku štěpen restričními endonukleázami a vzniklé produkty jsou elektroforeticky separovány.

Reakční směs PCR metody byla složena z 2,5 µl lyzátu; 1,5 µl 25 mM MgCl₂; 2,5 µl 10× PCR pufru; 2 µl dNTP mixu; 0,125 µl primeru CAH 16S 1a; 0,125 µl primeru CAH 16S 1b; 0,25 µl *Taq* polymerázy. Sekvence použitých primerů jsou uvedeny v **Tabulce 7**. Směs byla doplněna PCR vodou na konečný objem 25 µl. Podmínky průběhu PCR jsou uvedeny v **Tabulce 8**.

Tabulka 7 Primery použité pro identifikaci pomocí 16S rRNA PCR-RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012).

Primer	Sekvence primeru
CAH 16S 1a	5'-AATACATGCAAGTCGAAGTCGAACGA-3'
CAH 16S 1b	5'-TTAACCCAACATCTCAGAC-3'

Tabulka 8 Optimální podmínky průběhu 16S rRNA PCR-RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012).

	Teplota [°C]	Čas [min]	
Počáteční denaturace	95	120	
Denaturace	94	45 s	} 30×
Annealing	52	45 s	
Syntéza	72	2	
Závěrečná syntéza	72	10 min	

Po skončení PCR reakce byla provedena separace a identifikace PCR produktů. Byl připraven 1,5% agarózový gel z 1× TBE pufru a do gelu byl přidán ethidium bromid (10 mg/ml). PCR produkt byl dávkován do gelu společně s vkládacím pufrům. Současně byl v rámci každé elektroforetické separace zařazen i velikostní standard (DNA marker 155–970 bp). Elektroforetická separace probíhala vždy 60 min v prostředí 1× TBE pufru a při 100 V.

Amplifikované produkty o velikosti 1026 bp byly v dalším kroku metody 16S rRNA PCR-RFLP podrobeny štěpení restriční endonukleázou *MseI*, popř. *MnII*. Reakční směs o celkovém objemu 25 µl byla složena z 21,5 µl PCR vody; 2,5 µl 10× restričního pufru; 0,5 µl PCR produktu a 0,5 µl restričního enzymu *MseI*. Připravená směs byla 15 min

inkubována při teplotě 37 °C. Následně byla provedena inaktivace restrikčního enzymu při teplotě 65 °C po dobu 20 min. V případě provedení třetího restrikčního štěpení restrikční endonuklázou *BfaI* pro rozlišení shodných RFLP profilů byla reakční směs připravena obdobným způsobem. Po přidání enzymu *BfaI* byla reakční směs inkubována 60 min při teplotě 37 °C. Následná inaktivace probíhala po dobu 20 min při teplotě 80 °C.

Po každém restrikčním štěpení byla provedena separace a identifikace restrikčních produktů, a to v připraveném 3% agarózovém gelu připravém z 1× TBE pufru a do gelu byl přidán ethidium bromid. Restrikční produkt byl dávkován do gelu společně s vkládacím pufrům. Současně byl v rámci každé elektroforetické separace zařazen i velikostní standard (DNA marker 50 bp). Elektroforetická separace probíhala vždy 120 min v prostředí 1× TBE pufru a při 100 V.

2.7.5. Typizace arkobakterů na základě stanovení mastných kyselin

2.7.5.1. Optimalizace přípravy methylesterů mastných kyselin

Nejprve bylo optimalizováno množství buněčné kultury k analýze mastných kyselin. Nejprve byla připravena suspenze bakterií zaočkováním 1, 2 nebo 3 kalibrovaných očkovacích kliček o objemu 1 µl do 4 ml PBS pufru. Dále byla připravena suspenze bakterií o přesné hustotě buněk odpovídající 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice (9×10^8 CFU/ml). Studované kmeny *Arcobacter*-like species byli zaočkováni do 4 ml PBS pufru.

V rámci optimalizace byl také testován postup extrakce mastných kyselin z buněk arkobakterů. Nejprve byly mastné kyseliny extrahovány 4 ml směsí chloroformu a methanolu v poměru 2:1 (v/v) a poté 4 ml směsí chloroformu a methanolu v poměru 9:1 (v/v). Dalším testovaným postupem byla extrakce 4 ml směsí hexanu a methanolu v poměru 2:1 (v/v) a poté 4 ml směsí hexanu a methanolu v poměru 9:1 (v/v).

Předmětem optimalizace byl i vliv přidaného antioxidačního činidla (butylovaný hydroxytoulén). Přídavek antioxidačního činidla rozpuštěného v methanolu byl přidáván do extrakční směsi v koncentraci 0,1 % a 1 %.

Při přípravě FAME byl při extrakci a derivatizaci obsah zkumavky po každém přidání reagentie 5 minut míchán.

2.7.5.2. Příprava methylesterů mastných kyselin

Studované kmeny *Arcobacter*-like species byli zaočkováni do 4 ml PBS pufru po předchozí 48 h kultivaci při teplotě 30 °C na TSA agaru. Následně byla připravena bakteriální suspenze

odpovídající 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice (odpovídá hustotě buněk 9×10^8 CFU/ml). Před extrakcí mastných kyselin byly buňky bakterií homogenizovány sonikací po dobu 5 minut. Mastné kyseliny extrahovány směsí chloroformu a methanolu obsahující 0,1 % butylovaného hydroxytoulenu (antioxidační činidlo). K suspenzi bakteriálních buněk byly přidány 4 ml směsi chloroformu a methanolu (2:1, v/v), obsah zkumavky 5 minut intenzivně třepán a organická vrstva převedena do čisté zkumavky. Krok extrakce byl opakován, jen poměr chloroformu k methanolu byl 9:1 (v/v). Organické rozpouštědlo bylo odpařeno v atmosféře dusíku.

Mastné kyseliny byly derivatizovány na odpovídající FAME. K odparce bylo přidáno 500 μ l methanolu a 40 μ l acetylchloridu a směs inkubována při teplotě 100 °C po dobu 60 minut. Po ochlazení na okolní teplotu byl obsah zkumavky neutralizován 500 μ l 6% K_2CO_3 (otevřené zkumavky třepány po dobu 5 minut). Methylestery mastných kyselin byly extrahovány hexanem. Ke směsi byl přidán 1 ml hexanu, obsah zkumavky třepán po dobu 5 minut, organická vrstva přenesena do čisté zkumavky, k směsi přidán opět 1 ml hexanu, obsah zkumavky třepán po dobu 5 minut a organická vrstva přenesena do čisté zkumavky. Hexan byl odpařen v atmosféře dusíku a odparek uchováván před analýzou GC-FID při 4 °C. Proces odpařování organického rozpouštědla v atmosféře dusíku je zobrazen v **Příloze A**.

2.7.5.3. Určení profilu mastných kyselin plynovou chromatografií

Nejprve byly určeny retenční časy standardů 37 mastných kyselin (Supelco 37 FAME Mix) metodou GC-MS v módu SCAN.

Objem dávkovaného vzorku: 1 μ l

Split mód: 10:1

Teplota nástřiku: 250 °C

Kolona: HP-88, J&W, 100 m \times 250 μ m \times 0,25 μ m, stacionární fáze 88 % kyanopropylen a 12 % arylpolysiloxan

Teplotní gradient: viz **Tabulka 9**

Doba analýzy: 58 min

Průtok MF (helium): 1,56 ml/min

Teplota MS: 200 °C iontový zdroj

250 °C teplota rozhraní

Tabulka 9 Teplotní gradient GC-MS.

Změna hodnoty [°C/min]	Teplota [°C]	Čas [min]
–	75	3
10	200	0
0,8	230	5

Pro určení profilu mastných kyselin u jednotlivých bakteriálních kmenů, byl odparek před analýzou GC-FID rozpuštěn v 200 µl dichlormethanu a směs přenesena do insertu vialky.

Objem dávkovaného vzorku: 1 µl

Split mód: 10:1

Teplota nástřiku: 250 °C

Kolona: HP-88, J&W, 100 m × 250 µm × 0,25 µm, stacionární fáze 88 % kyanopropylen a 12 % arylpolysiloxan

Teplotní gradient: viz **Tabulka 10**

Doba analýzy: 58 min

Průtok MF (helium): 1,56 ml/min

Teplota detektoru: 250 °C iontový zdroj

Průtok plynů v detektoru:

Vodík: 30 ml/min

Vzduch: 400 ml/min

Make-up (helium): 25 ml/min

Tabulka 10 Teplotní gradient GC-FID.

Změna hodnoty [°C/min]	Teplota [°C]	Čas [min]
–	75	3
10	200	0
0,8	230	5

Plynový chromatograf GC-2010 Plus s plamenově-ionizačním detektorem, který byl použit pro analýzu vzorků, je zobrazen v **Příloze B**.

3. VÝSLEDKY A DISKUZE

3.1. Izolace *Arcobacter*-like species z různých vzorků

Pro izolaci *Arcobacter*-like species z různých vzorků byla v této diplomové práci použita dříve popsaná metoda se zařazeným krokem pasivní filtrace (Šilha *et al.*, 2015). Pasivní filtrace přes membránový filtr totiž významně zlepší záchyt arkobakterů a odseparuje je od doprovodné mikroflóry vzorku. Drobné buňky arkobakterů jsou schopny projít přes póry filtru o průměru 0,45 μm a doprovodná mikroflóra je tím většinou odseparována. Tato metoda byla popsána ve studii pro izolaci kampylobakterů a arkobakterů z kuřecího masa (Atabay a Corry, 1997). Ve studii Šilha *et al.* (2015) byla navržena modifikace této metody. Z různých vzorků odebraných z životního prostředí a potravin živočišného původu byla provedena izolace s krokem pasivní filtrace na chromogenní selektivní agar CASA primárně určený pro izolaci *Campylobacter* spp. Při použití tohoto růstového média došlo k výrazné inhibici doprovodné mikroflóry. Zároveň tak byly arkobaktery prokazatelné na základě charakteristiky růstových projevů (Šilha *et al.*, 2015).

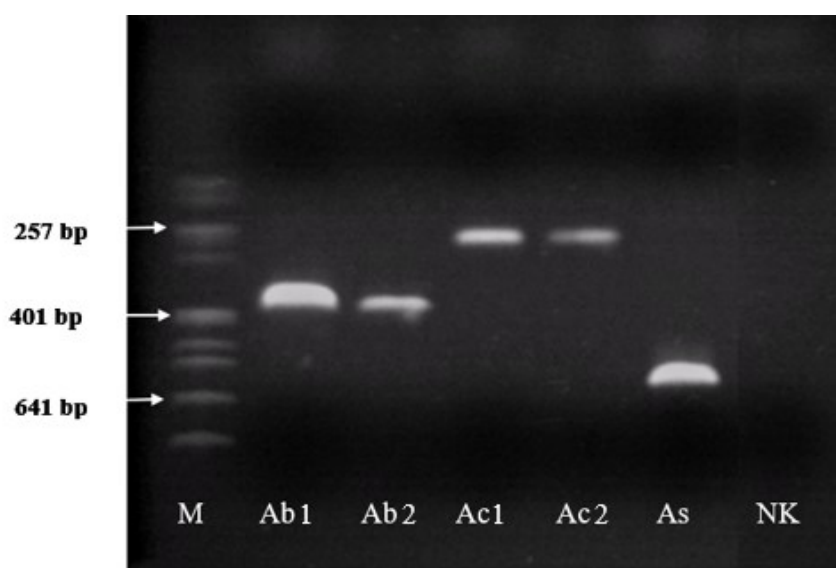
Suspektní kolonie *Arcobacter*-like species byly izolovány v případě 8 (38 %) vzorků potravin živočišného původu. Identifikace izolovaných suspektních kolonií byla provedena molekulárně-biologickými metodami, a to pomocí *m*PCR dle Houf *et al.* (2000), *m*PCR dle Doudah *et al.* (2010) a 16S *r*RNA PCR-RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012). Všechny kmeny byly identifikovány jako druh *Al. butzleri*. Ve studii Rivas *et al.* (2004) byl ze vzorků mletého masa izolován také pouze *Al. butzleri*. Ve studii Houf *et al.* (2001) byly arkobaktery izolovány z 65 % vzorků kuřecího masa. Ve většině případů se také jednalo o druh *Al. butzleri* (Houf *et al.* 2001).

Druhy *Arcobacter*-like species jsou izolovány převážně ze vzorků humánního, animálního a také environmentálního původu. Druhy *Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus* a *Al. skirrowii* jsou druhy převažující ve vzorcích humánního původu (Ferreira *et al.*, 2019). K infikování lidí dochází nejpravděpodobněji po požití fekálně kontaminovaných potravin nebo vody. Pacienti následně trpí enteritidou a akutními vodnatými průjmy. Pro izolaci arkobakterů nebyl ale popsán standardizovaný izolační postup. Tato skutečnost znamená, že mnoho infekcí vyvolaných arkobaktery není odhalena (Collado a Figueras, 2011; Šilha *et al.*, 2019). Zavedení standardní metodiky pro izolaci arkobakterů z humánních vzorků by tak představovalo přesnější a rychlejší možnost hlášení těchto infekcí. Absence standardní metodiky pro izolaci

arkobakterů zároveň představuje jisté rozdíly v jednotlivých studiích, které se věnovaly této problematice (Merga *et al.*, 2011).

3.2. Identifikace izolovaných kmenů metodou *mPCR* dle Houf *et al.* (2000)

Molekulárně-biologická metoda *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) byla vyvinuta pro identifikaci tří nejčastěji se vyskytujících druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus* a *Al. skirrowii*). Elektroforetický záznam identifikace tří druhů sbírkových kmenů, pro které byla tato metoda popsána, je zobrazen na **Obrázku 12**.



Obrázek 12 Elektroforetický záznam separace produktů *mPCR* dle Houf *et al.* (2000).

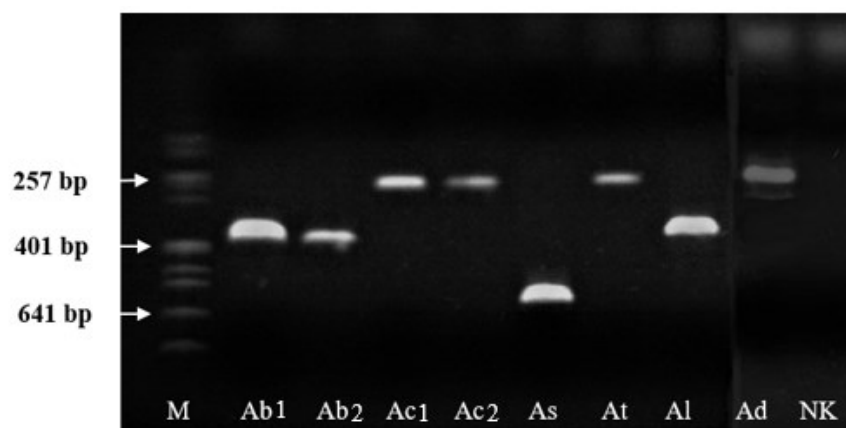
Pozn.: M – DNA marker; Ab1 – *Al. butzleri* LMG 10828; Ab2 – *Al. butzleri* UPa Ab KK; Ac1 – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; Ac2 – *Al. cryaerophilus* CCM 3933; As – *Al. skirrowii* LMG 6621; NK – negativní kontrola.

Metodou *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) byly identifikovány všechny sbírkové kmeny a kmeny izolované z různého prostředí. Identifikace byla provedena zcela správně u kmenů, pro které byla tato metoda popsána. Kmeny izolované z různých vzorků byly ve většině případů identifikovány jako *Al. butzleri*. Avšak kmen UPa 2013/13 byl identifikován jako *Al. cryaerophilus*. U kmene *Al. lanthieri* LMG 28517 byl generován PCR produkt o velikosti 400 bp, který tak nebylo možné rozlišit od *Al. butzleri*. Při identifikaci druhů *Al. thereius* LMG 24488 a *P. defluvii* LMG 25694 byly zaznamenány stejné PCR amplikony jako pro *Al. cryaerophilus*. Elektroforetický záznam této identifikace je znázorněn na **Obrázku 13**. Výsledky identifikace všech sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí pomocí protokolu dle Houf *et al.* (2000) je zaznamenána v **Tabulce 9**.

Tabulka 11 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou *mPCR* dle Houf *et al.* (2000)

Označení kmene	Identifikovaný druh
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 3933	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	<i>Al. skirrowii</i>
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter defluvii</i> LMG 25694	<i>Al. cryaerophilus</i>
UPa KK	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3e	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3f	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/30	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/13	<i>Al. cryaerophilus</i>
UPa 2021/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/3	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/5	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/9	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/12	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/13	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/15	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/2	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/6	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/12	<i>Al. butzleri</i>

Pozn.: CCUG – Sbíрка mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku; LMG – Sbíрка mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbíрка mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně; UPa – sbíрка mikroorganismů Univerzity Pardubice; KK – kuřecí krk; *Al.* – *Aliarcobacter*.



Obrázek 13 Elektroforetický záznam separace produktů sbírkových kmenů *Arcobacter* spp. mPCR dle Houf *et al.* (2000).

Pozn.: M – DNA marker; Ab1 – *Al. butzleri* LMG 10828; Ab2 – *Al. butzleri* UPa Ab KK; Ac1 – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; Ac2 – *Al. cryaerophilus* CCM 3933; As – *Al. skirrowii* LMG 6621; At – *Al. thereius* LMG 24488; Al – *Al. lanthieri* LMG 28517; Ad – *P. deflugii* LMG 25694; NK – negativní kontrola.

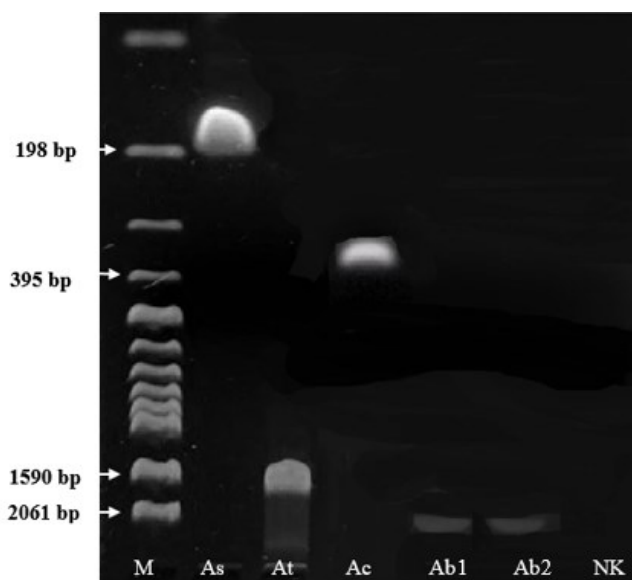
Tato metoda byla ve studii Houf *et al.* (2000) popsána jako metoda pro rychlou identifikaci arkobakterů ze vzorků původem z drůbežího masa. V provincii Kayseri byla tato metoda použita také pro identifikaci suspektních kolonií izolovaných z čerstvé zeleniny. Většina izolátů byla identifikována jako druh *Al. butzleri* a pouze v případě několika kmenů se jednalo o druh *Al. cryaerophilus* (Abay *et al.*, 2022). Ve studii Scarano *et al.* (2014) byla metoda mPCR dle Houf *et al.* (2000) použita pro ověření výsledků identifikace arkobakterů izolovaných z mlékárenských výrobků a také z prostředí výrobního podniku. Izoláty byly touto metodou identifikovány jako *Al. butzleri*.

Metoda dle Houf *et al.* (2000) je využívána pro identifikaci kmenů v celé řadě studií (Uljanovas *et al.*, 2021), avšak i přes značné využití této metody se jedná o méně spolehlivou metodu pro identifikaci *Arcobacter*-like species. Jak bylo popsáno výše, metoda je primárně určena pro identifikaci třech nejčastěji se vyskytujících druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii*). V těchto případech je identifikace spolehlivá a nedochází k záměně s jinými druhy. Avšak u nově popsáných druhů může docházet k chybné identifikaci arkobakterů (Levican a Figueras, 2013). Např. druh *M. mytili* izolovaný z mušlí byl chybně identifikován jako *Al. skirrowii* (Collado *et al.*, 2009). Stejný problém nastal při identifikaci *Arcobacter*-like species izolovaných z masa a korýšů. Druh *Al. thereius* byl chybně identifikován jako *Al. cryaerophilus*, a to na základě generování ampliconu o shodné velikosti (Collado *et al.*, 2009). Ve studii Kerkhof *et al.* (2021) byly izolovány a identifikovány arkobaktery ze vzorků humánního původu. Při použití metody mPCR Houf *et al.* (2000) byly vytvořeny amplicony velikostně odpovídající druhu *Al. butzleri*. Avšak při použití sekvenačních metod byly kmeny nakonec identifikovány jako druh *Al. lanthieri* (Kerkhof *et al.*, 2021). Je tedy diskutabilní, zda

jsou dříve publikované výsledky identifikace arkobakterů s použitím této metody zcela spolehlivé. Tato úvaha vyplývá z výše popsáných výsledků a také výsledků dalších studií, ve kterých bylo navrženo využití více molekulárně-biologických metod pro přesnější identifikaci arkobakterů (Levican a Figueras, 2013).

3.3. Identifikace izolovaných kmenů metodou *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010)

Pro identifikaci kmenů arkobakterů byl dále využit také *mPCR* protokol dle Doudah *et al.* (2010). Tato metoda byla navržena pro identifikaci pěti druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii*, *Al. thereuis* a *Al. cibarius*). Identifikace byla správná u kmenů, pro které byla tato metoda popsána. Elektroforetický záznam identifikace těchto kmenů je zobrazen na **Obrázku 14**. Kmeny izolované z různých vzorků byly touto metodou ve většině případů identifikovány jako druh *Al. butzleri*. Kromě kmene UPa 2013/13, který byl identifikován jako *Al. cryaerophilus*. Jediný problém nastal při identifikaci kmene *P. defluvii* LMG 25694 ze sbírkových kmenů. U tohoto druhu byl pozorován PCR produkt o stejné velikosti jako u druhu *Al. butzleri*. Tudiž ze vzorků neznámého původu by nedošlo touto metodou k identifikaci tohoto druhu. Výsledky identifikace všech sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí *mPCR* metodikou dle Doudah *et al.* (2010) je zaznamenána v **Tabulce 10**.



Obrázek 14 Elektroforetický záznam separace produktů sbírkových kmenů *Arcobacter* spp. *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010).

Pozn.: M – DNA marker; *As* – *Al. skirrowii* LMG 6621; *At* – *Al. thereuis* LMG 24488; *Ac* – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; *Ab1*– *Al. butzleri* LMG 10828; *Ab2*– *Al. butzleri* CCUG 30484; NK – negativní kontrola.

Tabulka 12 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010).

Označení kmene	Identifikovaný druh
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 3933	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobater lanthieri</i> LMG 28517	Neúspěšná identifikace
<i>Arcobacter defluvii</i> LMG 25694	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	<i>Al. skirrowii</i>
<i>Aarcobacter burzleri</i> CCUG 30484	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	<i>Al. thereius</i>
UPa KK	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3e	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3f	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/30	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/13	<i>Al. cryaerophilus</i>
UPa 2021/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/3	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/5	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/9	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/12	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/13	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/15	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/2	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/6	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/12	<i>Al. butzleri</i>

Pozn.: CCUG – Sbíрка mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku; LMG – Sbíрка mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbíрка mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně; UPa – sbíрка mikroorganismů Univerzity Pardubice; KK – kuřecí krk; *Al.* – *Aliarcobacter*.

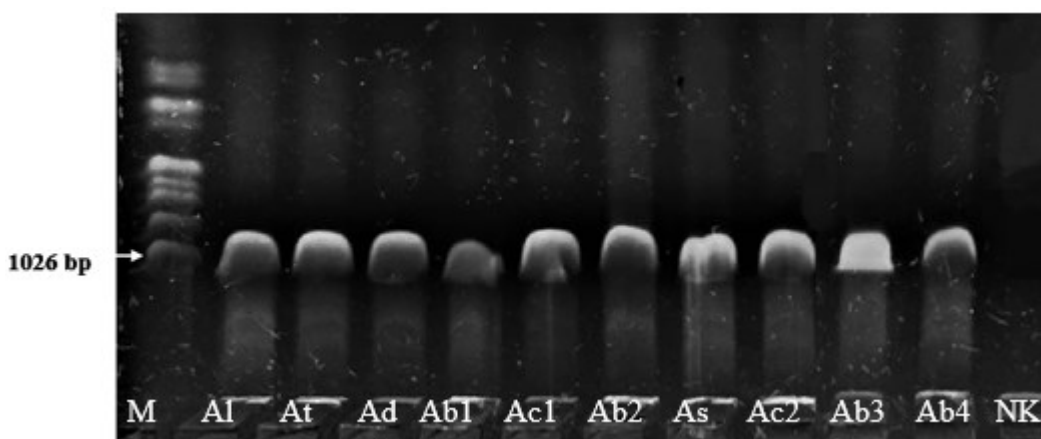
Ve studii Doudah *et al.* (2010) je uvedeno, že se jedná o přesnější metodu pro identifikaci arkobakterů ze vzorků humánního a animálního původu. Touto metodou bylo možné odlišit druh *Al. thereius* od druhu *Al. butzleri*. Tento protokol také umožňuje identifikovat druh *Al. cibarius*, což jsou hlavní přednosti metody oproti dříve popsané *mPCR* (Doudah *et al.*, 2010; Levican a Figueras, 2013). Ve studii Barboza *et al.* (2017) byl studován první případ izolace druhu *Al. cryaerophilus* ze vzorku humánního původu na Kostarice. Metodou *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010) byl tento druh prokazatelně identifikován (Barboza *et al.*, 2017). Ve studii Giacometti *et al.* (2013) byla touto metodou provedena identifikace druhu *Al. butzleri* ze vzorků environmentálního původu a mlékárenských výrobků v Itálii. Ve studii Oliveira *et al.* (2017) byla provedena izolace a identifikace arkobakterů z fekálních vzorků kajmanů v Brazílii. Metoda *mPCR* dle metodiky Doudah *et al.* (2010) byla použita k potvrzení identifikace druhu *Al. butzleri* a *Al. cryaerophilus* v izolovaných suspektních koloniích (Oliveira *et al.*, 2017).

Metoda *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010) je velmi využívaná molekulárně-biologická metoda při identifikaci *Arcobacter*-like species izolovaných ze vzorků humánního i animálního původu. Zároveň je tato metoda využívána pro identifikaci dvou druhů arkobakterů, které nelze identifikovat výše popsanou *mPCR* (Collado a Figueras, 2011). Vzhledem k postupnému nárůstu nově popsaných druhů arkobakterů se přesto jedná o méně spolehlivou molekulárně-biologickou metodou pro identifikaci *Arcobacter*-like species. Jak bylo popsáno výše, metoda je primárně určena pro identifikaci pěti druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. cryaerophilus*, *Al. skirrowii*, *Al. thereius* a *Al. cibarius*). V těchto případech je identifikace spolehlivá a nedochází k záměně s jinými druhy. Avšak u nově popsaných druhů může docházet k chybné identifikaci arkobakterů (Collado a Figueras, 2011). Např. při identifikaci druhu *Al. trophiarum* izolovaného ze vzorků animálního původu nebyly na výsledném elektroforetickém záznamu generovány žádné amplikony (De Smet *et al.*, 2011). Podobné výsledky byly popsány ve studii zabývající se izolací nově popsaných druhů *Arcobacter*-like species z měkkýšů. Druhy *P. venerupis* a *H. bivalviorium* byly chybně identifikovány s použitím *mPCR* dle Doudah *et al.* (2010). Ve výsledném elektroforetickém záznamu byly generovány amplikony shodné velikosti s druhem *Al. butzleri* nebo dokonce nebyly generovány žádné amplikony (Levican *et al.*, 2012). Proto, stejně jako u předchozí metody *mPCR* dle Houf *et al.* (2000), je diskutabilní, zda jsou výsledky starších studií identifikace arkobakterů s použitím této metody zcela správné. Tato úvaha vyplývá z výše popsaných výsledků a také

výsledků dalších studií, ve kterých bylo navrženo využití více molekulárně-biologických metod pro přesnější identifikaci arkobakterů (Levicán a Figueras, 2013).

3.4. Identifikace kmenů metodou 16S rRNA PCR-RFLP

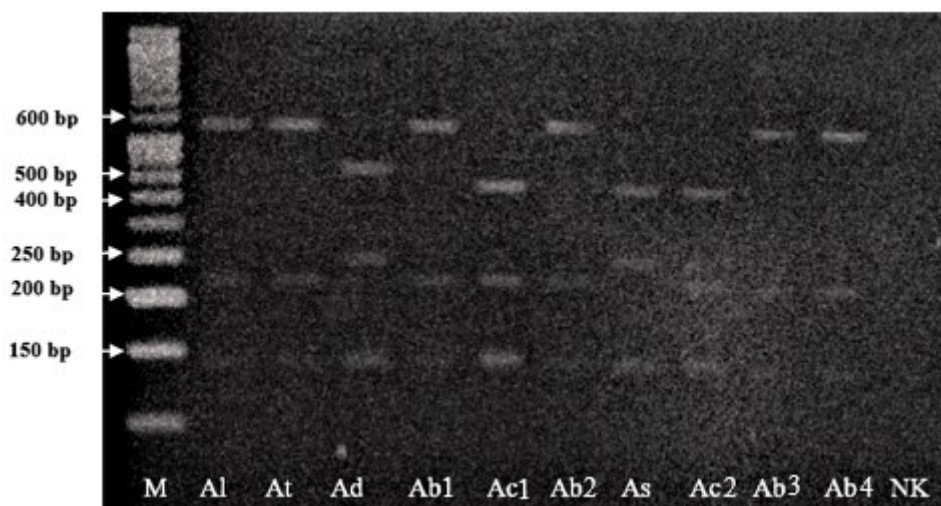
Pro identifikaci kmenů *Arcobacter*-like species byla také použita molekulárně-biologická metoda 16S rRNA PCR-RFLP dle Figueras *et al.* (2008) a Figueras *et al.* (2012). V prvním kroku této metody byly vytvořeny amplikony shodné velikosti 1026 bp pro následné restriční štěpení restričními enzymy. Elektroforetický záznam vzniklých PCR produktů je zobrazen na **Obrázku 15**.



Obrázek 15 Elektroforetický záznam PCR produktů o velikosti 1026 bp.

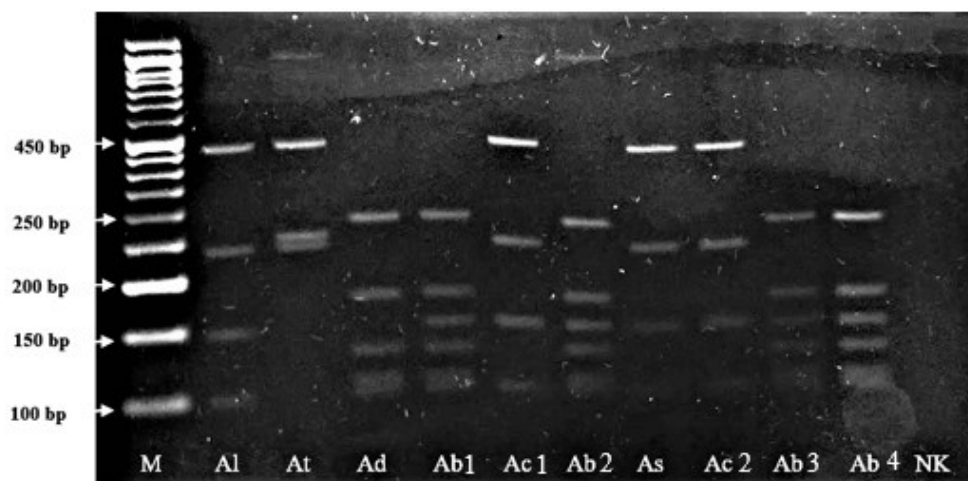
Pozn.: M – DNA marker; Al – *Al. lanthieri* LMG 28517; At – *Al. thereius* LMG 24488; Ad – *P. defluvii* LMG 25694; Ab1 – *Al. butzleri* UPa 2013/30; Ac1 – *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13; Ab2 – *Al. butzleri* UPa Ab KK; As – *Al. skirrowii* LMG 6621; Ac2 – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; Ab3 – *Al. butzleri* LMG 10828; Ab4 – *Al. butzleri* CCUG 30484; NK – negativní kontrola.

Během prvního restričního štěpení byla použita restriční endonukleáza *MseI*. Vzniklé RFLP profily jsou zobrazeny na **Obrázku 16**. Z těchto výsledků je patrné, že nelze rozlišit druhy *Al. lanthieri*, *Al. thereius* a *Al. butzleri* na základě shodných RFLP profilů po *MseI* štěpení. Proto bylo provedeno druhé restriční štěpení restriční endonukleázou *MnII*. Vzniklé RFLP profily po druhém restričním štěpení jsou zobrazeny na **Obrázku 17**. Zde je již patrný rozdíl v RFLP profilech mezi jednotlivými druhy *Arcobacter*-like species. Vzhledem k tomu, že byly druhy *Arcobacter*-like species identifikovány po použití restriční endonukleázy *MseI* nebo *MnII*, nebylo zapotřebí provádět restriční štěpení enzymem *BfaI*, které je nutné použít pro odlišení *P. defluvii*, *P. suis*, *Al. cryaerophilus* a *Al. trophiarum* (Figueras *et al.*, 2012). Výsledky identifikace všech sbírkových kmenů a vzorků izolace z různých prostředí metodou 16S rRNA PCR-RFLP je zaznamenány v **Tabulce 11**.



Obrázek 16 Elektroforetický záznam RFLP profilů po štěpení restrikční endonukleázou *Mse*I.

Pozn.: M – DNA marker; *Al* – *Al. lanthieri* LMG 28517; *At* – *Al. thereius* LMG 24488; *Ad* – *P. defluvii* LMG 25694; *Ab1* – *Al. butzleri* UPa 2013/30; *Ac1* – *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13; *Ab2* – *Al. butzleri* UPa Ab KK; *As* – *Al. skirrowii* LMG 6621; *Ac2* – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; *Ab3* – *Al. butzleri* LMG 10828; *Ab4* – *Al. butzleri* CCUG 30484; NK – negativní kontrola.



Obrázek 17 Elektroforetický záznam RFLP profilů po štěpení restrikční endonukleázou *Mnl*I.

Pozn.: M – DNA marker; *Al* – *Al. lanthieri* LMG 28517; *At* – *Al. thereius* LMG 24488; *Ad* – *P. defluvii* LMG 25694; *Ab1* – *Al. butzleri* UPa 2013/30; *Ac1* – *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13; *Ab2* – *Al. butzleri* UPa Ab KK; *As* – *Al. skirrowii* LMG 6621; *Ac2* – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; *Ab3* – *Al. butzleri* LMG 10828; *Ab4* – *Al. butzleri* CCUG 30484; NK – negativní kontrola.

Tabulka 13 Výsledky identifikace sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí metodikou 16S rRNA PCR-RFLP.

Označení kmene	Identifikovaný druh
<i>Arcobacter butzleri</i> LMG 10828	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 3933	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter cryaerophilus</i> CCM 7050	<i>Al. cryaerophilus</i>
<i>Arcobacter lanthieri</i> LMG 28517	<i>Al. lanthieri</i>
<i>Arcobacter defluvii</i> LMG 25694	<i>P. defluvii</i>
<i>Arcobacter skirrowii</i> LMG 6621	<i>Al. skirrowii</i>
<i>Arcobacter butzleri</i> CCUG 30484	<i>Al. butzleri</i>
<i>Arcobacter thereius</i> LMG 24488	<i>Al. thereius</i>
UPa KK	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/1d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3a	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3b	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3c	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3d	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3e	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2022/3f	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/30	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2013/13	<i>Al. cryaerophilus</i>
UPa 2021/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/3	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/5	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/9	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/12	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/13	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2021/15	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/1	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/2	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/4	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/6	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/7	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/10	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/11	<i>Al. butzleri</i>
UPa 2023/12	<i>Al. butzleri</i>

Pozn.: CCUG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Göteborg ve Švédsku; LMG – Sběrka mikroorganismů Univerzity Gent v Belgii; CCM – Česká sbírka mikroorganismů Masarykovy univerzity v Brně; UPa – sbírka mikroorganismů Univerzity Pardubice; KK – kuřecí krk; *Al.* – *Aliarcobacter*.

Tato metoda byla poprvé popsána ve studii Figueras *et al.* (2008) pro identifikaci šesti druhů *Arcobacter*-like species. Zároveň jak bylo popsáno výše, protokoly *mPCR* dle Houf *et al.* (2000) a Doudah *et al.* (2010) neposkytovaly přesné výsledky při identifikaci těchto nových druhů arkobakterů (Figueras *et al.*, 2008). Jelikož ale nebylo možné identifikovat všechny nové druhy *Arcobacter*-like species při použití pouze restrikční endonuklázy *MseI*, byla tato metoda aktualizována. Přidání restrikčního štěpení enzymy *MnII* a *BfaI* tak zajistilo identifikaci všech popsaných druhů arkobakterů (Figueras *et al.*, 2010). Ve většině studií pro identifikaci arkobakterů je použita jedna z výše uvedených *mPCR* s metodou 16S rRNA PCR-RFLP. Ve studii Collado *et al.* (2009) byla provedena identifikaci izolovaných suspektních kolonií arkobakterů ze vzorků masa a měkkýšů metodou *mPCR* dle Houf *et al.* (2000). Výsledky identifikace metodou *mPCR* ale byly vcelku nepřesné u některých kmenů. Až právě identifikace metodou 16S rRNA PCR-RFLP byla vyhodnocena jako přesná na základě rozdílných RFLP profilů mezi jednotlivými izolovanými druhy arkobakterů (Collado *et al.*, 2009). Podobné schéma bylo aplikováno ve studii Cruzado-Bravo *et al.* (2020) při identifikaci *Arcobacter*-like species ze vzorků mléka v Brazílii. Izolované suspektní kolonie arkobakterů byly napřed identifikovány *mPCR*. Načež neprůkazné výsledky byly následně identifikovány právě metodou 16S rRNA PCR-RFLP (Cruzado-Bravo *et al.*, 2020). Na základě studií, a ze získaných výsledků tak vyplývá, že se jedná o spolehlivou, jednoduchou a rychlou molekulárně-biologickou metodu ze tří výše popsaných metod pro identifikaci *Arcobacter*-like species (Collado a Figueras, 2011; Levican a Figueras, 2013).

3.5. Typizace arkobakterů na základě profilu mastných kyselin

3.5.1. Optimalizace metody stanovení profilu mastných kyselin

Nejprve byla optimalizována metoda přípravy FAME pro analýzu mastných kyselin metodou GC-FID. Předmětem optimalizace bylo testování množství bakteriální kultury pro přípravu buněčné suspenze. V první fázi byla připravena buněčná suspenze pouze orientační buněčné density, a to na základě vnesení určitého počtu kalibrovaných očkovacích kliček s mikrobiální kulturou (1, 2 nebo 3 kličky). Tímto postupem však nebyl znám počet bakteriálních buněk v připravené buněčné suspenzi. Z tohoto důvodu byla připravena přesněji definovaná buněčná suspenze kmenů *Arcobacter*-like species, která odpovídala 3. stupni McFarlandovy zákalové stupnice (odpovídající hustotě buněk 9×10^8 CFU/ml). Tímto postupem bylo známo množství buněk u všech analyzovaných arkobakterů pro analýzu, které bylo kontrolováno i kultivačním postupem (vyočkováním příslušného ředění na kultivační médium).

Pro dvojnásobnou extrakci mastných kyselin ze suspenze buněk byly testovány směsi chloroformu a methanolu a hexanu a chloroformu. K suspenzi buněk byly přidávány 4 ml směsi, prvně v poměru 2:1 (v/v), a poté 9:1 (v/v). Výsledky jsou uvedeny v **Tabulce 14**. Z výsledků je patrné, že lepší extrakce bylo dosaženo se směsí chloroformu a methanolu, proto byla tato směs vybrána pro následné analýzy v této studii.

Při přípravě methylesterů bylo testováno, zda přidavek antioxidačního činidla, BHT, zabrání oxidaci PUFA. Při použití 1 % roztoku bylo pozorováno rozmývání čela píku BHT (přesycení kolony), proto musela být koncentrace snížena na 0,1 %. Výsledky naznačují, že přidavek BHT vede ke snížení oxidace PUFA (**Tabulka 15**).

Tabulka 14 Porovnání profilu mastných kyselin u vybraných sbírkových kmenů *Arcobacter*-like species při extrakci směsí chlorofomu s methanolem a hexanu s methanolem, n=3.

Methylester mastné kyseliny	t _R [min]	<i>Ac</i>	<i>Ab</i>	<i>Ac</i>	<i>Ab</i>
		Zastoupení MK [% ± SD]			
		Extrakce chloroform-methanol		Extrakce hexan-methanol	
Hexanová	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–
Dekanová	15,31	–	0,03±0,01	–	–
Undekanová	–	–	–	–	–
Dodekanová	17,26	0,17±0,01	–	0,27±0,12	0,35±0,29
Tridekanová	18,03	0,05±0,04	0,96±0,56	1,85±0,92	–
Tetradekanová	19,1	1,18±0,05	0,11±0,12	–	5,02±1,38
(Z)-9-tetradecenová	19,87	0,04±0,01	5,57±2,66	–	–
Pentadekanová	20,04	0,22±0,02	0,04±0,02	0,28±0,15	0,40±0,11
(Z)-10-pentadecenová	20,74	0,06±2,83	0,06±2,83	0,05±0,08	0,04±0,06
Hexadekanová	21,05	53,12±0,13	37,80±26,74	45,85±7,03	16,47±23,29
(Z)-9-hexadecenová	21,76	7,76±0,49	12,75±5,45	1,42±1,02	1,23±0,32
Heptadekanová	22,09	0,33±0	0,38±0,15	0,06±2,83	0,06±2,83
(Z)-10-heptadecenová	22,87	0,06±0,04	40,19±13,37	–	63,08±17,81
Oktadekanová	23,29	35,67±0,65	0,46±0,22	33,27±10,94	0,16±0,11
(E)-9-oktadecenová	23,87	0,17±0,02	0,40±0,15	–	1,00±10,38
(Z)-9-oktadecenová	24,09	0,29±0,02	0,05±0,02	12,87±15,82	0,64±0,28
(E,E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–
(ZZ)-oktadeka-9,12-dienová	25,37	0,05±0,02	–	2,56±3,15	1,13±0,29
Ikosanová	26,11	0,42±0,01	–	0,64±0,07	0,02±0,01
(Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	27,06	0,01±0	0,06±0,02	0,10±0,13	0,10±0,07
(Z)-11-ikosanová	–	–	–	–	–
Heneikosanová	27,83	0,03±0,02	0,23±0,07	0,02±0,02	0,45±0,19
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–
Dokosanová	29,8	0,21±0,01	0,13±0,07	0,24±0,03	0,20±0,06
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	31,17	0,15±0,01	–	0,11±0,08	0,19±0,06
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	34,57	0,08±3,77	–	0,11±0,03	–
(Z)-15-tetrakosanová	36,44	0,03±0,01	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; *Ab* – *Al. butzleri* LMG 10828; *Ac* – *Al. cryaerophilus* CCM 3933.

Tabulka 15 Porovnání výsledků stanovení profilu mastných kyselin s přidáním přídavkem a bez přídavku butylovaného hydroxytoluenu do extrakčního činidla směsi, n=3.

Methylester mastné kyseliny	t _R [min]	Ac	Al	Ac	Al
		Zastoupení MK [% ± SD]			
		Bez BHT		Přídavek BHT	
Hexanová	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–
Dekanová	15,96	–	–	0,64±0,32	0,69±0,35
Undekanová	–	–	–	–	–
Dodekanová	17,96	–	–	0,63±0,32	0,47±0,24
Tridekanová	–	–	–	–	–
Tetradekanová	–	–	–	–	–
(Z)-9-tetradecenová	–	–	–	–	–
Pentadekanová	20,8	4,49±2,25	3,51±0,11	3,28±2,25	3,73±0,11
(Z)-10-pentadecenová	–	–	–	–	–
Hexadekanová	21,73	56,45±1,05	54,67±0,28	54,3±1,05	54,11±0,28
(Z)-9-hexadecenová	22,5	2,81±1,76	2,37±0,33	6,33±1,76	3,03±0,33
Heptadekanová	22,8	–	–	0,16±0,08	–
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–
Oktadekanová	24,00	36,3±0,86	39,45±1,11	34,59±0,86	37,23±1,11
(E)-9-oktadecenová	24,61	–	–	–	0,74±0,37
(Z)-9-oktadecenová	–	–	–	–	–
(E,E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–
(Z,Z)-oktadeka-9,12-dienová	–	–	–	–	–
Ikosanová	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosanová	27,97	–	–	0,27±0,14	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–
Dokosanová	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; Ac – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; Al – *Al. lanthieri* LMG 28517.

3.5.2. Určení profilu mastných kyselin *Arcobacter-like species*

Analýzou GC-FID byl určen profil mastných kyselin sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různého prostředí. Výsledné profily mastných kyselin (šesti sbírkových kmenů *Arcobacter-like species* *Al. cryaerophilus*, *Al. lanthieri*, *P. defluvii*, *Al. thereius*, *Al. skirrowii* a *Al. butzleri*) jsou uvedeny v **Tabulce 16**. U všech sbírkových kmenů arkobakterů byly identifikovány tři hlavní mastné kyseliny (pentadekanová, palmitová, stearová). Nejvyšší zastoupení bylo pozorováno v případě kyseliny palmitové, a to zpravidla převyšující 50 % z celkového obsahu mastných kyselin. U všech sbírkových kmenů bylo také zjištěno významné zastoupení kyseliny stearové (30 % z celkového obsahu mastných kyselin). Zastoupení kyseliny pentadekanové bylo pozorováno pod 10 %.

U kmene *Al. butzleri* LMG 10828 byla identifikována kyselina palmitoolejová v koncentraci převyšující 7 %. Tato kyselina byla identifikována také u dalších čtyř sbírkových kmenů arkobakterů, avšak u těchto kmenů bylo zastoupení nižší 6 %. Pouze u kmene *P. defluvii* LMG 25695 nebyla kyselina palmitoolejová identifikována.

U kmene *Al. butzleri* LMG 10828 nebyly detekovány kyselina kaprinová, undekanová a laurová. Oproti tomu u kmene *Al. thereius* LMG 24488 byla detekována kyselina undekanová téměř ve 2 %. Tyto mastné kyseliny byly u dalších sbírkových kmenů arkobakterů detekovány, avšak nepřevyšovaly 1 %. U kmene *Al. cryaerophilus* CCM 7050 byla jako u jediného kmene detekována kyselina heptadekanová (0,16 %) a (Z)-11-eikosenová (0,27 %).

Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter-like species* izolovaných z různého prostředí (UPa) jsou uvedeny v **Tabulce 17-21**. Na základě předchozí identifikace kmenů molekulárně-biologickými metodami lze konstatovat, že se téměř ve všech případech jednalo o *Al. butzleri* a pouze jeden kmen byl identifikován jako *Al. cryaerophilus* (*Al. cryaerophilus* UPa 2013/13). U těchto izolovaných kmenů arkobakterů bylo detekováno 13 mastných kyselin, což je více než u předchozích šesti sbírkových kmenů arkobakterů. Avšak i u těchto kmenů bylo detekováno dominantní zastoupení dvou mastných kyselin (kyseliny palmitové a stearové) u všech kmenů arkobakterů. Zastoupení kyseliny pentadekanové bylo nižší než 7 %. U kmenů identifikovaných molekulárně-biologickými metodami jako druh *Al. butzleri* dominovala kyselina palmitoolejová. Také u těchto kmenů identifikovaných jako druh *Al. butzleri* bylo pozorováno zastoupení kyseliny kaprinové, undekanové a laurové. U kmene *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13 nebylo pozorováno zastoupení kyseliny

(Z)-11-eikosenové. U obou kmenů bylo pozorováno zastoupení kyseliny dokosanové. U kmene *Al. butzleri* UPa 2021/3 bylo detekováno zastoupení kyseliny dokosanové vyšší než 5 %.

Z výsledků analýzy zastoupení mastných kyselin u arkobakterů jsou kyselina palmitová a stearová dominantní u všech kmenů. Možnou identifikaci kmene *P. defluvii* lze předpokládat na základě kyseliny palmitoolejové, která u tohoto kmene nebyla detekována. Lze také předpokládat možnou identifikaci kmene *Al. butzleri* na základě detekce kyseliny dokosanové. Možnost identifikovat kmen *Al. cryaerophilus* detekcí kyseliny heptadekanové a (Z)-11-eikosenové je ovšem diskutabilní. Na základě výsledků z analýzy sbírkových kmenů arkobakterů z různého prostředí byla kyselina heptadekanová detekována u kmene *Al. butzleri*. Kyselina (Z)-11-eikosenová nebyla detekována u kmene *Al. cryaerophilus*, takže pro možnost identifikace na základě zastoupení této kyseliny je důležité provést další analýzy a potvrdit tuto úvahu. Pro ověření všech získaných výsledků je však důležité provést další analýzy ve více opakování pro porovnání s výsledky sbírkových kmenů *Arcobacter*-like species a dalšími druhy arkobakterů.

Tabulka 16 Výsledky určení profilu mastných kyselin sbírkových kmenů *Arcobacter*-like species metodou GC-FID, n=3.

		<i>Ac</i>	<i>Al</i>	<i>Ad</i>	<i>At</i>	<i>As</i>	<i>Ab</i>
Methylester mastné kyseliny	t_R [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,96	0,64±0,32	0,69±0,35	0,82±0,41	0,62±0,31	0,45±0,23	–
Undekanová	16,99	–	–	–	1,81±0,91	0,76±0,38	–
Dodekanová	17,95	0,63±0,32	0,47±0,24	0,54±0,27	0,4±0,03	–	–
Tridekanová	–	–	–	–	–	–	–
Tetradekanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-9-tetradecenová	–	–	–	–	–	–	–
Pentadekanová	20,77	3,28±0,61	3,73±0,11	4,23 ± 0,26	6,79±1,50	4,26±0,23	4,7±2,35
(Z)-10-pentadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Hexadekanová	21,73	54,3±1,05	54,11±0,28	56,61±2,24	53,35±1,66	50,39±1,70	56,17±0,21
(Z)-9-hexadecenová	22,47	6,33±1,76	3,03±0,33	–	4,16±2,08	6,2±1,42	7,52±2,02
Heptadekanová	22,80	0,16±0,08	–	–	–	–	–
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,99	34,59±0,86	37,23±1,11	37,79±0,81	31,6±7,05	36,74±0,69	31,61±15,37
(E)-9-oktadecenová	24,60	–	0,74±0,37	–	1,27±0,64	1,16±58	–
(Z)-9-oktadecenová	–	–	–	–	–	–	–
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z)-oktadeka-9,12-dienová	–	–	–	–	–	–	–
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosenová	27,97	0,27±0,14	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-dokosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; *Ac* – *Al. cryaerophilus* CCM 7050; *Al* – *Al. lanthieri* Al LMG 28517; *Ad* – *P. defluvii* Ad LMG 25695; *At* – *Al. theerius* At LMG 24488; *As* – *Al. skirrowii* As LMG 6621; *Ab* – *Al. butzleri* Ab LMG 10828.

Tabulka 17 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species z různých vzorků (UPa 2022/1 – UPa 2022/3b) metodou GC-FID, n=3.

		UPa 2022/1a	UPa 2022/1b	UPa 2022/1c	UPa 2022/1d	UPa 2022/3a	UPa 2022/3b
Methylester mastné kyseliny	t _R [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,96	–	0,73±0,05	0,8±0,01	0,815±0,01	1,52±0,01	0,52±0,1
Undekanová	–	–	–	–	–	–	–
Dodekanová	–	–	–	–	–	–	–
Tridekanová	18,88	–	–	–	0,45±0,02	0,54±0,06	0,36±0,07
Tetradekanová	19,76	2,70±0,17	2,71±0,70	2,87±0,24	2,51±0,16	1,30±0,05	2,02±0,65
(Z)-9-tetradecenová	–	–	–	–	–	–	–
Pentadekanová	20,76	2,41±0,12	2,23±0,27	1,33±0,20	1,52±0,76	2,77±0,56	0,89±0,05
(Z)-10-pentadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Hexadekanová	21,72	48,28±0,29	48,38±0,58	48,69±0,76	45,67±2,75	49,96±0,19	49,15±2,01
(Z)-9-hexadecenová	22,46	4,55±0,04	5,87±1,24	7,02±0,26	4,56±2,17	6,44±0,38	4,08±1,21
Heptadekanová	22,72	3,02±0,45	2,15±0,15	1,26±0,05	1,52±0,15	1,59±0,23	0,90±0,04
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,98	36,83±0,92	36,88±1,11	37,2±1,23	41,02±0,86	34,69±0,43	41,50±0,17
(E)-9-oktadecenová	24,54	0,55±0,28	–	–	4,18±2,09	0,55±0,12	0,28±0,14
(Z)-9-oktadecenová	–	–	–	–	–	–	–
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z) -oktadeka-9,12-dienová	–	–	–	–	–	–	–
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosenová	–	–	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	30,93	1,94±0,25	1,07±0,49	0,84±0,23	0,63±0,10	–	0,47±0,35
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; UPa – Univerzita Pardubice.

Tabulka 18 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species z různých vzorků (UPa 2022/3c – UPa 2022/3f, UPa 2013/13, UPa 201/13) metodou GC-FID, n=3.

		UPa 2022/3c	UPa 2022/3d	UPa 2022/3e	UPa 2022/3f	UPa 2013/13	UPa 2013/30
Methylester mastné kyseliny	tr [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,96	0,74±0,38	0,72±0,05	0,85±0,02	1,08±0,06	1,26±0,08	1,02±0,38
Undekanová	–	–	–	–	–	–	–
Dodekanová	–	–	–	–	–	–	–
Tridekanová	18,88	0,2±0,10	–	0,38±0,19	–	0,55±0,06	0,46±0,23
Tetradekanová	19,76	2,20±0,36	2,99±0,41	2,49±0,14	1,79±0,09	2,32±0,51	2,68±0,64
(Z)-9-tetradekanová	20,54	0,42±0,02	0,31±0,16	0,39±0,20	0,47±0,20	0,99±0,61	0,59±0,05
Pentadekanová	20,76	1,49±0,59	1,43±0,07	1,73±0,06	1,76±0,72	1,3±0,65	1,24±0,03
(Z)-10-pentadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Hexadekanová	21,71	44,15±3,58	48,99±1,09	49,26±0,14	46,72±3,00	49,78±1,78	48,04±1,97
(Z)-9-hexadecenová	22,45	3,49±1,31	5,48±1,27	5,95±1,10	5,62±0,51	3,83±1,29	3,59±0,33
Heptadekanová	22,72	1,49±0,31	1,90±0,19	2,10±0,29	1,57±0,13	1,51±0,04	2,06±0,01
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,97	44,78±5,91	37,18±2,37	36,50±1,52	34,17±3,16	37,90±2,53	38,84±0,66
(E)-9-oktadecenová	24,57	0,21±0,06	–	0,47±0,24	0,35±0,03	0,84±0,25	–
(Z)-9-oktadecenová	–	–	–	–	–	–	–
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z) -oktadeka-9,12-dienová	–	–	–	–	–	–	–
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosenová	–	–	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	30,92	0,97±0,03	0,90±0,08	1,00±0,17	–	0,8±0,40	1,73±1,57
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: tr – retenční čas; UPa – Univerzita Pardubice.

Tabulka 19 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species z různých vzorků (UPa KK, UPa 2021/1 – UPa 2021/9) metodou GC-FID, n=3.

		UPa KK	UPa 2021/1	UPa 2021/3	UPa 2021/5	UPa 2021/7	UPa 2021/9
Methylester mastné kyseliny	t _R [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,95	0,94±0,02	0,34±0,19	0,13±0,01	0,18±0,06	0,16±0,01	0,15±0,01
Undekanová	16,92	–	1,77±0,13	1,46±0,04	1,76±0,45	1,62±0,05	1,58±0,11
Dodekanová	17,89	–	0,23±0,12	0,16±0,09	0,44±0,17	0,39±0,07	0,26±0,13
Tridekanová	–	–	–	–	–	–	–
Tetradekanová	19,76	2,14±0,30	1,84±0,21	1,95±0,43	2,95±0,99	2,06±0,03	1,45±0,25
(Z)-9-tetradecenová	20,54	0,5±0,25	0,72±0,12	0,68±0,10	0,64±0,27	0,77±0,05	0,85±0,02
Pentadekanová	20,74	0,67±0,33	1,47±0,98	1,04±0,09	1,90±1,76	0,21±0,11	0,17±0,09
(Z)-10-pentadecenová	21,48	–	–	0,87±0,44	–	–	0,58±0,06
Hexadekanová	21,72	48,64±1,19	46,81±0,92	42,78±2,33	57,40±13,88	49,43±0,04	46,08±1,07
(Z)-9-hexadecenová	22,46	5,02±0,09	8,05±0,35	3,75±0,69	9,74±4,87	9,35±0,29	6,0±0,67
Heptadekanová	22,84	1,57±0,50	0,87±0,44	0,99±0,21	0,66±0,15	0,68±0,06	0,76±0,01
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,98	39,92±0,76	33,71±0,71	39,94±0,02	18,87±18,06	34,39±0,21	39,26±0,71
(E)-9-oktadecenová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-9-oktadecenová	24,87	–	4,22±0,32	0,60±0,29	0,35±0,01	0,25±0,04	0,67±0,05
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z)-oktadeka-9,12-dienová	26,08	–	–	–	–	–	1,07±0,54
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	30,93	0,88±0,09	–	5,95±2,76	2,76±1,63	0,37±0,19	1,67±1,32
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheptaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; UPa – Univerzita Pardubice.

Tabulka 20 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species z různých vzorků (UPa 2021/10 – UPa 2021/15, UPa 2023/1) metodou GC-FID, n=3.

		UPa 2021/10	UPa 2021/11	UPa 2021/12	UPa 2021/13	UPa 2021/15	UPa 2023/1
Methylester mastné kyseliny	t _R [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,94	0,13±0,02	0,13±0,07	0,13±0,07	0,12±0,01	0,11±0,02	0,09±0,02
Undekanová	16,93	1,18±0,06	1,43±0,72	1,33±0,03	0,78±0,64	1,10±0,10	0,88±0,05
Dodekanová	17,89	0,41±0,03	0,41±0,07	0,27±0,02	–	0,39±0,20	0,41±0,01
Tridekanová	–	–	–	–	–	–	–
Tetradekanová	19,76	2,64±0,39	2,32±0,06	1,91±0,96	1,52±0,03	3,35±0,72	2,56±0,41
(Z)-9-tetradekanová	20,56	0,60±0,10	0,59±0,09	0,54±0,27	0,59±0,01	0,45±0,04	0,27±0,02
Pentadekanová	20,71	1,51±0,94	0,17±0,05	0,50±0,23	0,16±0,08	2,15±0,29	1,16±0,07
(Z)-10-pentadekanová	21,47	0,47±0,01	0,50±0,07	0,36±0,11	0,35±0,18	0,40±0,06	0,37±0,02
Hexadekanová	21,72	45,31±0,01	47,42±0,03	47,86±0,01	47,38±0,50	45,62±1,43	43,57±1,54
(Z)-9-hexadecenová	22,46	10,42±0,19	7,66±0,09	9,70±0,02	13,61±1,11	4,64±0,71	8,55±0,68
Heptadekanová	22,84	0,51±0,07	0,62±0,12	1,66±0,17	1,22±0,45	1,59±0,20	1,36±0,34
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,98	34,76±1,80	35,14±0,06	31,01±0,34	31,46±1,17	37,06±0,03	36,06±1,14
(E)-9-oktadecenová	24,51	–	–	–	–	–	–
(Z)-9-oktadecenová	24,80	0,60±0,07	2,74±0,16	3,62±0,83	3,06±0,15	2,13±0,41	3,59±1,35
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z) -oktadeka-9,12-dienová	26,08	–	–	1,12±0,07	–	0,81±0,09	–
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosenová	–	–	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	30,94	1,50±0,04	0,78±0,07	–	–	0,83±0,42	0,56±0,40
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: t_R – retenční čas; UPa – Univerzita Pardubice.

Tabulka 21 Výsledky určení profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species z různých vzorků (UPa 2023/2 – UPa 2023/11) metodou GC-FID, n=3.

		UPa 2023/2	UPa 2023/4	UPa 2023/6	UPa 2023/7	UPa 2023/10	UPa 2023/11
Methylester mastné kyseliny	tr [min]	Zastoupení MK [% ± SD]					
Hexanová	–	–	–	–	–	–	–
Oktanová	–	–	–	–	–	–	–
Dekanová	15,99	0,42±0,30	0,60±0,05	0,76±0,24	0,68±0,18	0,89±0,06	0,59±0,05
Undekanová	16,95	1,70±0,34	1,31±0,17	1,67±0,01	1,67±0,78	0,87±0,03	0,62±0,31
Dodekanová	17,90	0,43±0,06	0,36±0,18	0,21±0,11	0,21±0,11	0,42±0,21	0,31 ± 0,04
Tridekanová	18,89	2,33±1,17	–	–	–	–	–
Tetradekanová	19,76	1,85±0,05	1,98±0,50	1,41±0,01	3,34±0,66	2,59±0,75	1,64±0,31
(Z)-9-tetradecenová	–	0,37±0,19	–	–	–	0,42±0,21	0,35±0,18
Pentadekanová	20,76	1,99±0,07	2,5±1,25	1,67±0,17	1,00±0,88	1,20±0,90	2,11±1,06
(Z)-10-pentadecenová	21,47	0,33±0,17	0,41±0,21	0,57±0,29	3,47±3,09	0,47±0,24	0,55±0,28
Hexadekanová	21,71	44,17±1,24	45,27±0,56	43,83±2,01	42,89±2,08	46,38±0,96	44,82±1,97
(Z)-9-hexadecenová	22,45	8,76±3,29	9,42±0,89	8,26±1,67	9,00±1,81	7,26±1,46	6,87±0,87
Heptadekanová	22,78	1,30±0,06	3,03±0,41	2,04±0,25	1,42±0,19	2,8±0,21	3,18±0,06
(Z)-10-heptadecenová	–	–	–	–	–	–	–
Oktadekanová	23,97	34,47±3,04	32,43±2,87	35,82±3,20	34,51±5,24	34,34±1,67	38,29±2,60
(E)-9-oktadecenová	24,56	–	–	–	–	–	0,61±0,31
(Z)-9-oktadecenová	24,80	2,63±0,15	3,97±1,19	3,67±0,24	1,28±0,64	1,78±0,25	1,57±0,15
(E, E)-9,12-oktadekadienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z) -oktadeka-9,12-dienová	26,11	0,70 ±0,35	0,72±0,36	–	–	–	0,61±0,31
Ikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z, Z,Z)-6,9,12-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z,Z,Z)-9,12,15-oktadekatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11-ikosenová	–	–	–	–	–	–	–
Heneikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-11,14-ikosadienová	–	–	–	–	–	–	–
Dokosanová	30,93	0,87±0,44	–	0,71±0,36	0,83±0,42	1,61±0,81	–
(Z,Z,Z)-8,11,14-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
11,14,17-ikosatrienová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13-dokosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14-ikosatetraenová	–	–	–	–	–	–	–
Trikosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-13,16-docosadienová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-5,8,11,14,17-ikosapentaenová	–	–	–	–	–	–	–
Tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(Z)-15-tetrakosanová	–	–	–	–	–	–	–
(all-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosahexaenová	–	–	–	–	–	–	–

Pozn.: tr – retenční čas; UPa – Univerzita Pardubice.

Jedna z prvních analýz methylesterů mastných kyselin arkobakterů byla provedena ve studii Vandamme *et al.* (1992). Hlavními mastnými kyselinami byly určeny kyselina laurová, myristová, palmitová, palmitoolejová a olejová (Vandamme *et al.*, 1992). Ve studii Jelínek *et al.* (2006) byl určen profil mastných kyselin metodou GC-MS pro čtyři druhy *Arcobacter*-like species (*Al. cryarophilus*, *Al. butzleri*, *Al. skirrowii* a *A. nitrofigilis*). Jako hlavní mastné kyseliny byly určeny kyselina myristová, palmitová, palmitoolejová, stearová a olejová. Avšak v naší studii nebyla kyselina myristová, palmitoolejová a olejová určena jako dominantní mastné kyseliny. Navíc kyselina palmitoolejová byla nejvíce zastoupena u kmene *Al. butzleri*. Ve studii Jelínek *et al.* (2006) bylo identifikováno celkem 21 mastných kyselin u kmenů *Al. butzleri*. Jednalo se o nasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (kyselina dokosanová, trikosanová a tetrakosanová), které však nebyly identifikovány u zbylých arkobakterů. V porovnání s výsledky této diplomové práce, tak z nasycených mastných kyselin s dlouhým řetězcem byla určena jen kyselina dokosanová u kmenů arkobakterů izolovaných z různého prostředí. I když byla tato kyselina detekována i u kmene *Al. cryaerophilus* UPa 2013/13, koncentrace této mastné kyseliny byla nižší než 1 %. Avšak výsledky zastoupení kyseliny dokosanové u kmene *Al. butzleri* jsou shodné s výsledky studie Jelínek *et al.* (2006).

U druhu *M. marinus* izolovaného z mořského prostředí byl určen profil mastných kyselin pro identifikaci šesti druhů arkobakterů (*Al. butzleri*, *Al. skirrowii*, *Al. cryaerophilus*, *M. halophilus*, *A. nitrofigilis* a *M. marinus*). V profilu mastných kyselin tohoto druhu byly jako hlavní mastné kyseliny určeny kyselina palmitová, palmitoolejová a olejová. Zastoupení kyseliny palmitoolejové bylo detekováno v nejvyšší koncentraci u druhu *Al. butzleri* a kyselina olejová byla pozorována v nejvyšší koncentraci u druhu *M. marinus* (Kim *et al.*, 2010). Je ale diskutabilní, zda zastoupení kyseliny olejové u druhu *M. marinus* lze použít pro následnou identifikaci tohoto druhu. Je nutné ověřit tyto úvahy dalšími analýzami profilu mastných kyselin *Arcobacter*-like species. Zároveň ale v porovnání výsledků této studie a výše popsanych výsledků diplomové práce vyplývá, že určení kyseliny palmitoolejové by mohlo být použito pro identifikaci druhu *Al. butzleri*.

Rozdíl ve výsledcích různých studií je ovlivněn postupem přípravy methylesterů mastných kyselin a také vlastní metody GC spojené s konkrétním typem detektoru. Jak bylo popsáno v předchozích kapitolách, na stanovení mastných kyselin v buněčných extraktech má vliv mnoho faktorů (teplota kultivace, doba kultivace, kultivační médium, extrakční činidlo, atp.). V této diplomové práci byly tyto podmínky optimalizovány. Avšak v některých dřívějších studiích je uveden pouze výsledek určeného profilu mastných kyselin. Na základě těchto

výsledků nejsou zřejmé veškeré podmínky a pracovní postupy přípravy methylesterů mastných kyselin a stanovení profilu mastných kyselin *Arcobacter*-like species.

U *Campylobacter* spp. byl také pozorováno výskyt kyseliny palmitové a olejové. Avšak mezi hlavními mastnými kyselinami byla určena kyselina tridekanová s koncentrací vyšší než 13 % a pentadekanová s koncentrací vyšší než 33 % z celkového obsahu mastných kyselin (Hughes *et al.*, 2009). Druh *C. jejuni* a *C. coli* bylo možné identifikovat na základě stanovení kyseliny 3-hydroxytridekanové v koncentraci vyšší než 5 % a cyklické nonadecylové v koncentraci vyšší než 10 %. Druhy *C. lari* a *C. fetus* byly identifikovány stanovením vysokého zastoupení kyseliny palmitové v koncentraci vyšší než 35 % a olejové v koncentraci vyšší než 30 %. Zároveň ale nebyla stanovena cyklická nonadecylová kyselina, jako je popsáno u ředchozích dvou druhů kampylobakterů (Lambert *et al.*, 1987). Avšak u výše popsaných výsledků analýzy kmenů *Arcobacter*-like species nebyla u žádného kmene detekována kyselina tridekanová. Zároveň u výsledků profilu mastných kyselin kmenů *Arcobacter*-like species není určena kyselina pentadekanová v koncentraci vyšší než 33 %. Z výše popsaných výsledků stanovení profilu mastných kyselin kampylobakterů je tak možné odlišit kmeny *Arcobacter*-like species od tohoto příbuzného rodu.

U rodu *Helicobacter* bylo určeno zastoupení dvou hlavních mastných kyselin, a to tetradekanové a palmitové (Haque *et al.*, 1996). Ve studii Melito *et al.* (2000) byla provedena identifikace klinických izolátů druhů rodu *Helicobacter*. Druh *H. pullorum* byl identifikován na základě stanovení kyseliny myristové v nejnižší koncentraci ze všech sledovaných kmenů helikobakterů. Oproti tomu druh *H. cinaedi* byl zas identifikován stanovením kyseliny myristové v nejvyšší koncentraci mezi všemi sledovanými kmeny helikobakterů. Při identifikaci druhu *H. muridarum* byla zjištěna kyselina laurová v koncentraci vyšší než 18 % (Melito *et al.*, 2000). Z těchto výsledků je zřejmé, že kmeny *Arcobacter*-like species lze odlišit od bakterií rodu *Helicobacter*, a to na základě rozdílu v obsahu kyseliny laurové a myristové. Tyto mastné kyseliny nejsou určeny ve výsledcích profilu mastných kyselin sbírkových kmenů arkobakterů a kmenů arkobakterů z různých prostředí.

U rodu *Bacteroides* byly mezi hlavními mastnými kyselinami určeny kyselina pentadekanová, 3-hydroxyhexadekanová a 3-hydroxyheptadekanová (Lan *et al.*, 2006). Ve studii Brondz a Olsen (1991) byl identifikován druh *B. gracilis* stanovením kyseliny laurové v koncentraci vyšší než 22 % a stanovením kyseliny myristové v koncentraci vyšší než 28 % z celkového obsahu mastných kyselin. Druh *B. fragilis* byl identifikován určením kyseliny

3-hydroxyheptadecenové v koncentraci 38 % z celkového obsahu mastných kyselin (Brondz a Olsen, 1991). Ve studii Logar *et al.* (2001) byly mezi hlavními mastnými kyselinami druhů rodu *Prevotella* detekovány kyselina pentadekanová a palmitová. Identifikace těchto druhů byla možná na základě pozorování zastoupení unikátních mastných kyselin (kyselina kaprinová a olejová) (Logar *et al.*, 2001).

Z výsledků studií a výše popsaných výsledků u kmenů *Arcobacter*-like species jsou zřejmé rozdíly mezi jednotlivými rody bakterií při identifikaci stanovením profilu mastných kyselin. Proto by tak použití CG-FID nebo GC-MS pro analýzu bakteriálních methylesterů mastných kyselin mohlo poskytnout vysoce citlivou a přesnou metodu pro typizaci bakterií (Jelínek *et al.*, 2006).

4. ZÁVĚR

Teoretická část diplomové práce pojednává o výskytu a patogenitě bakterií *Arcobacter*-like species v různých vzorcích a také o metodách pro izolaci a identifikaci těchto bakterií. Výzkumná část práce je zaměřena na aplikování protokolů molekulárně-biologických metod pro identifikaci arkobakterů z různých vzorků. Stěžejní částí studie je optimalizace metody typizace a identifikace *Arcobacter*-like species určením profilu mastných kyselin pomocí GC-FID. Následně byla tato optimalizovaná metoda použita pro typizaci mnohých kmenů arkobakterů.

V rámci diplomové práce byly použity protokoly *m*PCR dle metodiky Houf *et al.* (2000) a dle Doudah *et al.* (2010) a 16S *r*RNA PCR-RFLP (Doudah *et al.*, 2010; Figueras *et al.*, 2008; Figueras *et al.* 2012; Houf *et al.*, 2000) pro identifikaci arkobakterů izolovaných z různých vzorků. V případě identifikace s použitím protokolů *m*PCR dle Houf *et al.* (2000) a Doudah *et al.* (2010) byly správně identifikovány pouze druhy pro které byly metody popsány. Na základě toho nezajišťovaly tyto metody spolehlivé výsledky při identifikaci všech popsaných druhů *Arcobacter*-like species. Při identifikaci s použitím protokolu 16S *r*RNA PCR-RFLP bylo z výsledných restričních profilů možné identifikovat všechny druhy *Arcobacter*-like species. Ze získaných výsledků tak vyplývalo, že metoda 16S *r*RNA PCR-RFLP poskytovala spolehlivé výsledky pro identifikaci arkobakterů.

V další části diplomové práce byla provedena optimalizace přípravy methylesterů mastných kyselin pro analýzu GC-FID. Připravené methylestery mastných kyseliny šesti sbírkových kmenů a kmenů izolovaných z různých prostředí byly analyzovány s použitím GC-FID. U všech kmenů *Arcobacter*-like species byly detekovány 2 dominantní mastné kyseliny, a to kyselina palmitová a kyselina stearová. Arkobaktery bylo možné identifikovat od dalších bakterií na základě výsledků dřívějších studií, ve kterých byly detekovány dominantní mastné kyseliny těchto bakterií. U kmene *P. defluvii* LMG 25695 nebyla detekována kyselina palmitoolejová, což by mohlo být určitým znakem tohoto druhu. Jelikož bylo u kmene *Al. butzleri* UPa 2021/3 pozorována kyselina dokosanová v relativně vysoké koncentraci, tento druh by mohl být identifikovatelný na základě obsahu právě této mastné kyseliny. Pro potvrzení těchto výsledků je ale důležité provést další analýzy, a to se zahrnutím většího počtu kmenů *Arcobacter*-like species.

Závažným rizikem u bakterií *Arcobacter*-like species jako potencionálních patogenů je jejich rozsáhlý výskyt v různých prostředích. Z výsledků této diplomové práce vyplývá, že protokoly

molekulárně-biologických metod popsané pro identifikaci těchto bakterií mohou poskytovat nepřesné výsledky. Do budoucna je tedy vhodné pokračovat ve studii určování profilu mastných kyselin pro typizaci *Arcobacter*-like species. Kromě optimalizace přípravy methylesterů mastných kyselin je žádoucí provést určení profilu mastných kyselin u všech popsaných druhů *Arcobacter*-like species. Na základě takto získaných výsledků by bylo možné rychle a jednoduše identifikovat všechny popsané druhy *Arcobacter*-like species z různých vzorků.

5. POUŽITÁ LITERATURA

1. **Abay, S., Yaman, A., Karakaya, E., Aydin, F. (2022).** Prevalence and antibacterial susceptibilities of *Arcobacter* spp. and *Campylobacter* spp. from fresh vegetables. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 38(8), 1–9.
2. **Abdelbagi, K., Buissonnière, A., Prouzet-Mauleon, V., Gresser, J., Wesley, I., Mégraud, F., Ménard, A. (2007).** Development of a real-time fluorescence resonance energy transfer PCR to detect *Arcobacter* species. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(9), 3015–3021.
3. **Alispahic, M., Hummel, K., Jandreski-Cvetkovic, D., Nöbauer, K., Razzazi-Fazeli, E., Hess, M., Hess, C. (2010).** Species-specific identification and differentiation of *Arcobacter*, *Helicobacter* and *Campylobacter* by full-spectral matrix-associated laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry analysis. *Journal of Medical Microbiology*. 59(3), 295–301.
4. **Alonso, R., Girbau, C., Martinez-Malaxetxebarria, I., Fernández-Astorga, A. (2014).** Multilocus sequence typing reveals genetic diversity of foodborne *Arcobacter butzleri* isolates in the North of Spain. *International Journal of Food Microbiology*. 191, 125–128.
5. **Assanta, M. A., Roy, D., Lemay, M. J., Montpetit, D. (2002).** Attachment of *Arcobacter butzleri*, a new waterborne pathogen, to water distribution pipe surfaces. *Journal of Food Protection*. 65(8), 1240–1247.
6. **Atabay, H. I., Corry, J. E. (1997).** The prevalence of campylobacters and arcobacters in broiler chicken. *Journal of applied microbiology*. 83(5), 619–626.
7. **Axelsson, M., Gentill, F. (2024).** A single-step method for rapid extraction of total lipids from green microalgae. *PloS One*. 9(2), e89643.
8. **Balouiri, M., Sadiki, M., Ibsouda, S. K. (2016).** Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*. 6(2), 71–79.
9. **Barboza, K., Cubillo, Z., Castro, E., Redondo-Solano, M., Fernández-Jaramillo, H., Echandi, M. L. A. (2017).** First isolation report of *Arcobacter cryaerophilus* from a human diarrhea sample in Costa Rica. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 59, e72.
10. **Bertani, G., Savo Sardaro, M. L., Neviani, E., Lazzi, C. (2019).** AFLP protocol comparison for microbial diversity fingerprinting. *Journal of Applied Genetics*. 60(2), 217–223.

11. **Bligh, E. G., Dyer, W. J. (1959).** A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*. 37(8), 911–917.
12. **Brightwell, G., Mowat, E., Clemens, R., Boerema, J., Pulford, D. J., On, S. L. (2007).** Development of a multiplex and real time PCR assay for the specific detection of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus*. *Journal of Microbiological Methods*. 68(2), 318–325.
13. **Brückner, V., Fiebiger, U., Ignatius, R., Friesen, J., Eisenblätter, M., Höck, M., Alter, T., Bereswill, S., Heimesaat, M. M., Gölz, G. (2020).** Characterization of *Arcobacter* strains isolated from human stool samples: results from the prospective German prevalence study Arcopath. *Gut Pathogens*. 12(1), 3.
14. **Bruegge, J. zur, Hanisch, C., Einspanier, R., Alter, T., Gölz, G., Sharbati, S. (2014).** *Arcobacter butzleri* induces a pro-inflammatory response in THP-1 derived macrophages and has limited ability for intracellular survival. *International Journal of Medical Microbiology*. 304(8), 1209–1217.
15. **Bücker, R., Troeger, H., Kleer, J., Fromm, M., Schulzke, J. D. (2009).** *Arcobacter butzleri* induces barrier dysfunction in intestinal HT-29/B6 cells. *Journal of Infectious Diseases*. 200(5), 756–764.
16. **Çelik, E., Otlu, S. (2020).** Isolation of *Arcobacter* spp. and identification of isolates by multiplex PCR from various domestic poultry and wild avian species. *Annals of Microbiology*. 70(1), 1–7.
17. **Çelik, E., Ünver, A. (2015).** Isolation and identification of *Arcobacter* spp. by multiplex PCR from water sources in Kars region. *Current Microbiology*. 71(5), 546–550.
18. **Collado, L., Cleenwerck, I., van Trappen, S., de Vos, P., Figueras, M. J. (2009).** *Arcobacter mytili* sp. nov., an indoxyl acetate-hydrolysis-negative bacterium isolated from mussels. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(6), 1391–1396.
19. **Collado, L., Guarro, J., Figueras, M. J. (2009).** Prevalence of *Arcobacter* in meat and shellfish. *Journal of food protection*, 72(5), 1102–1106.
20. **Collado, L., Figueras, M. J. (2011).** Taxonomy, epidemiology, and clinical relevance of the genus *Arcobacter*. *Clinical Microbiology Reviews*. 24(1), 174–192.
21. **Collado, L., Levican, A., Perez, J., Figueras, M. J. (2011).** *Arcobacter defluvii* sp. nov., isolated from sewage samples. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61(Pt 9), 2155–2161.

22. **Cruzado-Bravo, M., Barancelli, V. B., Andreote, A. P. D., Salda na, E., Vidal-Veuthey, B., Collado, C., Contreras-Castillo, C. J. (2020).** Occurrence of *Arcobacter* spp. in brazilian Minas frescal cheese and raw cow milk and its association with microbiological and physicochemical parameters. *Food Control*. 190, 106904.
23. **De Boer, E., Tilburg, J. J. H. C., Woodward, D. L., Lior, H., Johnson, W. M. (1996).** A selective medium for the isolation of *Arcobacter* from meats. *Letters in Applied Microbiology*. 23(1), 64–66.
24. **De Carvalho, C. C. C. R., Caramujo, M. J. (2018).** The various roles of fatty acids. *Molecules*. 23(10), 2583.
25. **de Smet, S., Vandamme, P., De Zutter, L., On, S. L. W., Doudiah, L., Houf, K. (2011).** *Arcobacter trophiarum* sp. nov., isolated from fattening pigs. *International journal of systematic and evolutionary mikrobiology*. 61(2), 356–361.
26. **Donachie, S. P., Bowman, J. P., On, S. L. W., Alam, M. (2005).** *Arcobacter halophilus* sp. nov., the first obligate halophile in the genus *Arcobacter*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55(3), 1271–1277.
27. **Doudiah, L., de Zutter, L., Vandamme, P., Houf, K. (2010).** Identification of five human and mammal associated *Arcobacter* species by a novel multiplex-PCR assay. *Journal of Microbiological Methods*. 80(3), 281–286.
28. **Ercolini, D. (2004).** PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. *Journal of Microbiological Methods*. 56(3), 297–314.
29. **Espy, M. J., Uhl, J. R., Sloan, L. M., Buckwalter, S. P., Jones, M. F., Vetter, E. A., Yao, J. D. C., Wengenack, N. L., Rosenblatt, J. E., Cockerill, F. R., Smith, T. F. (2006).**
Real-time PCR in clinical microbiology: Applications for routine laboratory testing. *Clinical Microbiology Reviews*. 19(1), 165–256.
30. **Fera, M. T., Maugeri, T. L., Gugliandolo, C., Beninati, C., Giannone, M., la Camera, E. Carbone, M. (2004).** Detection of *Arcobacter* spp. in the coastal environment of the Mediterranean Sea. *Applied and Environmental Microbiology*. 70(3), 1271–1276.
31. **Ferreira, S., Luís, Â., Oleastro, M., Pereira, L., Domingues, F. C. (2019).** A meta – analytic perspective on *Arcobacter* spp. antibiotic resistance. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. 16, 130–139.
32. **Ferreira, S., Oleastro, M., Domingues, F. (2019).** Current insights on *Arcobacter butzleri* in food chain. *Current Opinion in Food Science*. 26, 9–17.

33. **Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., Domingues, F. C. (2014).** Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*. 76, 19–25.
34. **Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., Domingues, F. C. (2016).** Insights in the pathogenesis and resistance of *Arcobacter*. *Critical Reviews in Microbiology*. 42(3), 364–383.
35. **Figueras, M., Collado, L., Guarro, J. (2008).** A new 16S *r*DNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 62(1), 11–15.
36. **Figueras, M., Levican, A, Collado, L. (2012).** Updated A new 16S *r*DNA-RFLP method for the discrimination of the accepted species of *Arcobacter* spp. *BMC Microbiology*. 12, 292.
37. **Folch, J., Lees, M., Sloane, S. G. (1957).** A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 226(1), 497–509.
38. **Giacometti, F., Lucchi, A., Manfreda, G., Florio, D., Zanoni, R. G., Serraino, A. (2013).** Occurrence and genetic diversity of *Arcobacter butzleri* in an artisanal dairy plant in Italy. *Applied and environmental mikrobiology*. 79(21), 6665–6669.
39. **Giacometti, F., Piva, S., Vranckx, K., de Bruyne, K., Drigo, I., Lucchi, A., Manfreda, G., Serraino, A. (2018).** Application of MALDI-TOF MS for the subtyping of *Arcobacter butzleri* strains and comparison with their MLST and PFGE types. *International Journal of Food Microbiology*. 277, 50–57.
40. **Gobbi, D. D. S., Spindola, M. G., Moreno, L. Z., Matajira, C. E. C., Oliveira, M. G. X., Paixão, R., Ferreira, T. S. P., Moreno, A. M. (2018).** Isolation and molecular characterization of *Arcobacter butzleri* and *Arcobacter cryaerophilus* from the pork production chain in Brazil. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 38(3), 393–399.
41. **Haira, A. K. (1974).** On extraction of acyl and alkyl dihydroxyacetone phosphate from incubation mixture. *Lipids*. 9(8), 502–505.
42. **Haque, M., Hirai, Y., Yokota, K., Mori, N., Jahan, I., Ito, H., Hotta, H., Yano, I., Kanemasa, Y., Oguma, K. (1996).** Lipid profile of *Helicobacter* spp.: Presence of cholesteryl glucoside as a characteristic feature. *Journal of Bacteriology*. 178(7), 2065–2070.
43. **Higgins, R., Messier, S., Daignault, D., Lorange, M. (1999).** *Arcobacter butzleri* isolated from a diarrhoeic non-human primate. *Laboratory Animals*. 33(1), 87–90.

44. **Ho, H. T. K., Lipman, L. J. A., Gaastra, W. (2006).** *Arcobacter*, what is known and unknown about a potential foodborne zoonotic agent! *Veterinary Microbiology*. 115, 1–13.
45. **Houf, K., Devriese, L. A., de Zutter, L., van Hoof, J., Vandamme, P. (2001).** Development of a new protocol for the isolation and quantification of *Arcobacter* species from poultry products. *International Journal of Food Microbiology*. 71(2–3), 189–196.
46. **Houf, K., On, S. L. W., Coenye, T., Debruyne, L., de Smet, S., Vandamme, P. (2009).** *Arcobacter thereius* sp. nov., isolated from pigs and ducks. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59(10), 2599–2604.
47. **Houf, K., Tutenel, A., de Zutter, L., van Hoof, J., Vandamme, P. (2000).** Development of a multiplex PCR assay for the simultaneous detection and identification of *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* and *Arcobacter skirrowii*. *FEMS Microbiology Letters*. 193(1), 89–94.
48. **Hou, T. Y., Chiang-Ni, C., Teng, S. H. (2019).** Current status of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical microbiology. *Journal of Food and Drug Analysis*. 27(2), 404–414.
49. **Hughes, R. A., Hallett, K., Cogan, T., Enser, M., Humphrey, T. (2009).** The response of *Campylobacter jejuni* to low temperature differs from that of *Escherichia coli*. *Applied and environmental mikrobiology*. 75(19), 6292–6298.
50. **Chieffi, D., Fanelli, F., Fusco, V. (2020).** *Arcobacter butzleri*: Up-to-date taxonomy, ecology, and pathogenicity of an emerging pathogen. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 19(4), 2071–2109.
51. **Ichihara, K., Fukubayashi, Y. (2010).** Preparation of fatty acid methyl esters for gas-liquid chromatography. *Journal of Lipid Research*. 51(3), 635–40.
52. **Isidro, J., Ferreira, S., Pinto, M., Domingues, F., Oleastro, M., Gomes, J. P., Borges, V. (2020).** Virulence and antibiotic resistance plasticity of *Arcobacter butzleri*: Insights on the genomic diversity of an emerging human pathogen. *Infection, Genetics and Evolution*, 80, 104213.
53. **Jelinek, D., Miketova, P., Khailova, L., Schram, K. H., Moore, I. M., Vyřasová, J. (2006).** Identification of *Arcobacter* species using phospholipid and total fatty acid profiles. *Folia Microbiologica*. 51, 329–336.
54. **Jensen, S. (2008).** Improved Bligh and Dyer extraction procedure. *Lipid Technology*. 20(12), 280–281.

55. **Johnson, L. G., Murano, E. A. (1999).** Development of a new medium for the isolation of *Arcobacter* spp. *Journal of Food Protection*. 62(5), 456–462.
56. **Karadas, G., Bücker, R., Sharbati, S., Schulzke, J. D., Alter, T., Gözl, G. (2016).** *Arcobacter butzleri* isolates exhibit pathogenic potential in intestinal epithelial cell models. *Journal of Applied Microbiology*. 120(1), 218–225.
57. **Kenkel, J. (2003).** *Analytical Chemistry for Technicians*. 3rd ed. United States of America: Lewis Publishers. ISBN 1-56670-519-3.
58. **Kerkhof, P. J., van den Abeele, A. M., Strubbe, B., Vogelaers, D., Vandamme, P., Houf, K. (2021).** Diagnostic approach for detection and identification of emerging enteric pathogens revisited: the *(Ali)arcobacter lanthieri* case. *New Microbes and New Infections*. 39, 1–7.
59. **Kim, H. M., Hwang, C. Y., Cho, B. C. (2010).** *Arcobacter marinus* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary mikrobiology*. 60(Pt 3), 531–536.
60. **Kokotovic, B., On, S. L. W. (1999).** High-resolution genomic fingerprinting of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* by analysis of amplified fragment length polymorphisms. *FEMS Microbiology Letters*. 173(1), 77–84.
61. **Laishram, M., Rathlavath, S., Lekshmi, M., Kumar, S., Nayak, B. B. (2016).** Isolation and characterization of *Arcobacter* spp. from fresh seafood and the aquatic environment. *International Journal of Food Microbiology*. 232, 87–89.
62. **Lambert, M. A., Patton, C. M., Barrett, T. J., Moss, C. W. (1987).** Differentiation of *Campylobacter* and *Campylobacter*-like organisms by cellular fatty acid composition. *Journal of Clinical Microbiology*. 25(4), 706–713.
63. **Lan, P. T. N., Sakamoto, M., Sakata, S., Benno, Y. (2006).** *Bacteroides barnesiae* sp. nov., *Bacteroides salanitronis* sp. nov. and *Bacteroides gallinarum* sp. nov., isolated from chicken caecum. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 56(Pt 12), 2853–2859.
64. **Larsson, L. (1994).** Determination of microbial chemical markers by gas chromatography – mass spectrometry – potential for diagnosis and studies on metabolism in situ. *APMIS: acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 102(1-6), 161–169.
65. **Lehner, A., Tasara, T., Stephan, R. (2005).** Relevant aspects of *Arcobacter* spp. as potential foodborne pathogen. *International Journal of Food Microbiology*. 102(2), 127–135.

66. **Levican, A., Collado, L., Aguilar, C., Yustes, C., Diéguez, A. L., Romalde, J. L., Figueras, M. J. (2012).** *Arcobacter bivalviorum* sp. nov. and *Arcobacter venerupis* sp. nov., new species isolated from shellfish. *Systematic and applied mikrobiology*. 35(3), 133–138.
67. **Levican, A., Collado, L., Figueras, M. J. (2013).** *Arcobacter cloacae* sp. nov. and *Arcobacter suis* sp. nov., two new species isolated from food and sewage. *Systematic and Applied Microbiology*. 36(1), 22–27.
68. **Levican, A., Figueras, M. J. (2013).** Performance of five molecular methods for monitoring *Arcobacter* spp. *BMC mikrobiology*. 13, 1–7.
69. **Logar, R. M., Zorec, M., Kopečný, J. (2001).** Reliable identification of *Prevotella* and *Butyrivibrio* spp. from rumen by fatty acid methyl ester profiles. *Folia microbiologica*. 46(1), 57–59.
70. **Maddi, B. (2019).** Extraction methods used to separate lipids from microbes. *Methods in molecular biology*, 1995. 151–159.
71. **Maiden, M. C. J., van Rensburg, M. J. J., Bray, J. E., Earle, S. G., Ford, S. A., Jolley, K. A., McCarthy, N. D. (2013).** MLST revisited: the gene-by-gene approach to bacterial genomics. *Nature Reviews Microbiology*. 11(10), 728–736.
72. **Manirakiza, P., Covaci, A., Schepens, P. (2001).** Comparative study on total lipid determination using Soxhlet, Roese-Gottlieb, Bligh & Dyer, and modified Bligh & Dyer extraction methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 14, 93–100.
73. **Markoulatos, P., Siafakas, N., Moncany, M. (2002).** Multiplex polymerase chain reaction: A practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 16(1), 47–51.
74. **Martinez-Malaxetxebarria, I., Girbau, C., Salazar-Sánchez, A., Baztarrika, I., Martínez – Ballesteros, I., Laorden, L., Alonso, R., Fernández-Astorga, A. (2022).** Genetic characterization and biofilm formation of potentially pathogenic foodborne *Arcobacter* isolates. *International Journal of Food Microbiology*. 373, 109712.
75. **Marwal, A., Sahu, A. K., Gaur, R. K. (2014).** *Animal Biotechnology: Models in Discovery and Translation*. 1st ed. United State Of America: Elsevier. ISBN 978-0-12-416002-6.
76. **Melito, P. L., Woodward, D. L., Bernard, K. A., Price, L., Khakhria, R., Johnson, W. M., Rodgers, F. G. (2000).** Differentiation of clinical *Helicobacter pullorum* isolates from related *Helicobacter* and *Campylobacter* species. *Helicobacter*. 5(3), 142–147.
77. **Merga, J. Y., Leatherbarrow, A. J. H., Winstanley, C., Bennett, M., Hart, C. A., Miller, W. G., Williams, N. J. (2011).** Comparison of *Arcobacter* isolation methods, and

- diversity of *Arcobacter* spp. in Cheshire, United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*. 77(5), 1646–1650.
78. **Miller, W. G., Wesley, I. V., On, S. L. W., Houf, K., Mégraud, F., Wang, G., Yee, E., Srijan, A., Mason, C. J. (2009).** First multi-locus sequence typing scheme for *Arcobacter* spp. *BMC Microbiology*. 9(1), 1–10.
 79. **Mottola, A., Bonerba, E., Figueras, M. J., Pérez-Cataluña, A., Marchetti, P., Serraino, A., Bozzo, G., Terio, V., Tantillo, G., di Pinto, A. (2016).** Occurrence of potentially pathogenic arcobacters in shellfish. *Food Microbiology*. 57, 23–27.
 80. **Oliveira, M. G., Pressinotti, L. N., Carvalho, G. S., Oliveira, M. C., Moreno, L. Z., Matajira, C. E., Bergamo, A. S., Aleixo, V. M., Veiga, A. C., de Souza Corsino, E., Christ, A. P., Sato, M. I., Moreno, A. M., Knöbl, T. (2017).** *Arcobacter* spp. in fecal samples from Brazilian farmed caimans (*Caiman yacare*, Daudin 1802). *Tropical animal health and production*. 49(4), 777–782.
 81. **On, S. L. W., Harrington, C. S., Atabay, H. I. (2003).** Differentiation of *Arcobacter* species by numerical analysis of AFLP profiles and description of a novel *Arcobacter* from pig abortions and turkey faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 95(5), 1096–1105.
 82. **On, S., L., W., Miller, W., G., Biggs, P., J., Cornelius, A., J., Vandamme, P. (2020).** A critical rebuttal of the proposed division of the genus *Arcobacter* into six genera using comparative genomic, phylogenetic, and phenotypic criteria. *Systematic and applied mikrobiology*. 43(5), 126108.
 83. **Öngör, H., Çetinkaya, B, Açıık, M. N., Atabay, H. I. (2004).** Investigation of arcobacters in meat and faecal samples of clinically healthy cattle in Turkey. *Letters in Applied Microbiology*. 38(4), 339–344,
 84. **Oviaño, M., Rodríguez-Sánchez, B. (2021).** MALDI-TOF mass spectrometry in the 21st century clinical microbiology laboratory. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica (English Ed.)*. 39(4), 192–200.
 85. **Pejchalová, M., Dostalíková, E., Slámová, M., Brožková, I., Vytrásová, J. (2008).** Prevalence and Diversity of *Arcobacter* spp. in the Czech Republic. *Journal of Food Protection*. 71(4), 719–727.
 86. **Pérez-Cataluña, A., Salas-Massó, N., Diéguez, A. L., Balboa, S., Lema, A., Romalde, J. L., Figueras, M. J. (2018).** Revisiting the taxonomy of the genus *Arcobacter*: getting order from the chaos. *Frontiers in Microbiology*. 9, 2077.

87. **Pérez-Cataluña, A., Tapiol, J., Benavent, C., Sarvise, C., Gómez, F., Martínez, B., Terron – Puig, M., Recio, G., Vilanova, A., Pujol, I., Ballester, F., Rezusta, A., Figueras, M. J. (2017).** Antimicrobial susceptibility, virulence potential and sequence types associated with *Arcobacter* strains recovered from human faeces. *Journal of Medical Microbiology*. 66(12), 1736–1743.
88. **Perretti, G., Montanari, L., Fantozzi, P. (2006).** Lipid extraction from *Olea europia* L., by supercritical carbon dioxide for analytical use. *International Journal of Food Engineering*. 2, 1–12.
89. **Petersen, R. F., Harrington, C. S., Kortegaard, H. E., On, S. L. W. (2007).** A PCR-DGGE method for detection and identification of *Campylobacter*, *Helicobacter*, *Arcobacter* and related *Epsilobacteria* and its application to saliva samples from humans and domestic pets. *Journal of Applied Microbiology*, 103(6), 2601–2615.
90. **Politz, M., Lennen, R., Pflieger, B. (2013).** Quantification of bacterial fatty acids by extraction and methylation. *Bio-Protocol*. 3(21), e950.
91. **Rahman, F. U., Andree, K. B., Salas-Massó, N., Fernandez-Tejedor, M., Sanjuan, A., Figueras, M. J., Furones, M. D. (2020).** Improved culture enrichment broth for isolation of *Arcobacter*-like species from the marine environment. *Scientific Reports*. 10(1), 1–12.
92. **Rajalakshmi, S. (2017).** Different types of PCR techniques and its application. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical & Biological Sciences*. 7(3), 285–292.
93. **Ramees, T. P., Dhama, K., Karthik, K., Rathore, R. S., Kumar, A., Saminathan, M., Tiwari, R., Malik, Y. S., Singh, R. K. (2017).** *Arcobacter*: an emerging food-borne zoonotic pathogen, its public health concerns and advances in diagnosis and control. *The Veterinary Quarterly*. 37(1), 136–161.
94. **Robards, K., Ryan, D. (2022).** *Principles and Practice of Modern Chromatographic Methods*. 2nd ed. United States of America: Academic Press. ISBN 0128220961.
95. **Salas-Massó, N., Andree, K. B., Furones, M. D., Figueras, M. J. (2016).** 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. *Science of The Total Environment*. 566–567, 1355–1361.
96. **Santos, C. F., Sakai, V. T., Machado, M. A. A. M., Schippers, D. N. Greene, A. S. (2004).** Reverse transcription and polymerase chain reaction: principles and applications in dentistry. *Journal of Applied Oral Science*. 12(1), 1–11.

97. **Sasser, M. (1990).** Bacterial Identification by Gas Chromatographic Analysis of Fatty Acid Methyl Esters (GC-FAME); Technical Note #101; MIDI, Inc.: Newark.
98. **Scarano, C., Giacometti, F., Manfreda, G., Lucchi, A., Pes, E., Spanu, C., De Santis, E. P., Serraino, A. (2014).** *Arcobacter butzleri* in sheep ricotta cheese at retail and related sources of contamination in an industrial dairy plant. *Applied and environmental mikrobiology*. 80(22), 7036–7041.
99. **Shah, A. H., Saleha, A. A., Zunita, Z., Murugaiyah, M. (201).** *Arcobacter* – An emerging threat to animals and animal origin food products. *Trends in Food Science & Technology*. 22(5), 225–236.
100. **Skoog, A. D., Holler, J. F., Crouch, J. R. (2007).** *Principles of Instrumental Analysis*. 6th ed. Canada: Thomson Brooks/Cole. ISBN 13: 978-0-495-01201-6.
101. **Snelling, W. J., Matsuda, M., Moore, J. E., Dooley, J. S. G. (2006).** Under the microscope: *Arcobacter*. *Letters in applied microbiology* 42(1), 7–14.
102. **Sparkman, O. D., Penton, E. Z., Kitson, F. G. (2011).** *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. 2nd en. United State of America: Elsevier. ISBN 9780123736284.
103. **Stauffer, E., Dolan, J. D., Newman, R. (2008).** *Fire Debris Analysis*. 1th ed. United State of America: Academic Press. ISBN 978-0-12-663971-1.
104. **Šilha, D., Morávková, K., Škodová, G., Vyřasová, J. (2019).** Viability and biofilm formation of *Arcobacter* spp. at various processing temperatures. *Journal of Food and Nutrition Research*. 58(3), 208–213.
105. **Šilha, D., Šilhov-Hruřkov, L., Vyřasová, J. (2015).** Modified isolation method of *Arcobacter* spp. from different environmental and food samples. *Folia Microbiol.* 60, 515–521.
106. **Tenover, F.C. (2009).** *Encyclopedia of Microbiology*. 3rd ed. United State Of America: Elsevier. ISBN 9780123739445.
107. **Thompson, L. M., Smibert, R. M., Johnson, J. L., Krieg, N. R. (1988).** Phylogenetic study of the genus *Campylobacter*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38(2), 190–200.
108. **Uljanovas, D., Glz, G., Brückner, V., Grineviciene, A., Tamuleviciene, E., Alter, T., Malakauskas, M. (2021).** Prevalence, antimicrobial susceptibility and virulence gene profiles of *Arcobacter* species isolated from human stool samples, foods of animal origin, ready-to-eat salad mixes and environmental water. *Gut Pathogens*. 13(1), 76.

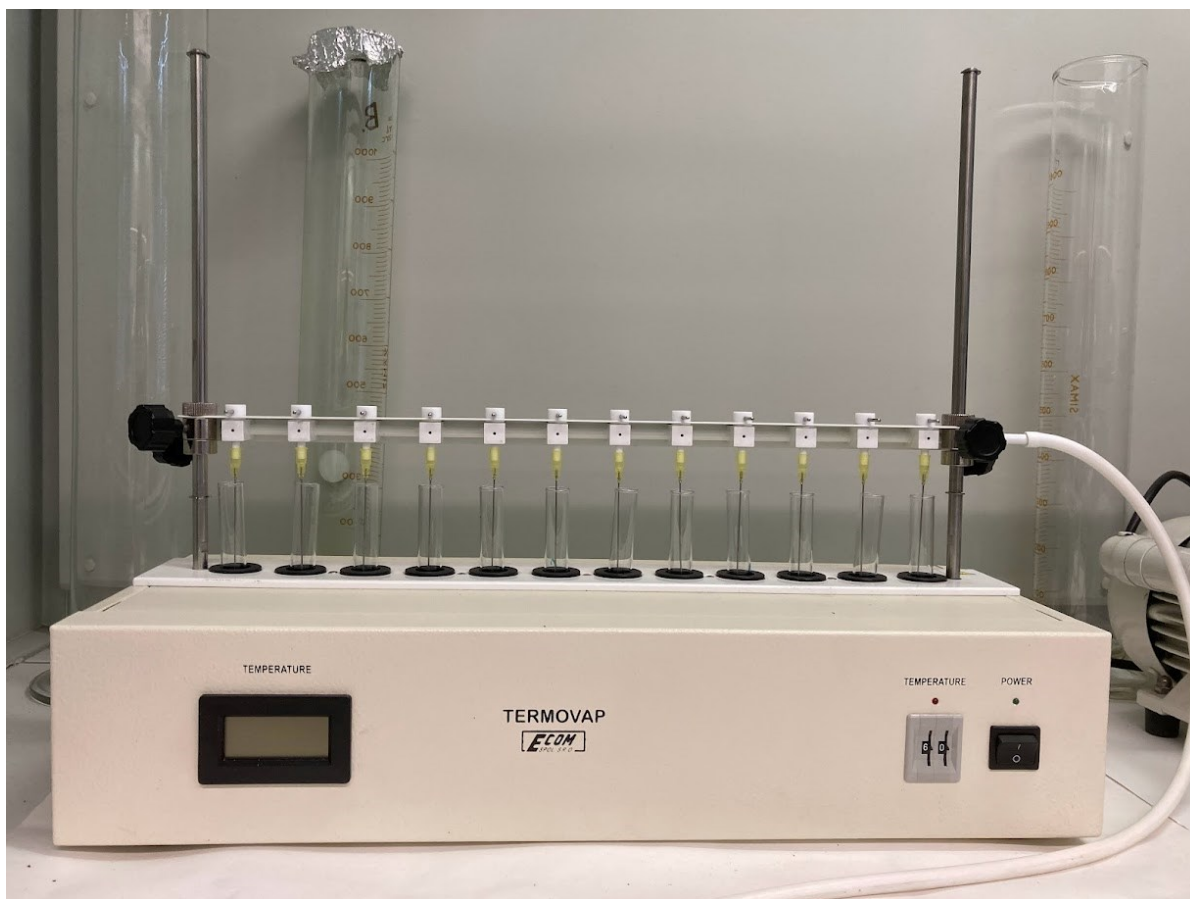
109. **Undeland, I., Härröd, M., Lingnert, H. (1998).** Comparison between methods using low-toxicity solvents for the extraction of lipids from herring (*Clupea harengus*). *Food Chemistry*. 61, 355–365.
110. **Valones, M. A. A., Guimarães, R. L., Brandão, L. A. C., de Souza, P. R. E., de Albuquerque Tavares Carvalho, A., Crovela, S. (2009).** Principles and applications of polymerase chain reaction in medical diagnostic fields. *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(1), 1–11.
111. **Vandamme, P. de Ley, J. (1991).** Proposal for a new family, *Campylobacteraceae*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41(3), 451–455.
112. **Vandamme, P., Falsen, E., Rossau, R., Hoste, B., Segers, P., Tytgat, R., de Ley, J. (1991).** Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy: emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 41(1), 88–103.
113. **Vandamme, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Mels, L., Hoste, B., Dewettinck, D., Vlaes, L., van den Borre, C., Higgins, R., Hommez, J., Kersters, K., Butzler, J. P., Goossens, H. (1992).** Polyphasic taxonomic study of the emended genus *Arcobacter* with *Arcobacter butzleri* comb. nov. and *Arcobacter skirrowii* sp. nov., an aerotolerant bacterium isolated from veterinary specimens. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42(3), 344–356.
114. **van Driessche, E., Houf, K., van Hoof, J., de Zutter, L., Vandamme, P. (2003).** Isolation of *Arcobacter* species from animal feces. *FEMS Microbiology Letters*. 229(2), 243–248.
115. **van Driessche, E., Houf, K., Vangroenweghe, F., de Zutter, L., van Hoof, J. (2005).** Prevalence, enumeration and strain variation of *Arcobacter* species in the faeces of healthy cattle in Belgium. *Veterinary Microbiology*. 105(2), 149–154.
116. **Vasiljevic, M., Fenwick, A. J., Nematollahi, S., Gundareddy, V. P., Romagnoli, M., Zenilman, J., Carroll, K. C. (2019).** First case report of human bacteremia with *Malacobacter (Arcobacter) mytili*. *Open Forum Infectious Diseases*. 6(7), 319.
117. **Waite, D. W., Vanwonderghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., Hugenholtz, P. (2017).** Comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*. 8, 682.

118. **Waite, D. W., Vanwongerghem, I., Rinke, C., Parks, D. H., Zhang, Y., Takai, K., Sievert, S. M., Simon, J., Campbell, B. J., Hanson, T. E., Woyke, T., Klotz, M. G., Hugenholtz, P. (2018).** Addendum: comparative genomic analysis of the class *Epsilonproteobacteria* and proposed reclassification to *Epsilonbacteraeota* (phyl. nov.). *Frontiers in Microbiology*. 9, 772.
119. **Wei, G., Zeng, E. Y. (2011).** Gas chromatography-mass spectrometry and high – performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry in quantifying fatty acids. *Trends in Analytical Chemistry*. 30, 1429–1436.
120. **Welker, M., van Belkum, A., Girard, V., Charrier, J. P., Pincus, D. (2019).** An update on the routine application of MALDI-TOF MS in clinical microbiology. *Expert Review of Proteomics*. 16(8), 695–710.
121. **Wieser, A., Schneider, L., Jung, J., Schubert, S. (2012).** MALDI-TOF MS in microbiological diagnostics-identification of microorganisms and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 93(3), 965–974.

6. PŘÍLOHY

Příloha A Sušení vzorků pod proudem dusíku v procesu přípravy FAME mastných kyselin před analýzou GC-FID.	91
Příloha B Plynový chromatograf GC-2010 Plus s plamenově-ionizačním detektorem.....	92

Příloha A Sušení vzorků pod proudem dusíku v procesu přípravy FAME mastných kyselin před analýzou GC-FID.



Příloha B Plynový chromatograf GC-2010 Plus s plamenově-ionizačním detektorem.

