

Skríning antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu

Adéla Rajnochová

Bakalářská práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adéla Rajnochová
Osobní číslo: T20346
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: **Skríning antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu**

Zásady pro vypracování

Teoretická část

Vodní drůbež – charakteristika, chov a produkce

Mechanismy a příčiny vzniku antibiotické rezistence

Antibiotická rezistence grampozitivních koků izolovaných z potravin a nápojů

Praktická část

Mikrobiologický rozbor vodní drůbeže – grampozitivních koků

Skríning antibiotické rezistence izolovaných grampozitivních koků

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce

Forma zpracování bakalářské práce: **tištěná/elektronická**

Seznam doporučené literatury:

- HUDSON, J.A., FREWER, L.J., JONES, G. et al. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 69: 131-147. 2017.
- RHOUMA, M., ROMERO-BARRIOS, P., GAUCHER, M-L., BHACHOO, S. Antimicrobial resistance associated with the use of antimicrobial processing aids during poultry processing operations: cause for concern?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 61: 3279-3296. 2021.
- GUALERZI, C.O., BRANDI, L., FABBRETTI, A., PON, C.L. eds. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Wiley-VCH. 2014. Dostupné z: doi:9783527659685.
- GALHANO, B.S.P., FERRARI, R.G., PANZENHAGEN, P. et al. Antimicrobial resistance gene detection methods for bacteria in animal-based foods: A brief review of highlights and advantages. *Microorganisms*, 9(5). 2021.
- SCHRIJVER, R., STUNTJES, M., RODRIGUEZ-BANO, J. et al. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical Microbiology and Infection*, 24: 577-590. 2018.
- Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

Vedoucí bakalářské práce: **prof. RNDr. Leona Buňková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2022**

Termín odevzdání bakalářské práce: **19. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

prof. Mgr. Marek Koutný, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 17. února 2023

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3;
- podle § 60 odst. 1 autorského zákona má Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- podle § 60 odst. 2 a 3 autorského zákona mohu užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- pokud bylo k vypracování bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem na bakalářské práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Bakalářská práce řeší problematiku antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků, které byly izolovány z vodní drůbeže (kachny) a z prostředí jejich chovu. Práce je zaměřena na antibiotickou rezistenci rodů *Staphylococcus* (a příbuzného rodu *Micrococcus*) a *Enterococcus*. V první části je charakterizována vodní drůbež a rozebrán její chov a produkce. Následně jsou vysvětleny mechanismy antibiotické rezistence a popsány příčiny jejího vzniku. Posledním tématem v části teoretické je výskyt grampozitivních koků v potravinách a popis přítomných odolných druhů. Při samotném experimentu byly izolované mikroorganismy identifikovány metodou MALDI-TOF. Celkem bylo identifikováno 106 kmenů, z toho 91 kmenů bylo zařazeno mezi grampozitivní koky. Vybrané identifikované bakterie byly podrobeny difuzním diskovým testům pro kvalitativní stanovení antibiotické citlivosti/rezistence. Výsledky byly srovnávány se systémem EUCAST. Všechny izolované kmeny stafylokoků i makrokoků byly rezistentní vždy alespoň k jednomu antibiotiku. U enterokoků byla prokázána odolnost na vybraná antibiotika jen u některých testovaných kmenů.

Klíčová slova: antibiotika, rezistence, vodní drůbež, grampozitivní koky, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, diskový difuzní test

ABSTRACT

The bachelor thesis deals with the issue of antibiotic resistance in selected Gram-positive cocci isolated from poultry (the duck) and their breeding environment. I focused specifically on the genera of staphylococci (and related micrococci) and enterococci. In the first part, the waterfowl is characterized, and its breeding and production are analysed. Subsequently, the mechanisms of antibiotic resistance are explained, and the causes of its occurrence are described. The last topic of theoretical part is the occurrence of gram-positive cocci in food and a description of the resistant species present. During the experiment, the isolated microorganisms were sent to laboratories, where they were identified by the MALDI-TOF method. A total of 106 strains were identified, of which 91 strains belonged to Gram-positive cocci. Selected identified bacteria were subjected to diffusion disc tests for qualitative determination of antibiotic activity. Finally, the results were compared with the system EUCAST. All isolated strains of staphylococci and macrococci were resistant at least to one antibiotic. In enterococci, the resistance to selected antibiotics was demonstrated only in some of the tested strains.

Keywords: antibiotics, resistance, waterfowl, gram-positive cocci, *Staphylococcus*, *Enterococcus*, diffusion disc test

Tímto bych chtěla poděkovat v první řadě paní prof. RNDr. Leoně Buňkové, PhD. za vedení mé bakalářské práce a užitečné rady při jejím zpracování. Dále bych také ráda poděkovala laborantkám, které mi byly ochotny pomoci při práci v laboratoři na Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí.

Určitě chci poděkovat své rodině, snoubenci a kamarádům za podporu po celou dobu mého studia. Na závěr děkuji i mým dvěma kolegům – přátelům ze studijní skupiny biotechnologie a mikrobiologie za vzájemnou oporu při studiu a realizaci bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VODNÍ DRŮBEŽ	12
1.1 CHARAKTERISTIKA VODNÍ DRŮBEŽE	12
1.1.1 Smyslové orgány domácí vodní drůbeže	12
1.1.2 Opeření a pelichání	13
1.2 DOMESTIKACE DRŮBEŽE	13
1.2.1 Příčiny domestikace	13
1.2.2 Domestikace husy domácí.....	14
1.2.3 Kachna domácí a pižmová a jejich šlechtění	14
1.3 CHOV VODNÍ DRŮBEŽE	15
1.3.1 Chov kachny domácí.....	15
1.3.2 Chov husy domácí.....	15
1.4 PRODUKCE VODNÍ DRŮBEŽE	16
1.5 PROCES JATEČNÍHO ZPRACOVÁNÍ DRŮBEŽE.....	16
2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	20
2.1 ANTIBIOTIKA.....	20
2.2 ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK PODLE MÍSTA A MECHANISMU ÚČINKU	20
2.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny.....	21
2.2.2 Narušení cytoplazmatické membrány	21
2.2.3 Porucha syntézy proteinů	21
2.2.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin	21
2.3 ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	22
2.3.1 Mechanismy vzniku antibiotické rezistence	22
2.3.2 Příčiny vzniku antibiotické rezistence	24
3 GRAMPOZITIVNÍ KOKY IZOLOVANÉ Z POTRAVIN A JEJICH ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	25
3.1 GRAMPOZITIVNÍ KOKY	25
3.2 ROD <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	26
3.2.1 Výskyt stafylokoků v potravinách	26
3.2.2 Antibiotická rezistence rodu stafylokoků.....	27
3.3 ROD <i>ENTEROCOCCUS</i>	28
3.3.1 Charakteristika rodu a jeho výskyt v potravinách.....	28
3.3.2 Antibiotická rezistence enterokoků	28
II PRAKTICKÁ ČÁST	29
4 CÍL PRÁCE	30
5 MATERIÁL	31

5.1	PRACOVNÍ POMŮCKY A PŘÍSTROJE.....	31
5.2	VZORKY	31
5.3	ANTIBIOTIKA.....	32
5.4	KULTIVAČNÍ PŮDY	33
5.4.1	Příprava kultivačních médií	33
5.5	FYZIOLOGICKÝ ROZTOK	34
6	METODIKA	35
6.1	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VODNÍ DRŮBEŽE.....	35
6.1.1	Izolace grampozitivních koků	35
6.1.2	Identifikace grampozitivních koků – Gramovo barvení	35
6.1.3	STAPHYtest.....	36
6.1.4	MALDI-TOF.....	37
6.2	SKRÍNING ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE VYBRANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	38
6.2.1	Diskový difuzní test	38
7	VÝSLEDKY.....	41
7.1	IZOLACE GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	41
7.1.1	Počty indikátorových mikroorganismů	42
7.1.2	Gramovo barvení.....	44
7.2	IDENTIFIKACE VYBRANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	45
7.3	SKRÍNING ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	46
7.3.1	Vliv testovaných antibiotik na enterokoky	47
7.3.2	Vliv testovaných antibiotik na stafylokoky a makrokoky.....	52
8	DISKUZE	56
	ZÁVĚR	61
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	62
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	68
	SEZNAM OBRÁZKŮ	69
	SEZNAM TABULEK.....	70

ÚVOD

Bakterie rodů *Staphylococcus* a *Enterococcus* se vyskytují na různých místech – v půdě, vodě, nebo jsou běžnou mikroflórou člověka i zvířat. Někdy mohou být i příležitostnými patogeny. Hlavní problematikou této práce je zkoumání antibiotické rezistence u těchto dvou rodů gram pozitivních koků, které byly izolovány z masa kachny pižmové, a také z prostředí jejího chovu.

Antibiotika (ATB) jsou antimikrobiální látky, která působí zejména na bakterie. Mohou být produkovány mnoha mikroorganismy, například plísněmi. Tento druh léčiv se začal využívat v medicíně v první polovině minulého století. Některé kmeny si však byly schopny vytvořit postupem času schopnost odolnosti k těmto látkám. Hlavními příčinami vzniku rezistence na antibiotika je jejich časté a nesprávné užívání (např. při infekcích způsobené virem). Často jsou antibiotika využívána i při léčbě chorob hospodářských zvířat, u kterých se vyskytují patogeny. U těchto mikroorganismů se může také projevit rezistence k těmto látkám. Požitím potravy živočišného původu je pak možný přenos odolných bakteriálních druhů na člověka. Proto je nutné dodržovat nastavenou ochrannou lhůtu mezi podáním ATB zvířeti a jeho manipulací – jatečním zpracováním apod. Existuje mnoho rezistentních kmenů patogenních mikroorganismů. Nejčastěji zmiňovaný je methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODNÍ DRŮBEŽ

1.1 Charakteristika vodní drůbeže

Obecně drůbež řadíme podle vědecké klasifikace do třídy ptáci (*Aves*). Pojmem drůbež označujeme domestikované ptáky, kteří se chovají pro vejce, maso a peří. Jedná se tedy o domácí druhy ptactva. Podle definice Nařízení evropského parlamentu a rady (ES) č. 853/2004 je drůbež dělena na vodní, hrabavou a holuby. [1] [2] Do skupiny hrabavé drůbeže řadíme nejčastěji slepice, kohouty, kuřata a krůty. Maso těchto druhů drůbeže je známo tím, že má nižší energetickou hodnotu oproti ostatním druhům masa, z nutriční stránky má vhodné složení, a navíc je lépe stravitelné. Mezi vodní drůbež můžeme zařadit husy, kachny, ale také pižmovky. Jejich maso je odlišné od druhů hrabavé drůbeže. Má tmavší zabarvení a obsahuje z výživového hlediska více tuku. [3] [4] [5]

Podle zoologie vodní drůbež náleží do řádu vrubozobí (*Anseriformes*). Hlavním společným znakem ptáků tohoto řádu jsou vroubkované okraje jejich zobáku. Tento typ zobáku mají proto, aby mohli přecedit malé částice z vody, nebo bahna. Pro vrubozobé jsou typické blány na dolních končetinách, které spojují tři přední prsty. Tyto blány jim pomáhají v plavání a zároveň potápění. [5] Tělo vrubozobých je kryto hustým prachovým peřím. Na kostrči mají žlázu produkující mazový sekret, díky kterému se stává peří voděodolné. [6] Jejich kosti jsou lehké a trávicí soustava je krátká, jako je tomu i u ostatních druhů ptáků. [7] Řadíme je do nadřádu létavých ptáků. Dokážou létat rychle a daleko. Mnoho druhů z vrubozobých jsou dokonce tažní ptáci. [1] [5]

Největší čeledí řádu vrubozobých je čeleď kachnovitých (*Anatidae*). Většina má velmi dobře vyvinutý hlasový orgán. V jejich hlasovém ústrojí se nachází prodloužená průdušnice tvořící kličku pod hrudní kostí. [8]

1.1.1 Smyslové orgány domácí vodní drůbeže

Obecně u drůbeže je velmi dobře vyvinutý zrak. Drůbež, podobně jako všichni ptáci, má binokulární vidění, což znamená, že vidí oběma očima. Konkrétně kachny mohou vidět až 80 metrů a husy dokonce i 120 metrů. Rozlišování barev u drůbeže se poměrně liší od člověka. Reagují na rozdílnou světelnost barev. Všichni ptáci jsou schopni vidět i v oblasti UV záření díky dalšímu typu čípků na sítnici oka, a také magnetického pole.

Ptákům, včetně drůbeže, chybí vnější ucho. Na okraji zvukovodu se nachází jemné peří, které slouží jako ochrana sluchového orgánu. Vodní i ostatní drůbež slyší na vzdálenost

50 metrů. Čichové a chuťové ústrojí není u drůbeže tolik vyvinuté. Všechny druhy rozlišují slanou, sladkou, kyselou i hořkou chuť. Avšak nejvyvinutější čich mají kachny. [1] [7]

1.1.2 Opeření a pelichání

Peří u ptáků slouží především jako ochrana před povětrnostními vlivy. Pomáhá jim také při létání a v některých případech je užitečné i jako maskovací plášť před různým nebezpečím. [9]

Ptáci mají dva druhy peří. První je krycí neboli obrysové. To zajišťuje ochranu proti povětrnostním podmínkám. Pod krycím peřím se nachází peří prachové, které těsně přiléhá k tělu. Jedná se o izolační vrstvu – chrání tělo před chladem. [7]

U dospělých jedinců vodní drůbeže dochází dvakrát ročně, v podzimních a letních měsících, k výměně peří. Tomuto jevu se říká pelichání. V tomto období je drůbež více náchylná k onemocnění. [7]

1.2 Domestikace drůbeže

Dříve zoologové zastávali názor, že každé domácí zvíře, včetně drůbeže, má původ ve více divokých (původních) druzích. Avšak v posledních letech se změnil pohled na problematiku domestikace. V novodobých moderních výzkumech se vědci přiklánějí k tomu, že každý domácí druh zvířete pochází z jedné divoké formy téhož druhu a domácí zvíře netvoří samostatný druh. [10]

1.2.1 Příčiny domestikace

Samotná domestikace představuje genetickou změnu divokého zvířete, v tomto případě divoké drůbeže. [10] Jde o proces, kdy jsou účelně přetvářena zvířata divoce žijící na druhy vhodnější k domácímu chovu. [11] Domestikovaná zvířata se od těch původních divokých liší jak vzhledem, tak i chováním. [12] S domestikací úzce souvisí pojem zkrocení, který tomu předchází. Když mluvíme o zkrocení, jedná se vždy jen o držení či ponechání divokého zvířete v domácím prostředí. [10]

V počátcích, když člověk zdomácňuje zvíře, může dojít k určitým problémům. Může se jednat o stresový faktor pro dané zvíře. Například zkrocená drůbež klade méně vajec, než je zvykem u divoké formy. Ve většině případů byla důvodem krocení zvířat obliba daného druhu, v jehož přítomnosti se člověk cítil dobře a živočich mu přinášel pocit radosti. [10]

1.2.2 Domestikace husy domácí

Husa domácí pochází z více druhů divokých předků. Nejznámějším a hlavním předkem pro domácí plemena hus je husa velká (*Anser anser*). V porovnání s domácími husami je o něco menší. Husy mohou obývat všechny typy vod, nejčastěji však dávají přednost vodním plochám a mokřadům s více porostlými břehy rákosím. [13] [14] [15] Patří mezi tažné ptáky, což znamená, do teplejších krajín odlétají za lépe dostupnou potravou, aby přežili zimu. [1]

Husa velká se vyskytuje ve dvou poddruzích – evropská a asijská. Existují také smíšené populace obou poddruhů. Husa velká evropská žije v evropských oblastech. Můžeme ji rozpoznat podle jejího hnědošedého zbarvení peří s bílými pruhy, a také podle šedého zbarvení hlavy. Především při letu jsou vidět její světle šedé až bílé křídelní krovky. Má poměrně silný a výrazný zobák oranžové barvy. Mezi samicí a samcem tohoto poddruhu nejsou velké rozdíly, avšak jejich mláďata mají zelenošedou barvu a ve spodní části těla jsou nažloutlá. Hnízdí ve většině případech v rákosí a samice mohou snášet 4-8 vajec, na kterých poté samy sedí až 30 dní. Asijský poddruh tohoto druhu divoké husy se nijak zvláště neliší od evropského. Hlavním znakem, kterým je možné tyto dva poddruhy rozeznat, je narůžovělý zobák. Barva peří tohoto poddruhu je poněkud světlejší, krk a hlava jsou širší. [12]

U hus domácích byla schopnost létání postupně potlačena. Vykazují se zvýšenou citlivostí na podmínky prostředí, ve kterém žijí, například při nízké vlhkosti se může projevit svědění kůže. V dospělosti mají dobře vyvinuté peří, které vyniká svými izolačními vlastnostmi. [1] Jejich peří se proto využívá jako izolační vrstva, např. při výrobě zimních bund a spacích pytlů. Česká husa domácí má v dospělosti typické bílé zbarvení, zatímco housata mají nažloutlé jemné peří. [16]

1.2.3 Kachna domácí a pižmová a jejich šlechtění

Předkem všech druhů kachen domácích je kachna divoká (*Anas platyrhynchos*). Žije téměř na celé severní polokouli. Je velmi přizpůsobivá na různé biotopy. Na našem území můžeme s největší pravděpodobností narazit na kachnu divokou holoarktickou. U tohoto poddruhu můžeme vidět jasné odlišnosti mezi samcem a samicí. [12] Samec má většinou zelenou barvu hlavy, bílý proužek kolem krku, dohněda zbarvenou hrud', došeda zbarvené tělo a pera na ocasu mají černou barvu. Samice jsou menší než samci a jsou hnědě skvrnité. Jejich mláďata se podobají zpočátku zbarvení samice. [14] Kachny bývají buď v hejnech, nebo alespoň v párech. Hnízda si zakládají na nejrůznějších místech – na zemi i stromech v oblasti

vodních ploch. Samice snáší vejce v jednom cyklu. Počet snesených vajec se pohybuje kolem deseti. Kachny mohou i nemusí být stěhovaví ptáci, ale záleží na podmínkách. [12]

Pižmovka domácí neboli kachna pižmová má za svého předka pižmovku velkou (*Cairina moschata*), která pochází z Jižní Ameriky. Tento druh se liší od kachny domácí svou vyšší hmotností i inkubační dobou. Je svým chováním a vzhledem spíše podobná huse. Hnízdí až třikrát do roka a mohou snést až 50 vajec, neboť mimo dobu hnízdění vejce nesnáší. Inkubační doba do vylíhnutí mláďete je 35 dnů. Kachně má bílé i černé peří, obličejová část je neopeřená a typická svým červeným zbarvením. Pro chov těchto kachen je třeba velký výběh. Velmi časté je také zastříhování letek u křídel, aby se jim zabránilo v úniku, protože se jedná o skvělé letce. [1] [16]

1.3 Chov vodní drůbeže

K chovu drůbeže dochází za účelem získání masa, vajec a peří, avšak některé druhy mohou být pouze na okrasu. Pro chov je zapotřebí si obstarat zvláštní zařízení, či prostory pro živobytí těchto druhů. [7]

1.3.1 Chov kachny domácí

Při chovu kachen je základním požadavkem dostatečný výběh s možností koupání ve vodě (jezíčko apod.). Ve výběhu by se měla vyskytovat plocha s rostoucí trávou nebo s pískem. Stáj má být prostorná, s pravidelným odvětráváním a se suchou podestýlkou z hoblin, pilin nebo slámy. Do podestýlky samice často zahrabávají svá snesená vejce. Krmná směs pro kachny je tvořena obilnými šrotky (70 %), otrubami, živočišnými bílkovinami (př. masová moučka), suchými kvasinkami, a nakonec směsí minerálních látek. Ke krmení dochází dvakrát denně – ráno a večer. Krmná směs bývá navlhčená, někdy až v kašovité formě. [10] [17]

1.3.2 Chov husy domácí

Při chovu hus domácích jsou požadavky na výběh podobné ve srovnání s výběhem pro kachny. Chovné husy a nosnice jsou méně citlivé na chlad, jelikož mají husté peří, které je chrání před zimou. Přesto se jako podestýlka používá suchá sláma nebo hobliny ze dřeva. Suchá podestýlka je dobrá jak pro snášení vajec, tak i pro zdraví dané husy. Zařízení ve vnitřních prostorech se skládá z krmítek, napájecích nádob a hnízd. Husí ustájení má mít také dostatečné odvětrávání. Hnízda jsou umístěna na podlaze, aby byla lehce přístupná pro husy. Pro urychlení snášení vajec se husám uměle přisvětluje. Směs krmení je srovnatelná

se směsí pro kachny. Na smíchání krmné směsi je třeba hlavně 65 % obilného škrobu a ve zbylé části otruby, bílkovinný koncentrát, krmné kvasinky, směs minerálních látek pro drůbež a rybí moučka, která může být zaměnitelná za masovou. [7] [10]

1.4 Produkce vodní drůbeže

Podmínky na porážení a porcování drůbeže musí být schváleny a kontrolovány Státní veterinární správou (SVS). Nesmí dojít ke zkřížené kontaminaci a prostory musí být snadno čistitelné. V těchto technologických provozech na zpracování drůbeže a následnou produkci masa se musí dbát na dostatečný přívod pitné vody. Zařízení či vybavení se musí řídit hygienickými předpisy. Drůbeží jatky mají navíc v těchto prostorech vyhrazené místo pro prohlídku zvířat před porážkou a celkově pro jejich příjem. V porážecích prostorech se určují tzv. zóny – musí být oddělené místo pro omráčení a vykrvování od napařování, škulání, a i kuchání. [8]

U kachen a hus je nejvíce využívané maso. Husí maso se řadí mezi tučnější, čím starší je daný jedinec, tím více tuku ukládá. Vyšší podíl tukové tkáně je zapříčiněno především stravou. Husy se nejčastěji živí trávou, zatímco kachny upřednostňují zrní. Husy i kachny mají tmavší maso a výraznou chuť, neboť tuk je nositelem chuti i vůně. Kachny se dělí podle hmotnosti do tříd. K prodeji do obchodů se dostávají buď barbarie, což jsou vyšlechtěné kachny pižmové, nebo mulardi, kdy se jedná o křížence „normálních“ druhů kachen. [18]

1.5 Proces jatečního zpracování drůbeže

Do procesu jatečního zpracování drůbeže se dostávají pouze jedinci ze zdravých chovů, kteří prošli veterinární prohlídkou. Je to proces, do kterého vstupuje celé zvíře a výsledným produktem jsou zpracované části jeho těla. [8] [19]

V těle jatečně zpracované drůbeže nesmí být rezidua kostí a opracované části nesmí být nijak znečištěny. Do prodeje se dávají buď jednotlivé části dané drůbeže, nebo celé vykuchané tělo bez hlavy a nohou. Drůbež se může dávat do oběhu bez drobů, nebo je v těle lze ponechat. Droby jsou vnitřnosti a vychází většinou jako vedlejší produkt při jatečném zpracovávání, avšak mohou mít i svá využití. [20]

Prvním okruhem procesu opracování drůbeže je porážení. Vše začíná omráčením samotného zvířete (Obrázek 1). Jinými slovy dochází ke ztrátě vědomí. Existují tři typy omračování. Prvním je ruční, které je typické pro porážky v domácím prostředí. Nejčastěji se používá

elektrický proud, hlavně ve velkých chovech a poslední je omračování plynem. Avšak nikdy nesmí dojít k usmrcení omračovaného zvířete. [8] [20]

Poté nastává vykrvení – drůbež se již usmrtí. K vykrvování se využívají pro automatizaci nejčastěji nože, kdy se jimi přeřízne krční tepna omračovaného jedince. Tato část musí proběhnout co nejdříve, nejpozději však do 1 minuty, záleží na typu omračovacího procesu. Rychlost vykrvení má značný vliv na jakost masa. [19]

Usmrcená těla pak přechází na paření, a díky tomu je snadnější následné šhubání peří. Zbytky peří a dalších nečistot se odstraňují poté z těla vodní drůbeže pomocí voskování a dočišťování. [8]

Všechny tyto operace se provádí v co nejkratší době, především trávicí trakt drůbeže musí být odstraněn z těla v brzké době, aby se zabránilo přechodu mikrobioty obývající trávicí ústrojí do těla, jinak by to mohlo vést ke kažení masa. [8]

Po dočištění se přechází k dalšímu okruhu, a tím je kuchání. Jsou využívány odlišné prostory než při porážení. Využívají se stroje tzv. kuchací automaty, nebo se kuchání provádí ručně. Vodní drůbež s tučnějším masem se chladí před vykucháním, zatímco u slepic se pracuje s čerstvě opracovaným tělem. Proces zahrnuje následující operace (Obrázek 1):

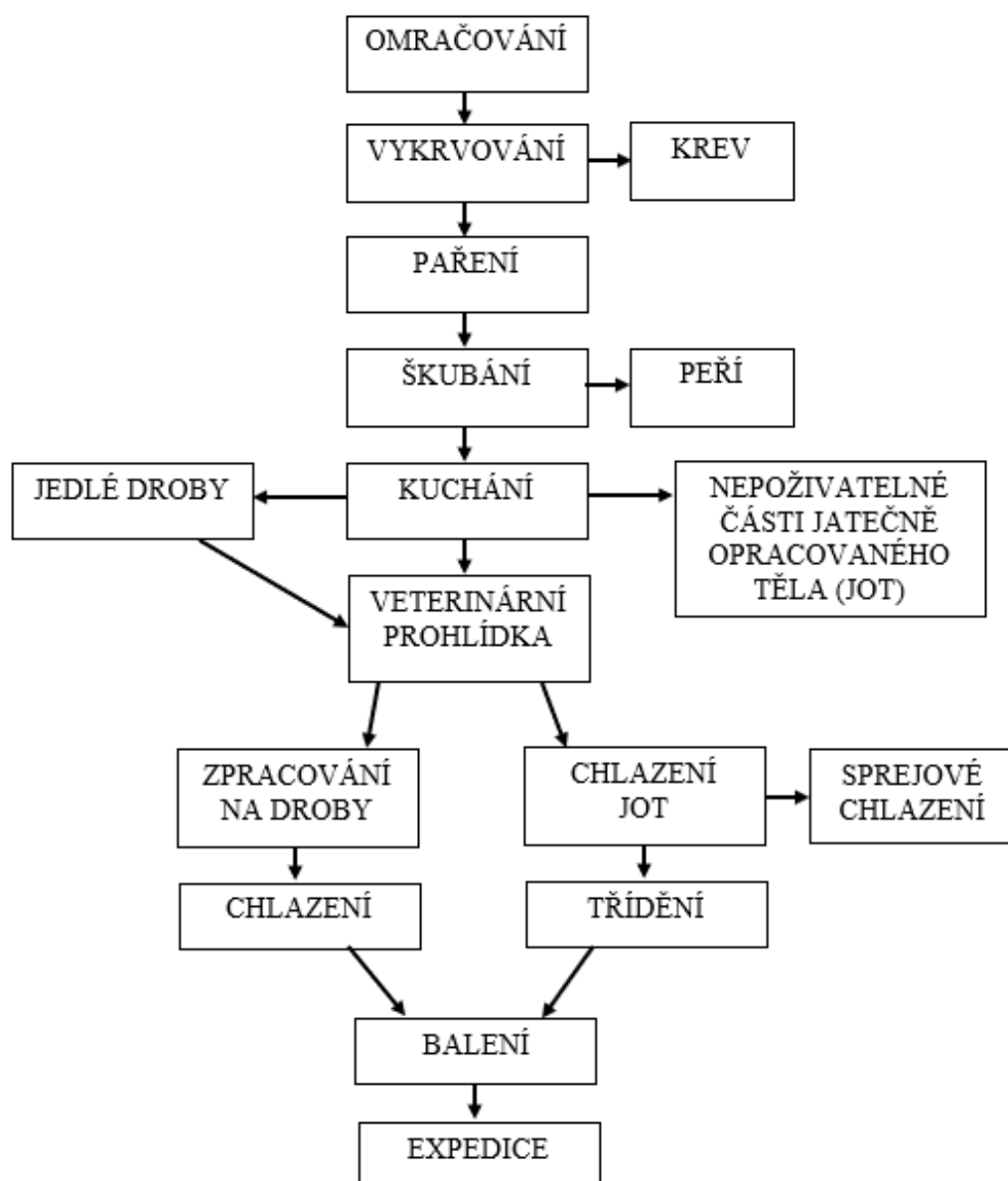
- a) Odřezání hlavy
- b) Odstranění nohou
- c) Naříznutí kůže kolem krku a vyjmutí vole
- d) Rozříznutí dutiny břišní a odstranění orgánů (trávicího ústrojí)
- e) Vyříznutí řitního otvoru
- f) Odřezání jater a vyjmutí žluči – odstranění nečistot z jater
- g) Po očištění jater dochází k oddělení žaludku od střev
- h) Odstranění zbylých vnitřností – opracování srdce, ledvin, popřípadě i plic
- i) Důkladné očištění veškerých částí (omytí pod vodou) [8] [21]

Po vykuchání je důležité, aby opracovaná těla i vnitřnosti prošla procesem chlazení, nejpozději však do 2 hodin. Teplota by neměla přesáhnout 4 °C. Opracovaná drůbež může být zavěšená v chladících komorách s proudícím vzduchem. [22]

Jako další možnost zchlazení lze použít vodní lázně, za využití speciálních nádrží s vodou a ledem. Těla drůbeže se chladí posunem proti proudu vody. [8]

Existuje také sprejové chlazení. Jedná se o kombinaci chlazení vzduchem a vodou. Těla visí v místnosti s proudícím vzduchem a jsou zároveň postříkována jemnými kapkami vody, a díky tomu nedochází k vysychání drůbeže. [20]

Nakonec přichází vytrídění podle jakosti, zda jsou části těla správně očištěna, bez mechanického poškození, barevných změn a také bez zápachu. Nesmí vykazovat žádné známky zkažení. Pak nastává fáze porcování, vážení a balení. K balení se většinou používají plastové obaly, do kterých se požadované kusy zabalí strojně. [8]



Obrázek 1: Schéma jatečního opracování vodní drůbeže. Upraveno podle [8]

2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

2.1 Antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou antimikrobiální látky. Řadíme je mezi produkty sekundárního metabolismu mikroorganismů, především některých rodů plísní (např. *Penicillium*), nebo také bakterií (např. *Streptomyces*, *Bacillus*). Řadíme je k nejvýznamnějším objevům v oblasti medicíny 20. století. K největšímu rozvoji došlo po objevení penicilinu známým lékařem a bakteriologem Alexandrem Flemingem v roce 1928. [23] [24]

Antibiotika jsou vyráběna, aby inhibovala konkrétní druh mikroorganismu, nebo mohou být vyvinuta proti širokému spektru mikroorganismů. [25] [26] Díky nim téměř došlo k vymizení bakteriálních nemocí anebo alespoň ke snížení jejich nebezpečnosti. Jejich účinek totiž spočívá buď v inhibici růstu a rozmnožování patogenních bakteriálních buněk, jedná se tedy o bakteriostázi, nebo mohou úplně zničit daný mikroorganismus, a pak účinkují baktericidně. [24] Avšak krátce po objevu těchto antimikrobních látek byla zjištěna rezistence u některých kmenů bakterií. [23]

2.2 Rozdělení antibiotik podle místa a mechanismu účinku

Antibiotika se liší svojí strukturou molekuly. To vede ke vzniku odlišných vlastností, a také mechanismy účinku jsou různé. [27] Inhibují funkci struktur v buňce a jsou tříděny do skupin podle zasaženého místa. [25] Rozdělení antibiotik je uvedeno v Tabulka 1.

Tabulka 1: Rozdělení ATB podle mechanismu jejich účinku [27]

Mechanismus účinku	Antimikrobiální látky
Inhibice syntézy buněčné stěny	β -laktamová ATB glykopeptidy polypeptidy karbapenemy monobaktamy
Působení na cytoplazmatickou membránu	polyeny polymyxiny azoly
Inhibice proteosyntézy	tetracykliny makrolidy linkosamidy
Narušení syntézy nukleových kyselin	chinolony sulfonamidy

2.2.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Buněčná stěna (BS) je pro většinu mikroorganismů životně důležitá. Její funkce spočívá v tom, že udržuje stálý tvar buňky a dává jí pevnost. [28] Antibiotika, která působí nepříznivě na syntézu BS, se navážou na dané místo, čímž inhibují enzymy tvořící peptidoglyken. ATB působí na mikroorganismy v době jejich růstu, a proto se doporučuje je podávat a předepisovat v počáteční fázi infekce. Jedná se o nevratný děj, který většinou vede k rozpadu buňky. Mezi látky využívající tohoto typu mechanismu řadíme např. peniciliny a cefalosporiny (β -laktamy). [29]

2.2.2 Narušení cytoplazmatické membrány

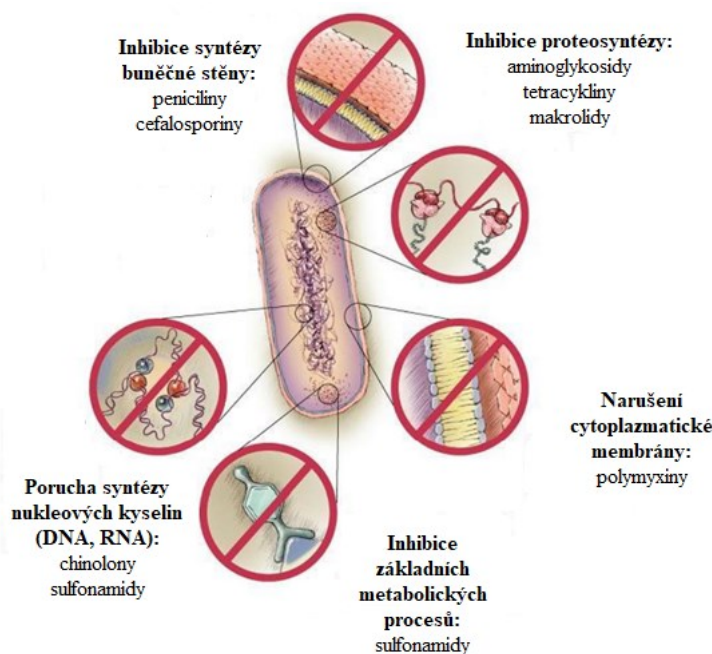
Cytoplazmatická membrána plní mnoho důležitých funkcí, především se jedná o její selektivní propustnost. Díky této semipermeabilitě řídí a reguluje transport látek do buňky a ven z ní. Při poškození funkce cytoplazmatické membrány se tedy polopropustnost poruší a dojde k úniku potřebných látek do okolí. [28] Toto může vést i k narušení rovnováhy iontů v buňce. Příkladem antimikrobiální látky s uvedenou funkcí je amfotericin B, který se řadí mezi antimykotika působící hlavně na kvasinky a plísně. Nejčastějším následkem jeho působení je zánik buňky. [27] [29]

2.2.3 Porucha syntézy proteinů

K syntéze bílkovin dochází na ribozomech, konkrétně na jedné nebo obou jejich podjednotkách (30S a 50S). Peptidový řetězec se postupně prodlužuje a vznikají nové proteiny. Některá antibiotika tuto syntézu narušují, a to například tetracyklin nebo mupirocin náležící mezi makrolidy. Jedná se o širokospektrá ATB s bakteriostatickým účinkem. [27] [30]

2.2.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Nukleové kyseliny (DNA, RNA) jsou důležitou součástí každé buňky. Je v nich uložena genetická informace organismu. Antibiotika inhibují enzymy, které se účastní transkripce i tvorby nukleových kyselin. [30] [31] Do této skupiny antimikrobiálních látek je zařazen například kotrimoxazol ze skupiny sulfonamidových antibiotik. [32]



Obrázek 2: Mechanismy účinku antibiotik [33]

2.3 Antibiotická rezistence

Rezistence je schopnost mikroorganismů přežít účinek určité koncentrace antimikrobiální látky. Pro zjištění účinků antibiotik a odolnosti proti nim, se zde zavádí termín minimální inhibiční koncentrace (MIC). Tato koncentrace definuje nejnižší potřebnou dávku pro usmrcení nebo zastavení růstu daného mikroorganismu. [34] V poslední době se odolnost vůči antibiotikům stala vážným a velmi diskutovaným tématem. [23]

Antibiotická rezistence je velkou hrozbou jak pro zdraví lidí, tak i zvířat. Díky schopnosti mikroorganismů odolávat antimikrobiální léčbě, se rezistence na antibiotika stala globálním problémem. [35] Nejedná se pouze o oblast lékařství a našeho zdraví, ale taktéž tato krize zasahuje do ekonomiky. Došlo ke zvýšení nákladů za léčbu proti nemocem způsobenými rezistentními patogeny. [36] [37]

2.3.1 Mechanismy vzniku antibiotické rezistence

Antibiotická rezistence je obranná reakce některých druhů mikroorganismů a existuje mnoho mechanismů jejího vzniku. Tento obranný mechanismus se může přenášet z generace na generaci formou přenosu genů zodpovědných za tuto rezistenci. Tuto genetickou informaci mají v sobě zakódovanou především plazmidy, proto může dojít k přenosu těchto genů mezi příbuznými i nepříbuznými bakteriemi. [38]

V buňce se mohou vytvořit enzymy, které naruší strukturu antibiotika, či ho inaktivují. Například proti penicilinu mohou bakterie produkovat β -laktamázy, které se naváží na β -laktamový kruh, který se rozštěpí. Rozštěpený kruh není schopen se vázat na cílové místo, takže ve výsledku nemá žádné antimikrobní účinky. Druhým typem mechanismu vzniku je změna v propustnosti membrány buňky bakterií, díky čemuž se zabrání průniku antimikrobiální látky do buňky. Opakem tohoto mechanismu je bakteriální eflux, jinak řečeno vyloučení cizích toxických látek, včetně antibiotik, ven z buňky. Využívají se přitom proteinové pumpy zabudované v buněčných membránách. Tím dojde ke snížení koncentrace ATB v buňce a současně i jeho účinnosti. [39] Bakteriální buňka si může vytvořit odolnost také tím, že se pozmění cílový receptor pro dané antibiotikum. Vytvoří se tzv. klamné místo, na které se naváže používané antibiotikum, místo původního cíle. [34]

Rozlišují se dva druhy antibiotické rezistence podle jejího vzniku. Vrozenou neboli přirozenou rezistenci mikroorganismy mají v sobě zabudovanou již od jejich samotného vzniku. Buňka je odlišná svou strukturou. V buňce se nenachází místo, kam by se antibiotikum mohlo navázat. V některých případech buněčná stěna, která pokrývá povrch buňky, může být i nepropustná pro tyto antimikrobiální látky. [27] Mikroorganismy s touto rezistencí mohou produkovat enzymy nebo látky, které působí na antibiotikum. Příkladem tohoto typu je nepřítomnost buněčné stěny u mykoplazmat, která jsou odolná vůči antibiotikům β -laktamového typu. S touto rezistencí se počítá již od počátku růstu daného rodu nebo druhu mikroorganismu. Této rezistenci lze využít při růstu mikroorganismů na kultivačních půdách *in vitro*. Tím můžeme kontrolovaně zamezit růstu nepožadovaných MO. [40]

Mnohem větší hrozbou je rezistence získaná během života neboli sekundární. Vystavení mikroorganismů antibiotikům, nebo celkově i dalším látkám s antimikrobiální aktivitou může vést ke vzniku a rozvoji rezistence. [41] Tato rezistence může přetrvat po celou dobu života nebo časem vymizet. Mikroorganismy se přizpůsobují a dochází k mutacím jejich genomu. [42]. Antibiotická rezistence získaná může vzniknout jak fenotypickou, tak genetickou změnou. Fenotypická změna je adaptace bakterií na pozměněné metabolické pochody. Avšak tento způsob vzniku rezistence je méně častý. Hlavní roli hrají genetické změny, které jsou zapříčiněny mutací genu na chromozomu, nebo dojde k převzetí genu na rezistenci od jiné bakterie. Výsledkem jsou tak rezistentní buňky. [34] [43]

2.3.2 Příčiny vzniku antibiotické rezistence

Existuje mnoho příčin, díky kterým dochází k odolnosti mikroorganismů proti antimikrobiálním látkách. Hlavním důvodem pro vznik rezistence je opakované a častější předepisování antibiotických léčiv. To souvisí s jejich nadměrným užíváním. Předepisují se v době, kdy nejsou třeba, např. při virových onemocněních. V některých případech pacienti nesplní celou předepsanou dobu užívání těchto léků. [44] [45]

Ve velkém množství se používají ATB i ve veterinární medicíně, k léčbě hospodářských zvířat a zemědělství, což může vést také k rozvoji této schopnosti. K vývoji přispívá i nedostatečná produkce nových antibiotických látek. [44] [45]

3 GRAMPOZITIVNÍ KOKY IZOLOVANÉ Z POTRAVIN A JEJICH ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Za posledních let bylo izolováno z potravin mnoho patogenních kmenů různých druhů mikroorganismů. Na opracovaném mase drůbeže se zjistila přítomnost hned několika zástupců grampozitivních koků. Mezi ně můžeme zařadit *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. durans*, nebo *Streptococcus salivarius*. Tyto druhy kolonizují především trávicí trakt lidí, ale také zvířat. [46] Z mléčných potravin se podařilo izolovat i některé zástupce rodu stafylokoků, např. *Staphylococcus aureus* anebo *S. chromogenes*. [47]

Drůbeží maso bývá často zdrojem patogenů. Jedná se o jednu z nejrizikovějších potravin živočišného původu. Maso se může kontaminovat zmiňovanými bakteriemi ve všech fázích výroby – při porážení, zpracování, skladování i uvádění produktu na trh. Čerstvě zpracované maso z poražených zvířat je ideálním prostředím pro růst a množení mikroorganismů. Proto je důležité dodržovat všechny hygienické předpisy, čistotu pracovního prostředí a podmínky skladování. Je zapotřebí vždy kontrolovat hotové výrobky, čímž se zabrání rozšíření určitých druhů mikroorganismů. [46]

V potravinové řetězci jsou hojně využívány antimikrobiální látky. V první řadě slouží jako prevence vzniku chorob anebo jsou užitečné při léčbě infekčních onemocnění hospodářských zvířat. Avšak přítomné patogenní mikroorganismy jsou schopny si vytvořit rezistenci na tyto látky. Skrze potravu se poté rezistentní kmeny mohou přenášet na člověka. Někdy postačí i pouhý kontakt s daným ošetřeným zvířetem. K přenosu může dojít, i když s masem manipuluje infikovaná osoba. Tento typ přenosu je typický například pro *Staphylococcus aureus*. [48]

3.1 Grampozitivní koky

Bakterie můžeme odlišit podle různých znaků, včetně morfologických. Základní rozdělení je podle tvaru buněk – nejčastější jsou kulovité (koky) a tyčinkovité (bacily). Grampozitivní koky jsou tedy skupina bakterií s kulovitým tvarem buňky. Od gramnegativních se liší hlavně stavbou a složením buněčné stěny. Pro rozpoznání, o který typ bakterie se jedná, se využívá Gramovo barvení. Tuto metodu obarvení vynalezl významný dánský mikrobiolog Hans Christian Gram v roce 1884. [49]

Buňky prokaryotických grampozitivních koků mají na povrchu buněčnou stěnu s tlustou vrstvou peptidoglykanu tvořenou polysacharidy. Na tuto vnější vrstvu se při barvení váže

krystalová violet' a roztok jodidu draselného a vytvoří se nerozpustný komplex. Buňky grampozitivních bakterií budou mít po obarvení modrou až fialovou barvu. U gramnegativních bakterií se rozpustí vnější lipopolysacharidová vrstva působením alkoholového roztoku. Díky tenké vrstvě peptidoglykanu v buněčné stěně se komplex smyje a buňky se zbarví do červena, popřípadě růžova. [50], [51]

Do této skupiny grampozitivních koků řadíme například rody *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus* a *Enterococcus*. [52]

3.2 Rod *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou fakultativně anaerobní. Běžně jsou součástí mikrobioty lidí i živočichů. Na pevných půdách mají lesklé, bezbarvé nebo do žluta zabarvené kolonie. Jedná se o kataláza-pozitivní bakterie, neboť produkují enzym katalázu, tedy až na pár výjimek (např. *S. saccharolyticus*). Mnoho druhů je patogenních a mohou způsobovat různá infekční onemocnění. [53] [54]

V nepříznivých podmínkách netvoří spory. Do značné míry bývají k těmto podmínkám vnějšího prostředí rezistentní. Bývají velmi dobře přizpůsobiví k nepříznivým podmínkám. Modifikují svůj metabolismus tak, aby přežili. [55] Jsou schopny přečkat zahřátí na 55 °C po dobu 30 minut, navíc také tolerují vyšší koncentrace chloridu sodného. Této schopnosti se využívá pro jejich izolaci. Kultivují se na pevných selektivních půdách s 10 % koncentrací NaCl. Jejich optimální teplota růstu je 35 °C. Jako většina bakterií, tak i stafylokoky, rostou v prostředí o neutrálním pH. [49]

Rod stafylokoků můžeme dělit podle jejich schopnosti produkovat koagulázu. Je to enzym, který se účastní tvorby krevní sraženiny. Za nejznámějšího koaguláza-pozitivního stafylokoka, tedy produkujícího tento enzym, můžeme považovat druh *S. aureus*. [56]

3.2.1 Výskyt stafylokoků v potravinách

Stafylokoky jsou poměrně odolné vůči změnám vnějšího prostředí. Proto je velice pravděpodobné, že budou schopny růst na různých typech potravin. [57] Požití těchto potravin může způsobit onemocnění. Většinou je to zapříčiněno produkcí toxinů těmito patogenními koky. Je to také důsledek nesprávného zacházení s potravinami a nedodržování podmínek hygieny při jejich zpracování či úpravě a skladování. [58]

Zástupci rodu stafylokoků byli izolováni například z masa (např. skot, drůbež, ryby), ale také ze syrového mléka. Po účinné pasteraci nepředstavovaly tyto druhy nebezpečí, neboť

byly usmrceny vysokou teplotou. Problémy však nastaly při konzumaci sušených mléčných výrobků. V syrovém mléce došlo k nárůstu stafylokoků, kteří vyprodukovali termostabilní toxiny. Ty nebyly následnou pasterací inaktivovány. [59]

Staphylococcus aureus

Pro člověka má ze stafylokoků z hlediska patogenity největší význam *Staphylococcus aureus* neboli „zlatý stafylokok“. Může se vyskytovat běžně na kůži člověka, či být součástí jeho nosní sliznice a dutiny ústní. Avšak při snížené imunitě může začít působit jako patogen. [60]

Patří mezi nejčastější původce pyogenních onemocnění, hlavně onemocnění kůže. Mezi nejrizikovější faktory vzniku infekce tímto druhem spadá dlouhodobá hospitalizace, např. kvůli operaci. Je producentem také řady látek. Důraz by měl být kladem především na jeho toxiny, které způsobují stafylokokovou enterotoxikózu požitím potravin obsahující tyto enterotoxiny. Působí jako neurotoxiny, které stimulují zrychlení střevní peristaltiky a vyvolávají průjemy anebo zvracení. [49] Mezi nejčastěji kontaminované potraviny tímto druhem stafylokoků patří různé druhy masa (např. drůbež), mražené krémy (zmrzlina), kozi i kravské mléko apod. [60] [47]

3.2.2 Antibiotická rezistence rodu stafylokoků

Methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA)

Mnohé kmeny stafylokoků vykazují jistou rezistenci k antibiotikům. Nejčastějším je **Methicilin-Rezistentní *Staphylococcus aureus***. Je rezistentní vůči oxacilinu či methicilinu. [60] [61]

Prvně byla vytvořena odolnost vůči mnohým β -laktamovým antibiotikům. Rezistence je založena na přítomnosti genů *blaZ*, díky kterým dojde k produkci penicilinázy (β -laktamázy), což je enzym degradující β -laktamový kruh. Později se tak vyvinula antibiotika na bázi penicilinu, která jsou rezistentní vůči působení enzymu β -laktamázy. Příkladem takových antibiotik je např. methicilin. Avšak postupem času si některé kmeny byly schopny vytvořit odolnost i k tomuto antibiotiku. [49] [62]

3.3 Rod *Enterococcus*

3.3.1 Charakteristika rodu a jeho výskyt v potravinách

Rod *Enterococcus* je skupina nepatogenních až podmíněně patogenních bakterií. Patří do skupiny kataláza negativních grampozitivních koků. Rostou i při zásaditém pH (8,5) a i při nízkých teplotách, kolem 10 °C. Jsou schopné se množit také v hypertonickém prostředí, při koncentraci 6,5 % NaCl. Nejznámějšími zástupci tohoto rodu jsou *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* a *E. durans*. [49]

Přestože osidlují většinou střeva – trávicí trakt lidí i zvířat, mohou růst i v nesterilních potravinách anebo rostlinách. Enterokoky jsou považovány za indikátory fekálního znečištění v potravinářském průmyslu. Jsou rezistentní vůči vyšším teplotám a celkově velmi odolné k vnějším chemickým i fyzikálním vlivům. Vyskytují se nejčastěji na mase, sýrech a v mléce. [63]

3.3.2 Antibiotická rezistence enterokoků

Pro zjištění, jaký má dopad používání antibiotik na drůbež, byly při studii [64] izolovány enterokoky celkem z 82 farem. Převažovaly především izoláty druhů *E. faecium* a *E. faecalis*. Oba druhy vykazovaly jistou multirezistenci k antimikrobiálním látkám. U druhu *E. faecalis* se vyskytovala rezistence především k makrolidovým a linkosamidovým antibiotikům. Tyto izoláty také byly více rezistentní k tetracyklinům. Avšak u izolovaných kmenů druhu *E. faecium* byla nejvíce vyzorována rezistence hlavně k penicilinu. Důležité je také poukázat na to, že většina izolovaných enterokoků z drůbeže a prostředí jejich chovu bývá odolná k antibiotickým léčivům používaných při humanitárním lékařství. [64]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem bakalářské práce bylo z vodní drůbeže a prostředí jejich chovu izolovat grampozitivní koky – konkrétně rody *Staphylococcus* a *Enterococcus*, případně příbuzné rody obou. Následně bylo třeba vybrané kolonie identifikovat pomocí metody MALDI-TOF. Identifikované kmeny byly podrobeny testům na rezistenci k vybraným antibiotikům. Následně bylo cílem vyhodnotit výsledky, zhodnotit kmeny citlivé/rezistentní k testovaným antibiotikům, výsledky zpracovat, zhodnotit a vyvodit z nich příslušné závěry práce.

5 MATERIÁL

5.1 Pracovní pomůcky a přístroje

- Sterilní vzorkovnice, zkumavky, Petriho misky,
- skleněné hokejky, etanol pro sterilaci, kahan,
- automatické pipety (20-200 μ l, 100-1000 μ l, 0,5-10 ml), sterilní špičky,
- očkovací kličky, pinzeta,
- analytické váhy,
- Densilometr,
- Biohazard box,
- Vortex Mixer,
- termostatické skříně (teplota 37 °C, 30 °C),
- autokláv a další.

5.2 Vzorke

Celkem bylo odebráno 30 vzorků v různých časech z více míst chovu kachny pižmové, včetně jejího těla. (Tabulka 2) Vzorke pocházely z masa poražených kachen a současně se odebraly také z chladicí vody využívané při jejich porážce. Dále byly udělány stěry peří živých zvířat z břicha, ale také v oblasti kloaky. Nakonec se vzaly vzorke vody z napájecích bazének i se sedimenty.

Tabulka 2: Počet odebraných vzorků a datum jejich odběru

Popis vzorku	Počet odebraných vzorků	Datum odběru
kachní maso	10	29.06.2022
stěry z peří živých kachen	10	10.07.2022
chladicí voda z porážky kachen	5	29.06.2022
napájecí voda	5	10.07.2022

5.3 Antibiotika

V mé bakalářské práci jsem zkoumala antibiotickou aktivitu (rezistence, citlivost) u vybraných grampozitivních koků. Pracovala jsem s rody *Staphylococcus* a *Enterococcus*. Byly využívány papírové disky s následnými zvolenými antibiotiky. (Obrázek 3)

Vybraná ATB pro rod *Staphylococcus*:

- Peniciliny – benzylpenicilin, amoxicilin
- Cefalosporiny – cefoxitin, cefotaxim
- Karbapenemy – meropenem, imipenem
- Fluorochinolony – ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin
- Aminoglykosidy – amikacin, gentamicin
- Makrolidy – erytromycin, klindamycin
- Ostatní – tetracyklin, nitrofurantoin, rifampicin

Vybraná ATB pro rod *Enterococcus*:

- Peniciliny – amoxicilin, piperacilin/taxobactam
- Karbapenemy – imipenem
- Fluorochinolony – ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin
- Aminoglykosidy – gentamicin, streptomycin
- Glykopeptidy – vankomycin, teikoplanin
- Ostatní – nitrofurantoin



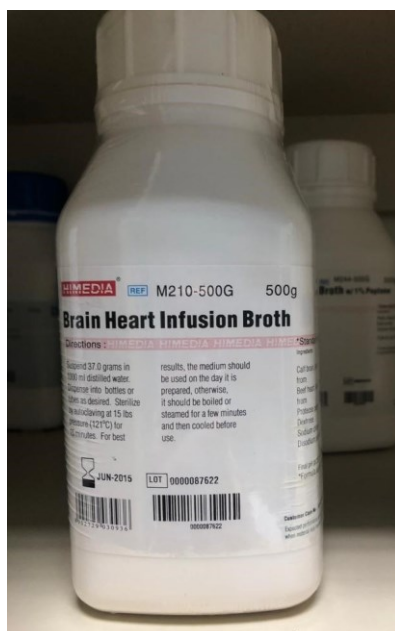
Obrázek 3: Dávkovací tuba s papírovými antibiotickými disky

5.4 Kultivační půdy

Pro izolaci enterokoků a stafylokoků byly vybrány tyto selektivně-diagnostické půdy:

- Slanetz-Bartley (SB) – pro detekci enterokoků
- Baird-Parker (BP) – k selektivní izolaci koaguláza-pozitivních stafylokoků

Pro následné uchování vybraných kolonií byla použita půda Brain Heart Infusion Broth (BHI). (Obrázek 4) Tento typ půdy obsahuje větší množství živin pro lepší růst mikroorganismů a je určena převážně k detekci patogenních koků. Jelikož jde o směs na přípravu půdy v tekuté podobě, bylo třeba přidat k navážce navíc agar.

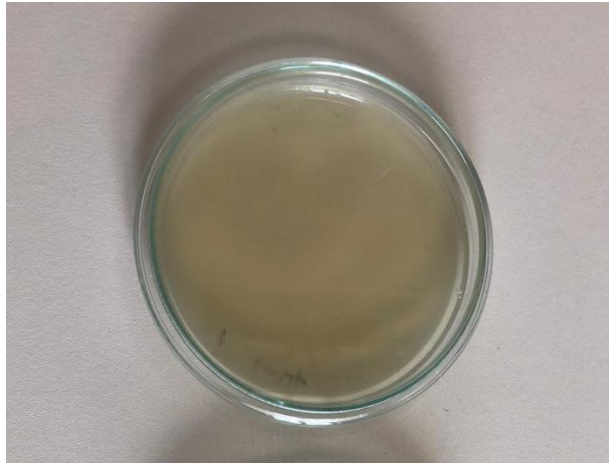


Obrázek 4: Směs BHI Broth

Při zkoumání antibiotické rezistence vybraných kmenů gram pozitivních koků byly využity plotny s Mueller-Hinton agarem.

5.4.1 Příprava kultivačních médií

Příprava kultivačních médií byla dle návodu, který je uveden na obalu nádoby. Příslušná navážka dané směsi byla smíchána s destilovanou vodou a sterilována v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Po částečném vychladnutí byly připravené půdy přelity do sterilních Petriho misek. (Obrázek 5)



Obrázek 5: Petriho miska s Mueller-Hinton (MH) agarem

5.5 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl potřeba pro přípravu výchozí suspenze tuhého vzorku – pro zhomogenizování kachního masa. Také byl využit pro další naředění této suspenze.

Roztok byl připraven rozpuštěním příslušného množství chloridu sodného (NaCl) v destilované vodě. Bylo třeba připravit roztok o výsledné koncentraci 0,9 %, který byl poté autoklávován při teplotě 121 °C a po dobu 15 minut.

6 METODIKA

6.1 Mikrobiologický rozbor vodní drůbeže

6.1.1 Izolace grampozitivních koků

Pro izolaci požadovaných grampozitivních koků bylo třeba aplikovat výchozí suspenzi vzorků na selektivně diagnostické živné půdy BP a SB.

K naředění bylo používáno desítkové ředění, což znamená 1 díl vzorku a 9 dílů fyziologického ředícího roztoku (1:9). Pevný vzorek byl prvně rozmělněn v homogenizátoru s ředícím roztokem, aby vznikla výchozí suspenze. S tekutými vzorky bylo možné rovnou pracovat, nebo je naředit za pomoci zmiňovaného ředění desítkové řady.

Jednotlivá ředění pak byla roztěrem vyseta na Petriho misky (PM) s připravenými půdami, přičemž na 1 miskou bylo nanášeno 100 µl suspenze. PM byly uloženy do termostatické skříně ke kultivaci při teplotě 37 °C po dobu 24 hod. Po kultivaci byly spočítány narostlé kolonie.

Z vykultivovaných kultur byly vybrány suspektní kolonie, které byly následně přeočkovány metodou křížového roztěru na čerstvě připravené agary. Pro tento účel byly užívány obohacené živné půdy BHI. Cílem křížového roztěru je získání samostatných kolonií. Tyto kolonie byly obarveny podle Grama.

6.1.2 Identifikace grampozitivních koků – Gramovo barvení

Gramovo barvení je metoda, jejíž účelem je odlišení grampozitivních a gramnegativních bakterií podle složení buněčné stěny. U grampozitivních bakterií se během barvení vytvoří komplex violeti s Lugolovým roztokem, který se dostane do struktury buňky. Aceton není schopen prostoupit přes vnější bariéru neboli buněčnou stěnu, takže komplex se nevymyje a buňky tohoto typu mají modrou barvu. [65]

Prvně bylo potřeba připravit fixovaný preparát. Na podložní sklíčko se nanášela kapka fyziologického roztoku, případně destilované vody. V ní se vzápětí rozetřela kultura testovaného mikroorganismu. Nakonec se pro docílení fixace preparátu sklíčko protáhlo plamenem plynového kahanu.

Na připravený fixovaný preparát byly postupně nanášeny barvicí roztoky v následujícím pořadí:

1. Krystalová violet – doba působení barviva 1 minuta
2. Opláchnutí sklíčka destilovanou vodou
3. Lugolův roztok – působení barviva 30 sekund
4. Oplach sklíčka acetonem
5. Safranin – ponoření sklíčka do barviva na 1 minutu a omytí destilovanou vodou

6.1.3 STAPHYtest

Pro identifikaci bakterií je k dispozici řada různých testů. V této práci byl využíván konkrétně STAPHYtest 24. Test je určen k identifikaci bakterií rodu *Staphylococcus*. Je založen na zkoumání daných mikroorganismů pomocí 24 různých biochemických testů, které se pak vyhodnocují jak vizuálně, tak i za výpomoci přístroje a počítače. [66] Tento komerční set tedy obsahuje mikrotitrační destičku. Ta se skládá ze 4 sad (3 sloupce), kdy každá z nich má 24 jamek. (Obrázek 6, Tabulka 3)

Postupovalo se podle návodu uvedeného u soupravy STAPHYtest 24. Pracovalo se s předem připravenou suspenzí bakterie a fyziologického roztoku. Stupeň zákalu této suspenze odpovídal číslu 2 podle McFarlandovy stupnice. Do jamek se pipetou dávkovalo 100 μ l připravené suspenze. Po inokulaci se do jamek s označením H, G a F prvního řádku přidal parafinový olej (po 2 kapkách do každé jamky). Poté byla destička vložena do sterilního sáčku a do termostatu s 37 °C. Po kultivaci se vyhodnotilo, zda testy vyšly pozitivně, či negativně.



Obrázek 6: STAPHYtest 24 – sada pro identifikace 1 kmene bakterie

Tabulka 3: Biochemické testy zahrnuté ve STAPHYtest 24

A	Eskulin	Mannóza	Xylitol
B	Fosfatáza	Xylóza	Raffinóza
C	β -Glukosidáza	Maltóza	Arabinóza
D	β -Glukuronidáza	Mannit	Cellobióza
E	β -Galaktozidáza	Trehalóza	Fruktóza
F	Ornithin	Sacharóza	Ribóza
G	Arginin	Galaktóza	Sorbitol
H	Ureáza	N-acetyl β -D-glykosamin	Laktóza

6.1.4 MALDI-TOF

Pro rychlou a přesnější identifikaci neznámých kmenů bakterií, byla využita metoda MALDI-TOF (Matrix Assisted Desorption Ionization – Time Of Flight). Je založena na principu hmotnostní spektrometrie, kdy dochází ke stanovení molekulové hmotnosti laserovou ionizací. Jako vzor je k dispozici matrice se současnou detekcí doby letu. Matricí je kyselina skořicová, která slouží jako rozpouštědlo. Tato kyselina vyextrahuje proteiny testované buněčné kolonie. Cílem je změřit spektra, která jsou vždy specifická pro určitý druh mikroorganismu. Následně se tato spektra porovnávají s profilovými výsledky v databázi. [67]

Postup přípravy bakteriálních kmenů na MALDI-TOF:

Do mikrozkušavky typu Eppendorf bylo pipetou přeneseno 300 μ l destilované vody, ve kterých byla rozmíchána inokulační kličkou hustá kultura testované bakterie. K suspenzi bylo následně přidáno 900 μ l etanolu.

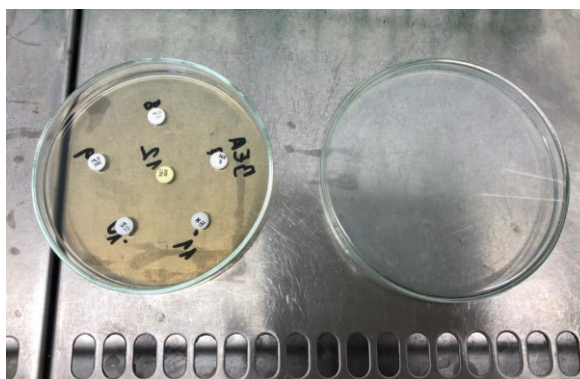
Druhové stanovení bakteriálních izolátů bylo provedeno v laboratoři Slovenské poľnohospodárske univerzity v Nitře ve Výskumném centru AgroBioTech ve spolupráci s prof. Ing. Kačániovou, PhD.

6.2 Skrining antibiotické rezistence vybraných grampozitivních koků

6.2.1 Diskový difuzní test

Diskový difuzní test je kvalitativní metodou stanovení antimikrobiální aktivity. Zjišťuje se, jestli je testovaný mikroorganismus citlivý (rezistentní) k dané antimikrobiální látce, v tomto případě antibiotiku. [68]

Při této metodě byla využívána antibiotika ve formě papírových disků. Test byl prováděn na Petriho miskách s agarem Mueller-Hinton (MH). Pomocí sterilní kličky byla ve fyziologickém roztoku rozmíchána kolonie bakterií. Vytvořená suspenze byla rovna zákalu 1 McFarlandovy stupnice, který byl změřen densilametrem. Na MH agary bylo přeneseno pipetou 200 μ l připravené suspenze, která byla skleněnou sterilní hokejkou rozetřena. Sterilní pinzetou byly zde pokládány disky s antibiotiky. (Obrázek 7) Hotové misky byly následně inkubovány 48 hodin v termostatu při teplotě 30 °C.



Obrázek 7: Antibiotické disky na misce s rozetřenou suspenzí před kultivací

Vyhodnocovala se velikost inhibičních zón. Výsledky se porovnávaly se stanovenými velikostními hranicemi Evropským výborem pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing), zkráceně EUCAST. (Tabulka 4, Tabulka 5) Když byla naměřena velikost zóny menší, než je dána předpisy EUCAST, tak z toho vyplývalo, že mikroorganismus je rezistentní k antibiotiku a neroste v jeho přítomnosti. [69]

Pro některá antibiotika mohou být výsledky různé. Závisí to hlavně na rezistenci k ostatním antibiotikům, a také na konkrétním testovaném druhu bakterie. V některých případech mohou být rezistentní k danému typu ATB, a v jiných zase citlivé (R/C).

Tabulka 4: Hodnoty velikosti inhibičních zón pro enterokoky podle EUCAST

Název testovaného antibiotika	Velikost inhibičních zón [mm] - určení rezistence
Amoxicilin	R/C
Piperacilin/taxobactam	R/C
Imipenem	<21
Ciprofloxacin	<15
Levofloxacin	<15
Norfloxacin	<12
Gentamicin	R/C
Streptomycin	R/C
Vankomycin	<12
Teikoplanin	<16
Nitrofurantoin	<15

U penicilinových antibiotik většinou platí, že kmeny druhu *E. faecium* jsou k nim rezistentní. Naopak kmeny bakterie *E. hirae* bývají často citlivé na působení antibiotik této skupiny.

Gentamicin může být využit pro testování vysoké úrovně rezistence k aminoglykosidům. Vysoce rezistentní jsou ty kmeny, kterým byla naměřena velikost zóny v průměru <8 mm. Tyto kmeny jsou zároveň rezistentní k ostatním aminoglykosidovým antibiotikům kromě streptomycinu, který musí být testovaný zvlášť. Izoláty rezistentní ke gentamicinu nemusí být rezistentní ke streptomycinu. Kmeny vykazují vysokou rezistenci ke streptomycinu, když je naměřena velikost inhibiční zóny <14 mm. [69]

U některých antibiotik pro testování stafylokoků také nejsou striktně předepsány limity pro velikosti inhibičních zón. K antibiotiku benzylpenicilin by měly být všechny kmeny rodu *Staphylococcus* rezistentní. Kmeny, které jsou zároveň rezistentní k cefoxitinu, bývají rezistentní i ke všem ostatním penicilinům. Když je prokázána odolnost k cefoxitinu, tak daný kmen bývá současně rezistentní ke karbapenemům (imipenem, meropenem). Také toto pravidlo často platí pro cefotaxim ze skupiny cefalosporinů. [69]

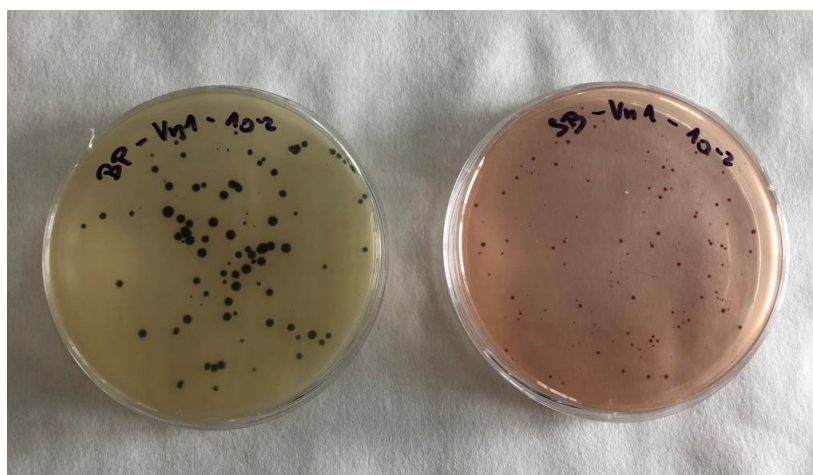
Tabulka 5: Hodnoty velikosti zón pro stafylokoky podle systému EUCAST

Název testovaného antibiotika	Velikost inhibičních zón [mm] - určení rezistence
Benzylpenicilin	R/C (<i>S. aureus</i> <26)
Amoxicilin	R/C
Cefoxitin	<22
Cefotaxim	R/C
Meropenem	R/C
Imipenem	R/C
Ciprofloxacin	<21 (<i>S. aureus</i> <24)
Levofloxacin	<22 (<i>S. aureus</i> <24)
Norfloxacin	<17
Amikacin	<15
Gentamicin	<18 (<i>S. aureus</i> <22)
Erytromycin	<21
Klindamycin	<22
Tetracyklin	<22
Nitrofurantoin	<13
Rifampicin	<26 (<i>S. aureus</i> <30)

7 VÝSLEDKY

7.1 Izolace grampozitivních koků

Na selektivně diagnostické půdě Baird-Parker byly stanovovány koaguláza pozitivní stafylokoky. Na půdě vyrostly kolonie černého a šedého zbarvení. Příčinou černé barvy je redukce teluričitanu obsaženého v médiu. Některé kolonie byly obklopeny precipitační zónou. Zóna projasnění (precipitace) je důkazem působení enzymu lecitinázy.



Obrázek 8: Morfologie kolonií na půdách BP a SB (izoláty z napájecí vody)

Pevná půda Slanetz-Bartley sloužila pro izolaci enterokoků. Barva jejich kolonií byla růžová s tmavě fialovým středem a světlými okraji.

Z každého vzorku byly zvoleny tři kolonie z obou pevných půd. Následně byly přeočkovány křížovým roztěrem na BHI agar, čímž jsem získala jednotlivé kolonie.



Obrázek 9: Křížový roztěr vybrané kolonie

7.1.1 Počty indikátorových mikroorganismů

Počty bakterií se udávají vždy v jednotkách CFU (Colony Forming Units) neboli KTJ (Kolonie Tvořící Jednotky) na jeden gram, nebo mililitr vzorku. [70] Tyto hodnoty byly spočítány z narostlých kolonií na Petriho miskách, jak pro stanovení počtu mikroorganismů narostlých na kultivační půdě BP, tak i na SB.

$$N = \frac{\sum C}{V \cdot d}$$

Bylo vypočteno CFU/g (ml), což odpovídá N . Ve vzorci výše je $\sum C$ označení pro součet kolonií na jedné vybrané misce. V je pipetovaná hodnota objemu suspenze na misku. Kolikrát byla pipetovaná suspenze zředěna se zapisovalo pod symbol d .

Z výsledků uvedených v tabulkách 6,7 a 8 je patrné, že vyšší nárůst stafylokoků, než enterokoků byl vyzorován až u 26 z celkového počtu odebraných vzorků. Nejnižší výsledné hodnoty KTJ byly získány z vody chladicí. Nejvíce mikroorganismů bylo izolováno ze vzorků kachního masa. Nejvyšší vypočtené hodnoty KTJ/g, jak pro stafylokoky, tak i enterokoky, byly získány konkrétně ze vzorku masa 6. U stafylokoků byla nejvyšší hodnota $5,15 \cdot 10^6$ KTJ/g a u enterokoků $1,27 \cdot 10^5$ KTJ/g. Naopak nejnižší počty enterokoků byly zjištěny ve vzorku masa 4 a stafylokoků ve vzorku masa 10.

Alespoň u 7 vzorků kachního masa (Tabulka 6) se výsledky KTJ/g lišily minimálně o dva řády. Nejvíce se od všech ostatních vzorků kachního masa odlišoval vzorek 4. U vzorku 10 se výsledné hodnoty KTJ/g stafylokoků a enterokoků lišily nejméně, v porovnání s ostatními výsledky vzorků kachního masa.

Tabulka 6: Indikátorové mikroorganizmy (KTJ/g) u vzorků kachního masa

KTJ/g – Kachní maso					
	BP*	SB*		BP*	SB*
1	$3,34 \cdot 10^6$	$8,16 \cdot 10^4$	6	$5,15 \cdot 10^6$	$1,27 \cdot 10^5$
2	$2,48 \cdot 10^6$	$1,29 \cdot 10^4$	7	$2,44 \cdot 10^6$	$2,12 \cdot 10^4$
3	$3,89 \cdot 10^6$	$4,28 \cdot 10^4$	8	$4,59 \cdot 10^6$	$2,52 \cdot 10^4$
4	$1,13 \cdot 10^6$	$4,80 \cdot 10^3$	9	$8,34 \cdot 10^5$	$2,23 \cdot 10^4$
5	$2,97 \cdot 10^6$	$8,50 \cdot 10^4$	10	$4,18 \cdot 10^5$	$1,19 \cdot 10^5$

*na půdě BP byl stanovován počet stafylokoků, na SB počet enterokoků

Z Tabulka 7 lze vyčíst, že výsledné hodnoty KTJ/ml enterokoků a stafylokoků izolované z povrchu peří si jsou hodně podobné. Nejvíce stafylokoků i enterokoků bylo izolováno ze vzorku 15, naopak nejméně mikroorganismů bylo detekováno ve vzorku označeném číslem 17. Počty indikátorových bakterií izolované ze vzorků z peří, vody chladicí a napájecí, se příliš neliší.

Tabulka 7: Indikátorové mikroorganismy (KTJ/g) – stěry z povrchu peří

KTJ/ml – Stěry z peří živých kachen					
	BP*	SB*		BP*	SB*
11	$7,20 \cdot 10^5$	$3,54 \cdot 10^5$	16	$7,00 \cdot 10^5$	$1,27 \cdot 10^5$
12	$6,17 \cdot 10^5$	$3,66 \cdot 10^5$	17	$3,96 \cdot 10^4$	$2,12 \cdot 10^4$
13	$3,14 \cdot 10^5$	$5,16 \cdot 10^5$	18	$2,54 \cdot 10^5$	$2,52 \cdot 10^4$
14	$7,80 \cdot 10^5$	$6,90 \cdot 10^5$	19	$8,98 \cdot 10^4$	$2,23 \cdot 10^4$
15	$3,89 \cdot 10^6$	$8,25 \cdot 10^5$	20	$3,93 \cdot 10^5$	$1,19 \cdot 10^5$

*na půdě BP byl stanovován počet stafylokoků, na SB počet enterokoků

U izolátů z vody napájecí a chladicí (Tabulka 8) je patrné, že větší nárůst stafylokoků i enterokoků byl zjištěn ve vody napájecí. V případě izolátů z napájecí vody byly vyšší hodnoty enterokoků až u tří odebraných vzorků z pěti. U vody chladicí byly vyšší hodnoty detekovány ve všech případech. Rozdíl mezi počtem enterokoků a stafylokoků byl mnohdy až o 2 řády.

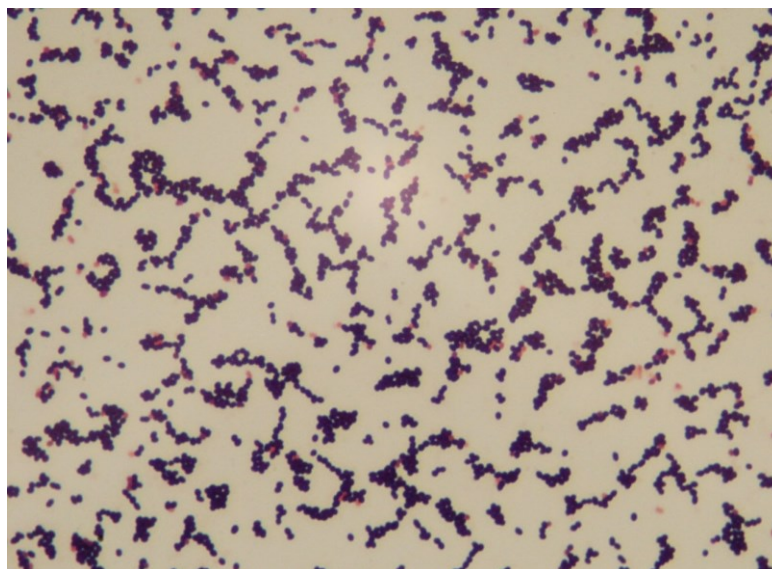
Tabulka 8: Indikátorové mikroorganismy (KTJ/g) – voda napájecí a chladicí při porážce

KTJ/ml					
Napájecí voda			Chladicí voda		
	BP*	SB*		BP*	SB*
21	$8,90 \cdot 10^4$	$2,03 \cdot 10^5$	26	$5,87 \cdot 10^4$	$8,00 \cdot 10^2$
22	$4,57 \cdot 10^5$	$3,35 \cdot 10^5$	27	$2,83 \cdot 10^5$	$5,30 \cdot 10^3$
23	$1,54 \cdot 10^5$	$3,01 \cdot 10^5$	28	$1,01 \cdot 10^5$	$1,90 \cdot 10^3$
24	$1,72 \cdot 10^6$	$1,86 \cdot 10^5$	29	$8,50 \cdot 10^3$	$7,00 \cdot 10^2$
25	$5,50 \cdot 10^4$	$1,51 \cdot 10^5$	30	$9,57 \cdot 10^4$	$1,80 \cdot 10^3$

*na půdě BP byl stanovován počet stafylokoků, na SB počet enterokoků

7.1.2 Gramovo barvení

Po obarvení fixovaného preparátu byly viděny v mikroskopu buňky kulovitého tvaru tmavě modrého zbarvení (Obrázek 10). Byl to důkaz výskytu grampozitivních koků. Buňky se shlukovaly, v některých případech se vyskytovaly v párech (diplokoky) anebo tvořily krátké řetízky.



Obrázek 10: Grampozitivní koky (izolované z masa) – pod mikroskopem

7.2 Identifikace vybraných grampozitivních koků

Celkem bylo identifikováno 106 kmenů grampozitivních bakterií. Z tohoto počtu bylo celkem 64 kmenů zařazených do rodu *Enterococcus*:

- *E. hirae* – 49 kmenů
- *E. faecium* – 15 kmenů

Také byly izolovány a identifikovány kmeny patřící do *Staphylococcus* spp.:

- *S. equorum* – 3 kmeny
- *S. nepalensis* – 1 kmen
- *S. sciuri* – 2 kmeny
- *S. aureus* – 1 kmen
- *S. lentus* – 4 kmenů

Do čeledi Staphylococcaceae se navíc řadí rod *Macrococcus*, který je příbuzný stafylokokům. Z tohoto rodu bylo izolováno 16 kmenů druhu *M. caseolyticus*.

Zbýlých 15 kmenů bylo identifikováno jako následující grampozitivní bakterie:

- *Corynebacterium ammoniagenes*
- *C. callunae*
- *C. stationis*
- *C. casei*
- *Rothia terrae*

Z chladicí vody po porážce byly izolovány pouze dva druhy bakterií, konkrétně z rodu enterokoků (*E. faecium* a *E. hirae*). Tyto dva druhy rodu *Enterococcus* byly izolovány také z ostatních vzorků. V napájecí vodě se vyskytovaly navíc jiné druhy grampozitivních bakterií, včetně stafylokoků (*Staphylococcus lentus*). Nejvíce různých druhů bylo identifikováno ve vzorcích stěrů z povrchu peří. Mimo již vyjmenované se zde nacházely druhy *Staphylococcus sciuri*, *S. lentus* a *S. aureus*. Z masa byly izolovány kmeny druhu *Macrococcus caseolyticus*. (Tabulka 9)

Tabulka 9: Bakterie izolované z odebraných vzorků

Vzorek	Izoláty		
	<i>Enterococcus</i>	<i>Staphylococcus</i>	Ostatní
Chladící voda	<i>E. hirae</i>		
	<i>E. faecium</i>		
Napájecí voda	<i>E. hirae</i>	<i>S. lentus</i>	<i>C. stationis</i>
	<i>E. faecium</i>		<i>R. terrae</i>
Maso	<i>E. hirae</i>		<i>M. caseolyticus</i>
	<i>E. faecium</i>		
Stěry z peří	<i>E. hirae</i>	<i>S. equorum</i>	<i>C. ammoniagenes</i>
	<i>E. faecium</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>C. nepalensis</i>
		<i>S. lentus</i>	<i>C. casei</i>
		<i>S. aureus</i>	<i>C. callunae</i>
			<i>R. terrae</i>

7.3 Skríning antibiotické rezistence

Skríning antibiotické rezistence byl proveden pomocí diskové difuzní metody. Výsledky byly porovnávány s hodnotami (limity) zapsanými v systému EUCAST, které jsou uvedeny v části metodiky (kapitola 6.2.1).

V následujících tabulkách jsou zapsány hodnoty velikostí inhibičních zón, které byly měřeny v průměru celé zóny. Zvýrazněné velikosti zón udávají rezistenci kmenů k jednotlivým antibiotikům. Tmavě žlutá pole značí jistou rezistenci podle hraničních zón zapsaných v EUCAST. Světlá barva pole udává pravděpodobnou rezistenci – u těchto mikroorganismů se může, ale nemusí rezistence k daným antibiotikům vždy potvrdit.

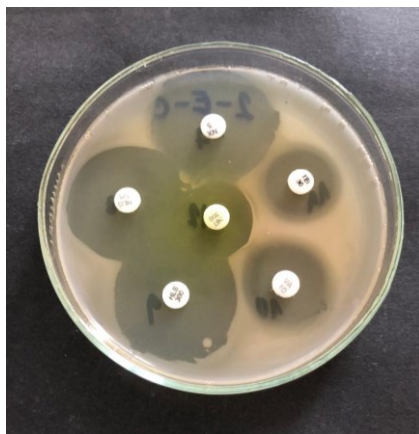
7.3.1 Vliv testovaných antibiotik na enterokoky

Izoláty z kachního masa

Tabulka 10: Zóny působení antibiotik (\varnothing v mm) – kmeny *E. faecium* izolované z masa

Antibiotikum	Izoláty <i>E. faecium</i> – velikost zón (mm)				
	2EC	3EA	5EC	7EB	8EB
Amoxicilin	20	24	14	20	20
Piperacilin/taxobactam	12	20	6	14	16
Imipenem	24	35	18	22	23
Ciprofloxacin	12	16	12	10	10
Levofloxacin	6	16	14	10	10
Norfloxacin	32	20	16	0	8
Gentamicin	28	18	14	16	16
Streptomycin	29	14	17	14	16
Vankomycin	20	20	16	16	20
Teikoplanin	18	18	16	17	17
Nitrofurantoin	18	14	14	14	17

V Tabulka 10 jsou uvedeny velikosti průměru zón v milimetrech pro bakterie druhu *Enterococcus faecium*, které byly izolovány ze vzorků kachního masa. Podle systému EUCAST, kmeny tohoto druhu bývají často rezistentní k penicilinům (kapitola 6.2.1). Všechny 5 testovaných kmenů *E. faecium* bylo rezistentních alespoň k jednomu testovanému antibiotiku. Dokonce byly izolovány i dva multirezistentní kmeny (5EC, 7EB), které byly rezistentní minimálně k jednomu antibiotiku ze tří a/nebo více antibiotických skupin. Z naměřených velikostí zón lze usoudit, že antibiotika vankomycin a teikoplanin nejvíce zamezují růstu testovaných kmenů druhu *E. faecium*. Naopak u antibiotik na bázi fluorochinolonů (ciprofloxacin, levofloxacin) byla dokázána rezistence u většiny kmenů, vyjma izolátu označeného 3EA. Jako nejvíce rezistentní izolát byl označen kmen 7EB, u kterého se nevyskytla žádná zóna po působení norfloxacinu. Ze všech testovaných izolátů *E. faecium* byl nejvíce citlivým kmen 3EA, u kterého byla prokázána rezistence jen ke dvěma antibiotikům.



Obrázek 11: Diskový difuzní test enterokoků (izolát 2EC) – inhibiční zóny

Tabulka 11: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny *E. hirae* izolované z masa

Antibiotikum	Izoláty <i>Enterococcus hirae</i> – velikosti zón (mm)							
	1EA	3EB	4EA	6EA	7EA	8EC	9EA	10EB
Amoxicilin	34	26	25	24	15	12	26	27
Piperacilin/taxobactam	29	27	22	18	21	15	20	21
Imipenem	40	37	32	25	40	25	29	29
Ciprofloxacin	23	21	22	18	12	18	22	20
Levofloxacin	20	18	18	20	15	16	8	12
Norfloxacin	24	18	20	19	17	22	15	22
Gentamicin	18	16	12	13	18	16	17	18
Streptomycin	15	14	15	16	15	16	16	17
Vankomycin	22	17	20	18	22	21	25	29
Teikoplanin	20	16	20	18	17	21	19	20
Nitrofurantoin	18	11	14	16	13	18	20	20

Pro druh *E. hirae* platí, že ve většině případech jsou kmeny citlivé na penicilinová antibiotika. Pouze u jediného kmene byla naměřena menší zóna, což může znamenat, že tento izolát se prokazuje jistou odolností k amoxicilinu. Podle EUCAST systému může být rezistence ke gentamicinu a streptomycinu odlišná u různých kmenů. Pokud je prokázána vysoká odolnost ke gentamicinu, tak je daný kmen zároveň pravděpodobně odolný i k ostatním aminoglykosidům. Výjimkou je může být antibiotikum streptomycin. U něj je třeba provádět testy na antibiotickou aktivitu zvlášť. Z výše uvedených izolátů byly identifikovány pouze dva kmeny s pravděpodobnou nízkou rezistencí ke gentamicinu. Při testování účinku streptomycinu byly naměřené velikosti inhibičních zón velice podobné. Avšak konkrétně izolovaný kmen 3EB by mohl být vysoce odolný ke streptomycinu.

Kvalitativním diskovým difuzním testem byla zjištěna rezistence k antibiotiku nitrofurantoinu u třech testovaných kmenů. Vankomycin a teikoplanin, na které byly citlivé kmeny *E. faecium*, inhibovaly růst i bakterie *E. hirae*.

Také u antibiotik piperacilin/taxobaktamu, imipenemu a norfloxacinu byla prokázána inhibice růstu u všech testovaných kmenů.

Z izolovaných kmenů *E. hirae* nebyla ani u jednoho z nich zjištěna multirezistence. Všechny izoláty byly rezistentní minimálně k jednomu antibiotiku, kromě kmene 1EA. Největší míru rezistence vykazoval kmen 9EA, a to k levofloxacinu, u kterého byla naměřena v průměru nejmenší inhibiční zóna. (Tabulka 11)

Izoláty z peří

Tabulka 12: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny *E. hirae* – stěry z peří

Antibiotikum	Izoláty <i>E. hirae</i> – velikosti zón (mm)						
	11EC	12EB	13EA	13EC	14EA	14EB	15EB
Amoxicilin	24	20	29	24	20	22	22
Piperacilin/taxobactam	18	17	22	25	17	17	17
Imipenem	20	27	30	32	28	26	27
Ciprofloxacin	18	17	22	16	21	20	22
Levofloxacin	23	17	20	18	18	20	17
Norfloxacin	20	17	20	13	18	12	16
Gentamicin	16	17	21	19	18	19	17
Streptomycin	16	15	18	17	16	16	17
Vankomycin	21	22	22	23	21	19	20
Teikoplanin	20	20	22	21	19	20	20
Nitrofurantoin	18	16	20	20	21	20	20

V Tabulka 12 jsou uvedeny výsledné hodnoty inhibičních zón testovaných kmenů *E. hirae* izolovaných z povrchu peří vodní drůbeže (kachny pižmové).

Při srovnávání výsledků se systémem EUCAST bylo zjištěno, že všechny testované kmeny jsou citlivé na vybraná ATB.

Tabulka 13: Zóny působení antibiotik (\varnothing v mm) – enterokoky ze stěrů z peří

Antibiotikum	Izoláty <i>E. hirae</i> , <i>E. faecium</i> * – velikost zón (mm)								
	16EA	17EA	17EB	18EA	18EC	19EC	20EB	16EB*	20EA*
Amoxicilin	28	20	20	22	29	26	26	27	22
Piperacilin/ taxobactam	26	16	14	12	18	26	22	21	18
Imipenem	31	29	26	24	25	32	30	32	24
Ciprofloxacin	16	20	17	23	24	20	21	14	16
Levofloxacin	20	14	16	25	20	18	22	20	15
Norfloxacin	19	20	20	24	18	12	20	14	17
Gentamicin	17	14	19	16	18	14	18	16	16
Streptomycin	15	15	15	15	12	16	15	18	16
Vankomycin	27	20	19	22	22	23	22	22	22
Teikoplanin	20	18	18	18	20	20	20	18	20
Nitrofurantoin	20	14	18	20	17	17	19	17	15

* kmeny identifikované jako *E. faecium*, ostatní kmeny identifikovány jako *E. hirae*

V příložené Tabulka 13 je pokračování naměřených velikostí zón pro kmeny enterokoků – *E. hirae* a *E. faecium*. Kmeny *E. faecium* jsou označeny jako 16EB a 20EA.

Z výsledných hodnot lze usuzovat na to, že většina testovaných kmenů izolovaných z peří je citlivá na vybraná antibiotika. Ani u jednoho z testovaných kmenů nebyla zjištěna multirezistence. Pouze u třech kmenů 16EB, 17EA a 18EC byly naměřeny menší velikosti zón, než je stanoveno limity dle systému EUCAST. Kmen 16EB vykazoval rezistenci k ciprofloxacinu, zatímco 20EA byl inhibován všemi antibiotiky. Izolát 17EA, zástupce druhu *E. hirae*, byl nejvíce rezistentní v porovnání s ostatními izoláty, na rozdíl od jiných izolátů ze stěrů byl odolný jak k levofloxacinu, tak i k nitrofurantoinu. Ke streptomycinu byl v menší míře rezistentní kmen 18EC.

Izoláty z vody chladicí a napájecí

Tabulka 14: Zóny působení antibiotik (\varnothing v mm) – enterokoky izolované z vody napájecí a vody chladicí po porážce

Antibiotikum	Izoláty <i>E. hirae</i> , <i>E. faecium</i> * – velikosti zón (mm)						
	21EB*	27EA*	28EA*	29EB*	29EC*	21EA	27EB
Amoxicilin	18	20	18	18	14	23	28
Piperacilin/taxobactam	15	17	16	13	10	21	26
Imipenem	22	22	23	19	20	30	22
Ciprofloxacin	13	13	12	12	8	25	18
Levofloxacin	12	12	11	12	8	24	19
Norfloxacin	16	12	16	18	0	25	17
Gentamicin	20	16	16	17	14	16	16
Streptomycin	13	16	16	15	16	15	16
Vankomycin	21	20	19	18	14	24	17
Teikoplanin	21	19	19	18	15	16	18
Nitrofurantoin	14	14	17	14	11	14	17

* kmeny identifikované jako *E. faecium*, ostatní kmeny identifikovány jako *E. hirae*

Z chladicí vody byly získány a identifikovány pouze dva kmeny. Izolát označený 21EA patří mezi druh *Enterococcus hirae* a 21EB je *E. faecium*.

Z vody napájecí bylo izolováno celkem 5 kmenů a z toho pouze 1 *E. hirae* (kmen 27EB). Z naměřených hodnot uvedených v Tabulka 14 je patrné, že kmeny druhu *E. faecium* jsou více odolné k antibiotikům. Nejvíce rezistentní byl kmen 29EC. Při zjišťování účinku norfloxacinu u tohoto kmene nebyla zjištěna žádná inhibiční zóna. U všech izolátů *E. faecium* se prokázala rezistence k antibiotiku ciprofloxacinu a levofloxacinu. Z výše uvedených výsledků je patrné, že kmen 27EB byl inhibován všemi testovanými antibiotiky. Tento kmen tedy nebyl rezistentní ani k jednomu antibiotiku.

Jistou multirezistenci vykazovaly celkem 3 kmeny, z toho 2 byly izolované z vody napájecí (29EB, 29EC) a jeden pocházel z vody chladicí (21EB). Všechny multirezistentní kmeny byly odolné alespoň vůči jednomu ATB z třech různých antibiotických skupin. Jednalo se vždy o izoláty druhu *E. faecium*.

7.3.2 Vliv testovaných antibiotik na stafylokoky a makrokoky

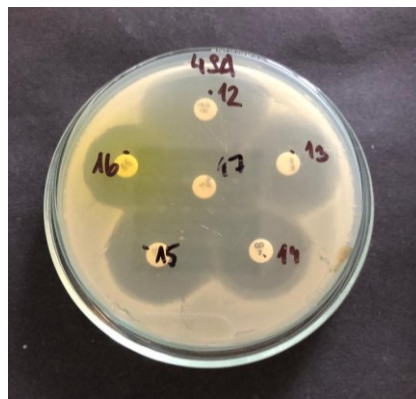
Izoláty z kachního masa

Tabulka 15: Zóny působení antibiotik (\varnothing v mm) na kmeny *M. caseolyticus* izolovaných z masa

Antibiotikum	Izoláty <i>Macrococcus caseolyticus</i> – velikost zóny (mm)						
	1SB	4SA	5SA	6SB	7SA	9SA	10SA
Benzylpenicilin	18	16	20	19	20	0	17
Amoxicilin	32	25	25	24	29	14	30
Cefoxitin	25	20	20	20	24	12	20
Cefotaxim	30	22	22	27	27	10	26
Meropenem	40	28	28	28	34	27	38
Imipenem	28	34	34	32	36	42	36
Ciprofloxacin	22	20	26	22	23	8	27
Levofloxacin	20	20	35	20	24	10	25
Norfloxacin	24	20	22	20	24	13	28
Amikacin	20	22	34	20	24	28	20
Gentamicin	38	32	38	24	26	33	27
Erytromycin	22	28	25	24	25	25	27
Clindamycin	24	20	21	25	22	24	27
Tetracyklin	24	32	26	12	27	10	24
Nitrofurantoin	25	24	26	25	26	24	25
Rifampicin	22	23	26	26	25	26	28

Výše uvedené naměřené hodnoty inhibičních zón (Tabulka 15) patří izolátům *Macrococcus caseolyticus* z masa kachny pižmové. Na antibiotickou rezistenci bylo testováno 7 kmenů této bakterie. Jedná se o grampozitivní koky, který je příbuzné rodu *Staphylococcus*. Proto výsledné hodnoty byly porovnávány se stanovenými limity systémem EUCAST pro stafylokoky.

Všechny vybrané testované kmeny byly rezistentní k rifampicinu. K antibiotiku benzylpenicilinu by měla být rezistentní většina stafylokoků. Konkrétně u kmene 9SA nebyla patrná žádná zóna inhibice. Tento kmen byl zároveň nejvíce rezistentním v porovnání s kmeny ostatními. Všechny kmeny byly pravděpodobně multirezistentní. Výjimkou byl izolát 7SA, který byl rezistentní jen ke dvěma ATB z dvou různých antibiotických skupin. Pět testovaných kmenů *M. caseolyticus* bylo odolných na cefoxitin a zároveň byla tedy pravděpodobná u nich rezistence k amoxicilinu, cefotaximu, imipenemu a meropenemu. K antibiotikům amikacinu, gentamicinu, erytromycinu a nitrofurantoinu naopak nebyl žádný kmen rezistentní.



Obrázek 12: Diskový difuzní test stafylokoků po kultivaci – izoláty z masa

Izoláty z povrchu peří

Tabulka 16: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny stafylokoků izolované z peří

Antibiotikum	Izoláty stafylokoků* – velikosti zón (mm)							
	11SA	12SA	12SB	16SB	15SA	19SC	20SA	19SA
Benzylpenicilin	19	11	14	16	10	12	10	9
Amoxicilin	32	32	33	31	28	30	27	32
Cefoxitin	21	23	22	22	18	26	20	18
Cefotaxim	35	24	28	26	22	25	24	20
Meropenem	35	39	35	32	35	30	34	26
Imipenem	48	47	48	46	27	30	34	24
Ciprofloxacin	31	25	30	30	12	18	20	28
Levofloxacin	26	22	27	23	23	22	20	27
Norfloxacin	24	23	22	26	15	25	20	30
Amikacin	20	24	23	22	23	26	26	26
Gentamicin	26	26	30	25	28	28	28	28
Erytromycin	25	10	22	26	25	20	24	16
Clindamycin	26	20	24	25	25	22	23	23
Tetracyklin	23	23	23	26	24	25	24	22
Nitrofurantoin	23	22	22	20	21	20	18	19
Rifampicin	25	25	28	26	21	26	22	23

* identifikace testovaných kmenů: 11SA *S. aureus*; 12SA *S. lentus*; 12SB a 16SB *S. sciuri*; 15SA, 19SC a 20SA *S. equorum* a 19SA *S. nepalensis*

Stejně jako u bakterií izolovaných z masa kachny pižmové, tak i u izolátů odebraných z povrchu kachního peří byly všechny kmeny rezistentní k antibiotiku rifampicinu. Kmen označený 11SA byl jediný izolovaný identifikovaný jako *Staphylococcus aureus*. Podle hodnot EUCAST (Tabulka 5) je kmen tohoto druhu rezistentní k benzylpenicilinu, protože byla naměřena zóna menší než 26 mm.

U ostatních druhů stafylokoků je rezistence k benzylpenicilinu také pravděpodobná. Testované kmeny rezistentní na cefoxitin by měly být odolné i ke karbapenemům. Mezi ně patří izoláty značené 11SA (*S. aureus*), 15SA a 20SA (*S. equorum*) a 19SA (*S. nepalensis*). Nejvíce citlivé byly kmeny 12SB a 16SB, které byly identifikovány jako *S. sciuri*. Kmen 12SA (*S. lentus*) byl navíc rezistentní k antibiotiku levofloxacinu a erytromycinu v porovnání s izolátem 12SB. Poslední kmen 19SC, patřící mezi *S. equorum*, byl naměřenými hodnotami mírně odlišný. Při působení antibiotika cefoxitinu vznikla inhibiční zóna větší než 22 mm – v tomto případě se jednalo o citlivý kmen.

Z izolátů uvedených v Tabulka 16 bylo pravděpodobně 7 multirezistentních, což znamená, že byla dokázána rezistence vždy alespoň k jednomu antibiotiku ze třech a více různých antibiotických skupin. Z výsledků je zřetelné, že ani jeden testovaný kmen nebyl citlivý ke všem antibiotikům, což znamená, že všechny kmeny byly rezistentní minimálně k 1 antibiotiku. Za nejvíce rezistentní kmen, u kterého byla naměřena nejmenší velikost zóny, lze považovat kmen 19SA (*S. nepalensis*).

Izoláty z vody napájecí

Tabulka 17: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – izoláty *S. lentus* z vody napájecí

Antibiotikum	<i>S. lentus</i> – velikost zón (mm)		
	26SA	27SA	27SB
Benzylpenicilin	19	12	18
Amoxicilin	17	34	36
Cefoxitin	22	34	26
Cefotaxim	24	26	28
Meropenem	40	40	41
Imipenem	42	45	42
Ciprofloxacin	32	20	26
Levofloxacin	25	22	22
Norfloxacin	32	23	28
Amikacin	20	20	21
Gentamicin	23	22	23
Erytromycin	8	10	10
Clindamycin	18	22	20
Tetracyklin	22	22	25
Nitrofurantoin	21	20	22
Rifampicin	22	22	22

V Tabulka 17 jsou uvedeny velikosti inhibičních zón u kmenů druhu *S. lentus*, které byly izolovány z napájecí vody. Všechny 3 kmeny byly rezistentní k erytromycinu a zároveň k rifampicinu. Lze předpokládat i pravděpodobnou rezistenci na benzylpenicilin, neboť k tomuto antibiotiku je většina stafylokoků odolná. Všechny kmeny byly rezistentní k antibiotikům až ze 4 různých antibiotických skupin, což pravděpodobně poukazuje na jistou multirezistenci. K největšímu počtu testovaných antibiotik (ke 4 plus u dvou předpokládaná rezistence) byl rezistentní kmen 26SA, u kterého byla navíc zjištěna velikostně nejmenší inhibiční zóna po působení erytromycinu.

U kmene 26SA byla naměřena velikost zóny v průměru u cefoxitinu menší, než je zapsána v systému EUCAST. V tomto případě platí také pravidlo, že současně je možná odolnost k ostatním cefalosporinům a penicilinům.

8 DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývala výskytem antibioticky rezistentních kmenů rodů *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Enterococcus* izolovaných z kachny pižmové a prostředí jejího chovu.

Jak bylo popsáno v kapitole 2.1, antibiotika byla vynalezena už v roce 1928 lékařem Alexandrem Flemingem. Prvním antibiotikem byl penicilin, izolovaný z plísně *Penicillium notatum*, který brání růstu bakteriím *Staphylococcus aureus*. Během následujících let se vyvíjela nová antibiotika. To, že si některé kmeny bakterií, včetně patogenních, později byly schopny vytvořit schopnost rezistence k těmto látkách, se dříve nevědělo. [24]

Podle článku z časopisu Vesmír [24] bylo již v roce 1999 rezistentních až 40 % klinických kmenů zmiňovaného patogena *S. aureus*. Možnou náhradou penicilinových antibiotik, která by mohla přispět k léčbě stafylokokových infekcí, bylo antibiotikum vankomycin.

Prvně došlo v důsledku používání antibiotik (často nadměrného) k vytvoření rezistence k penicilinovým ATB. Na základě toho byla vyvíjena nová antibiotika, podobná penicilinům, často chemickou syntézou. Příkladem takového penicilinového ATB, tzv. polysyntetické varianty penicilinu, je methicilin, který byl začleněn do klinické praxe v roce 1960. Avšak postupem času si byly určité kmeny stafylokoků schopny vytvořit rezistenci i na toto antibiotikum. Souhrnně se tyto kmeny začaly označovat jako methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). [62]

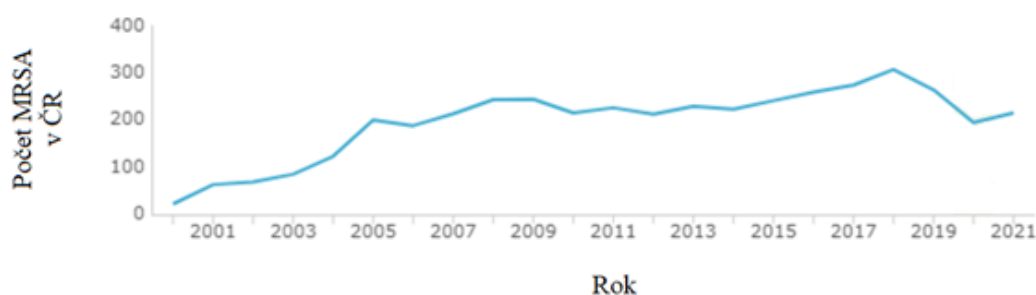
V současnosti se vyskytuje široká škála grampozitivních koků, které jsou původci mnoha onemocnění a současně mohou být rezistentní k jednomu nebo několika antibiotikům. Z rodu stafylokoků jde především o výše zmiňovaný *S. aureus*. Velký důraz by měl být kladen i na koaguláza-negativní stafylokoky, které se obecně považují za podmíněně patogenní. [71]

V rámci výzkumu této bakalářské práce byl izolován pouze jeden kmen identifikovaný jako *S. aureus*, i když dle literárních zdrojů byla očekávána vyšší četnost výskytu tohoto druhu. Kmen, který byl izolován, byl zároveň multirezistentním kmenem. Multirezistence znamená, že daný kmen je rezistentní minimálně k jednomu antibiotiku ze tří nebo více antibiotických skupin. [72]

V článku [72], o nebezpečných multirezistentních bakteriích zvaných „superbugs“, je popsáno zároveň několik skupin s tímto typem rezistence, které mohou být nebezpečné pro klinickou

medicínu. Příkladem jsou vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE) a methicilin-rezistentní stafylokoky.

Rezistence k methicilinu, především v České republice, je omezujícím faktorem při léčbě mnoha stafylokokových onemocnění. Když byla prokázána infekce způsobená kmeny MRSA, tak úmrtnost na dané onemocnění byla vyšší, v porovnání s kmeny citlivými k methicilinu/oxacilinu. Pokud při infekci hraje etiologickou roli MRSA, tak je terapie onemocnění složitá. Často se používají antibiotika na bázi glykopeptidů, jako jsou vankomycin a teikoplanin. Zvýšeným užíváním těchto ATB to však může souviset se vznikem VRE. [72] Kmeny rezistentní k methicilinu jsou ve většině případech rezistentní i k ostatním antibiotikům ze skupiny β -laktamů. Do této skupiny řadíme například cefalosporiny nebo peniciliny. [73]



Obrázek 13: Počet izolovaných rezistentních stafylokoků k methicilinu v České republice (převzato z [74])

Z grafu uvedeném na Obrázek 13 je patrné, že v posledních letech počet identifikovaných MRSA v ČR kolísá. Nejvíce zachycených rezistentních izolátů bylo zaznamenáno v roce 2018 [74].

Enterokoky běžně osidlují trávicí trakt lidí i zvířat. [63] Enterokoky jsou velice odolné vůči podmínkám vnějšího prostředí. Už od počátku minulého století je rod *Enterococcus* považován za hlavní příčinu endokarditidy, dlouho jsou také uznávány jako etiologické agens infekcí močového traktu, či břicha. To souviselo s rostoucím užíváním antibiotik skupiny cefalosporinů (třetí generace), vůči kterým přirozeně vykazují odolnost. [75]

V současnosti bývají často považovány za původce nozokomiálních infekcí. Mezi dva nejvýznamnější původce patří *Enterococcus faecalis* a *E. faecium*. Zástupci *E. faecium* bývají často rezistentní k aminopenicilinovým antibiotikům, a proto je nutná léčba pomocí glykopeptidových antibiotik. V poslední době se zvyšuje výskyt infekcí vyvolaných kmeny VRE, takže léčba nemocí je poněkud komplikovanější. [76]

Během studie [76] byly poprvé zachyceny kmeny VRE v České republice v roce 1997 na Hematoonkologické klinice Fakultní nemocnice Olomouc. Celkem bylo izolováno z biologických materiálů 121 kmenů rezistentních k vankomycinu. Výskyt těchto kmenů byl spojován s nadměrným užíváním vankomycinu, teikoplaninu a jiných širokospektrých antibiotik.

V experimentu této bakalářské práce bylo identifikováno celkem 106 kmenů, z toho 91 náleželo do skupiny grampozitivních koků. Do čeledi *Staphylococcaceae* (*Staphylococcus*, *Micrococcus* spp.) bylo zařazeno 27 izolovaných kmenů. V rámci rodu *Enterococcus* bylo identifikováno 64 kmenů. Vybrané kmeny byly následně podrobeny diskovým difuzním testům.

Největší počet izolovaných bakterií pocházel ze stěrů z peří. Z povrchu peří bylo izolováno celkem 11 různých druhů bakterií. Z grampozitivních koků se jednalo o izoláty *E. faecium* a *E. hirae*. Z rodu stafylokoků byly izolovány 4 různé druhy (*S. equorum*, *S. sciuri*, *S. lentus* a *S. aureus*). Kromě grampozitivních koků byly získány také jiné grampozitivní bakterie, například rod *Corynebacterium*.

Ze vzorků kachního masa byly získány izoláty enterokoků (*E. faecium*, *E. hirae*) a makrokoků (*M. caseolyticus*).

Z napájecí vody bylo získáno 5 odlišných druhů grampozitivních bakterií. Dva druhy náležely k rodu enterokoků. Jednalo se o jediné dva izolované druhy, a to *E. faecium* a *E. hirae*. Z vody napájecí byl izolován i druh *S. lentus*. Z ostatních grampozitivních bakterií byly izolovány druhy *Rothia terrae* a *Corynebacterium stationis*.

Pro testování stafylokoků a makrokoků byla vybrána antibiotika z následujících skupin: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, fluorochinolony, aminoglykosidy a makrolidy. Na izoláty rodu *Staphylococcus* byla navíc testována antimikrobiální aktivita tetracyklinu, nitrofurantoinu a rifampicinu.

Při následném sledování antibiotické rezistence nebyl při difuzních diskových testech nalezen ani jeden VRE. Nejméně citlivý na vankomycin byl kmen 29EC, identifikovaný jako *E. faecium*, který byl izolován z napájecí vody. U tohoto kmene byla naměřena velikost zóny pouhých 14 mm. Podle systému EUCAST však nepatří mezi rezistentní kmeny. U kmene 29EC byla ale prokázána rezistence k teikoplaninu, který patří také do skupiny glykopeptidových antibiotik.

Stafylokoky jsou jednou z nejčastějších příčin vzniku infekcí i u ptáků (včetně drůbeže). Celosvětově je sledován zejména druh *S. aureus*, díky rychlému nárůstu rezistentních izolátů. Velká pozornost je věnována především multirezistentním kmenům, na které nepůsobí mnoho antibiotik, a tak léčba nimi způsobená je velice obtížná. [77]

Proto byla při studii [77] v Íránu ve městě Karaj v roce 2015 charakterizována distribuce MRSA izolovaných z farem. Bylo izolováno celkem 55 kmenů stafylokoků rezistentních na methicilin. Pomocí diskové difuzní metody byla stanovena citlivost/rezistence těchto izolátů. Zjistilo se, že všechny izolované kmeny byly rezistentní alespoň k penicilinu. Dále 58 % kmenů vykazovalo rezistenci k erytromycinu a u 55 % byla dokázána rezistence k ciprofloxacinu. Naopak všechny kmeny byly citlivé k antibiotikům vankomycinu a nitrofurantoinu. [77]

V rámci diskových difuzních testů provedených během této bakalářské práce se ukázalo, že z čeledi Staphylococcaceae byly všechny testované kmeny rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku. Nejvíce odolné vůči působení antibiotik byly kmeny *M. caseolyticus*. Mnohé z nich byly také multirezistentní (6 kmenů). Toto však může být zapříčiněno tím, že zástupci tohoto rodu nejsou příliš izolováni z klinického materiálu. Z tohoto důvodu se nepovažují za patogeny, pouze některé izoláty bývají příčinou infekcí, a proto nejsou udávány limitní hodnoty v rámci tabulek EUCAST. V této práci byly hodnoty antibiotické rezistence makrokoků, z důvodu příbuznosti, posuzovány dle limitů pro stafylokoky. Z izolátů rodu *Staphylococcus* bylo celkem 10 kmenů multirezistentních. Tyto kmeny vykazovaly rezistenci minimálně k jednomu ATB ze tří a více antibiotických skupin. Z uvedených 10 kmenů bylo 7 izolováno z peří. Zbylé tři kmeny, náležící druhu *S. lentus*, byly izolovány z vody napájecí.

Všechny kmeny makrokoků by měly být rezistentní k benzylpenicilinu a rifampicinu. Z druhé strany u antibiotika nitrofurantoinu nebyla dokázána rezistence – všechny kmeny byly inhibovány, podobně jako tomu bylo ve studii [77].

Enterokoky byly testovány na vybraná antibiotika ze skupin penicilinů, karbapenemů, fluorochinolonů, aminoglykosidů, glykopeptidů, a také na antibiotikum nitrofurantoin.

U enterokoků byla dokázána rezistence alespoň k jednomu antibiotiku celkem u 21 testovaných kmenů. Převládaly rezistentní kmeny druhu *E. faecium*.

V rámci studie [78] byla hodnocena citlivost stafylokoků i enterokoků izolovaných z prostředí chovu drůbeže. Jednalo se o izoláty z 24 farem situovaných po celé Gruzii.

Z 90 izolovaných kmenů rodu *Enterococcus* se nejčastěji vyskytoval *E. hirae* (46 %). Druhým nejvyskytovanějším druhem byl *E. faecium* (27 %). Mezi izolovanými kmeny byly identifikovány také *E. gallinarum* a *E. faecalis*. U izolovaných kmenů byla prokázána rezistence především k antibiotiku tetracyklin (z 96 %). Dále byla vyzorována odolnost ke klindamycinu (z 90 %). Některé kmeny byly rezistentní rovněž k penicilinu (53 %), erytromycinu (50 %) a nitrofurantoinu (49 %).

Ve studii [78] bylo izolováno celkem 110 kmenů patřících do rodu *Staphylococcus*. Všechny byly identifikovány jako koaguláza-negativní. Nejčastěji se vyskytoval *S. sciuri* (38 %) a *S. lentus* (21 %). Také byly identifikovány některé kmeny jako *S. xylosus* a *S. simulans*.

Vyšší míra rezistence byla pozorována u zástupců enterokoků než u stafylokoků. U testovaných stafylokoků se primárně vyskytovala rezistence na erytromycin (ze 71 %), klindamycin (z 48 %) a tetracyklin (z 38 %). U zástupců obou rodů byly často identifikovány kmeny s multirezistentní schopností. [78]

Při porovnávání s výsledky experimentů provedenými v této bakalářské práci bylo zjištěno, že převládajícím druhem enterokoků byl také *E. hirae*. Druhým a posledním izolovaným zástupcem tohoto rodu byl *E. faecium*. Tyto druhy byly nejvíce rezistentní k ciprofloxacinu, levofloxacinu, a také nitrofurantoinu.

U izolovaných kmenů rodu *Staphylococcus* byl zachycen především druh *S. lentus* (z napájecí vody). Následovaly druhy *S. equorum* a *S. sciuri*. Tyto kmeny byly izolovány z peří. Dalším druhem byl *S. nepalensis*. U všech 3 kmenů druhu *S. lentus* byla prokázána rezistence k erytromycinu. K tomuto antibiotiku byly také odolné kmeny *S. nepalensis* (19SA) a 1 zástupce druhu *S. equorum* (19SC).

ZÁVĚR

V bakalářské práci jsem se zabývala zkoumáním antibiotické rezistence u grampozitivních koků izolovaných z kachny pižmové a z prostředí, kde žije. Pro diskové difuzní testy byly vybrány kmeny rodu stafylokoků a enterokoků. Kmeny rodů *Staphylococcus* a *Micrococcus* byly podrobeny testům na celkem 16 antibiotik – benzylpenicilin, amoxicilin, cefoxitin, cefotaxim, meropenem, imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, amikacin, gentamicin, erytromycin, clindamycin, tetracyklin, nitrofurantoin a rifampicin. Vybrané izoláty náležící k rodu enterokoků byly testovány na 11 různých antibiotik – amoxicilin, piperacilin/taxobactam, imipenem, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, gentamicin, streptomycin, vankomycin, teikoplanin a nitrofurantoin. Cílem bylo vyhodnotit rezistentní kmeny.

Nejvíce druhů bakterií bylo izolováno z povrchu peří kachny. Z rodu *Enterococcus* se jednalo o 2 druhy (*E. hirae* a *E. faecium*). Mezi druhy stafylokoků izolované z peří patřily *S. equorum*, *S. sciuri*, *S. lentus* a *S. aureus*.

Při testování antimikrobiální aktivity vybraných antibiotik na enterokoky byla dokázána rezistence celkem u 21 kmenů. Zjistilo se, že více rezistentní byly kmeny *Enterococcus faecium*, než izoláty *E. hirae*. U enterokoků byla prokázána odolnost hlavně k ciprofloxacinu, levofloxacinu a nitrofurantoinu. Naopak zcela inhibičně působila antibiotika vankomycin a teikoplanin.

Při skríningu antibiotické rezistence stafylokoků a makrokoků bylo dokázáno, že všechny izolované kmeny byly rezistentní k rifampicinu. K amikacinu, gentamicinu a nitrofurantoinu byly zase citlivé všechny testované izoláty. Všechny kmeny patřící do čeledi *Staphylococcaceae* byly rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] KŘIVÁNKOVÁ, Tereza a Eva VOŠLÁŘOVÁ. *Etologie drůbeže* [online]. Brno, 2019 [cit. 2022-10-30]. Dostupné z: <https://cit.vfu.cz/oz/IVA/drubez/>
- [2] PIPEK, Petr. *Základy technologie masa*. Vyškov, 1998. ISBN 80-7231-010-0.
- [3] Drůbež: Charakteristika, členění. In: *Naše výživa* [online]. [cit. 2022-10-27]. Dostupné z: <https://www.nasevyziva.cz/sekce-Drubez/clanek-drubez-charakteristika-cleneni-350.html>
- [4] KREJČÍ, Petr a Václav FORMAN. *Základy technologie přípravy pokrmů*. Zlín UTB, 2006. ISBN 80-7318-399-4.
- [5] *Drůbežář: Vodní drůbež* [online]. 2021 [cit. 2022-10-30]. Dostupné z: <http://drubezar.com/vodni-drubez/>
- [6] JELÍNEK, Jan a Vladimír ZICHÁČEK. *Biologie: pro gymnázia*. 8. vydání. Olomouc: Nakladatelství Olomouc s. r. o., 2005. ISBN 80-7182-177-2.
- [7] ESTERMANN, Marie-Theres. *Začínáme s chovem slepic, hus a kachen*. [Líbeznice]: Víkend, 2013. ISBN 978-80-7433-060-5.
- [8] SIMEONOVÁ, Jana. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. Vyd. 1. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. ISBN 80-7157-405-8.
- [9] Peří: evoluční záhada. *Creation magazine* [online]. 1988, **10**(3), 17-19 [cit. 2022-11-06]. Dostupné z: <https://creation.com/peri-evolucni-zahada>
- [10] BAUMEISTER, Michael a Heinz MEYER. *Chov drůbeže jako hobby: slepice, kachny, husy, krůty, perličky*. Ostrava: Blesk, 1995. ISBN 80-85606-72-0.
- [11] Vodní drůbež: Původ a domestikace vodní drůbeže. In: *Zemědělské komodity* [online]. [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: <http://www.zemedelskekomodity.cz/index.php/zivocisna-vyroba/chov-drubeze/vodni-drubez>
- [12] PROCHÁZKA, Miloslav. *Klub chovatelů vodní drůbeže: Původ a domestikace vodní drůbeže* [online]. [cit. 2022-11-18]. Dostupné z: <https://klubvodnidrubeze.estranky.cz/clanky/puvod-a-domestikace-vodni-drubeze.html>
- [13] *Ptáci: Ottův průvodce přírodou*. Přeložil Alena ČERVENÁ. Praha: Ottovo nakladatelství, 2015. Ottův průvodce přírodou. ISBN 978-80-7451-366-4.
- [14] ŠŤASTNÝ, Karel a Anton KRIŠTÍN. *Ptáci Česka a Slovenska: Ottův obrazový atlas*. Praha: Ottovo nakladatelství, s.r.o., 2021. ISBN 978-80-7451-866-9.
- [15] JÄNNES, Hannu a Owen ROBERTS. *Ptáci našich vod a mokřadů*. Vydání první. Přeložil Jana VLČKOVÁ. Frýdek-Místek: Alpress, 2016. ISBN 978-80-7466-973-6.
- [16] STERN- LES LANDES, Alice. *Začínáme s chovem domácích zvířat*. [Líbeznice]: Víkend, 2013. ISBN 978-80-7433-068-1.
- [17] BARLÍK, Dušan. Chováme kachny I. In: *Energys* [online]. [cit. 2022-12-03]. Dostupné z: <https://www.energyshobby.cz/chovame-kachny-ii-plemena-kachen-a-komercni-hybridy/>
- [18] BAUER, Wilhelm. *Domácí porážky drůbeže a králíků*. Přeložil Jana COOLMAN. [Líbeznice]: Víkend, 2018. ISBN 978-80-7433-228-9.

- [19] INGR, Ivo. *Produkce a zpracování masa*. Vyd. 2., nezměn. V Brně: Mendelova univerzita, 2011. ISBN 978-80-7375-510-2.
- [20] HRABĚ, Jan, Pavel BŘEZINA a Pavel VALÁŠEK. *Technologie výroby potravin živočišného původu: bakalářský směr*. Vyd. 1. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, 2006. ISBN 80-7318-405-2.
- [21] Jak vykuchat drůbež. In: *Kavapo drůbež* [online]. 2016 [cit. 2023-01-27]. Dostupné z: <http://www.kavapo.cz/jak-vykuchat-drubez/>
- [22] DRDÁK, Milan. *Základy potravinářských technologií: spracovanie rastlinných a živočišných surovín, cereálne a fermentačné technológie, uchovávanie, hygiena a ekológia potravín*. 1. vyd. Bratislava: Malé centrum, 1996. ISBN 80-967064-1-1.
- [23] KOLÁŘ, Milan. VÝVOJ BAKTERIÁLNÍ REZISTENCE A NOVÁ ANTIMIKROBNÍ LÉČIVA. *Interní medicína pro praxi* [online]. Olomouc, 2007, 9(5), 213-216 [cit. 2022-10-22]. Dostupné z: <https://www.internimediceina.cz/pdfs/int/2007/05/03.pdf>
- [24] SPÍŽEK, Jaroslav. *Vesmír: Rezistence na antibiotika* [online]. Praha, 1999, , 78 s. [cit. 2022-10-12]. ISSN 1214-4029. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>
- [25] NĚMEC, Miroslav a Dagmar MATOULKOVÁ. *Základy obecné mikrobiologie*. 1. vydání. Brno, Masarykova Univerzita, 2015. ISBN 978-80-210-7923-6.
- [26] DIKEMAN, Michael a Carrick DEVINE. Antibiotic Resistance by Microorganisms. In: *Encyclopedia of Meat Sciences* [online]. 2. vydání. [cit. 2022-10-24]. ISBN 978-1-68015-340-8. Dostupné z: https://app.knovel.com/web/view/khtml/show.v/rcid:kpEMSE0003/cid:kt00U6GLT/O/viewerType:khtml//root_slug:encyclopedia-meat-sciences/url_slug:antibiotic-resistance?page=158&view=collapsed&zoom=1
- [27] SCHINDLER, Jiří. *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 1. vyd. Praha: Grada, 2010. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [28] LOCHMANN, Otto. *Základy antimikrobní terapie*. Vyd. 2. Praha: Triton, 1999. ISBN isbn80-7254-005-x.
- [29] *Antibiotika: Nemoci hospodářských zvířat* [online]. 2017 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/antibiotika/>
- [30] KOPEČKOVÁ, Klára. *Mechanismus účinku antibiotik na mikroorganismy* [online]. Fakulta chemicko-technologická, 2012 [cit. 2023-01-21]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/47371/KopeckovaK_Mechanismusucinku_EK_2012.pdf?sequence=2&isAllowed=y. Bakalářská práce. UNIVERZITA PARDUBICE. Vedoucí práce Mgr. Eva Kusáková.
- [31] KLOUDA, Pavel. *Základy biochemie*. 3. vyd. Ostrava: Pavko, 2013. ISBN 978-80-86369-16-7.
- [32] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI. *Základní a aplikovaná farmakologie*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Galén, 2007. ISBN 978-80-7262-373-0.
- [33] JANOVSÁ, Sylva. Citlivost a rezistence mikroorganismů na antimikrobiální léčiva. In: *Upce* [online]. Univerzita Pardubice (fakulta chemicko-technologická) [cit. 2023-05-06]. Dostupné z: https://www.upce.cz/sites/default/binary_www_old/fcht/uechi/crp-msmt-2015/ci-re-mi.pdf

- [34] *Rezistence na antibiotika: Nemoci hospodářských zvířat, Výživa a krmení* [online]. In: . [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.agropress.cz/rezistence-na-antibiotika/>
- [35] *World Health Organization: Antibiotic resistance* [online]. 2020 [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>
- [36] *COMMISSION NOTICE: EU Guidelines for the prudent use of antimicrobials in human health*. In: . 2017, ročník 60, 212/1.
- [37] SCHRIJVER, R., M. STIJNTJES, J. RODRÍGUEZ-BAÑO, E. TACCONELLI, N. BABU RAJENDRAN a A. VOSS. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2018, **24**(6), 577-590 [cit. 2023-01-24]. Dostupné z: <https://www.clinicalmicrobiologyandinfection.com/action/showPdf?pii=S1198-743X%2817%2930526-8>
- [38] GÖPFERTO VÁ, Jana, Jan ŠEJDA a Daniela JANOVS KÁ. *Mikrobiologie, imunologie, epidemiologie: pro střední a vyšší odborné zdravotnické školy*. Vyd. 1. Praha: Triton, 1997. ISBN 80-85875-48-9.
- [39] PETERSON, Elizabeth a Parjit KAUR. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2023-01-24]. ISSN 1664302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.02928
- [40] ČEŘOVSKÁ, Klára. *Vývoj antibiotické rezistence u bakterií* [online]. Fakulta chemicko-technologická, 2021 [cit. 2023-01-02]. Dostupné z: https://dk.upce.cz/bitstream/handle/10195/78359/CerovskaK_Vyvoj_rezistence_IB_2021.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Bakalářská práce. Univerzita Pardubice. Vedoucí práce Ing. Iveta Brožková, Ph.D.
- [41] PRAŽSKÝ, Bohumil. *Bakteriální rezistence k antibiotické léčbě* [online]. [cit. 2022-12-28]. Dostupné z: <https://zdravi.euro.cz/clanek/postgradualni-medicina/bakterialni-rezistence-k-antibioticke-lecbe-472462>
- [42] CHRISTAKI, Eirini. Antimicrobial Resistance in Bacteria: Mechanisms, Evolution, and Persistence. *Journal of Molecular Evolution* [online]. 2020, **88**(1), 26-40 [cit. 2023-01-02]. ISSN 00222844. Dostupné z: doi:10.1007/s00239019099143
- [43] LOCHMANN, Otto. *Antimikrobní terapie v praxi*. Vyd. 1. Praha: Triton, 2006. ISBN 80-7254-826-3.
- [44] *News medical life sciences: Global travel and antibiotic resistance* [online]. AZoNetwork, 2022 [cit. 2023-01-25]. Dostupné z: <https://www.news-medical.net/health/Global-travel-and-antibiotic-resistance.aspx>
- [45] VENTOLA, C. Lee. The antibiotic resistance crisis. In: *PubMed Central* [online]. USA: MediMedia, 2015, s. 277–283 [cit. 2023-01-25]. ISSN 1052-1372. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>
- [46] TURTURA, G. C. a P. LORENZELLI. Gram-positive cocci isolated from slaughtered poultry. *Microbiological research* [online]. 1994, **149**(2), 203-213 [cit. 2023-01-30]. PMID: 7921897. Dostupné z: doi:10.1016/S0944-5013(11)80120-5
- [47] RAHMDEL, Samane a S. S. SHEKARFOROUSH. Antimicrobial spectrum activity of bacteriocinogenic Staphylococcus strains isolated from goat and sheep milk. *Journal of Dairy Science* [online]. 2019, **102**(4), 2928-2940 [cit. 2023-01-30]. Dostupné z: doi:10.3168.2018-15414

- [48] HUDSON, John A. a Lynn J. FREWER. The agri-food chain and antimicrobial resistance. *Trends in food science and technology* [online]. 2017, **69**, 131-143 [cit. 2023-01-31]. Dostupné z: doi:10.1016.2017.09.007
- [49] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie*. První. Praha: Marvil, 1996.
- [50] PRESCOTT, Lansing M., John P. HARLEY a Donald A. KLEIN. *Microbiology*. 3rd Ed. Dubuque: Wm. C. Brown Publishers, 1996. ISBN 0-697-29390-4.
- [51] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 80-210-4207-9.
- [52] ŠULCOVÁ, Margaréta. *Mikrobiologie, epidemiologie, hygiena: učební texty pro zdravotnické obory*. Vydání třetí přepracované. Ústí nad Labem: Univerzita Jana Evangelisty Purkyně v Ústí nad Labem, Fakulta zdravotnických studií, 2018. ISBN 978-80-7561-116-1.
- [53] PLATA, Konrad, Adriana ROSATO a Grzegorz WEGRZYN. Staphylococcus aureus as an infectious agent: Overview of biochemistry and molecular genetics of its pathogenicity. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 2009, **56**(4), 597-612 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.18388/abp.2009_2491
- [54] BECKER, Karsten, Christine HEILMANN a Georg PETERS. Coagulase-Negative Staphylococci. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(4), 870–926 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00109-13
- [55] ALRESHIDI, M. M., R. H. DUNSAN, M. M. MACDONALD, N. D. SMITH, J. GOTTFRIES a T. K. ROBERTS. Metabolomic and proteomic responses of Staphylococcus aureus to prolonged cold stress. *Proteomics* [online]. 2015, **121**, 44-55 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2015.03.010>
- [56] JING, M., W. ROSARIO, E. WATLER a D. H. CALHOUN. Development of a large-scale HPLC-based purification for the urease from Staphylococcus leei and determination of subunit structure. *Protein Expression and Purification* [online]. 2004, **34**(1), 111-117 [cit. 2023-02-02]. Dostupné z: doi:10.1016/j.pep.2003.10.012
- [57] LOIR, Yves Le, Florence BARON a Michel GATIER. Staphylococcus aureus and food poisoning. *Genetics and molecular research* [online]. 2003, **2**(1), 63-76 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://www.geneticsmr.com/sites/default/files/articles/year2003/vol2-1/pdf/sim0009.pdf>
- [58] COGGIN, Joseph H. Biological safety - principles and practices (4th edition): Staphylococci. *American Society for Microbiology* [online]. 2006 [cit. 2023-02-03]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008X9Z01/biological-safety-principles/staphylococci>
- [59] ADAMS, Martin a Maurice MOSS. Food Microbiology (3rd Edition) - Isolation and Identification. *Royal Society of Chemistry (RSC)* [online]. 2008 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00AAJCYM/food-microbiology-3rd/staphylococcus-isolation-identification>
- [60] RAUNEROVÁ, Eliška. *ATB REZISTENCE, JEJÍ VÝZNAM V SOUČASNÉ MEDICÍNĚ A MOŽNOSTI PREVENCE* [online]. Plzeň, 2016 [cit. 2023-02-04]. Dostupné z: <https://otik.uk.zcu.cz/bitstream/11025/25443/1/Bakalarska%20prace%20-%20Raunerova.pdf>. Bakalářská práce. Fakulta zdravotnických studií. Vedoucí práce RNDr. Karel Fajfrlík, Ph.D.

- [61] NEWSTEAD, Logan L, Katarina VARJONEN, Tim NUTTALL a Gavin K PATERSON. Staphylococcal-Produced Bacteriocins and Antimicrobial Peptides: Their Potential as Alternative Treatments for Staphylococcus aureus Infections. *Antibiotics* [online]. 2020, 9(2) [cit. 2023-02-04]. PMID: 31973108. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9020040
- [62] ŠVÁBOVÁ, Tereza. *Rezistence k antibiotikům u bakterie Staphylococcus aureus* [online]. Hradec Králové, 2018 [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://dspace.cuni.cz/bitstream/handle/20.500.11956/98063/130229200.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Bakalářská práce. Univerzita Karlova - Farmaceutická fakulta v Hradci Králové. Vedoucí práce Mgr. MARCELA VEJSOVÁ, Ph.D. HRADEC KRÁLOVÉ,.
- [63] ŠILHÁNKOVÁ, CSC., Doc., Ing. Ludmila. *Mikrobiologické zkoumání potravin*. Praha, 1987. Vysoká škola chemicko-technologická.
- [64] HAYES, Joshua R., Linda L. ENGLISH, Lewis E. CARR, David D. WAGNER a Sam W. JOSEPH. Multiple-Antibiotic Resistance of Enterococcus spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. *ASM Journals* [online]. 2004, 70(10) [cit. 2023-02-08]. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004>
- [65] BEVERIDGE, Tj. Use of the Gram stain in microbiology. *Biotechnic & Histochemistry* [online]. 2001, 76(3), 111-118 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>
- [66] *Pracovní návody - Mikrobiologie: Staphytest24* [online]. Erba Group, 2018 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: https://www.erbalachema.com/attachments/MLT00013%20STAPHYtest%2024_I-nvc8OZJhaG.pdf
- [67] STANĚK, RNDr, Ing. Libor a MUDr. Filip PRUSÍK. Využití a přínos sofistikované metody MALDI-TOF. *SYNLABIANER* [online]. 2020, (1), 15-16 [cit. 2023-03-23]. Dostupné z: <https://synlabianer.cz/clanek/vyuziti-a-prinos-moderni-sofistikovane-metody-maldi-tof/>
- [68] *Stanovení citlivosti mikroorganismů k antibiotikům, stanovení koncentrace antibiotik* [online]. Přírodovědecká fakulta Masarykovy Univerzity, 2017 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: https://is.muni.cz/do/rect/el/estud/prif/js17/cviceni_mikrobiologie/web/pages/stanoveni_citlivosti_atb.html
- [69] Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. In: *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST)* [online]. 2023, s. 34-45 [cit. 2023-03-12]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_13.0_Breakpoint_Tables.pdf
- [70] CFU. In: *Bezpečnost potravin* [online]. [cit. 2023-03-27]. Dostupné z: <https://bezpecnostpotravin.cz/termin/cfu/>
- [71] P. WEINSTEIN, Melvin. The Clinical Significance of Positive Blood Cultures in the 1990s: A Prospective Comprehensive Evaluation of the Microbiology, Epidemiology, and Outcome of Bacteremia and Fungemia in Adults. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1997, 24(4), 584-602 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1093/clind/24.4.584>

- [72] KOLÁŘ, Milan. Nebezpečné multirezistentní bakterie „superbugs“ v současné medicíně. *Interní medicína pro praxi* [online]. 2019, **21**(3), 142–148 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2019/03/02.pdf>
- [73] TIEMERSMA, Edim. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Europe, 1999–2002. *Emerging infectious diseases* [online]. 2004, **10**(9) [cit. 2023-05-17]. ISSN 1080-6059. Dostupné z: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/10/9/04-0069_article
- [74] *Surveillance Atlas of Infectious Diseases* [online]. European Centre for Disease Prevention and Control -, 2023 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <http://atlas.ecdc.europa.eu/public/index.aspx>
- [75] CETINKAYA, Yesim, Pamela FALK a Glen MAYHALL. Vancomycin-resistant enterococci. *American Society for Microbiology* [online]. 2000, **13**(4), 686-707 [cit. 2023-05-17]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/epub/10.1128/CMR.13.4.686>
- [76] VÁGNEROVÁ, Iva a Milan KOLÁŘ. Možnosti terapie infekcí způsobených vankomycin-rezistentními enterokoky. *Klin Farmakol Farm* [online]. 2003, **17**, 170-173 [cit. 2023-05-17]. Dostupné z: <https://www.klinickafarmakologie.cz/pdfs/far/2003/03/09.pdf>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ATB	antibiotikum
BHI	Brain Heart Infusion
BP	Baird-Parker agar
BS	buněčná stěna
CFU	Colony forming units
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
JOT	jatečně opracované tělo
KTJ	Kolonie tvořící jednotky
<i>M.</i>	<i>Macrooccus</i>
MH	Mueller-Hinton
MIC	minimální inhibiční koncentrace (minimum inhibitory concentration)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
PM	Petriho misky
RNA	ribonukleová kyselina
SB	Slanetz-Bartley agar
<i>S.</i>	<i>Staphylococcus</i>
SVS	Státní veterinární správa

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Schéma jatečního opracování vodní drůbeže. Upraveno podle [8].....	19
Obrázek 2: Mechanismy účinku antibiotik [33]	22
Obrázek 3: Dávkovací tuba s papírovými antibiotickými disky.....	32
Obrázek 4: Směs BHI Broth	33
Obrázek 5: Petriho miska s Mueller-Hinton (MH) agarem	34
Obrázek 6: STAPHYtest 24 – sada pro identifikace 1 kmene bakterie.....	36
Obrázek 7: Antibiotické disky na misce s rozetřenou suspenzí před kultivací	38
Obrázek 8: Morfologie kolonií na půdách BP a SB (izoláty z napájecí vody).....	41
Obrázek 9: Křížový roztěr vybrané kolonie	41
Obrázek 10: Grampozitivní koky (izolované z masa) – pod mikroskopem	44
Obrázek 11: Diskový difuzní test enterokoků (izolát 2EC) – inhibiční zóny.....	48
Obrázek 12: Diskový difuzní test stafylokoků po kultivaci – izoláty z masa.....	53
Obrázek 13: Počet izolovaných rezistentních stafylokoků k methicilinu v České republice (převzato z [74]).....	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Rozdělení ATB podle mechanismu jejich účinku [27]	20
Tabulka 2: Počet odebraných vzorků a datum jejich odběru.....	31
Tabulka 3: Biochemické testy zahrnuté ve STAPHYtest 24.....	37
Tabulka 4: Hodnoty velikosti inhibičních zón pro enterokoky podle EUCAST	39
Tabulka 5: Hodnoty velikosti zón pro stafylokoky podle systému EUCAST	40
Tabulka 6: Indikátorové mikroorganismy (KTJ/g) u vzorků kachního masa	42
Tabulka 7: Indikátorové mikroorganismy (KTJ/g) – stěry z povrchu peří.....	43
Tabulka 8: Indikátorové mikroorganismy (KTJ/g) – voda napájecí a chladící při porážce	44
Tabulka 9: Bakterie izolované z odebraných vzorků.....	46
Tabulka 10: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny <i>E. faecium</i> izolované z masa...	47
Tabulka 11: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny <i>E. hirae</i> izolované z masa	48
Tabulka 12: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny <i>E. hirae</i> – stěry z peří.....	49
Tabulka 13: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – enterokoky ze stěrů z peří.....	50
Tabulka 14: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – enterokoky izolované z vody napájecí a vody chladící po porážce.....	51
Tabulka 15: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) na kmeny <i>M. caseolyticus</i> izolovaných z masa	52
Tabulka 16: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – kmeny stafylokoků izolované z peří...	53
Tabulka 17: Zóny působení antibiotik (Ø v mm) – izoláty <i>S. lentus</i> z vody napájecí.....	54