

Výskyt genů antibiotické rezistence v drůbežím mase

Adéla Himmerová

Bakalářská práce
2024



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

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

Akademický rok: 2023/2024

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Adéla Himmerová
Osobní číslo: T21540
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin
Specializace: Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie
Forma studia: Prezenční
Téma práce: Výskyt genů antibiotické rezistence v drůbežím mase

Zásady pro vypracování

V teoretické části se věnujte antibiotické rezistenci a cestám šíření.
Popište antibiotický rezistom drůbežního masa.
Zaměřte se na metody molekulární biologie využitelné ke studiu rezistomu.
Experimentálně aplikujte vybrané metody pro detekci genů rezistence u drůbežního masa.
Výsledky analyzujte a formulujte závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

SAMTIYA, Mrinal, Karl R. MATTHEWS, Tejpal DHEWA a Anil Kumar PUNIYA. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods* [online]. 2022, 11(19) [cit. 2023-06-17]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11192966

WANG, Yanan, Na LYU, Fei LIU, et al. More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environment International* [online]. 2021, 153 [cit. 2023-06-17]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2021.106534

GALHANO, Beatriz S. P., Rafaela G. FERRARI, Pedro PANZENHAGEN, Ana Carolina S. DE JESUS a Carlos A. CONTE-JUNIOR. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(5) [cit. 2023-06-17]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923

LI, YiMing, WeiWei CAO, ShuLi LIANG, Shinji YAMASAKI, Xun CHEN, Lei SHI a Lei YE. Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes in representative ready-to-eat food in southern China. *Scientific Reports* [online]. 2020, 10(1) [cit. 2023-06-17]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72620-4

Vedoucí bakalářské práce:

doc. Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce: **2. ledna 2024**

Termín odevzdání bakalářské práce: **17. května 2024**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Jaroslav Filip, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 6. února 2024

PROHLÁŠENÍ AUTORKY 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 pracovala samostatně a použitou literaturu jsem citovala. V případě publikace výsledků budu uvedena jako spoluautorka.
- že odevzdaná verze bakalářské práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studentky:

.....
podpis studentky

ABSTRAKT

Antibiotická rezistence představuje aktuální hrozbu pro lidstvo 21. století. K šíření genů determinujících rezistenci dochází především díky nadužívání antibiotik při léčbě infekcí nejen v humánní, ale také ve veterinární medicíně. Potraviny živočišného původu, včetně drůbežního masa, mohou být rezervoáry rezistentních bakterií a přispívat k jejich šíření prostřednictvím potravinového řetězce. Cílem této bakalářské práce bylo sledovat výskyt genů *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-7}*, *ereA*, *sulI*, *floR*, *catA1*, *tet(A)*, *tet(M)* a *mcr1* v drůbežím masu zakoupeném v maloobchodních řetězcích Zlínského kraje. K jejich detekci byla použita polymerázová řetězová reakce. Nejčastěji byla detekována přítomnost genů rezistence k β -laktamovým antibiotikům, sulfonamidům, tetracyklinům a amfenikolům, nejméně k makrolidům a polypeptidovým antibiotikům. Z drůbežního masa bylo navíc izolováno a identifikováno 12 bakteriálních kmenů patřících do pěti rodů – *Comamonas*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Pseudomonas* a *Serratia*. Metodou diskové difuze bylo stanoveno, že všechny izoláty jsou rezistentní na makrolidy, velká většina na betalaktamová antibiotika, méně než polovina na polypeptidy, tetracykliny a chinolony a tři a méně kmenů bylo rezistentní na antibiotika z ostatních skupin. Tato studie naznačuje rozšíření genů antibiotické rezistence v chlazeném drůbežím masu, byl také prokázán výskyt multirezistentních bakterií. Je potřeba hledat cesty, jak lze šíření antibiotické rezistence zabránit, jelikož multirezistentní kmeny mohou mít brzy závažný dopad na veřejné zdraví.

ABSTRACT

Antibiotic resistance represents a current threat to humanity in the 21st century. The spread of genes determining resistance mainly occurs due to the overuse of antibiotics in treating infections not only in human but also in veterinary medicine. Food of animal origin, including poultry meat, can serve as reservoirs of resistant bacteria and contribute to their spread through the food chain. The aim of this bachelor's thesis was to monitor the occurrence of *bla*_{TEM}, *bla*_{OXA-7}, *ereA*, *sulI*, *floR*, *catA1*, *tet(A)*, *tet(M)*, and *mcr1* genes in poultry meat purchased from retail chains in the Zlín region. Polymerase chain reaction was used for their detection. The presence of resistance genes to β -lactam antibiotics, sulfonamides, tetracyclines, and amphenicols was most frequently detected, while the least resistance was observed to macrolides and polypeptide antibiotics. Furthermore, 12 bacterial strains belonging to five genera – *Comamonas*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Pseudomonas*, and *Serratia* - were isolated and identified from poultry meat. By disk diffusion method, it was determined that all isolates were resistant to macrolides, the vast majority to beta-lactam antibiotics, less than half to polypeptides, tetracyclines, and quinolones, and three or fewer strains were resistant to antibiotics from other groups. This study indicates the spread of antibiotic resistance genes in chilled poultry meat, and the occurrence of multidrug-resistant bacteria was also demonstrated. It is necessary to seek ways to prevent the spread of antibiotic resistance, as multidrug-resistant strains may soon have a significant impact on public health.

Chtěla bych poděkovat paní doc. Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za obětavou pomoc a odborné vedení i přes mezistátní vzdálenost během její trvající stáže ve Velké Británii. Dále bych chtěla poděkovat paní laborantce Ing. Veronice Kubačové za pomoc v mikrobiologické laboratoři.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ANTIBIOTIKA A ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	12
1.1 BETALAKTAMOVÁ ANTIBIOTIKA	12
1.2 MAKROLIDY	13
1.3 SULFONAMIDY	14
1.4 AMFENIKOLY	15
1.5 TETRACYKLINY	15
1.6 POLYPEPTIDOVÁ ANTIBIOTIKA	16
1.7 ZPŮSOBY ŠÍŘENÍ REZISTENCE NA ANTIBIOTIKA	18
1.7.1 Transformace.....	18
1.7.2 Transdukce	19
1.7.3 Konjugace	19
1.8 MULTIREZISTENCE	20
2 MIKROBIOTA DRŮBEŽÍHO MASA	22
2.1 ŘÁD <i>ENTEROBACTERALES</i>	23
2.2 ŘÁD <i>PSEUDOMONADALES</i>	25
2.3 ŘÁD <i>BURKHOLDERIALES</i>	25
3 CÍL PRÁCE	27
4 MATERIÁL A METODIKA	28
4.1 MATERIÁL.....	28
4.1.1 Vzorky.....	28
4.1.2 Laboratorní pomůcky, přístroje a spotřební materiál.....	28
4.1.3 Kultivační média a roztoky	29
4.1.4 Chemické látky a antibiotika.....	30
4.1.5 Použité primery	31
4.2 METODIKA	32
4.2.1 Příprava vzorků a izolace bakteriálních kmenů	32
4.2.2 Izolace DNA.....	33
4.2.3 Měření čistoty a koncentrace dsDNA	34
4.2.4 Metoda PCR.....	34
4.2.5 Gelová elektroforéza	35
4.2.6 Gramovo barvení.....	38
4.2.7 Fenotypová identifikace	38
4.2.8 Genotypová identifikace	39
4.2.9 Disková difuzní metoda	40
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	42
5.1 DETEKCE GENŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	42

5.2 IDENTIFIKACE A CHARAKTERIZACE BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ	50
ZÁVĚR	60
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	62
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	78
SEZNAM OBRÁZKŮ	81
SEZNAM TABULEK	82
SEZNAM PŘÍLOH	83

ÚVOD

Drůbeží maso vykazuje nárůst v jeho produkci a konzumaci. V důsledku zachování bezpečnosti živočišných potravin jsou antibiotika používána v rámci profylaxe a terapie infekčních onemocnění hospodářských zvířat. Dříve se používala i jako stimulanty růstu, ale Nařízením Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1831/2003 byla vymazána z registru a tento zákaz vešel v platnost 1. 1. 2006. I přesto se antibiotika nachází ve velkém množství nejen v prostředí zemědělské produkce, ale i podzemních vodách, půdě a čističkách odpadních vod, kdy se do roku 2050 předpokládá až 65% nárůst koncentrace léčiv ve zdrojích pitné vody. Nadměrné užívání antibiotik jak v humánní, tak veterinární medicíně může bakterie tvořící mikrobiotu živočišných potravin vystavovat selekčnímu tlaku, který umožňuje vznik rezistence. Zpracování a konzumace živočišných potravin tak může způsobit přenos a šíření genů rezistence nejen do prostředí, ale také do zažívacího traktu lidí i zvířat.

Antimikrobiální rezistence je schopnost mikroorganismů odolávat účinkům antibiotik. Mikroorganismy si vyvinuly různé obranné mechanismy, kterými znemožňují proniknutí antibiotika k buněčným cílům. Jedná se především o enzymatickou inaktivaci antibiotika, efluxní mechanismy, alternace buněčného cíle nebo snížení permeability buněčné stěny a plazmatické membrány. Šíření rezistence probíhá rychlým tempem, což umožnilo vznik multirezistentních mikroorganismů. Multirezistentní patogenní mikroorganismy se stávají středobodem zájmu, jelikož disponují rezistencí na několik skupin antibiotik. Představují riziko pro společnost, jelikož jsou nejčastějšími původci nozokomiálních infekcí, se kterými se setkáváme v nemocničním prostředí. Multirezistentní bakterie *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* byly Světovou zdravotnickou organizací (WHO) uvedeny jako nejčastější bakterie způsobující infekce dolních cest dýchacích, které byly v roce 2019 příčinou úmrtí 3,57 milionů lidí.

Vzhledem k závažnosti této problematiky, se tato práce zabývá zjištěním aktuálního výskytu fenotypové a zejména genotypové antibiotické rezistence v drůbežím mase z maloobchodní sítě Zlínského kraje.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA A ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Antibiotická rezistence je aktuálním problémem budoucího fungování medicínského a veterinárního sektoru. Každým rokem přibývají druhy bakterií, u nichž se prokázala rezistence v důsledku častého vystavení účinkům jednotlivých antibiotik v klinické praxi nebo potravinovém řetězci. Experti odhadují, že incidence bakteriálních infekcí způsobených multirezistentními (MDR) kmeny v následujících letech rapidně vzroste, s tím že v roce 2050 při neschopnosti produkce nových antibiotik dojde k roční úmrtnosti 10 milionů lidí na komplikace s nimi spojenými [1][2]. Světová zdravotnická organizace (WHO) aktuálně uvádí, že *Enterobacteriaceae* představuje jednu z nejproblematičtějších čeledí, kvůli vícedruhové schopnosti produkovat karbapenemázy a β -laktamázy s širokým spektrem (ESBL) [3]. Bakterie z této čeledi mohou být rezistentní i na polymixin E [4][5]. Dále WHO sdělila, že karbapenem rezistentní *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* patří mezi kritické patogeny, které je nutno potlačit. Situace je ztížená jejich hojným výskytem v nemocničních zařízeních. Důležitou součástí prevence šíření těchto kmenů je obsáhlý screening, epidemiologická opatření a vývoj nových účinných látek [3].

Vývin nových antibakteriálních látek je klíčový ke snížení počtu narůstajících infekcí, které nejsou dostupná antibiotika schopna léčit. Americký úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) v roce 2018 schválil nové terapeutické možnosti – plazomicin, eravacyklin, sarecyklin, omadacyklin a rifamycin [6]. Plazomicin představuje nové semisyntetické aminoglykosidové antibiotikum, které působí dokonce proti některým zástupcům čeledi *Enterobacteriaceae* rezistentních na karbapenem [7].

1.1 Betalaktamová antibiotika

Betalaktamová antibiotika jsou nejvíce používanou skupinou antibiotik, kdy ve Spojených státech tvořila 65 % všech předepsaných receptů [8]. Je tomu tak kvůli jejich mírné toxicitě.

Ve struktuře mají typický čtyřčlenný betalaktaamový kruh. Řadíme k nim cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a peniciliny. Jejich baktericidní účinek spočívá v přerušení syntézy buněčné stěny výsledkem kovalentní vazby na serinové aktivní místo penicillin-binding proteinů (PBP) [8]. Tyto proteiny jsou transpeptidázy nebo karboxypeptidázy katalyzující zesíťování peptidoglykanu buněčné stěny [8][9]. Příčinou vazby betalaktamů je následná autolýza buňky.

Rezistence na tento mechanismus vzniká různými způsoby. Nejčastěji se jedná o expresi a produkci β -laktamáz, které zabráňují navázání antibiotika na penicilin vázající protein (PBP). Karbapenemázy používají kationty Zn^{2+} k hydrolyze β -laktamového kruhu a jeho inaktivaci, kdežto β -laktamázy třídy A, C, D využívají k hydrolyze serin jako nukleofil [10][11]. Dalšími způsoby jsou modifikace efluxní pumpy nebo mutace, které mění funkci porinů nebo samotných penicilin vázajících proteinů.

Gen *bla_{OXA-7}* nese informaci k produkci oxacillinázy patřící do β -laktamáz třídy D. Hydrolyzují oxacillin, meticilin a cloxacilin. Oxacillinázy mohou být inhibovány chloridem sodným (NaCl) nebo kyselinou klavulanovou [12][13]. Gen *bla_{TEM}* kóduje enzym TEM-1 patřící do třídy A, které produkují širokospektré β -laktamázy (ESBL). Hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy. Mají stejnou citlivost ke kyselině klavulanové jako β -laktamázy třídy D [14]. Specificky karbapenemová antibiotika jsou používána jako volba první instance při léčbě infekcí. Největším nebezpečím jsou pak zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* produkující karbapenemázu, jako např. *Klebsiella pneumoniae*, u kterých byla zaznamenána produkce karbapenemázy (KPC) a metalo- β -laktamázy využívající Zn^{2+} jako kofaktor namísto serinového zbytku pro nukleofilní útok β -laktamového kruhu [15][16]. Ze všech zástupců této čeledi jsou nejvíce ohrožujícími bakteriemi *Klebsiella* spp., *Escherichia coli* a *Enterobacter* spp. [13]. Dále byl tento typ rezistence zjištěn také u zástupců z jiných čeledí, a to u bakterií *Enterococcus faecium*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* [13][17].

Aktuální míra rezistence u *Escherichia coli* na cefalosporiny třetí a čtvrté generace rychle stoupá. V roce 2023 byl pro *E. coli* hlášen medián ze 76 zemí ve výši 42 % vůči cefalosporinům třetí generace. Stav u bakterie *Staphylococcus aureus* byl pouze o 7 % nižší [18]. Při studiu rezistence představuje modelový mikroorganismus *E. coli*, kvůli jejímu výskytu ve střevním traktu, který představuje ideální místo pro přenos genů mezi patogenními druhy.

1.2 Makrolidy

Makrolidy jsou složeny z laktonových kruhů s navázanými deoxy cukry [19]. Působí baktericidně a mohou představovat náhradu za betalaktamová antibiotika. Nejvíce používanými antibiotiky jsou erytromycin, klaritromycin a azitromycin. Používají se hlavně při léčbě infekcí spojených s gramnegativní bakterií *Helicobacter pylori* [20] nebo

při atopické pneumonii způsobené *Mycoplasma pneumoniae* či *Legionella pneumophila* [21; 22].

Makrolidy inhibují aparát zodpovědný za syntézu proteinů. Reverzibilně se navážou na bakteriální ribozomální podjednotku 50S, čímž znemožní translaci mRNA inhibicí peptidyltransferázy [19][23].

Determinantou makrolidové rezistence je *ereA* gen, který nese informaci pro expresi erytromycinesterázy (EreA), hydrolyzující makrolaktonový kruh. Dalšími jsou geny *erm* (A, B, C), které modifikují ribozomální cíl 23S rRNA metylací, nebo *msrA* specifický pro efluxní mechanismus [24][25]. Výskyt těchto genů u drůbežního masa není ojedinělý. Garofalo a spol. zjistil vysoký nález *ermB* genu u celkové DNA izolované z kuřecího masa [26].

1.3 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou širokospektrální chemoterapeutika obsahující ve struktuře skupinu SO_2NH_2 . Čína společně s Evropskou unií (EU) patří mezi nejvyšší spotřebitele zmíněných chemoterapeutik při léčbě zvířat [27][28]. Hojně se používají jako antiparazitika a antipyretika [29]. Dále jsou využívány pro svou diuretickou aktivitu při léčbě močových infekcí [30][31].

Baktericidní účinek sulfonamidů spočívá v kompetitivní inhibici kyseliny *p*-aminobenzoové (PABA), která se podílí na syntéze kyseliny listové. Kyselina listová je důležitým substrátem, který je potřebný během syntézy DNA. Zajišťuje také její ochranu před endonukleázovou aktivitou pomocí metylace [29] [32]. Jestliže dojde k záměně PABA navázané v enzymu dihydropteroátsyntetáza (DHPS) za sulfonamidy, zastaví se tvorba dihydrofolátu potřebného k syntetickým reakcím kyseliny listové. Její nedostatek v buňce zastaví replikaci DNA [29][30]. Sulfonamidy působí zejména na grampozitivní bakterie, ale také na gramnegativní: *Klebsiella* sp., *Escherichia* sp., *Salmonella* sp. a *Enterobacter* sp. [29][30].

Rezistence k sulfonamidům je dána geny *sul1* až *sul3*, které exprimují DHPS s nižší afinitou pro sulfonamidy [27][33]. Prevalence genů *sul1* v půdě získané z drůbežích farem v jihovýchodní Číně koreluje s přítomností rodů *Bacillus*, *Pseudomonas* a *Shigella* [27]. Sulfonamidy nepůsobí inhibiční aktivitou proti *Pseudomonas aeruginosa* a *Serratia* sp. [29][30].

1.4 Amfenikoly

Ze skupiny amfenikolů je chloramfenikol jediným zástupcem, který se v současné době předepisuje v humánní medicíně, i přes jeho toxické účinky spojené s alergickými reakcemi. Kvůli jeho nežádoucím účinkům je používán při ojedinělých případech. Chloramfenikolem se léčí oční infekce nebo břišní tyfus a skvěle působí proti bakteriální meningitidě způsobené *Haemophilus influenzae* [34; 35]. Ve své struktuře obsahuje *p* – nitrofenylový kruh, který je spojen s dichloracetylem pomocí 2- amino- 1,3- propandiolu. Chloramfenikol se reverzibilně váže na aminoacylovou část tRNA v místě A ribosomální podjednotky 50S. Znemožní se tak interakci tRNA a peptidyltransferázy. Následkem je přerušení syntézy proteinů [35; 36].

Gen *catA1* je šířitelem rezistence k chloramfenikolu. Derivát chloramfenikolu florfenikol, který je určen pouze pro veterinární praxi, se liší od chloramfenikolu ve dvou skupinových substitucích. Nitro skupina (-NO₂) chloramfenikolu je nahrazena sulfometylovou (-SO₂CH₃) a hydroxylová skupina fluorovou [37]. Rezistence florfenikolu je determinována genem *floR*. Byla zjištěna především u bakterií, které způsobují respirační onemocnění zvířat [38; 39]. Gen *catA1* kóduje enzym – chloramfenikol acetyltransferázu typu A, který převádí acetylovou skupinu z acetyl-S-CoA na 3' hydroxylovou skupinu chloramfenikolu. Vzniklá molekula 3- acetoxychloramfenikol není schopna navázání na ribozom a přerušení syntézy proteinů [40]. Gen byl zaznamenán především u bakterií *Acinetobacter* spp. z odpadních vod farmaceutických zařízení nebo v malém množství u kolistin rezistentních *Escherichia coli* získaných z drůbežího masa [41; 42]. Výskyt genu *floR* byl hlášen u patogenních *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Sérovar Typhimurium, *Vibrio cholerae* a *Klebsiella pneumoniae* [43]. V Nigérii byl zjištěn výskyt *floR* v izolátech z pitné vody u rodů – *Pseudomonas* spp., *Serratia* spp., *Acinetobacter* spp. a především *Proteus* spp. [44].

1.5 Tetracykliny

Tetracykliny jsou širokospektrální bakteriostatická antibiotika. Používají se k léčbě bakteriálních infekcí, především skvrnitého tyfu způsobeného bakterií *Rickettsia prowazekii* nebo leptospirózy či brucelózy [45]. Všeobecně se preferují tetracykliny druhé generace, jako je minocyklin potlačující nozokomiální infekce *Acinebacter baumannii* [46]. Tetracykliny se do roku 2006 v EU používaly jako přísada krmiv pro stimulaci růstu zvířat [47]. I když tetracykliny v letech mezi 2019 až 2021 zaznamenaly trend nižší spotřeby

u 26 z 27 členských států EU (kromě Bulharska), Islandu a Norska, vzniklá rezistence a její mechanismy představují předmět neustálého studia [48].

Mechanismus působení tetracyklinů spočívá ve schopnosti procházet skrz poriny (OmpF a OmpC) vnější membrány gramnegativních bakterií v návaznosti s kationtem hořčiku. Utvořený kladný komplex uvolní tetracyklin do cytoplazmy, který se prostřednictvím protonové hybné síly dostane až k vazebnému místu, které se nachází na 30S ribozomální podjednotce RNA [47]. Návaznost antibiotika je reverzibilní a zabraňuje specifické vazbě aminoacyl-tRNA k ribozomálnímu akceptoru A [45; 47]. Vazbou na ribozom ztrácí buňka schopnost proteosyntézy.

Vzniklé mechanismy rezistence byly nalezeny u genů *tet* (*A*, *B*, *C*, *D*, *G*), které jsou asociovány s mechanismem membránových Tet-efluxních pump. Gen *tetA* kóduje TetA protein spadající do Major Facilitator Superfamily (MFS) membránových transportérů závislých na elektrochemickém gradientu – hybné síle protonů [49]. TetA efluxní pumpa čerpá komplex tetracyklin-hořčík z cytosolu do periplazmatického prostoru a následně mimo buňku [50]. Snižuje se tak koncentrace tetracyklinu uvnitř buňky a jeho návaznost na ribozom neproběhne – proteosyntéza zůstane zcela funkční. Další mechanismus rezistence je zprostředkován geny *tet* (*O*, *M*, *S*, *T*, *Q*, *P*, *W*) kódující ribozomální ochranné proteiny (RPP). Tyto proteiny znemožňují vazbu tetracyklinu na 30S ribozomální podjednotku jeho uvolněním z vazebného místa A za přítomné GTP hydrolyzy [51; 52]. Geny *tet* se poprvé objevily u čeledi *Enterobacteriaceae* a *Pseudomonadaceae*. Přesto se mohou nacházet i u zástupců z rodů – *Nisseria*, *Haemophilus* a *Vibrio* [47]. Geny *tet* (*L*, *M*, *O*, *A*, *K*, *Q*) se hojně vyskytují v mikrobiotě kuřecího masa [53]. Dokonce i v syrovém mléce byl detekován gen *tet(M)* [54].

1.6 Polypeptidová antibiotika

Jedná se o kationtová lipopeptidová antibiotika narušují membránu gramnegativních bakterií. Mají významný baktericidní účinek a považují se za sekundární antibiotika používané k léčbě MDR kmenů gramnegativních bakterií. Strukturálně jsou uspořádány do cyklického heptapeptidu s tripeptidovým postranním řetězcem, který je navázán na řetězec mastných kyselin [55][56]. Polymyxiny byly poprvé objeveny u bakterie *Paenibacillus polymyxa* subs. *colistinus* [57]. V současné době jsou komerčně dostupné dva druhy polymyxinů: polymyxin B a polymyxin E (kolistin) [58]. Vzájemně se odlišují pouze

v jednom aminokyselinovém zbytku peptidového kruhu. U polymyxinu E je nahrazen D- fenylalaninový zbytek za D-leucinový [57].

Mechanismus jejich účinku spočívá v navázání kladně nabitého polymyxinu na záporně nabitý nasycený řetězec lipidu A, který je van der Waalsovými silami propojen s vnější membránou. Dojde k vytěsnění Mg^{2+} nebo Ca^{2+} kationů, zodpovědných za vaznost na lipopolysacharid (LPS) a jeho celkovou stabilitu. Integrita vnější i vnitřní buněčné membrány se poškodí a vede ke destabilizaci, a tím zvýšením permeability. Následkem je pak vylití buněčného obsahu a usmrcení buňky [58][55]. Kolistin působí na: *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* a další *Enterobacteriaceae* [59][58][55].

Opětovné nasazení kolistinu při léčbě infekcí způsobilo příliv globální rezistence. *Escherichia coli* představuje významný indikátor při sledování výskytu antibiotické rezistence. Její izoláty z hospodářských zvířat v současných letech vykazují 21% míru rezistence, *Klebsiella pneumoniae* dokonce 75% [4].

Je tomu tak vznikem různých mechanismů působících proti polymyxinům. Nejběžnější je modifikace LPS přidáním 4-amino-4-deoxy-L-arabinózy (LAra4N) k fosfátové skupině lipidu A. Sníží se tak jeho negativní náboj a pravděpodobnost navázání polymyxinu. Biosyntéza a přenos LAra4N na lipid A je zprostředkován geny v operonu *arn*. Obdobná biosyntéza byla už pozorována u bakterií *Pseudomonas aeruginosa* a *Yersinia pestis* [55] [60]. Další modifikací je zvýšení produkce pouzdrového polysacharidu u *Klebsiella pneumoniae* [55]. Naopak přirozenou vnitřní rezistencí disponují: *Serratia marcescens*, *Edwardsiella* spp. *Providencia* spp., *Burkholderia cepacia* a některé druhy *Aeromonas* [58][59].

Nejběžněji se však vyskytuje mobilní gen nesoucí rezistenci na kolistin (*mcr-1*) detekovaný u druhů *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Salmonella enteritica*, *Kluyvera ascorbata*. Gen *mcr-1* je přítomen na rezervoárových plazmidech IncI2, IncHI2 a IncX4 [61]. Tento gen kóduje enzym MCR-1 patřící mezi fosfoetanolamin transferázy. Dochází k přenosu fosfoetanolaminu na lipid A za snížení jeho afinity vůči polymyxinům [62]. Podle Gelbíčová a spol. byl gen *mcr-1* detekován ve 21 % při screeningu celkové DNA krůtího masa a jater z různých zemí EU. Naopak četnost výskytu *mcr-1* až *mcr-5* genů u vzorků kuřecího masa a jater byla negativní nebo v malém množství [63]. Za zmínku stojí také fakt, že gen *mcr10* byl identifikován v lidském, tak i kuřecím střevním mikrobiomu.

1.7 Způsoby šíření rezistence na antibiotika

Přenos rezistence se váže na prostředí odpadních vod, potravin, humánní i veterinární medicínu a zemědělství. Rezistence je způsobena především horizontálním přenosem rezistenčních genů vyskytujících se v extrachromozmálním genetickém materiálu (plazmidech), nebo pomocí transpozonů [64].

Plazmidy jsou genetické mobilní elementy vyskytující se v jedné či mnoha kopiích a jsou schopny autonomní replikace cyklické dsDNA. Nesou geny rezistence, které jsou pro buňku postradatelné a nezávisí na nich důležité procesy. Geny mají vlastní specifickou a způsob, jakým se fenotypicky projeví v hostitelské buňce, jestliže dojde k jejich přenosu – většinou inaktivují účinnost antibiotik [65]. Plazmidy představují důležité vehikulum pro šíření rezistence. Je známo mnoho druhů plazmidů: epizomální plazmidy, které se reverzibilně integrují crossing-overem do chromozomu cílené buňky a způsobí tak rekombinaci; kolicinogenní plazmidy, produkují bakteriociny; R plazmidy nesoucí geny antibiotické rezistence. Existují i kryptické plazmidy, které se fenotypicky nijak neprojeví a jejich funkce nebyla podrobně popsána [66] [67].

Transpozony jsou DNA sekvence lišící se od plazmidů svou neschopností autonomní existence. Jsou schopny přemísťovat část genetické informace mezi bakteriálním chromozomem a plazmidem. Zmíněný přenos je buď v téže buňce, nebo v rámci jiné [68].

Rozvoj rezistence také záleží na frekvenci spontánních nebo indukovaných mutací v různých lokusech chromozomu. Genová mutace představuje jakoukoliv změnu sekvence bází v DNA. Většinou dochází ke změně jednoho páru bází (bodová mutace), nastane tak transverze nebo tranzice. Často dochází také k delecí a inzercí. Jestliže se zkoumá populace bakterií, bere se zřetel na frekvenci mutace, která udává pravděpodobnost jejího vzniku po každém dělení buňky [66]. Děje se tak například u perzistentní grampozitivní bakterie druhu *Mycobacterium tuberculosis* [69]. Má relativně vysokou frekvenci spontánních mutací pro rezistenci na rifampicin pohybující se v rozmezí 10^{-8} až 10^{-7} [70] [71].

Nejdůležitější je však horizontální přenos genů antibiotické rezistence, který probíhá třemi metodami: transformací, transdukcí a konjugací.

1.7.1 Transformace

Jedná se o přenos genu, který probíhá mezi dárcovskou buňkou a recipientní, aniž by došlo k jejich kontaktu. Prvně byla pozorována u grampozitivní bakterie *Streptococcus*

pneumoniae a je mechanismem s nejvyšší frekvencí rekombinací. Probíhá vniknutím externí DNA do cytoplazmy hostující buňky přes vnější a následně vnitřní membránu, což umožní její integraci do genomu a homologní rekombinaci [72]. Tímto způsobem získá transformovaná buňka nové vlastnosti – nejčastěji rezistenci vůči antibiotiku. Homologní rekombinace je omezena na jedince stejného nebo příbuzného druhu, v důsledku přítomnosti nutných homologních úseků. Na druhou stranu přenos plazmidů, které fungují jako autonomní jednotka uvnitř hostitelské buňky, není druhově omezen. Je známo několik přirozeně kompetentních transformovatelných bakterií: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter baylyi*, *Vibrio cholerae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus* sp., *Agrobacterium* sp. a *Staphylococcus* sp. [72; 73].

1.7.2 Transdukce

Transdukce se od transformace odlišuje přítomností virového vektoru – bakteriofága. Bezkontaktnost je zprostředkována intracelulárním bakteriálním parazitem, který horizontálně přenáší geny rezistence na antibiotika z jedné buňky na druhou. Děje se tak vniknutím fága do bakteriální buňky, kde se množí a štěpí hostitelskou chromozomální DNA na fragmenty. Fragmenty DNA se enkapsidují – vzniknou transdukční částice, které se přenesou infekcí na novou recipientní buňku [74]. Mohou se rekombinovat do chromozomu hostitelské buňky. Dále se přenesený fragment nemusí rekombinovat a pouze se replikuje do jedné dceřiné buňky nebo se přenesou celý plazmid, který se replikuje v hostitelské buňce a přechází do obou dceřiných buněk. Nejčastěji probíhá transdukce u bakterií – *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* a *Shigella* sp. [75].

1.7.3 Konjugace

Konjugace je jediná metoda přenosu genetické informace, kdy dochází k přímému kontaktu mezi donorovou a recipientní buňkou. Poprvé byla pozorována u *Escherichia coli*. Donorová buňka nese sekvenci DNA – fertilní faktor, který je potřebný ke správnému průběhu konjugace [76; 77]. Kóduje pilus, který provádí iniciální kontakt mezi buňkami a umožňuje přenos genetické informace ve formě plazmidů nebo malé cirkulární DNA přes vytvořený cytoplazmatický můstek [75]. V mnoha případech slouží konjugace pro přenos F-plazmidů (fertilního faktoru), který se může včlenit do chromozomu hostitelské buňky a předat mu informaci potřebnou pro uskutečnění další konjugace. Konjugace byla pozorována např. u *Escherichia coli*, *Shigella* sp., *Proteus* sp., *Bacillus* sp. a *Enterococcus faecalis* [78].

1.8 Multirezistence

Neuvážlivé předepisování antibiotik ve zdravotnictví i hospodářství v rámci profylaxe zvířat vedlo ke vzniku multirezistentních kmenů a podpoře jejich šíření. Bakterie jsou neustále vystavovány selektivnímu tlaku a dokážou se rychle adaptovat. Ke vzniku tohoto tlaku dochází například při předčasném vysazení antibiotik během léčby infekce. Neopomenutelným zdrojem antibiotické rezistence jsou také čistírny odpadních vod (ČOV). Představují ideální prostředí, kde se bakterie vystavují antibiotickým reziduíům a přenosu genů [79]. Odpadní vody obsahují bakterie z enviromentálního, lidského a zvířecího prostředí, které mohou nést geny rezistence [79].

Multirezistentní kmeny vykazují odolnost vůči několika antibiotikům zároveň. Mohou být rezistentní na antibiotika s obdobnou strukturou – tzv. zkřížená rezistence. V případě mnohočetné rezistence na antibiotika odlišující se v chemické struktuře, mají bakterie v důsledku hromadění ARG různé obranné mechanismy. U MDR kmenů se musí často volit kombinovaná terapie [80].

V publikaci Murray a spol. zjistili, že úmrtnost pacientů na infekce dolních cest dýchacích byly v roce 2019 nejvíce spojovány s následujícími rezistentními patogeny – *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* a *Pseudomonas aeruginosa* [81]. Právě MDR patogenní bakterie představují největší riziko. Dobře popsán byl grampozitivní meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA), který je zároveň odolný vůči gentamycinu, ciprofloxacinu, erytromycinu a tetracyklinu [80]. V reakci na tuhle skutečnost se používají protistafylokoková antibiotika a chemoterapeutika – nejčastěji vankomycin. Glykopeptidové antibiotikum vankomycin však nepůsobí na vankomycin-rezistentní enterokoky (VRE), způsobující infekce močových cest [80]. U MDR *Enterobacteriaceae* se nejčastěji setkáváme s produkcí β -laktamáz s rozšířeným spektrem (ESBL) a karbapenemáz. Světová zdravotní organizace (WHO) zveřejnila v roce 2017 seznam bakterií, pro které je urgentní potřeba vývoje nových léčiv. Karbapenem rezistentní a ESBL produkující *Enterobacteriaceae* byly zařazeny do prvotní kritické skupiny [3]. Zmíněné multirezistentní bakterie se vyskytují především v lidském organismu, ale v posledních letech se hojně izolují také ze zvířat, masa a masných výrobků [82; 83]. Byl zaznamenán značný výskyt v drůbežích chovech. Z rakouské studie podle Zarfel a spol. byly z kuřecího masa izolovány ESBL *E. coli*, které obsahovaly geny *bla_{SHV-12}*, *bla_{CTX-m-1}* a *bla_{TEM}*. Většina izolátů *E. coli* měla potvrzenou fenotypovou multirezistenci na glykosidy, karbapenemy

a ciprofloxacin [82]. Bakterie *Enterococcus faecium* obsahovaly geny *vanA* a byly rezistentní na vankomycin. Bakterie z rodu *Staphylococcus* (*S. fleurettii*, *S. sciuri*, *S. vitulinus*) obsahovaly geny *mecA* a vykazovaly rezistenci pouze na penicilin a cefotaxim [82].

2 MIKROBIOTA DRŮBEŽÍHO MASA

Drůbež představuje jeden z nejdůležitějších zdrojů masa na světě, což v roce 2020 dokazuje 40% zastoupením v celosvětové produkci masa [84]. Produkce a konzumace drůbežího masa nadále stoupají, tudíž jsou kladeny i vysoké nároky na jeho kvalitu a nezávadnost, čehož se dosahuje používáním antibiotik v rámci profylaxe a léčbě infekčních onemocnění drůbeže. Nevýhodou přílišného používání antibiotik je výskyt jejich reziduí ve finální živočišném produktu, podzemních vodách, půdě nebo krmivech. Z tohoto důvodu představují potraviny živočišné produkce zdroj genů antibiotické rezistence v potravinovém řetězci a nepřímo je mohou šířit na člověka [85].

Antibiotický rezistom drůbežího masa představuje všechny geny antibiotické rezistence napříč jeho celou mikrobiotou. Studie podle Li spol. zjistila celkově 132 přítomných genů rezistence na 10 antibiotických tříd ve vzorcích syrového kuřecího masa. Většina detekovaných genů byla spojována s rezistencí na aminoglykosidy a β -laktamová antibiotika [86; 87]. Další studie z Číny zjistila vysoký výskyt genů rezistence na tetracykliny, aminoglykosidy a erytromycin z kuřecích výkalů [88]. Wang a spol. uvádí vysokou četnost genů rezistence vůči aminoglykosidům, MLS (makrolid-linkosamidy-streptogramin) a β -laktamovým antibiotikům v prostředí drůbežích farem [89].

Rezistom se dá zkoumat pomocí molekulárních metod – konvenční a multiplex PCR, qPCR (quantitative PCR), RT-PCR (real time – PCR), PCR-RFLP (PCR – restriction fragment length polymorphism) a microarray [90]. Nejlepší metodou studia rezistomu je však metagenomika, která dokáže sekvenovat celý přítomný mikrobiom [90]. Spektrum genů antibiotické rezistence úzce souvisí s přítomnou mikrobiotou [85].

Mikroflóra se během procesu zpracování drůbeže od vykrvácení až po finální produkci neustále mění. Během každého kroku zpracování jatečního těla se musí dodržovat přísné hygienické postupy. Celý proces je shrnut do sedmi kroků – doprava, porážka, opaření, eviscerace, mytí, chlazení a porcování. *Proteobacteria* představují převažující mikrobiotu drůbežího masa a zároveň významně ovlivňují jeho kvalitu. Jedná se především o rody *Pseudomonas*, *Acinetobacter* a *Enterobacteriaceae* [91; 92]. V průběhu dalších zpracovatelských postupů se však počty bakterií zvyšují co do počtu i rozmanitosti. Eviscerace (vyjmutí vnitřních orgánů) je důležitým kontrolním bodem kontaminace rezistentními patogeny rodů *Campylobacter*, *Salmonella* a *Escherichia*. Je nutné zamezit

kontaktu obsahu slepého střeva s povrchem drůbežího masa, protože představuje rezervoár výskytu zmíněných bakteriálních rodů způsobujících alimentární infekce [91; 93].

Campylobacter jejuni způsobuje kampylobakteriózu – zánětlivé průjemy s horečkou, která má podobnou četnost výskytu v letních měsících jako salmonelóza. Nejčastěji se průběh infekce zmírní makrolidy [94]. *Salmonella enteritica* subs. *enterica* sérovar Enteritidis anebo *Salmonella enterica* subs. *enterica* sérovar Typhimurium jsou původci salmonelózy. Projevuje se nauzeou, zvracením, průjmem a horečkou [95]. Těmto infekcím lze zamezit správným tepelným opracováním a zacházením s drůbežím masem. Vyjímaje možnou přítomností patogenních bakterií, mikrobiota drůbežího masa má rozmanitý charakter. Variabilita mikrobiota drůbežího masa je závislá na určitém ročním období. Podle Kim a spol. byla mikrobiota v syrovém nebaleném kuřecím masu variabilnější a přítomna ve vyšším množství, kdy v červenci převládaly bakterie z kmene *Firmicutes*, kdežto v lednu to byly bakterie z kmene *Proteobacteria* [92; 96]. Je to nejspíš způsobeno specifickými teplotami a přístupem kyslíku, kterým jsou bakterie na povrchu masa vystavovány. Nejčastěji čerstvé chlazené drůbeží maso obsahuje – *Pseudomonas* sp., zástupce čeledi *Enterobacteriaceae*, *Lactobacillus* sp., *Acinetobacter* sp. a *Brochothrix thermophacta* [91; 97]. Dále byl ve vzorcích kuřecích prsou identifikován výskyt zástupců rodů *Yersinia*, *Serratia*, *Hafnia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Buttiauxella* či *Erwinia* [86].

2.1 Řád *Enterobacterales*

Řád *Enterobacterales* se nově od roku 2016 dělí na čeledě: *Enterobacteriaceae*, *Budviciaceae*, *Erwiniaceae*, *Hafniaceae*, *Morganellaceae*, *Pectobacteriaceae* a *Yersiniaceae* [98].

Čeď *Enterobacteriaceae* jsou gramnegativní, nesporulující tyčky o délce 1–6 μ a o šířce 0,4–1 μ [99]. Jsou úzce spjaty druhovou příbuzností a v rámci taxonomie představují čeď s největší rozmanitostí. Mohou mít peritrichální bičíky (*Shigella* sp., *Klebsiella* sp.) nebo jsou nepohyblivé. Vyznačují se fakultativně anaerobním růstem. Přírodním prostředím je tlusté střevo teplokrevných zvířat a člověka jako součást mikroflóry. Dále se vyskytují v půdě, vodě a rozkládajících materiálech. Jsou oxidáza-negativní a kataláza-pozitivní. Dokážou redukovat nitráty na nitrit a fermentují glukózu za tvorby kyselin a plynů [100]. Do čeledi *Enterobacteriaceae* se řadí mnoho druhů, nejnámějšími jsou – *Citrobacter*, *Cronobacter*, *Enterobacter*, *Escherchia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Salmonella* a *Shigella* [101]. V rámci *Enterobacteriaceae* se definuje skupina koliformních bakterií klasifikující

se na základě rychlé fermentace laktózy – *Citrobacter*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* a *Klebsiella* [102]. Představují indikátory fekálního znečištění potravin, povrchových a podzemních vod. U nefermentujících druhů jako *Salmonella* a *Shigella* je pozorována vyšší virulence. *Kluyvera intermedia* je ubikvitní a byla izolována z lidské stolice a střev, odpadních vod i potravin. Byly u ní nalezeny karbapenem a kolistin rezistentní geny – *bla_{KPC-2}*, *bla_{KPC-3}*, *mcr10.1*, *mcr1.1* a *mcr9.2*. *Escherichia coli* má multirezistentní charakter a může obsahovat hodně ARG [103; 104].

Hafniaceae je taxonomicky malá čeleď. Obsahuje rody *Hafnia* a *Edwardsiella* [98; 105]. Jedná se o fakultativně anaerobní tyčinky. Rod *Hafnia* má negativní test na indol, citrát a metylovou červeň. Jediný pozitivní má Voges Proskauerův test pro detekci 3-hydroxybutan-2-onu [106]. Mezi nejznámější zástupce rodu *Hafnia* patří *Hafnia alvei*, kterou lze izolovat z potravin, vody, půdy a gastrointestinálního traktu savců i lidí [107]. Vyskytuje se v potravinách živočišného původu, zejména v mase – mletém hovězím, vakuově baleném hovězím a vepřovém. Dále se vyskytuje v mléčných výrobcích, sýrech dokonce i v medu [107; 108]. *Hafnia alvei* představuje oportunní lidský patogen. Existují případy, kdy *Hafnia alvei* způsobila střevní infekce, které nejsou však časté [109]. Do povědomí se dostala, když u ní byla pozorována rezistence na karbapenemy v důsledku nedostatku proteinu OmpK36, určujícího permeabilitu vnější membrány [110; 109]. O 13 let později byla zaznamenána první zpráva o *Hafnia alvei*, která byla rezistentní vůči aminopenicilinům a cefalosporinům první generace, protože produkovala β-laktamázu OXA-48 [109]. Rezistenci s největší pravděpodobností získala horizontálním přenosem genů z *Enterobacter cloacae*, pro kterou je typická terapie karbapenemy [109].

Bakterie čeledi *Yersiniaceae* jsou o něco větší čeledí oproti *Hafniaceae*. Mají fakultativně anaerobní charakter růstu a neprodukují sirovodík. Zastupují ji typové rody *Serratia* a *Yersinia* [98]. Bakterie rodu *Serratia* jsou všudypřítomné, pohyblivé s pozitivním citrátovým a Voges Proskauerovým testem. Nejsou schopné přeměnit tryptofan na indol a reagují variabilně na metylčerveňový test [106]. Jsou typické produkcí deoxyribonukleázy, lipázy a želatinázy. Nejvíce se setkáváme s následujícími druhy – *Serratia marcescens*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefacines*, *Serratia fonticola* atd. Typovým druhem je *Serratia marcescens*, která produkuje červený pigment prodigiosin, kterého si lze povšimnout při tvorbě biofilmu [111]. Vyskytuje se v půdě, vodě a ve vlhkém prostředí. Jedná se o oportunní lidský i zvířecí patogen. Izoláty *Serratia marcescens* z nemocničních prostředí vykazují multirezistenci, jelikož disponují rezistencí na ampicilin, první a druhou

generaci cefalosporinů, makrolidy, tetracykliny, peniciliny a kolistin [112; 113; 114]. Může způsobit nozokomiální infekce dýchacího traktu u lidí s oslabeným imunitním systémem. Poměrně účinně na ni zabírá piperacilin [115]. I přesto byla v roce 2017 zařazena podle WHO mezi problémové bakterie, pro které je nutno nalézt novou antimikrobiální látku [3]. *Serratia fonticola* se běžně vyskytuje u zvířat a není častým lidským patogenem. Stejně jako *S. marcescens* ji lze izolovat z trusu ptáků, vody a půdy [116; 117]. Také byl prokázán přenos rezistentních genů na jiné bakterie a může vykazovat i multirezistenci [117]. *Serratia grimesii* je spojována s produkcí grimelysinu, což je metaloproteáza podobná proteáze ECP32 od *Escherichia coli*, která hydrolyzuje aktin [118].

2.2 Řád *Pseudomonadales*

Řád *Pseudomonadales* se větví na několik čeledí – *Moraxallaceae*, *Pseudohongiellaceae*, *Ventosimonadaceae* a *Pseudomonadaceae* [119]. Nejpočetnější čeleď představuje *Pseudomonadaceae*. Řadí se mezi gramnegativní nefermentující aerobní tyčky o délce 1–3 μ a tloušťce 0,8 μ [120]. Mají pozitivní oxidázovou i katalázovou aktivitu a polární bičíky, které jim umožňují pohyb. Jsou široce rozšířeny v okolním prostředí jako saprofyty nebo komenzálové. Patří zde mnoho rodů jako například – *Azomonas*, *Azorhizopilus*, *Azotobacter*, *Halopseudomonas*, *Pseudomonas* a *Rhizobacter* [121]. Důležitým rodem je *Pseudomonas*, který obsahuje bakterie představující lidské oportunní patogeny. Nejběžnější je *Pseudomonas aeruginosa* asociována s nemocničními infekcemi. Produkuje řadu virulentních faktorů jako – nekrotoxin A, elastázu, proteázy a hemolyziny [120]. Problémovost *P. aeruginosa* spočívá v její multirezistenci a většinou se musí proti ní volit kombinovaná léčba. Je snadno rozeznatelná kvůli produkci několika pigmentů. Nejběžnější je modrý pyocyanin [120]. Dále zelený pyoverdin, černý pyomelanin a červený pyorubin. *Pseudomonas fluorescens* je oproti *P. aeruginosa* méně virulentní. Nepovažuje se ani za patogen. Její běžný výskyt je v půdě, poblíž kořenových systémů rostlin, nebo v chlazených potravinách, kde produkuje enzymy a pigmenty během jejich kažení. Je typická produkcí fluoresceinu, který pod UV fluoreskuje nažloutlou barvou [122; 123].

2.3 Řád *Burkholderiales*

Řád *Burkholderiales* jsou *Betaproteobacteria* patřící do stejného kmene jako řád *Pseudomonadales*. Dělí se na čeledě – *Alcaligenaceae*, *Burkholderiaceae*, *Comamonadaceae*, *Oxalobacteraceae* a *Sutterellaceae* [124; 125]. Čeleď *Comamonadaceae* je různorodá a obsahuje velký počet rodů – *Comamonas*, *Delftia*,

Acidovorax apod. Rod *Comamonas* představují bakterie, které se mohou vyskytovat v prostředí vody, půdy a střevního mikrobiomu zvířat. Hojně se vyskytují i v aktivních kalech a odpadních vodách [126]. Jsou gramnegativní, oxidáza i kataláza pozitivní tyčinky. Rostou při aerobních podmínkách a neutvářejí spory. Mají bičíky polárně umístěny po pěti vláčkách a nefermentují glukózu [126].

Rod *Comamonas* má obecně velmi blízko k rodu *Pseudomonas*. Několik druhů z rodu *Pseudomonas* bylo taxonomicky přeřazeno do *Comamonas* jako – *Comamonas acidovorans* a *Comamonas testosteroni* [126; 127]. Dalším zástupcem je *Comamonas terrigena*, která disponuje skvělými biodegradačními vlastnostmi. Odolává kombinaci fenolu a reaktivních forem kyslíku [128]. U *Comamonas testosteroni* byla prokázána rezistence na betalaktamová antibiotika, jelikož produkovala β -laktamázy třídy A [126; 129]. Dále byly nalezeny geny rezistence *tetA*, *sul1*, *sul2*, *floR* i *bla_{OXA-1}* u *Comamonas kerstersii* [126]. Dokonce i z příbuzné větve čeledě *Burkholderiaceae*, rodu *Burkholderia* je druh *Burkholderia cepacia* vyznačující se vnitřní rezistencí na polymyxin [58]. Vesměs bakterie rodu *Comamonas* nejsou až tak patogenní pro člověka, jako například *P. aeruginosa*. Bylo zaznamenáno pár případů, kdy způsobily infekci u lidí, avšak virulentní faktory jsou v závislosti na specifických druzích [126].

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo detekovat geny antibiotické rezistence (*floR*, *catA1*, *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-7}*, *ereA*, *sulI*, *tet(A)*, *tet(M)*) z 5 skupin antibiotik, zjistit jejich prevalenci a charakterizovat tak část rezistomu drůbežního masa. Dílčím cílem bylo izolovat a identifikovat bakterie z testovaného drůbežního masa. Ty charakterizovat fenotypovými a genotypovými metodami z hlediska výskytu antibiotické rezistence a zjištěné výsledky porovnat s výsledky studia rezistomu drůbežního masa.

4 MATERIÁL A METODIKA

V následující kapitole je uveden veškerý použitý materiál, chemikálie a přístroje. Dále obsahuje informace o použitých kultivačních médiích a použitých primerech u polymerázové řetězové reakce (PCR). Všechny materiál má uvedeného výrobce a zemi původu, popřípadě odkaz na literaturu.

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorky

Vzorky chlazeného nebaleného drůbežího masa s kůží (kuřecí – K, krůtí – R) byly zakoupeny v období červenec-srpen 2023 v různých maloobchodních prodejnách řeznictví Zlínského kraje (okresy Zlín a Vsetín). Vzorky byly převezeny v chladící tašce do dvou hodin do laboratoře k mikrobiologickému rozboru a stanovení.

4.1.2 Laboratorní pomůcky, přístroje a spotřební materiál

V Tabulce 1 jsou vyjmenované všechny přístroje a software používané v laboratoři včetně výrobců a sídla firmy. V Tabulce 2 je uveden použitý spotřební materiál.

Tabulka 1 Seznam laboratorních pomůcek, přístrojů a softwaru

Laboratorní přístroj	Výrobce
Aeris™ PCR Thermal Cycler	ESCO, Singapur
Binokulární mikroskop se čtyřmi objektivy	Intraco Micro, Česká republika
Dekontaminační digestoř Aura PCR	BioAir, Itálie
Elektroforetická vana	Cleaver Scientific Ltd, UK
InfiniteM200	Tecan, Švýcarsko
InGenius transluminátor	Syngene, UK
Magnetický separátor NucleoMag SEP	MACHREY-NAGEL, Německo
Mikropipety a pipety	Eppendorf, Německo
Počítačový program SnapGene InGenius	Syngene, UK
Počítačový program TNW	Erba Lachema, Česká republika
Spiral plater EDDY JET 2	ILU Instruments, Španělsko
Stolní centrifuga miniSpin	Eppendorf, Německo
Stomacher Classic IUL	BioTech, Česká republika
Suchý blokový termostat CH-100	BioSan, Česká republika
Třepačka VX-200 Vortex Mixer	Labnet International, USA
Váhy KB	KERN, Německo
Zákaloměr Densi-La-Meter	Erba Lachema, Česká republika
Zdroj energie EV243	Consort, Belgie

Tabulka 2 Spotřební materiál

Materiál	Výrobce
Eppendorfovy zkumavky 1,5 ml	BioTech, Česká republika
Mikrotitrační destička	GAMA, Česká republika
PCR mikrozukmavky	BioTech, Česká republika

4.1.3 Kultivační média a roztoky

V Tabulkách 3, 4, 5 a 6 jsou uvedeny hmotnostní zastoupení látek obsažených v kultivačních půdách a roztocích na litr destilované vody.

Tabulka 3 Složení Violet Red Bile Lactose Agar

Violet Red Bile Lactose Agar	HIMEDIA, Indie
Složení	Množství [g/l destilované vody]
Agar	15
Krystalová violet	0,002
Kvasničný extrakt	3
Laktóza	10
NaCl	5
Neutrální červen	0,03
Pepton	7
Směs žlučových solí	1,5

Tabulka 4 Složení Mueller Hinton agar

Mueller Hinton agar	HIMEDIA, Indie
Složení	Množství [g/l destilované vody]
Agar	17
Ekvivalent hovězího výtažku	300
Ekvivalent hydrolyzátu kyseliny kaseionové	1,5
Škrob	1,5

Tabulka 5 Složení peptonové vody

Peptonová voda	HIMEDIA, Indie
Složení	Množství [g/l destilované vody]
Pepton	10
NaCl	5

Tabulka 6 Složení fyziologického roztoku

Fyziologický roztok	-
Složení	Množství [g/l destilované vody]
NaCl	8,5

4.1.4 Chemické látky a antibiotika

Seznam použitých chemikálií a antibiotik uvádí Tabulka 7 a Tabulka 8, včetně výrobce a země původu.

Tabulka 7 Chemikálie

Chemikálie	Výrobce
Aceton	PENTA, Česká republika
Agaróza	Sigma-Aldrich, USA
Eluční pufr AE (Buffer AE)	QIAGEN, Německo
Etanol	PENTA, Česká republika
Gelred Nucleic Acid Stain 10,000x Water	Biotium, USA
Imerzní olej	Sigma-Aldrich, USA
Krystalová violet'	PENTA, Česká republika
Lugolův roztok	Erba Lachema, Česká republika
Lyzační pufr (Buffer AL)	QIAGEN, Německo
Parafin	Sigma-Aldrich, USA
Peqlab peqGOLD, DNA Ladder, 100 bp Plus	Avantor, Litva
Promývací pufr AW1 (Buffer AW1)	QIAGEN, Německo
Promývací pufr AW2 (Buffer AW2)	QIAGEN, Německo
Proteináza K	QIAGEN, Německo
Red Taq 2X Master Mix 1 .5 mM MgCl ₂	VWR International, USA
Safranin	HIMEDIA, Indie
Souprava mikrotestů ENTEROtest 24 N	Erba Lachema, Česká republika
SPRIselect magnetické kuličky	Beckman Coulter, USA
Tris-acetátový pufr (TAE pufr) 50X	Biogen, Česká republika

Tabulka 8 Seznam antibiotických disků

Skupina antibiotik		Koncentrace [µg/disk]	Název	Výrobce	
Amfenikoly		30	Chloramfenikol (C)	HIMEDIA, Indie	
Aminoglykosidy		300	Streptomycin (HLS)	HIMEDIA, Indie	
Betalaktamová	Cefalosporiny	IV. generace	30	Cefepim (FEP)	Oxoid, UK
		III. generace	30	Cefotaxim (CTX)	HIMEDIA, Indie
	Karbapenemy		10	Imipenem (IPM)	HIMEDIA, Indie
	Monobaktamy		30	Aztreonam (AT)	HIMEDIA, Indie
	Peniciliny	Širokospektrá	10	Amoxicilin (AMX)	HIMEDIA, Indie
Chinolony	Chinolony 2. generace		10	Ciprofloxacin (CIP)	HIMEDIA, Indie
Makrolidy	Makrolidy 1. generace		5	Erytromycin (E)	HIMEDIA, Indie
	Makrolidy 2. generace		30	Azitromycin (AZM)	HIMEDIA, Indie
Polypeptidová		10	Kolistin (CT)	Oxoid, UK	
Tetracykliny		10	Tetracyklin (TE)	HIMEDIA, Indie	

4.1.5 Použité primery

V Tabulce 9 je uveden seznam primerů použitých pro detekci genů antibiotické rezistence metodou PCR. Každý primer má své specifické teploty anealingu (T_A) a vytváří různě dlouhé nukleotidové sekvence v jednotkách párů bází (bp).

Tabulka 9 Seznam použitých primerů

Skupina antibiotik	Cílený gen	Sekvence 5'→3'	T_A (°C)	bp	ref.
Sulfonamidy	<i>sulI</i>	F: CGCCGCTCTTAGACGCCCTGT R: CAACGGTGGCGCCCAAGAAGG	58	433	tato práce

Makrolidy	<i>ereA</i>	F: GCCGGTGCTCATGAACTTGAG R: CGACTCTATTCGATCAGAGGC	58	419	[130]
Polymyxiny	<i>mcr1</i>	F: AGTCCGTTTGTTCCTTGTTGGC R: AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	58	320	[131]
Amfenikoly	<i>floR</i>	F: CACGTTGAGCCTCTATATGG R: ATGCAGAAGTAGAACGCGAC	55	868	[132]
	<i>catA1</i>	F: AGTTGCTCAATGTACCTATAACC R: TTGTAATTCATTAAGCATTCTGCC	55	547	
Tetracykliny	<i>tetA</i>	F: GGCCTCAATTCCTGACG R: AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	55	372	[133]
	<i>tetM</i>	F: GTGGACAAAGGTACAACGAG R: CGGTAAAGTTCGTCACACAC	55	406	[134]
β-laktamová	<i>bla_{oxA-7}</i>	F: AGTTCTCTGCCGAAGCC R: TCTCAACCCAACCAACCC	50	591	[135]
	<i>bla_{TEM}</i>	F: GAGTATTCAACATTTTCGT R: ACCAATGCTTAATCAGTGA	50	857	
Sekvenace	<i>16S rRNA</i>	FD1: AGAGTTTGATCCTGGCTCAG RD1: AAGGAGGTGATCCAGCC	57	1500	[136]

4.2 Metodika

4.2.1 Příprava vzorků a izolace bakteriálních kmenů

Pro izolaci celkové DNA ze vzorku drůbežího masa, byly mikroorganismy nejdříve neselektivně předpomnoženy. Pět gramů 32nealing masa bylo sterilně vloženo do 45 ml peptonové vody a kultivováno aerobně při 37 °C po dobu 24 hodin. Další postup je uveden v kapitole 4.2.2.

Pro izolaci gramnegativních bakterií ze vzorků masa byla využita selektivní půda Violet red bile agar with lactose (VRBL). Složky uvedené v Tabulce 3 zajišťují jejich optimální růst.

Mezi selektivní látky zde patří žlučové soli a krystalová violet inhibující růst grampozitivních mikroorganismů. Substrátem, hlavním zdrojem uhlíku a energie, je laktóza. Neutrální červeně indikuje pH v oblasti působnosti 6,8 a 8,0. Jestliže dochází k fermentaci laktózy, nastává změna barvy kolonie na červenofialovou s fialovým precipitátem žlučových solí a jedná se o laktóza pozitivní koliformní bakterie patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Fialový precipitát je ojedinělý a mohou ho mít bakterie *Escherichia coli*, kdežto *Klebsiella aerogenes* má zbarvení kolonií narůžovělé. Když je fermentace pomalá, nebo k ní nedochází, barva kolonií je světlá až nazelenalá. Laktóza negativní mohou být například bakterie rodu *Salmonella*. Kombinací těchto faktorů byla zajištěna předběžná selekce bakterií.

Celkem 5 g od vybraných vzorků masa bylo navázeno do sáčku a spolu s 45 ml sterilního fyziologického roztoku homogenizováno po dobu 90 s v přístroji Stomacher. Následovalo desítkového ředění až do 10^{-3} . Pro nanesení naředěné bakteriální suspenze na selektivní médium VRBL byl použit Spiral plater Eddy Jet 2. Šest set μl ředění se pipetovalo do sterilního pohárku, který se vkládal do spiral plateru. Na Petriho miskách vznikly Archimédovy spirály za nastaveného programu Log Mod 50. Koncentrace nanášeného ředění se logaritmičticky snižuje ze středu Petriho misky směrem k jejímu okraji. Misky byly kultivovány při $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 24 h. Pro izolaci byly vybrány kolonie s různou morfologií. Přeočkování křížovým roztěrem proběhlo u každého izolátu nejméně pětkrát.

4.2.2 Izolace DNA

Pro izolaci DNA z předpřipravených vzorků (kap. 4.2.1) byl zvolen Dneasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN (Německo), jehož principem je purifikace nukleových kyselin na chromatografických kolonkách v kombinaci s centrifugací [137]. Postup se řídil doporučením výrobce a byl následující.

Nejprve proběhl odběr $1000\ \mu\text{l}$ suspenze po kultivaci do eppendorfovy zkumavky a oddělení bakteriálních buněk od růstového média prostřednictvím 5minutové centrifugace na $15\ 000\ \text{rpm}$. Supernatant byl odpipetován a k vytvořenému sedimentu bakterií bylo přidáno $200\ \mu\text{l}$ PBS roztoku a $20\ \mu\text{l}$ proteinázy K. Celý obsah zkumavky se důkladně promíchal na třepače vortexového typu. Jakmile se do zkumavky přidalo $200\ \mu\text{l}$ lyzačního pufru AL, ihned se vložila do předehřátého suchého termostatu na $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 10 minut. Po uplynutí dané doby se ke směsi přidalo $200\ \mu\text{l}$ 96% chladného etanolu. Dále se směs napipetovala na kolonku a provedla se minutová centrifugace při $8000\ \text{rpm}$. Supernatant byl vylit do kolonky a přidalo se $500\ \mu\text{l}$ vymývacího pufru AW1. Znovu se centrifigovalo 1 minutu

při 8000 rpm. Tento krok se opakoval, jenom za použití vymývací pufru AW2 a centrifugace po dobu 3 minut při 15 000 rpm. Sběrná zkumavka byla nahrazena za eppendorfovu, do níž se vložila kolonka se zachycenou dsDNA. Finálním krokem byla eluce do 100 µl elučního pufru AE, který se nechal působit 10 minut. Zisk extrahované DNA proběhl poslední minutovou centrifugací na 8000 rpm. Izolace dsDNA z čistých kultur probíhala analogicky.

4.2.3 Měření čistoty a koncentrace dsDNA

Měření koncentrace dsDNA proběhlo spektrofotometricky při vlnových délkách 260 a 280 ± 1 nm na základě empirického zjištění lineární závislosti mezi její absorbcí a koncentrací. Platí tedy, že při absorbcí $A=1$ má koncentrace dsDNA 50 µg/ml s nutným předpokladem, že se v roztoku nevyskytují další absorbující látky [138]. Stanovení je postaveno na principu Lambert-Beerova zákona:

$$A = \varepsilon \cdot c \cdot l \quad (1)$$

Čistota byla určena dle poměru hodnot absorpance dsDNA a bílkovin. Optimum by mělo mít hodnotu 1,8 značící obecně přijímanou hodnotu čistoty.

Každý ze čtyř nukleotidů obsažených v DNA má odlišnou na sobě nezávislou hodnotu podílu 260/280. Nejvyšší má adenin s 4,50. Cytosin má 1,51 a Tymidin 1,47. Nejméně světla pak pohlcuje guanin s 1,15. Celkově má dsDNA nižší hodnotu 260/280 než RNA, jelikož postrádá uracil ve své struktuře. Uracil má podíl roven 4,00 [139].

Stanovení čistoty a koncentrace dsDNA proběhlo na zařízení Infinite®M200, Tecan (Švýcarsko) v programu Infinite 200 PRO. Nejprve byla destička nanoquant očištěna 70% etanolem. Jako slepý vzorek pro kalibraci přístroje se použil eluční pufr AE, který se napipetoval na sklíčko o objemu 2 µl. Po slepém měření absorpance rozpouštědla se provedlo nové s 2 µl roztoku izolované dsDNA. Výsledky byly zaznamenány v programu Microsoft Office Excel.

4.2.4 Metoda PCR

Polymerázová řetězová reakce (PCR) probíhá zcela *in vitro*. Cílem metody je rychlá a efektivní amplifikace konkrétní nukleotidové sekvence zodpovědné za antibiotickou rezistenci obsažené v dsDNA [137]. Pro každý gen byla provedena PCR reakce nejméně třikrát. Příslušné geny jsou ohraničeny specifickými oligonukleotidovými primery (viz. Tabulka 9) [140]. Je důležité, aby nebyly primery mezi sebou výrazně komplementární, jelikož by mohly vznikat dimery. Dále nesmí být komplementarita v rámci sekvence jednoho

primeru, což by způsobilo vznik vlásenky a jeho nefunkčnost. Složení PCR směsi je uvedeno v Tabulce 10.

Tabulka 10 Složení PCR směsi

Složky	Množství [μ l/vzorek]
PCR destilovaná H ₂ O	7
Red Taq 2X Master Mix 1 .5 mM MgCl ₂	10
Primer ®	1
Primer (F)	1
DNA	1

PCR má tři fáze – denaturace, annealing a extenze, které probíhají za rozdílných teplot [141]. Iniciálním krokem v termocycleru je pre-denaturace dsDNA při 95 °C/ 3 minuty. Následná denaturace probíhala při 95 °C/ 30sekund. Teplota annealingu byla převzata z literatury, ev. optimalizována s využitím gradientové PCR. Teplota extenze se odvíjela podle teplotního optima použité DNA-polymerázy obsažen v mastermixu, která činila 72 °C po dobu 1 minuty. Finální extenze pak trvala 10 minut při stejné teplotě. Denaturace, annealing a extenze se opakovaly ve 35 cyklech. Iniciální a finální krok nejsou součástí cyklů a proběhly jenom jednou (Tabulka 11, 12).

Tabulka 11 PCR program při teplotě annealingu 55-58 °C

Pre-denaturace	Denaturace	Annealing	Extenze	Finální extenze	Chlazení
95 °C/ 3 min	95 °C/ 30 s	55 °C/ 30 s	72 °C/ 1 min	72 °C/ 10 min	4 °C/ ∞
35 cyklů					

Tabulka 12 PCR program při teplotě annealingu 50-52 °C

Pre-denaturace	Denaturace	Annealing	Extenze	Finální extenze	Chlazení
95 °C/ 3 min	95 °C/ 30 s	52 °C/ 30 s	72 °C/ 1 min	72 °C/ 10 min	4 °C/ ∞
35 cyklů					

4.2.5 Gelová elektroforéza

Elektroforéza nukleových kyselin je separační technika využívající principu migrace nabitých molekul v elektrickém poli. Fosfátová skupina obsažena ve struktuře dsDNA má negativně nabitý náboj a způsobuje pohyb nukleové kyseliny směrem k anodě, která má náboj kladný. Rychlost pohybu iontů je závislá na velikostech dsDNA fragmentů. Kratší se pohybují rychleji, kdežto delší pomaleji, což se projeví na jejich vzdálenosti

v elektroforetickém gelu [142]. Rychlost pohybu iontu ve stejnosměrném elektrickém poli vychází z následujícího vzorce:

$$v = qE/6\pi\eta r \quad (2)$$

Kdy v je rychlost pohybu iontu, q je velikost elektrického náboje iontu, E je intenzita elektrického pole, r je poloměr iontu, η je viskozita prostředí a π Ludolfovo číslo. Nabitou částici pohání tzv. „hnací síla“ F_1 , která je vyjádřena dle vzorce:

$$F_1 = E \cdot q \quad (3)$$

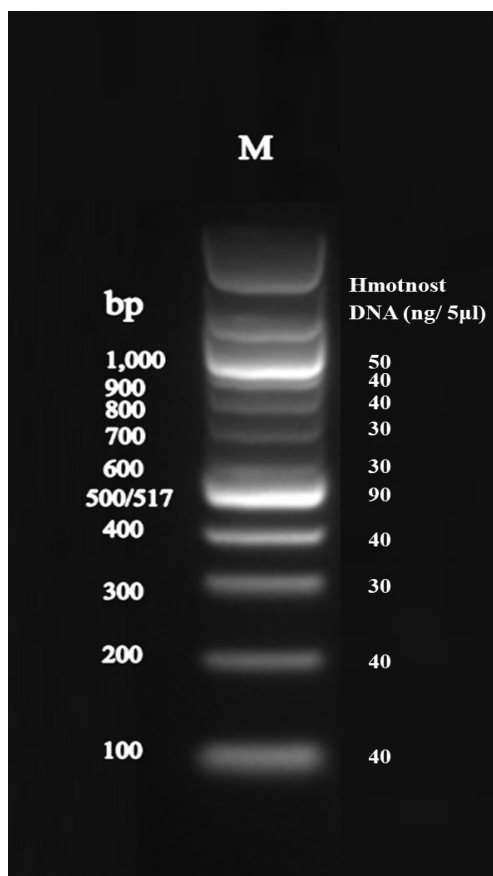
V homogenním prostředí dochází k velmi rychlému ustálení hnací síly se silou vnitřního tření a nastane stav rovnováhy. Síla vnitřního tření F_2 vychází ze Stokesova zákona:

$$F_2 = -6\pi r \eta v \quad (4)$$

Jakmile byly vztahy (2) a (3) dány do rovnosti, byl odvozen vzorec pro výpočet rychlosti pohybu iontu (1) [143],[144] Z rychlosti pohybu iontů se vyjadřuje elektroforetická pohyblivost μ_e . což je rychlost pohybu dsDNA fragmentů:

$$\mu_e = q/6\pi r \eta \quad (5)$$

Elektroforetická pohyblivost ampliconů se posuzuje na agarózovém gel s naneseným standardem o velikosti 100bp.



Obrázek 1 100bp DNA ladder (Avantor, Litva)

Agaróza je polysacharid skládající se z galaktózových a 3,6-anhydrogalaktózových podjednotek. Zprostředkovává vznik polymerní struktury, která má jasně definované velikosti pórů v závislosti na složení roztoku a koncentraci agarózy. Využívá se pro své vlastnosti separace molekul o velikostech od 100 bp – 50 kb [142].

Gel byl připraven v koncentraci 1,5 %. V Erlenmeyerově baňce se smíchalo 100 ml 1x TAE pufru a 1,5 g práškové agarózy. Suspenze byla vložena do mikrovlnné trouby na 1,5 minuty, než byla agaróza zcela rozpuštěna. Po mírném zchladnutí se přidaly 3 kapky interkalačního barviva Gelred Nucleic Acid Stain 10,000x Water. Jedná se o barvivo navržené k náhradě toxického ethidium bromidu (EtBr) pro svou identičnost spektra, a dokonce vyšší citlivost [145]. Jakmile nalitý gel ve vaničce ztuhnul, odstranilo se těsnění a hřeben. Vanička byla umístěna do elektroforetické vany naplněné 1x TAE puftrem s elektrodami na opačných koncích. Jamky musely být u záporného pólu a ponořeny pod puftrem zhruba 1-2 mm [146]. Do vzniklých jamek se pipetovala amplifikovaná dsDNA o objemu 4 µl/ jamku. Hmotnostní standard, 100bp DNA ladder (Obrázek 1), byl pipetován v objemu 3 µl/ jamku.

Hodnoty na elektroforetickém zdroji střídavého proudu byly nastaveny v závislosti na velikosti elektroforetické vany. U větší vany bylo nastaveno 120 V/ 75 minut a u menší

90 V/ 60 minut. Dokumentace gelů byla pořízena v programu SYNGENE, GeneSnap version 7.09.11.

4.2.6 Gramovo barvení

Gramovo barvení je jednou z nejdůležitějších diagnostických metod, využívající rozdílnost buněčných stěn u grampozitivních a gramnegativních bakterií. Fixovaný preparát se barvil krystalovou violetí (60 sekund) a následně mořil Lugolovým roztokem (30 sekund). Lugolův roztok je rozpuštěný elementární jód a jodid draselný, který spolu s krystalovou violetí vytváří komplex barviva, jódu a buněčné stěny. Rozdíl zbarvení nastal při promývání preparátu acetonem (2 sekundy). U gramnegativních bakterií aceton rozpustí vnější lipopolysacharidovou vrstvu a komplex je vymyt skrz tenkou vrstvu peptidoglykanu. Následkem promytí bylo odbarvení buněk, a proto musely být dobarveny safraninem (60 sekund).

Preparát podle Grama se mikroskopoval objektivem 100x a okuláry 16x s imerzním olejem. Byly pozorovány tvary, typické shluky, ev. pouzdra a velikosti bakterií a jejich povaha buněčné stěny.

4.2.7 Fenotypová identifikace

Souprava ENTEROtest 24N je sada biochemických mikrotestů určena pro fenotypovou identifikaci gramnegativních střevních bakterií z čeledí *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* a *Aeromonadaceae*. Obsahuje čtyři sady na jedné mikrotitrační destičce pro identifikaci čtyř kmenů. Jednotlivý test zahrnuje 24 biochemických testů [147].

Principem biochemických testů je utilizace substrátu. Pozoruje se produkce kyselin při štěpení cukrů – salicin (SAL), sorbitol (SOR), melibióza (MLB), celobióza (CEL), laktóza (LAC), trehalóza (TRE), manitol (MAN), dulcitol (DUL), adonitol (ADO), arabitol (ART), sacharóza (SUC), inositol (INO) a rafinóza (RAF). Poté se prokazuje aktivita enzymů, které jsou specifické pro určité druhy bakterií – ureáza (URE), β – galaktosidáza (ONP), β – glukuronidáza (GLR) a β – xylosidasa (bXY). Ještě se zjišťuje, zda bakterie dekarboxylují určité aminokyseliny – arginin (ARG), ornithin (ORN) a lysin (LYS). Zkoumá se utilizace malonátu (MAL) a Simmons citrátu (SCI). A v poslední řadě ENTEROtest 24 N disponuje indikací hydrolýzy eskulinu (ESL) a produkcí sirovodíku (H_2S).

Exemplárním průkazem aktivity enzymu je URE. Spočívá v přítomnosti amoniaku (NH_3), který vznikl hydrolýzou močoviny. NH_3 způsobil změnu barvy indikátoru na červenou

až červenooranžovou [148]. Dalším je produkce H_2S , který se projeví černou barvou kvůli síranu železnatému. Na stejném principu funguje hydrolyza ESL, při níž vzniká 6,7- dihydroxykumarin (eskuletin) reagující s ionty Fe^{3+} indikující černé barvy. U rozkladu cukrů je pozorován vznik kyselin, které se projeví žlutým zbarvením acidobazického indikátoru – bromtymolové modři. Zbytek testů funguje obdobně s výsledkem změny nebo tvorby barevných spekter indikátorů v lyofilizované půdě [148].

Pro přípravu inokula se odebral nárůst 24hodinové čisté kultury z neselektivního média standardizovanou bakteriologickou technikou a resuspendovala se ve 3 ml fyziologického roztoku. Připravená suspenze se denzitometricky změřila, aby vykazovala hodnotu 1,0 McF.

Postup práce probíhal dle protokolu výrobce. Nejprve se strhnula aluminiová vrstva, pod kterou byly připravené lyofilizované substráty. Do každé jamky stripu se přidalo 100 μ l homogenizované suspenze. Testy v prvních pěti jamkách první řady musely probíhat anaerobně. Jednalo se o URE, ARG, ORN, LYS a H_2S . Anaerobní prostředí bylo zprostředkováno přidáním dvou kapek parafínu [147]. Destičky byly s bakteriální suspenzí vloženy do polyethylenového sáčku a inkubovány při 37 °C/ 24 hodin. Vyhodnocené změny barev byly zaznamenány podle barevné srovnávací stupnice ENTEROtest 24N. Pro vyhodnocení se použil software TNW Pro Auto 7.0 – modul automatických odečtů.

4.2.8 Genotypová identifikace

Pro genotypovou metodu identifikace bylo zvoleno sekvenování genu 16S ribozomální RNA (16S rRNA). Tento gen o délce 1500bp kóduje RNA složku malé ribozomální podjednotky 30S [149]. Třetí konec sekvence genu 16S rRNA obsahuje ribozomální vazebné místo anti- Shine-Dalgarnovu sekvenci interagující s Shine-Dalgarnovou sekvencí, která zprostředkovává vazbu ribozomální podjednotky 30S s 5' koncem messengerové RNA (mRNA) [150]. Důsledkem těchto interakcí je iniciace syntézy proteinů [151; 152]. Z těchto důvodů je gen 16S rRNA široce přítomen u všech bakterií a esenciální pro jejich přežití.

Primery FD1 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' a RD1 5'-AAG GAG GTG ATC CAG CC-3' byly navrženy pro konzervativní oblasti genu 16S rRNA [136]. Klasifikaci a identifikaci bakterií pak zprostředkovávají variabilní oblasti genu, které jsou pro jednotlivé bakterií unikátní. Primery FD1, RD1 sekvenují celý gen 16S rRNA a obsahují variabilními oblastmi: V1 = 69 – 99; V2 = 137; V3 = 433 – 497; V4 = 576 – 682; V5 = 822 – 879; V6 = 986 – 1043; V7 = 1117 – 1173; V8 = 1243 – 1294; V9 = 1435 – 1465.

Příprava vzorku na sekvenaci musela proběhnout dle doporučeného protokolu výrobce. Purifikací PCR produktů a jejich smícháním s primery FD1, RD1 se docílilo následovně:

Nejdřív se 15 μl PCR produktu napipetovalo do jamek mikrotitrační destičky. Přidalo se 15x0,8 μl SPRIselect magnetických kuliček. Směs kuliček s amplifikovanou dsDNA se 5x promíchala a mikrotitrační destička se ponechala na magnetické podložce po dobu 1minuty. Potom se přidalo 180 μl 85 % denaturovaného etanolu, který se nechal působit 30 sekund. Destička se vrátila zpět na magnetickou podložku. Separace trvala 1minutu. Etanol se následně odpipetoval a destička byla vysušena na termobloku při 65 °C/ 5 minut. Přídavkem 20 μl PCR vody se kuličky resuspendovaly. Celkem se promíchaly 10krát. Vrácením mikrotitrační destičky na magnetickou podložku a odpipetováním přebytečné PCR vody byla dsDNA purifikována a připravena ke smíchání s primery.

Pro každý z pěti vzorků se vytvořila řada FD1 a RD1. Celkově bylo použito 10 mikrozkuvek. K 1,25 μl primeru se přidalo 8,75 μl purifikované dsDNA, a takto připravené vzorky se poslaly na Sangerovu sekvenaci [153].

Sangerova metoda využívá fluorescenčně značených dideoxyribonukleotidových bází (ddNTP) a kapilárové elektroforézy. Fluorescenčně značené ddNTP nemají na třetím uhlíku hydroxylovou skupinu, tudíž znemožňují navázání fosfátové skupiny ostatních nukleotidů. Stávají se tak fluorescenčně značenými terminátory řetězce. Ke každé ze čtyř bází je přiřazeno jiné fluorescenční barvivo emitující světlo o jiných vlnových délkách ukazující poslední připojenou bázi amplifikovaných fragmentů [154]. PCR směs obsahuje ddNTP, deoxyribonukleotidové báze (dNTP), primery, DNA-polymerázu a purifikovanou dsDNA. Při kapilárové elektroforéze se pomocí snímače sekvenují pozice nukleotidů. Tyto sekvence se nahrají do veřejné databáze a je možné nalézt oblasti podobnosti mezi sekvencemi s bakteriemi již uloženými ve veřejné databázi (NCBI). Získané výsledky sekvenačních reakcí byly opraveny v programu DNA BASER assembler v5. 15. 0 (Heracle BioSoft, Rumunsko) a vyhodnoceny pomocí nástroje Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) porovnáním s databází [155]. Výsledky s 97% a vyšší shodou byly považovány za relevantní.

4.2.9 Disková difuzní metoda

Účelem Kirby-Bauer metody je určení citlivosti nebo rezistence bakterií vůči antibiotikům. Rezistence a citlivost se posuzuje podle průměrů inhibičních zón. Zvolilo se 12 antibiotik,

které byly impregnovány do jednotlivých disků s určitou koncentrací. Disky měly koncentrace antibiotik v rozmezí 5 až 300 µg/ disk.

Připravené inokulum o objemu 1000 µl se zákalem 0,5 McF bylo vylito na misky se standardizovaným Mueller-Hinton agarem (MHA). Zvolené médium neobsahuje inhibitory, pouze definované koncentrace hořečnatých a vápenatých kationtů, které ovlivňují výsledky testu [156]. Jakmile se bakteriální suspenze vstřebala po celém povrchu, položily se impregnované disky kruhovitě ke středu misky. Plotny se inkubovaly 18-20 hodin při 37 °C. V poslední řadě se změřily průměry vzniklých inhibičních zón, při kterých se dbal zřetel na 6 mm průměr disku [157].

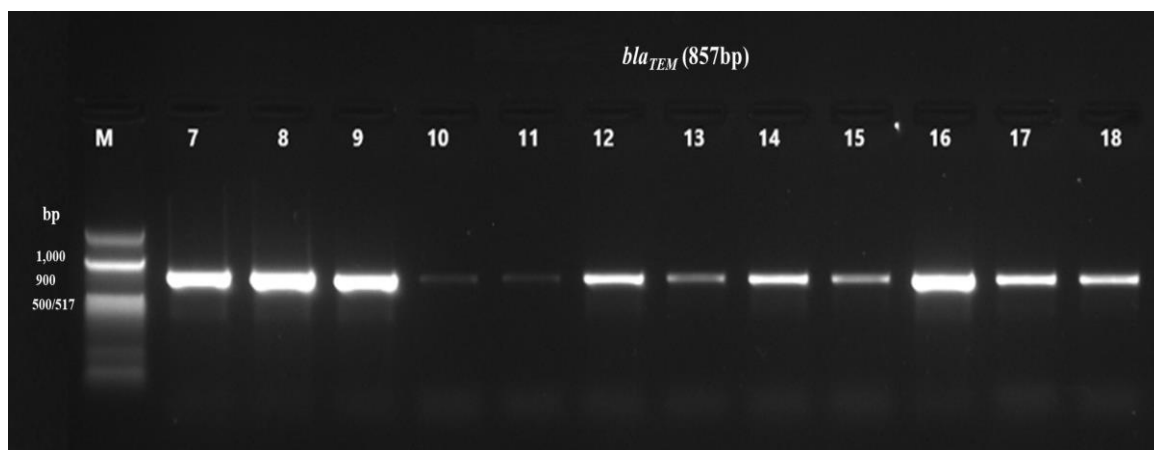
5 VÝSLEDKY A DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývá stanovením antibiotické rezistence v chlazeném drůbežím mase. Hlavní část práce byla provedena molekulárně biologickou metodou detekce specifických genů antibiotické rezistence pro amfenikoly, β -laktamová antibiotika, makrolidy, sulfonamidy a tetracykliny v celkové DNA izolované z kuřecího a krůtího masa. Dále byla provedena izolace 12 bakteriálních kmenů, u nichž byla stanovena rezistence fenotypově diskovou difuzní metodou a genotypově byly sledovány stejné geny rezistence jako u celkové DNA. Na závěr byly tyto dva přístupy porovnány.

5.1 Detekce genů antibiotické rezistence

Přenos a šíření genů představuje problém ve veterinárním, potravinářském a zdravotnickém sektoru, a děje se napříč kontinenty. Antimikrobiální látky se používají ke zlepšení podmínek a zdravotního stavu zvířat a lidí. Celosvětová spotřeba antibiotik každým rokem roste, kdy začátkem 21. století byl zaznamenán 35% nárůst [158][159]. Jejich užíváním se zamezí šíření nemocí a zajistí celková bezpečnost potravin. Na druhou stranu může potravinový řetězec podporovat šíření bakteriální rezistence a vzniku patogenních MDR bakteriálních druhů, které by mohly představovat zdravotní riziko pro společnost.

Cílem práce bylo zjistit výskyt ARG v potravinách živočišného původu. V této práci bylo zpracováno celkem 19 vzorků chlazeného drůbežího masa zakoupeného v maloobchodních prodejnách Zlínského kraje. Ze všech vzorků masa byla vyizolována celková DNA, která byla použita jako matrice pro studium rezistomu. Byly detekovány geny asociované s rezistencí na antibiotika často používané ve veterinární medicíně, a to z těchto skupin: amfenikoly (*floR*, *catA1*); β -laktamová antibiotika (*bla_{OXA-7}*, *bla_{TEM}*); makrolidy (*ereA*); polypeptidová antibiotika (*mcr1*); sulfonamidy (*sul1*); tetracykliny (*tetA*, *tetM*). Obrázek 2 představuje elektroforetickou dokumentaci reprezentativních výsledků pro ARG vyskytujících se v celkové DNA vzorků.



Obrázek 2 Detekce genu *bla_{TEM}* u DNA izolované z kuřecího a krůtího masa

V některých případech se při detekci vyskytla nepřesnost některých bandů, která mohla být způsobena Jouleovým teplem produkovaným na vodičích během elektroforézy. Jeho přímá úměra napětí, proudu a času mění odpor prostředí, který je úzce spjat se silou vnitřního tření, a tak i s rychlostí migrace [143].

Souhrnné výsledky všech detekovaných genů způsobujících rezistenci vůči amfenikolům (*floR*, *catA1*), β -laktamovým antibiotikům (*bla_{OXA-7}*, *bla_{TEM}*), makrolidům (*ereA*), polypeptidovým antibiotikům (*mcr1*), sulfonamidům (*sul1*) a tetracyklinům (*tetA*, *tetM*) prezentuje níže přiložená Tabulka 13. Jestliže byl gen přítomen ve vzorku, označil se znaménkem (+). Naopak, když se nevyskytoval, označil se daný gen znaménkem (–).

Tabulka 13 Výskyt ARG ve vzorcích drůbežího masa

Vzorek	Skupiny antibiotik						Geny asociované s rezistencí		
	Amfenikoly		β -laktamová	Makrolidy	Polypeptidy	Sulfonamidy	Tetracykliny		
	<i>floR</i>	<i>catA1</i>	<i>bla_{OXA-7}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>ereA</i>	<i>mcr1</i>	<i>sul1</i>	<i>tetA</i>	<i>tetM</i>
	Kuřecí maso								
K1	+	+	+	+	–	+	+	+	+
K2	+	+	+	+	–	+	+	+	+
K3	–	+	–	+	–	–	+	+	+
K4	–	–	+	+	–	–	+	+	+
K5	–	–	+	+	–	–	+	+	+
K6	–	–	+	+	–	–	+	+	+

K7	+	+	+	+	+	+	+	-	+
K8	+	+	+	+	-	+	+	-	+
K9	+	+	+	+	-	-	+	+	+
K10	-	+	+	+	+	-	+	+	+
K11	-	+	+	+	-	-	+	+	+
K12	-	+	+	+	-	-	+	+	+
K13	+	+	+	+	+	-	+	+	+
K14	+	+	+	+	+	-	+	+	+
K15	+	+	+	+	+	-	+	+	+
K17	+	+	+	+	-	-	+	+	+
K18	+	+	+	+	-	-	+	+	+
K19	+	+	+	+	-	-	+	+	+
celkem	11	15	18	19	5	4	19	16	19
celkem za skupinu	15		19		5	4	19	19	
Krůtí maso									
R16	+	+	+	+	-	-	+	+	+

Výskyt ARG byl pozorován u celkem 6 skupin antibiotik. U vzorků byly sledovány jeden nebo dva geny z každé sledované skupiny a to následovně: dva geny byly pozorovány u amfenikolů (*floR*, *catA1*), β -laktamových antibiotik (*bla_{OXA-7}*, *bla_{TEM}*) a tetracyklinů (*tetA*, *tetM*). Jestliže obsahoval vzorek oba geny rezistence, bylo provedeno jeho označení znaménky (+ +). Když neobsahoval ani jeden ze zkoumaných genů, označil se znaménky (- -). Jestliže vzorek nesl jeden gen a druhý postrádal, byl označen znaménky (+ -) nebo (- +) v závislosti na jejich pořadí v Tabulce 13. U makrolidů (*ereA*), polypeptidů (*mcr1*) a sulfonamidů (*sul1*) se určoval pouze jeden gen. U těchto skupin antibiotik byla značena přítomnost (+) nebo nepřítomnost (-) sledovaného genu rezistence.

Nejdříve byla pozornost zaměřena na celkový počet přítomných genů rezistence. Geny byly seřazeny od těch s nejvyšší až po ty s nejnižší prevalencí (četnosti uvedené v závorce, z celkového počtu vzorků 19) - u skupin antibiotik, kde byly sledovány dva geny: *bla_{TEM}* (n=19), *tet(M)* (n=19), *bla_{OXA-7}* (n=18); *tet(A)* (n=17), *catA1* (n=16) a *floR* (n=12); u antibiotik s jedním sledovaným genem: *sul1* (n=19), *ereA* (n=5) a *mcr1* (n=4). Výsledky jsou srovnatelné s údaji ve studii [160], která zkoumala prevalenci genů rezistence

na antibiotika skrze modelový mikroorganismus *Escherichia coli*, který byl izolován z kuřecího masa. Rahman a spol. zjistili, že nejvyšší prevalence rezistentních genů byla vůči tetracyklinům v podobě *tet(A)* a sulfonamidům v podobě *sulI* [160].

Geny rezistence k sulfonamidům byly detekovány ve všech 19 vzorcích, geny tetracyklinové rezistence byly nalezeny také u všech 19 vzorků. U dvou vzorků (K7, K8) byl přítomen jenom jeden gen *tet(M)*. Betalaktamové geny rezistence se vyskytovaly ve všech 19 vzorcích, z čehož ve vzorku K3 byl přítomen jenom gen *bla_{TEM}*. Výsledné rezistenční geny na amfenikoly byly přítomny v 16 z 19 vzorků. Pozitivní detekce obou genů rezistence (*floR*, *catA1*) byla ve 12 vzorcích, u zbylých čtyřech (K3, K10, K11 a K12) byl detekován pouze gen *catA1*. Makrolidová rezistence spadá spolu s polypeptidobou do méně se vyskytujících. Geny kódující rezistenci na makrolidy byly přítomny v 5 z 19 vzorků. Pozitivní nález vykazovaly vzorky K7, K10, K13, K14 a K15. Podobný trend byl pozorován u genů spojených s rezistencí vůči polypeptidovým antibiotikům. Pozitivní detekce byla ze všech nejnižší, a to pouze ve 4 z 19 vzorků. Pozitivními vzorky byly K1, K2, K7 a K8.

U jednotlivých vzorků se vyskytly vzorce stejných profilů v rozložení jednotlivých genů, které určovaly genotypovou přítomnost/ nepřítomnost rezistence v rámci všech antibiotických skupin. Větší počet vzorků, který vykazoval stejný genový profil, byl rozdělen do pěti skupin (I-V). Zbylé čtyři vzorky K3, K7, K8 a K10, měly unikátní profily v rozložení ARG (Tabulka 15) a nebyly zahrnuty do žádné skupiny.

Nejpočetnější skupina I, která obsahuje vzorky K9, K17, K18, K19 a R16, měla genotypovou rezistenci vůči amfenikolům (+ +), tetracyklinům (+ +), karbapenemům (+ +), sulfonamidům (+). Negativní rezistenci měla na makrolidy (-) a polypeptidová antibiotika (-). Druhá nejpočetnější skupina II obsahuje vzorky K13, K14, K15. Je rezistentní vůči amfenikolům (+ +), tetracyklinům (+ +), karbapenemům (+ +), sulfonamidům (+) a makrolidům (+). Negativní rezistenci má jenom vůči polypeptidovým antibiotikům (-). Druhá skupina se liší v její rezistenci na makrolidy, jinak má identické rozložení genů jako skupina I. Skupina III, která zahrnuje vzorky K4, K5 a K6, vykazuje rezistenci na tetracykliny (+ +), karbapenemy (+ +) a sulfonamidy (+). Postrádá rezistenci na amfenikoly (- -), makrolidy (-) a polypeptidová antibiotika (-). Skupina IV obsahuje profily dvou vzorků – K11 a K12. Vykazuje rezistenci na amfenikoly (- +), tetracykliny (+ +), karbapenemy (+ +) a sulfonamidy (+). Nedisponuje rezistencí vůči makrolidům (-) a polypeptidovým antibiotikům (-). Poslední skupina V má také jenom dva

zástupce – K1 a K2. Tyto dva vzorky byly rezistentní na všechny antibiotické skupiny (+ +), kromě makrolidů (-).

Tabulka 14 Výskyt genotypové rezistence v rámci jednotlivých skupin/ vzorků

Skupina nebo vzorek	Skupina antibiotik					
	Amfenikoly	β -laktamová	Makrolidy	Polypeptidy	Sulfonamidy	Tetracykliny
I (n=5)	+	+	-	-	+	+
IV (n=2)	+	+	-	-	+	+
K3	+	+	-	-	+	+
II (n=3)	+	+	+	-	+	+
K10	+	+	+	-	+	+
V (n=2)	+	+	-	+	+	+
K8	+	+	-	+	+	+
III (n=3)	-	+	-	-	+	+
K7	+	+	+	+	+	+

Napříč rozdílným rozložením genů rezistence, skupiny I, IV a vzorek K3 sdílely stejný profil genotypových rezistencí na určité skupiny antibiotik. Byly jimi amfenikoly, tetracykliny, β -laktamová antibiotika a sulfonamidy. Nedisponují však rezistencí na makrolidy a polypeptidová antibiotika. U skupiny II a vzorku K10 je přítomna rezistence u všech antibiotik kromě polypeptidových, kdežto u skupiny V a vzorku K8 není pouze u makrolidů. Samostatná skupina III se vyznačuje rezistencí na tetracykliny, β -laktamová antibiotika a sulfonamidy. Není rezistentní na amfenikoly, makrolidy a polypeptidová antibiotika. Jedná se o jedinou skupinu, kde není rezistence na amfenikoly a vykazuje rezistenci pouze na polovinu antibiotických skupin. Naopak vzorek K7 je ojedinělý, protože je rezistentní na všechny skupiny antibiotik.

Tabulka 15 Celkový počet pozitivních ARG a rezistentních vzorků

V Tabulce 15 jsou uvedeny souhrnné výsledky prevalence všech devíti sledovaných genů v rámci kuřecího a krůtího masa. V posledním sloupci jsou počty vzorků, které vykazovaly díky přítomnosti genů rezistenci.

Skupina antibiotik	Gen	Typ vzorku [počet vzorků]		
		Kuřecí (n=18)	Krůtí (n=1)	Kuřecí + krůtí (n=19)
		Četnost výskytu ARG		Počet rezistentních vzorků
Sulfonamidy	<i>sulI</i>	18	1	19
β-laktamová	<i>bla_{TEM}</i>	18	1	19
	<i>bla_{OXA-7}</i>	17	1	
Tetracykliny	<i>tet(M)</i>	18	1	19
	<i>tet(A)</i>	16	1	
Amfenikoly	<i>catA1</i>	15	1	16
	<i>floR</i>	11	1	
Makrolidy	<i>ereA</i>	5	0	5
Polypeptidy	<i>mcrI</i>	4	0	4

Podle Gelbíčové a spol. mají *Enterobacteriaceae*, izolované z kuřecího masa a jater, menší četnost výskytu genů *mcr1* až *mcr5* [63]. Naše práce potvrzuje toto zjištění, jelikož byla detekce pozitivní pouze ve 4 případech z 18 vzorků kuřecího masa (viz. Tabulka 15). Naopak u krůtího masa a jater studie tvrdí až 21% výskyt *mcr1* při screeningu celkové DNA v rámci různých zemí EU. V této bakalářské práci byl testován pouze jeden vzorek krůtího masa, který byl na detekci *mcr-1* genu negativní a nelze tedy vytvářet předběžné závěry o daném výsledku. Další studie dokonce uvádí, že byl gen *mcr10* identifikován jak v lidském, tak kuřecím střevním mikrobiomu [89]. Dochází k tomu nepřímou cestou, kdy je

konzumována potravina přechovávající bakterie nesoucí *mcr10* gen, nebo přímou cestou prostřednictvím kontaktu se zvířaty [85]. Většinou se nachází u pracovníků farem. Jediné pozitivní vzorky K1, K2, K7 a K8 mohou obsahovat bakterie s mechanismem zodpovědný za snížení afinity polymyxinu E vůči lipidu A – především *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, patogenní *Salmonella enteritica* nebo *Pseudomonas aeruginosa* [55; 58; 59]. Rezistence na polypeptidová antibiotika v chlazeném nebaleném kuřecím masu není detekována ve vysoké míře, což je způsobeno zákazem užívání kolistinu jako stimulantu růstu ve zvířecích krmivech. Zákaz byl uveden v platnost 1. 1. 2006 Nařízením Evropského parlamentu a rady (ES) č. 1831/2003. Jiné doplňky než kokcidiostatika a histomonostatika byly vymazány z registru [161].

Ve studii podle Garofalo a spol. byla zjištěna přítomnost genů *tet(M)*, z celkové DNA drůbežního masa, v počtu 11 z 28 testovaných vzorků [162]. V porovnání s touto prací je patrné, že se gen *tet(M)* často a ve velké míře vyskytuje v drůbežím masu. I když nejčastější výskyt v rámci gramnegativních bakterií má gen *tetB*, v celkem 20 rodech, u genu *tet(M)* byla prokázána větší variabilita v rámci gramnegativních i grampozitivních bakterií. Celkově se gen *tet(M)* vyskytoval u 26 rodů [47]. Co se týče genu *tet(A)*, studie v Tunisku prokázala jeho nálezy ve 176 z 195 vzorků DNA z kloakálních výtěrů brojlerových kuřat. Z té samé studie byl gen *tet(M)* přítomen ve 192 vzorcích [53]. Z toho vyplývá, že mikrobiota obývající povrchy živé drůbeže, obsahuje *tet* geny, které mohou být přenášeny na bakterie vyskytující se ve střevech zvířete a způsobit tím jejich výskyt ve finálním živočišném produktu – drůbežím masu.

V rámci genů *bla_{OXA-7}* a *bla_{TEM}* nebyl v současné práci pozorován překvapivý výsledek. Všechny 19 vzorků drůbeže obsahovaly geny rezistence na β-laktamová antibiotika. Vysoká míra výskytu rezistence je v souladu s výsledky filipínské studie z roku 2019, kdy z 69 ESBL izolátů *E. coli* byl detekován gen *bla_{TEM}* v 58 % [163]. Izoláty pocházely z výtěru kloak brojlerů a návleků na boty zaměstnanců. Vysoká četnost *bla_{TEM}* se dá srovnat s dalšími studii podle Seo a spol., kde byl *bla_{TEM}* detekován v 55 % z celkových 59 betalaktamáza produkujících *E. coli* izolovaných z kuřecího masa brojlerů [164]. Výskyt *bla_{TEM}* a *bla_{OXA-7}* je celosvětově vysoký a představují klinicky relevantní ARG [89]. Ve vzorcích drůbežního masa byl dříve prokázán výskyt ESBL *E. coli* nebo bakterií rezistentních vůči karbapenemům – *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* a *Enterobacter cloacae* [13; 17]. Tyto bakterie disponují mechanismy horizontálního přenosu genů a mohou je šířit mezi přítomnou mikrobiotou.

Rahman a spol. zjistili, že v izolátech *E. coli* z povrchových stěrů kuřecího masa, byla prevalence genu *ereA* 31,23 % [160]. Ze současné studie vyplývá, že gen *ereA* nebyl v tak vysokém zastoupení, jak uvádí Rahman a spol. Je to způsobeno rozdílnou maticí, kdy v bakalářské práci byly geny detekovány z celogenomové DNA drůbežího masa, nikoliv z DNA jednotlivých izolátů *E. coli*. Gen *ereA* se nevyskytuje tak často v celogenomové DNA kuřecího masa, naopak spíše v patogenních izolátech rodů – *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus* a *Campylobacter* [165]. Častější výskyt u celogenomové DNA z drůbežího masa sledujeme u genu *ermB*. Studie podle Garofalo a spol. uvádí jeho výskyt v 11 z 21 vzorků drůbežího masa [162]. Gen *ermB* je asociován s rezistencí na makrolid-linkosamid-streptogramin B [166].

Podle Wang a spol. je nejrozšířenějším genem rezistence v rámci mikrobioty kuřecího střeva *sulI* spolu s geny *bla_{TEM}* a *tet(O)* [89]. V bakalářské práci je gen *sulI* přítomen v nejvyšším počtu u všech vzorků kuřecího a krůtího masa. Gen *sulI* se pravidelně vyskytuje v rámci plazmidů u bakterií – *Enterobacter hormaechei*, *Enterobacter cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Klebsiella quasipneumoniae* a *Serratia marcescens* [89]. Vysoký počet genů *sulI* v celkové DNA drůbežího masa není neobvyklý. Gen *sulI* je často spojován také s výskytem u *E. coli* izolovaných z drůbežího masa. Rahman a spol. detekovali gen *sulI* v 44,16 % z 381 *E. coli* izolovaných z masa brojlerů a nosnic [160].

Studie od Li a spol. zjistila že nejvíce hojným genem v mase připraveného pro přímou spotřebu byl *catA1* [96]. Dále byl gen *catA1* identifikován v celkové DNA získané z 11 vzorků prostředí u 4 z 6 brojlerových hejn [131]. Je zajímavé, že v soudobé práci pozorujeme poměrně vysoký výskyt genu *catA1*, i když používání chloramfenikolu je u zvířat od roku 1994 v EU zakázáno. Studie tvrdí, že vyšší výskyt genů *catA1* je způsobeno jeho pravděpodobnou návazností na plazmid, který nese ještě jiné geny [131]. Co se týká genu *floR*, jeho detekce byla pozitivní u bakterií izolovaných z rozvodů pitné vody, kdy byl přítomný v 11 z 30 izolátů. Nejčastěji se vyskytoval u rodu *Proteus* (72,7 %), který může tvořit součást mikrobioty drůbežího masa jako např. *Proteus mirabilis*, který se vyskytuje u infikované drůbeže, masa a vejcí [167; 168]. Prostedí, v jakém zvířata žijí, představuje důležitý faktor. Dochází k neustálému přenosu těchto genů mezi bakteriemi skrze biologické složky (krev, moč, sliny, výkaly), ale i vodu a vzduch [85]. Proto je důležité zavádět a dodržovat stanovené hygienické podmínky a snažit se zamezit vzniku větším selekčním tlakům.

5.2 Identifikace a charakterizace bakteriálních izolátů

Izolace bakteriálních kmenů byla provedena u vzorků K1, K2 a K3. Z těchto tří vzorků, pomocí selektivního kultivačního média VRBL, bylo získáno celkem 12 izolátů, které byly dále charakterizovány a identifikovány buď metodami fenotypovými či genotypovými.

Pomocí Gramova barvení byla potvrzena gramnegativní buněčná stěna. Pod mikroskopem byly pozorovány světle růžové až červené tyčinky, kokotyčinky, samostatně nebo v typických shlucích – palisádách. Pouze u kmene K1B byla navíc pozorována přítomnost pouzder. Na základě testů na cytochromoxidázu a katalázu byly kmeny rozděleny do dvou skupin: 1) KAT+/OXI- 2) KAT+/OXI+. Do první skupiny spadalo 7 kmenů, které byly následně testovány na mikrotestu Enterotest 24N, do druhé skupiny pak náleželo 5 kmenů, které byly poslány na sekvenaci genu pro 16S rRNA.

Fenotypová a genotypová identifikace odhalila rodovou variabilitu bakterií vyskytujících se v chlazeném kuřecím mase. Enterotest 24N identifikoval 3 rody – *Hafnia*, *Kluyvera* a *Serratia*. Každý z rodů měl odlišné druhové zastoupení s tím, že *Serratia* měla celkem tři zástupce – *S. fonticola* (2x), *S. grimesii* a *S. marcescens*. Rod *Hafnia* měl pouze jednoho zástupce – *Hafnia alvei* (2x) stejně tak jako rod *Kluyvera* – *Kluyvera intermedia*. Byla zvolena určitá kritéria, které musely všechny identifikované izoláty splnit. Všech 7 KAT+/OXI- izolátů zvolená kritéria splnila s tím, že kmeny vykazovaly alespoň 80 % identifikační skóre a T-index 0,75. Kdyby nesplnily zmíněné parametry, byly by poslány na sekvenaci genu pro 16S rRNA spolu s ostatními KAT+/OXI+ izoláty. Podrobnější přehled nabízí Tabulka 16.

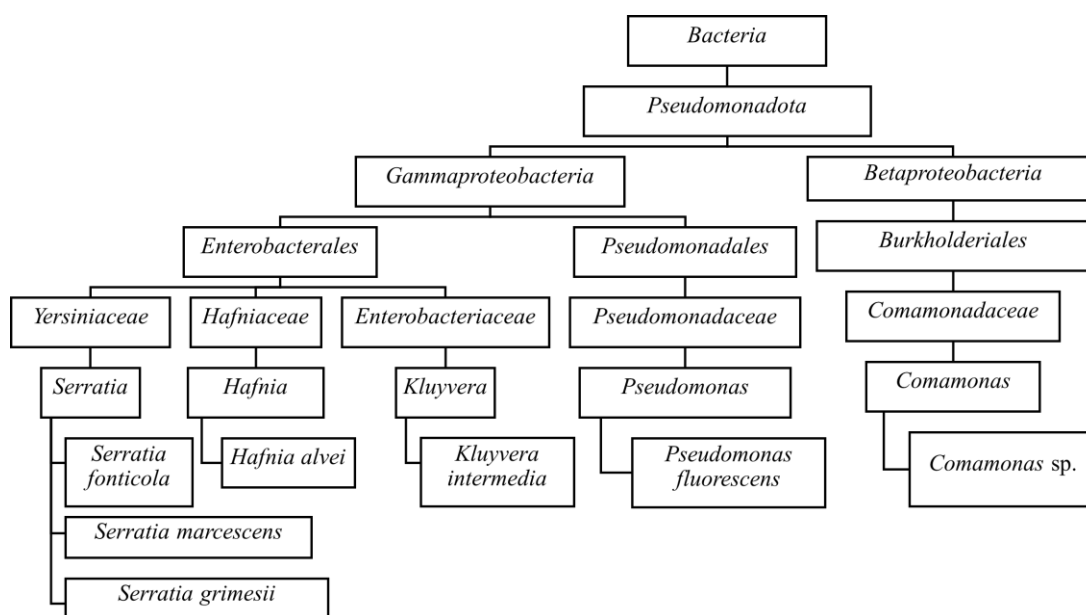
Druhá skupina KAT+/OXI+ nepatří do čeledi *Enterobacteriaceae*, tudíž nejsou vhodné pro identifikaci pomocí Enterotestu 24N. Z těchto 5 kmenů byla izolována DNA, dále byl amplifikován úsek genu pro 16S rRNA, po jehož sekvenaci byla provedena identifikace pomocí nástroje BLAST a porovnání s NCBI databází.

Sekvenování identifikovalo 2 rody – *Comamonas* a *Pseudomonas*. Z rodu *Comamonas* byla zjištěna pouze jedna druhová identifikace – *Comamonas terrigena*. Zbylé 3 izoláty bakterií ze vzorků K1, K2 a K3 bylo možné zařadit pouze do rodu. Jediný identifikovaný druh z rodu *Pseudomonas* byla bakterie *Pseudomonas fluorescens*.

Tabulka 16 Seznam identifikovaných kmenů

Vzorek	ENTEROtest 24 N	16S rRNA
K1A	x	<i>Comamonas</i> sp.
K3C	x	<i>Comamonas</i> sp.
K3D	x	<i>Comamonas</i> sp.
K2A	x	<i>Comamonas terrigena</i>
K1D	<i>Hafnia alvei</i>	x
K2D	<i>Hafnia alvei</i>	x
K2B	<i>Kluyvera intermedia</i>	x
K1B	x	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
K1C	<i>Serratia fonticola</i>	x
K2C	<i>Serratia fonticola</i>	x
K2E	<i>Serratia grimesii</i>	x
K3E	<i>Serratia marcescens</i>	x

Celkem bylo identifikováno 12 izolátů, které patřily do pěti rodů: *Comamonas*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Pseudomonas* a *Serratia*. Bakterie *Hafnia alvei*, *Kluyvera intermedia*, *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii* a *Serratia marcescens* spadají do řádu *Enterobacterales*. *Pseudomonas fluorescens* je řazena do řádu *Pseudomonadales* a *Comamonas* spp. do řádu *Burkholderiales* (viz. Obrázek 3).



Obrázek 3 Postavení identifikovaných bakterií v nomenklatuře

V případě bakterií vyskytujících se v kuřecím mase, převažovaly rody z řádu *Enterobacterales*, především *Serratia* a *Hafnia*. Studie podle Ridell a spol., kdy *Hafnia alvei* tvořila 50 % izolovaných střevních bakterií z chlazeného mletého masa, potvrzuje přítomnost bakterií rodu *Hafnia* v potravinách živočišného původu [169]. V další publikaci se vyskytovaly *Hafnia alvei* a *Hafnia paraalvei* ve 40 % izolovaných střevních bakterií z drůbežního masa baleného v ochranné atmosféře [170]. Lze tedy předpokládat, že *Hafnia alvei* je běžnou součástí mikrobioty drůbežního masa. Dále se ve větším počtu vyskytovaly bakterie rodu *Serratia*. Studie podle Säde a spol. zjistila výskyt *Serratia fonticola*, *Serratia grimesii*, *Serratia liquefaciens* a *Serratia proteamaculans* v drůbežím baleném a nebaleném mase ve vysokých počtech – 42 % z celkových izolovaných *Enterobacteriaceae* [170]. Všeobecně jsou *Serratia* spp. široce rozšířeny v přírodě, vodě i ptačím trusu [117; 116]. Bakterie rodu *Pseudomonas* nejsou výjimkou a jejich přítomnost je v drůbežím mase běžná, jelikož patří mezi hlavní příčiny kažení potravin. Stejně tak běžnými mikroorganismy jsou bakterie z čeledí *Enterobacteriaceae* a *Yersiniaceae* [91; 97].

Pro rozšířenější charakteristiku bylo všech 12 již identifikovaných kmenů (viz. Tabulka 16) testováno na výskyt rezistence ke specifickým antibiotickým látkám (Tabulka 8). Diskový difuzní test se vyhodnocoval z průměrů inhibičních zón a jejich porovnáním s limity uvedenými v dokumentu European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) [171]. Výsledné průměry inhibičních zón byly uvedeny v Příloze P I.

Průměr inhibiční zóny je přímo úměrný citlivosti k antibiotiku. Naopak přítomnost bakteriálního růstu či malá zóna inhibice poukazuje na rezistenci bakterie pro dané antibiotikum difundujícího z disku. Tabulka 17 uvádí, jestli jsou bakterie rezistentní (R), intermediární (I) nebo citlivé (S) na použité antibiotické látky (viz. Tabulka 8).

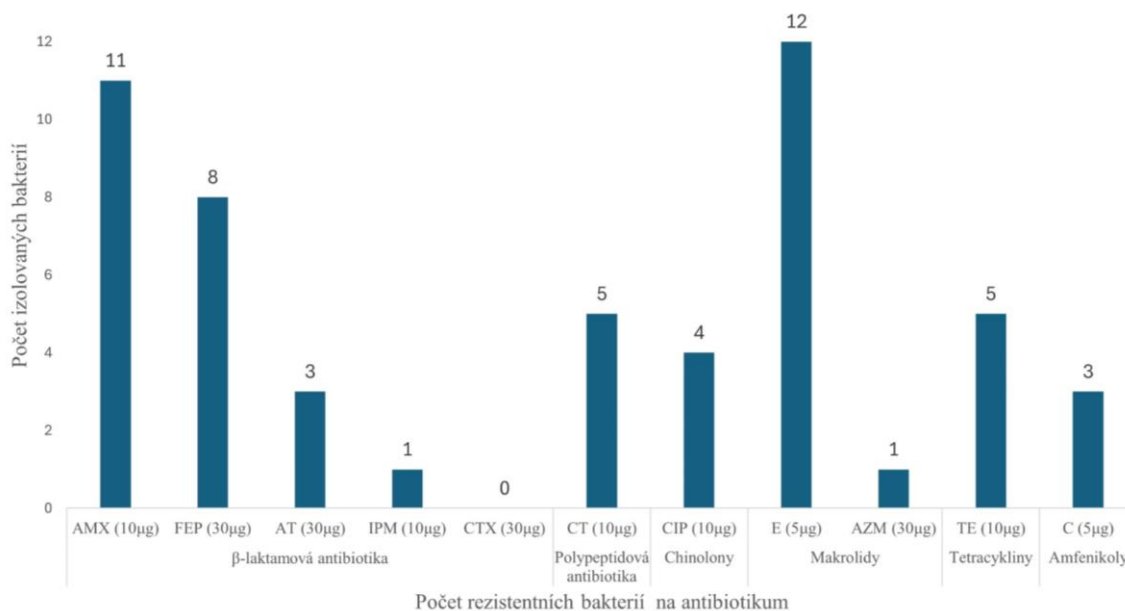
Tabulka 17 Určení rezistentních, intermediárních a citlivých bakterií

Dokument EUCAST neposkytuje limity pro streptomycin (HLS). Jeho inhibiční zóny jsou uvedeny v Příloze P. I.

Izolované kmeny	β-laktamy					Polypeptidová	Chinolony	Makrolidy		Tetracykliny	Amfenikoly	Aminoglykosidy
	IPM	FEP	AT	CTX	AMX			E	AZM			
<i>Hafnia aleveli</i> 1D	I	I	I	S	R	R	S	R	S	S	S	*
<i>Hafnia alvei</i> 2D	S	R	I	S	R	R	S	R	S	S	S	*
<i>Kluyvera intermedia</i>	I	R	I	S	R	I	S	R	S	R	S	*
<i>Serratia fonticola</i> 1C	I	R	S	S	R	I	S	R	S	S	S	*
<i>Serratia fonticola</i> 2C	I	I	I	S	R	I	R	R	R	S	R	*
<i>Serratia grimesii</i>	I	R	R	S	R	S	S	R	S	R	S	*
<i>Serratia marcescens</i>	I	R	S	S	I	R	S	R	S	R	S	*
<i>Comamonas</i> sp. 1A	I	R	R	I	R	R	R	R	I	I	S	*
<i>Comamonas</i> sp. 3C	I	I	R	I	R	S	R	R	S	S	S	*
<i>Comamonas</i> sp. 3D	R	I	I	I	R	R	R	R	S	R	R	*
<i>Comamonas terrigena</i>	I	R	I	I	R	S	I	R	S	S	S	*
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S	R	I	I	R	I	I	R	S	R	R	*

Porovnáním inhibičních zón s limity, které byly uvedeny v dokumentu EUCAST, se zjistilo, že nejvíce bakterií bylo rezistentní na erytromycin (n=12), dále na amoxicilin (n=11), cefepim (n=8), kolistin (n=5) a tetracyklin (n=5). Nejméně rezistentních bakterií bylo

na ciprofloxacin (n=4), chloramfenikol (n=3), aztreonam (n=3) a azitromycin (n=1). Bakterie nevykazovaly rezistenci vůči jedinému β -laktamovému antibiotiku – cefotaximu (viz. Obrázek 4).



Obrázek 4 Četnost výskytu antibiotické rezistence u izolovaných bakterií

U některých bakterií byla pozorována multirezistence. Třískupinovou multirezistenci vykazovalo celkem 5/12 testovaných bakterií (*Serratia grimesii*, *Hafnia alvei* 2D, *Kluyvera intermedia*, *Comamonas* sp. 3C, *Hafnia alvei* 1D). Čtyřskupinovou multirezistenci mělo 4/12 testovaných bakterií (*Comamonas* sp. 1D, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia fonticola* 2C, *Serratia marcescens*) a dvouskupinovou rezistenci měly 2/12 bakterií (*Serratia fonticola* 1C, *Comamonas terrigena*). Pouze *Comamonas* sp. 3D měla multirezistenci na šest skupin antibiotik.

Z antibiotických skupin, u kterých se testovaly bakterie na více antimikrobiálních látek, byly pozorovány určité vzorce. U β -laktamových antibiotik měly bakteriální izoláty nejčastěji rezistenci na amoxicilin (n=11), poté na cefepim (n=8), aztreonam (n=3), imipenem (n=1). Na amoxicilin byly všechny kmeny rezistentní až na *S. marcescens*. U imipenemu byla rezistence zjištěna pouze u *Comamonas* sp. 3D. Na aztreonam byly rezistentní 3/12 kmenů – *S. grimesii*, *Comamonas* sp. 1A a *Comamonas* sp. 3C. U makrolidů vykazovaly izoláty větší rezistenci vůči erytromycinu (n=12), než azitromycinu (n=1), kdy azitromycinovou rezistenci měla jenom *Serratia fonticola* 2C.

V rámci třískupinové multirezistence byly všechny bakterie rezistentní na β -laktamová antibiotika a makrolidy. Poslední třetí antibiotická skupina byla u jednotlivých kmenů variabilní. *Serratia grimesii* a *Kluyvera intermedia* měly rezistenci na tetracykliny, oba izoláty *Hafnia alvei* měly rezistenci na polypeptidová antibiotika a *Comamonas* sp. 3C byla rezistentní na chinolony. U čtyřskupinové multirezistence byly všechny bakterie také vždy rezistentní na β -laktamová antibiotika a makrolidy. Zbylé dvě antibiotické skupiny byly variabilní v rámci jednotlivých kmenů, kdy *Comamonas* sp. 1A byla rezistentní na polypeptidy a chinolony. *Pseudomonas fluorescens* byla rezistentní na amfenikoly a tetracykliny. *Serratia fonticola* 2C měla rezistenci na chinolony a amfenikoly. *Serratia marcescens* na polypeptidy a tetracykliny. *Serratia fonticola* 1C a *Comamonas terrigena* s dvouskupinovou rezistencí byly pokaždé rezistentní na β -laktamová antibiotika a makrolidy.

Testování prostřednictvím Kirby-Bauer metody zjistilo, že všechny izoláty byly rezistentní na β -laktamová antibiotika a makrolidy. Deset kmenů bylo multirezistentních, z čehož *Serratia grimesii*, *Hafnia alvei* 2D, *Kluyvera intermedia*, *Comamonas* sp. 3C, *Hafnia alvei* 1D měly multirezistenci na 3 odlišné skupiny antibiotik a *Comamonas* sp. 1A, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia fonticola* 2C, *Serratia marcescens* vykazovaly multirezistenci na 4 různé skupiny antibiotik. *Serratia fonticola* 1C a *Comamonas terrigena* byly rezistentní na 2 skupiny antibiotik. Jediná *Comamonas* sp. 3D vykazovala multirezistenci na 6 různých antibiotických skupin.

Kmeny *Serratia* spp. byly ze 75 % rezistentní na cefepim a amoxicilin. Ze 100 % byly rezistentní na erytromycin. Jediná *Serratia grimesii* byla rezistentní na aztreonam, kdy podobnou rezistenci vykazovala i *Serratia fonticola* 1C, jenomže na chloramfenikol. *Serratia grimesii* a *Serratia marcescens* byly rezistentní na tetracyklin. Oba izoláty *Hafnia alvei* byly rezistentní na amoxicilin, erytromycin a kolistin. Pouze *Hafnia alvei* 2D měla rezistenci na cefepim. *Kluyvera intermedia* vykazovala rezistenci na cefepim, amoxicilin, erytromycin a tetracyklin. *Pseudomonas fluorescens* byla rezistentní na cefepim, amoxicilin, erytromycin, tetracyklin a chloramfenikol. *Comamonas* spp. byly ze 100 % rezistentní na amoxicilin a erytromycin. Ze 75 % pak na ciprofloxacin. *Comamonas* sp. 1A a 3C byly rezistentní na aztreonam a *Comamonas* sp. 1A spolu s 3D zase na kolistin. *Comamonas terrigena* a *Comamonas* sp. 1A byly rezistentní na cefepim. Jediná *Comamonas* sp. 3D byla rezistentní na imipenem, tetracyklin a chloramfenikol.

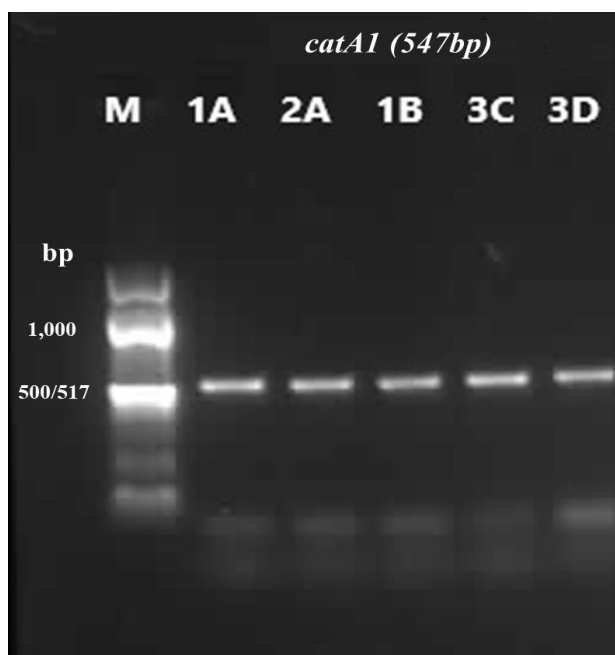
Studie podle Jayol a spol. uvádí, že *Hafnia* spp. (*Hafnia alvei*, *Hafnia paraalvei*) jsou přirozeně rezistentní na kolistin, což se v naší studii potvrzuje, jelikož oba izoláty *Hafnia alvei* byly rezistentní [172]. *Kluyvera intermedia* se vyskytuje jako koliform v rámci dominantní bakteriální komunity v ošetřené splaškové vodě. Studie podle Shekhawat a spol. uvádí, že *Kluyvera intermedia* byla citlivá na cefepim, imipenem, ciprofloxacin a kolistin [173]. V naší studii byla *Kluyvera intermedia* na cefepim rezistentní a imipenem intermediární, jinak se s ostatními výsledky shoduje. Příčinou mohou být odlišné vzorky, ze kterých byly bakterie izolovány. Bakterie rodu *Serratia*, především *Serratia marcescens*, jsou rezistentní na velkou řadu antibiotik – peniciliny, cefalosporiny, tetracykliny. Postupně se stávají rezistentní i na karbapenemy a třetí generaci cefalosporinů [3; 114]. Na imipenem, patřící do karbapenemů, byly všechny *Serratia* spp. intermediární a rezistenci vykazovaly na peniciliny (amoxicilin), makrolidy (erytromycin) a cefalosporiny IV. generace (cefepim). Ve studii podle Thomassen a spol. byla *Pseudomonas fluorescens*, izolována ze zpracovatelského prostředí lososů a jejich různých naporcovaných částí, ve většině případů rezistentní vůči cefotaximu, ampicilinu a imipenemu [174]. *Pseudomonas fluorescens*, která byla testována v bakalářské práci, se získala z kuřecího masa. Tato pseudomonáda měla stejnou rezistenci na cefotaxim, ale na imipenem byla citlivá. U rodu *Comamonas* dosud nebyly provedeny rozsáhlejší studie a testování na působnost antibiotických látek.

Na přítomnost genů souvisejících s rezistencí na amfenikoly (*floR*, *catA1*), β -laktamová antibiotika (*bla_{OXA-7}*, *bla_{TEM}*), makrolidy (*ereA*), polypeptidy (*mcr1*), sulfonamidy (*sul1*) a tetracykliny (*tet(A)*, *tet(M)*), bylo testováno pět identifikovaných bakterií – *Comamonas* sp. 1A, *Comamonas* sp. 3C, *Comamonas* sp. 3D, *Comamonas terrigena*, *Pseudomonas fluorescens*, které se nezařazují mezi běžné šířitele rezistence vyjma *Pseudomonas fluorescens* [126].

Tabulka 18 Výskyt ARG v bakteriálních izolátech kuřecího masa

kmen	Amfenikoly		β-laktamová		Makrolidy	Polypeptidy	Sulfonamidy	Tetracykliny	
	<i>floR</i>	<i>catA1</i>	<i>bla_{OXA-7}</i>	<i>bla_{TEM}</i>	<i>ereA</i>	<i>mcr1</i>	<i>sul1</i>	<i>tet(A)</i>	<i>tet(M)</i>
<i>Comamonas</i> sp. 1A	–	+	–	–	–	–	+	–	–
<i>Comamonas</i> sp. 3C	–	+	–	–	–	–	–	–	–
<i>Comamonas</i> sp. 3D	–	+	+	–	–	–	+	–	–
<i>Comamonas terrigena</i>	–	+	–	–	–	–	+	+	–
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	–	+	–	–	–	–	–	–	+

V Tabulce 18 *Comamonas* sp. 1A obsahuje geny *catA1* a *sul1*. *Comamonas* sp. 3C byla pozitivní na detekci *catA1* a *Comamonas* sp. 3D na geny *catA1*, *bla_{OXA-7}* a *sul1*. Druhový zástupce *Comamonas terrigena*, izolovaný ze vzorku K2, byl pozitivní na geny *catA1*, *sul1* a *tet(A)*. A v poslední řadě *Pseudomonas fluorescens* izolována ze vzorku K1, byla pozitivní na geny *catA1* a *tet(M)*.

Obrázek 5 Detekce genu *catA1* u izolovaných bakteriálních kmenů

Všechny nefermentující bakterie vykazovaly rezistenci na gen *catA1* (n= 5) (viz. Obrázek 5). Druhým nejčastějším genem byl *sul1* (n=3). Následují pak geny *bla_{OXA-7}* (n=1), *tet(A)* (n=1) a *tet(M)* (n=1). Všechny bakterie byly negativní na výskyt *floR*, *bla_{TEM}*, *ereA* a *mcr1* genů.

U *Comamonas kerstersii* byly z dřívějších studií identifikovány geny *tet(A)* a *sul1* [126]. V současné práci byly u *Comamonas terrigena* detekovány stejné geny, což nejspíš souvisí s tím, že *Comamonas kerstersii* je podskupinu *Comamonas terrigena* [175]. U *Pseudomonas protegens* (patřící do komplexu *P. fluorescens*) izolované z půdy, byl detekován gen *catA1*. Detekce genu *tet(M)* není u *Pseudomonas fluorescens* překvapivá, protože již první nálezy *tet* genů byly v rámci čeledě *Pseudomonadaceae* [47].

Bakterie *Comamonas* sp. 1A obsahuje geny *catA1*, *sul1* a zároveň bylo diskovou difuzní metodou zjištěna její rezistence na β -laktamová antibiotika (cefepim, aztreonam, amoxicilin), polypeptidová antibiotika (kolistin), chinolony (ciprofloxacin) a makrolidy (erytromycin). Přítomný gen *sul1* nemohl být porovnán s výsledky diskového difuzního testu, jelikož nebyl proveden pro sulfonamidové antibiotikum. *Comamonas* sp. 1A nebyla rezistentní na chloramfenikol, i když u ní byl *catA1* gen detekován. Je možné, že obsahuje jiné geny asociované s rezistencí na určité skupiny antibiotik. Dále *Comamonas* sp. 3C nese *catA1* a zároveň je rezistentní na β -laktamová antibiotika (aztreonam, amoxicilin), chinolony (ciprofloxacin) a makrolidy (erytromycin). Přítomný gen se opět neprojevil, jelikož byla bakterie na chloramfenikol citlivá. *Comamonas* sp. 3D nese nejvíce genů – *catA1*, *bla_{OXA-7}* a *sul1*. Disková difúzní metoda určila její rezistenci k β -laktamovým antibiotikům (imipenem, amoxicilin), polypeptidovým antibiotikům (kolistin), chinolonům (ciprofloxacin), makrolidům (erytromycin), tetracyklinům (tetracyklin) a amfenikolům (chloramfenikol). Geny *catA1* i *bla_{OXA-7}* mohou způsobovat rezistenci u *Comamonas* sp. 3D. I když *Comamonas* sp. 3D neobsahuje geny *floR*, *bla_{TEM}*, *ereA*, *mcr1*, *tet(A)* a *tet(M)*, může nést jiné, které způsobující rezistenci na dané třídy antibiotik.

U *Comamonas terrigena* byly detekovány geny *catA1*, *sul1* a *tet(A)*. Diskový difuzní test určil její rezistenci na β -laktamová antibiotika (cefepim, amoxicilin) a makrolidy. Opět byl pozorován *catA1* gen, který není fenotypově potvrzen přítomnou rezistencí na amfenikoly. Je běžné, že se geny nemusí projevit ve fenotypu. Mohou vznikat mutace a jejich rezistence je pak neúčinná a bakterie se jeví jako citlivé [176]. *Comamonas terrigena* vykazuje citlivost na chloramfenikol, i když nese *catA1* gen. Obdobně tomu tak je i u citlivosti na tetracyklin a zároveň přítomnému genu *tet(A)*.

Pseudomonas fluorescens obsahuje geny *catA1* a *tet(M)*. Fenotypově je rezistentní k β -laktamovým antibiotikům (cefepim, amoxicilin), makrolidům (erytromycin), tetracyklinům (tetracyklin) a amfenikolům (chloramfenikol). Zde je fenotypová a genotypová rezistence v souladu a lze konstatovat, že je tetracyklinová a amfenikolová rezistence způsobena přítomnými geny *tet(M)* a *catA1*. Shodují se v jak v genotypové rezistenci, tak fenotypové.

Přítomná fenotypová rezistence na makrolidy u většiny testovaných izolátů je pravděpodobně způsobena jinými *mcr* geny než sledovaným *mcr1*. To stejné platí pro ostatní přítomné fenotypové rezistence, které se neshodovaly v přítomnosti genu.

V porovnání rezistomu a genů přítomných v izolátech bylo zjištěno, že izolované bakterie obsahovaly nejvíce genů *catA1* a *sul1*, což odpovídá i rezistomu kuřecího masa. Shoda byla zaznamenána i u genů *floR*, *ereA* a *mcr1*, které u izolátů nebyly detekovány, a zároveň byly v rezistomu zastoupeny v nejnižším množství. Překvapivě geny *bla_{TEM}*, *bla_{OXA-7}*, *tet(A)* a *tet(M)* nejsou přítomny ve vysokých počtech jako v rezistomu, což s vysokou pravděpodobností znamená, že tyto geny jsou nesené bakteriemi jinými než z rodů *Comamonas* a *Pseudomonas*. Může se jednat o bakterie z čeledí *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae* a dalších, které jsou typické pro prostředí kuřecího masa.

ZÁVĚR

Práce byla zaměřena na detekci genů antibiotické rezistence u bakterií, které tvořily přítomnou mikrobiotu u 19 vzorků nebaleného chlazeného kuřecího (n=18) a krůtího (n=1) masa. Drůbeží maso je potenciálním rezervoárem MDR bakterií, které jsou zodpovědné za přenos genů i mezi patogenní bakterie a vznik rezistence u člověka nepřímou cestou přes potravinový řetězec. Ve studii bylo zkoumáno celkem 9 genů rezistence u 19 vzorků drůbežího masa. Největší prevalenci měly geny: *sull* (n=19), *bla_{TEM}* (n=19), *tet(M)* (n=19), *bla_{OXA-7}* (n=18), *tet(A)* (n=17), *catA1* (n=16), *floR* (n=12), *ereA* (n=5) a *mcr1* (n=4). Všechny 19 vzorků mělo rezistenci vůči sulfonamidům, β-laktamovým antibiotikům a tetracyklinům. Amfenikolová rezistence byla detekována u 16 vzorků. Nejnižší míra rezistentních genů byla u drůbežího masa prokázána vůči makrolidům s 5 pozitivními vzorky a polypeptidům se 4 vzorky. U všech 19 vzorků byla zjištěna rezistence vůči 3 a více skupinám antibiotik.

Dále bylo izolováno 12 bakterií ze tří vzorků kuřecího masa prostřednictvím selektivně diagnostické půdy VRBL. Identifikovaly se pomocí Enterotestu 24N a sekvenace pro 16S rRNA. Identifikované bakterie spadaly celkem do pěti rodů: *Comamonas*, *Hafnia*, *Kluyvera*, *Pseudomonas* a *Serratia*. Dále byly testovány na rezistenci vůči antibiotikům prostřednictvím diskové difuzní metody. Zjistilo se, že nejvíce bakterií bylo rezistentní na erytromycin (n=12), dále na amoxicilin (n=11), cefepim (n=8), kolistin (n=5) a tetracyklin (n=5). Nejméně rezistentních bakterií bylo na ciprofloxacin (n=4), chloramfenikol (n=3), aztreonam (n=3) a azitromycin (n=1). Ani jeden kmen nebyl rezistentní vůči cefotaximu. Deset kmenů bylo multirezistentních, z čehož 5/12 bakterií mělo multirezistenci na 3 odlišné skupiny antibiotik, 4/12 bakterií vykazovalo multirezistenci na 4 různé skupiny antibiotik a 2/12 bakterií bylo rezistentních jenom na 2 skupiny antibiotik. Pouze jedna bakterie z rodu *Comamonas* byla multirezistentní na 6 různých antibiotických skupin. A v poslední řadě bylo pět nefermentujících, kataláza a oxidáza pozitivních bakterií podrobena detekci na stejné geny rezistence jako u celkové DNA vyzolované z drůbežích vzorků. Čtyři bakterie byly z rodu *Comamonas* a jedna z rodu *Pseudomonas*. Všechny vykazovaly rezistenci na gen *catA1* (n=5). Druhým nejčastějším genem byl *sull* (n=3), po kterém následovaly geny *bla_{OXA-7}* (n=1), *tet(A)* (n=1) a *tet(M)* (n=1).

Porovnáním genotypové a fenotypové rezistence u různých druhů bakterií bylo zjištěno následující: U *Comamonas* sp. 1A gen *catA1* nezpůsobil rezistenci na chloramfenikol, ale může způsobit rezistenci na sulfonamidy díky přítomnosti genu *sull*. U *Comamonas* sp. 3C

se gen *catA1* neprojevil ve fenotypu, jelikož byla bakterie citlivá na chloramfenikol. U *Comamonas* sp. 3D se přítomnost genů *catA1* a *bla_{OXA-7}* shodovala s fenotypovou rezistencí na chloramfenikol, imipenem, amoxicilin a zároveň gen *sul1* může způsobovat fenotypovou rezistenci na sulfonamidy. Naopak u *Comamonas terrigena* přítomnost genů *catA1*, *sul1* a *tet(A)* nezpůsobila žádnou rezistenci ve fenotypu. U *Pseudomonas fluorescens* se projeví oba geny – *catA1* a *tet(M)*, čímž bakterie vykazovala rezistenci na chloramfenikol i tetracyklin.

Rezistom vykazoval shodu v přítomnosti genů *catA1*, *sul1*, *floR*, *ereA*, a *mcr1* s izolovanými bakteriemi rodů *Comamonas* a *Pseudomonas*. Naopak geny *bla_{OXA-7}*, *bla_{TEM}*, *tet(A)* a *tet(M)* nebyly u těchto bakterií zastoupeny v tak vysokých počtech jako u rezistomu. S největší pravděpodobností nedetekované geny nesou bakterie z čeledí *Enterobacteriaceae*, *Hafniaceae*, *Yersiniaceae* a dalších, které tvoří přítomnou mikrobiotu kuřecího masa.

Tato práce poukazuje na rozšířený výskyt genů antibiotické rezistence v bakteriálních populacích přítomných v drůbežím mase, pravděpodobně v důsledku nadužívání antibiotik ve zvířecí produkci a dalších faktorů přispívajících k šíření rezistence v potravinovém řetězci. Většina izolovaných bakterií vykazuje fenotypovou multirezistenci, což může být způsobeno horizontálním přenosem genů mezi bakteriemi. Studium této problematiky a možností zabránění šíření antibiotické rezistence je nutno podporovat jak z finančního, tak vědeckého hlediska, jelikož multirezistence a její globální dosah způsobuje bezprostřední hrozbu pro veřejné zdraví.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] MARTENS, Evan a Arnold L DEMAIN. The antibiotic resistance crisis, with a focus on the United States. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2017, **70**(5), 520-526 [cit. 2024-04-11]. ISSN 0021-8820. Dostupné z: doi:10.1038/ja.2017.30
- [2] CHURCH, Nicholas A. a John L. MCKILLIP. Antibiotic resistance crisis: challenges and imperatives. *Biologia* [online]. 2021, **76**(5), 1535-1550 [cit. 2024-04-11]. ISSN 0006-3088. Dostupné z: doi:10.1007/s11756-021-00697-x
- [3] WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. *World Health Organization* [online]. 2017 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>
- [4] LI, Jian, Roger L NATION, John D TURNIDGE, Robert W MILNE, Kingsley COULTHARD, Craig R RAYNER a David L PATERSON. Colistin: the re-emerging antibiotic for multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2006, **6**(9), 589-601 [cit. 2024-04-18]. ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(06)70580-1
- [5] HUGHES, Luke D., Ahmed ALJAWADI a Anand PILLAI. An overview of carbapenemase producing enterobacteriaceae (CPE) in trauma and orthopaedics. *Journal of Orthopaedics* [online]. 2019, **16**(6), 455-458 [cit. 2024-04-13]. ISSN 0972978X. Dostupné z: doi:10.1016/j.jor.2019.06.026
- [6] ANDREI, Stefan, Gabriela DROC a Gabriel STEFAN. FDA approved antibacterial drugs: 2018-2019. *Discoveries journals* [online]. 2019, 2019-12-31, **7**(4), e102 [cit. 2024-05-04]. ISSN 23597232. Dostupné z: doi:10.15190/d.2019.15
- [7] CASTANHEIRA, Mariana, Lalitagauri M DESHPANDE, Leah N WOOSLEY, Alisa W SERIO, Kevin M KRAUSE a Robert K FLAMM. Activity of plazomicin compared with other aminoglycosides against isolates from European and adjacent countries, including Enterobacteriaceae molecularly characterized for aminoglycoside-modifying enzymes and other resistance mechanisms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2018, 2018-09-14, **73**(12), 3346-3354 [cit. 2024-05-04]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dky344
- [8] BUSH, Karen a Patricia A. BRADFORD. B-Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, 2016-08-01, **6**(8), a025247 [cit. 2024-04-19]. ISSN 2157-1422. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a025247
- [9] GEORGOPAPADAKOU, N H a F Y LIU. Penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1980, **18**(1), 148-157 [cit. 2024-04-19]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.18.1.148
- [10] PAPP-WALLACE, Krisztina M., Andrea ENDIMIANI, Magdalena A. TARACILA a Robert A. BONOMO. Carbapenems: Past, Present, and Future. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2011, **55**(11), 4943-4960 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.00296-11
- [11] AMBLER, R P, A F W COULSON, J M FRÈRE, et al. A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochemical Journal* [online]. 1991, 1991-05-15, **276**(1), 269-270 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj2760269

- [12] SCOULICA, E, A ARANSAY a Y TSELENTIS. Molecular characterization of the OXA-7 beta-lactamase gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1995, **39**(6), 1379-1382 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.39.6.1379
- [13] AURILIO, Caterina, Pasquale SANSONE, Manlio BARBARISI, et al. Mechanisms of Action of Carbapenem Resistance. *Antibiotics* [online]. 2022, **11**(3), 421 [cit. 2024-04-20]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11030421
- [14] FARZI, Sorour, Reza RANJBAR, Mohammad NIAKAN a Mohammad Hossein AHMADI. Molecular Characterization of Antibiotic Resistance Associated with TEM and CTX-M ESBL in Uropathogenic E. coli Strains Isolated from Outpatients. *Iranian Journal of Pathology* [online]. 2021, **16**(4), 386–391 [cit. 2024-04-20]. Dostupné z: doi:10.30699/IJP.20201.521669.2556
- [15] BERGER, Sibel, Corentine ALAUZET, Nejla AISSA, Sandrine HÉNARD, Christian RABAUD, Richard BONNET a Alain LOZNIIEWSKI. Characterization of a New bla OXA-48 -Carrying Plasmid in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2013, **57**(8), 4064-4067 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.02550-12
- [16] MUNITA, Jose M., Cesar A. ARIAS, Indira T. KUDVA a Qijing ZHANG. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum* [online]. 2016, 2016-03-25, **4**(2) [cit. 2024-04-20]. ISSN 2165-0497. Dostupné z: doi:10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015
- [17] GIACCARI, Luca Gregorio, Maria Caterina PACE, Maria Beatrice PASSAVANTI, Francesca GARGANO, Caterina AURILIO a Pasquale SANSONE. Ceftolozane/Tazobactam for Resistant Drugs Pseudomonas aeruginosa Respiratory Infections: A Systematic Literature Review of the Real-World Evidence. *Life* [online]. 2021, **11**(6), 474 [cit. 2024-04-20]. ISSN 2075-1729. Dostupné z: doi:10.3390/life11060474
- [18] Antimicrobial resistance. *World Health Organization* [online]. 2023 [cit. 2024-04-20]. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
- [19] PATEL, Parth H. a Muhammad F. HASHMI. Macrolides. *NCBI Bookshelf* [online]. 2023 [cit. 2024-04-20]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551495/>
- [20] YEO, Yee Hui, Sz-Iuan SHIU, Hsiu J HO, Biyao ZOU, Jaw-Town LIN, Ming-Shiang WU, Jyh-Ming LIOU a Chun-Ying WU. First-line Helicobacter pylori eradication therapies in countries with high and low clarithromycin resistance: a systematic review and network meta-analysis. *Gut* [online]. 2017, 2017-12-12, **67**(1), 20-27 [cit. 2024-04-20]. ISSN 0017-5749. Dostupné z: doi:10.1136/gutjnl-2016-311868
- [21] CUNHA, B.A. The atypical pneumonias: clinical diagnosis and importance. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2006, **12**(3), 12-24 [cit. 2024-04-20]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1469-0691.2006.01393.x
- [22] PARNHAM, Michael J., Vesna Erakovic HABER, Evangelos J. GIAMARELLOS-BOURBOULIS, Gianpaolo PERLETTI, Geert M. VERLEDEN a Robin VOS. Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & therapeutics* [online]. 2014, **143**(2), 225-245 [cit. 2024-04-20]. ISSN 01637258. Dostupné z: doi:10.1016/j.pharmthera.2014.03.003

- [23] VÁZQUEZ-LASLOP, Nora a Alexander S. MANKIN. How Macrolide Antibiotics Work. *Trends in Biochemical Sciences* [online]. 2018, **43**(9), 668-684 [cit. 2024-04-20]. ISSN 09680004. Dostupné z: doi:10.1016/j.tibs.2018.06.011
- [24] ABU LILA, Amr Selim, Tareq Nafea ALHARBY, Jowaher ALANAZI, et al. Clinical Resistant Strains of Enterococci and Their Correlation to Reduced Susceptibility to Biocides: Phenotypic and Genotypic Analysis of Macrolides, Lincosamides, and Streptogramins. *Antibiotics* [online]. 2023, **12**(3), 461 [cit. 2024-04-20]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics12030461
- [25] MATSUOKA, Mayumi, Matsuhisa INOUE, Yoshihiro ENDO a Yoshinori NAKAJIMA. Characteristic expression of three genes, *mcr* (A), *mph* (C) and *erm* (Y), that confer resistance to macrolide antibiotics on *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiology Letters* [online]. 2003, **220**(2), 287-293 [cit. 2024-04-20]. ISSN 03781097. Dostupné z: doi:10.1016/S0378-1097(03)00134-4
- [26] GAROFALO, Cristiana, Carla VIGNAROLI, Giada ZANDRI, Lucia AQUILANTI, Donatella BORDONI, Andrea OSIMANI, Francesca CLEMENTI a Francesca BIAVASCO. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken and pork meat. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **113**(1), 75-83 [cit. 2024-04-23]. ISSN 01681605. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.015
- [27] WANG, Na, Xiaohong YANG, Shaojun JIAO, Jun ZHANG, Boping YE, Shixiang GAO a Jose Luis BALCAZAR. Sulfonamide-Resistant Bacteria and Their Resistance Genes in Soils Fertilized with Manures from Jiangsu Province, Southeastern China. *PLoS ONE* [online]. 2014, 2014-11-18, **9**(11), e11126 [cit. 2024-04-24]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0112626
- [28] KOOLS, Stefan A.E., Johann F. MOLTMANN a Thomas KNACKER. Estimating the use of veterinary medicines in the European union. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* [online]. 2008, **50**(1), 59-65 [cit. 2024-04-24]. ISSN 02732300. Dostupné z: doi:10.1016/j.yrtph.2007.06.003
- [29] OVUNG, Aben a Jhimli BHATTACHARYYA. Sulfonamide drugs: structure, antibacterial property, toxicity, and biophysical interactions. *Biophysical Reviews* [online]. 2021, **13**(2), 259-272 [cit. 2024-04-24]. ISSN 1867-2450. Dostupné z: doi:10.1007/s12551-021-00795-9
- [30] LAVANYA, R. Sulphonamides: A Pharmaceutical Review. In: *International Journal of Pharmaceutical Science Invention* [online]. 2017 [cit. 2024-04-24]. Dostupné z: [https://ijpsi.org/Papers/Vol6\(2\)/A06020103.pdf](https://ijpsi.org/Papers/Vol6(2)/A06020103.pdf)
- [31] DA SILVA, Luiz Everson, Antônio Carlos JOUSSEF, Leticia Kramer PACHECO, Daniela Gaspar DA SILVA, Mário STEINDEL a Ricardo Andrade REBELO. Synthesis and in vitro evaluation of leishmanicidal and trypanocidal activities of N-quinolin-8-yl-arylsulfonamides. *Bioorganic & medicinal chemistry* [online]. 2007, **15**(24), 7553-7560 [cit. 2024-04-24]. ISSN 09680896. Dostupné z: doi:10.1016/j.bmc.2007.09.007
- [32] MAHMOOD, Lubna. The metabolic processes of folic acid and Vitamin B12 deficiency. *Journal of Health Research and Reviews* [online]. 2014, **1**(1), 5 - 9 [cit. 2024-04-24]. ISSN 2394-2010. Dostupné z: doi:10.4103/2394-2010.143318
- [33] SKÖLD, Ola. Sulfonamide resistance: mechanisms and trends. *Drug Resistance Updates* [online]. 2000, **3**(3), 155-160 [cit. 2024-04-24]. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1054/drup.2000.0146

- [34] MIRECKA, A. Etiological agents of bacterial meningitis in adults and antibiotic susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* isolated between 2009-2016 from patients of Regional Specialist Hospital of Dr Wł. Biegański in Łódź. *Przegląd Epidemiologiczny* [online]. 2018, **72**(3), 313-324 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0033-2100. Dostupné z: doi:10.32394/pe.72.3.8
- [35] MCMAHON RS, Bashir K., Parmar M. NARAIN S, Sharman T. NIYAZOV R, Yarbrough T SHON NN a Tadi P. REYHANOGLU G. Chloramphenicol. *NCBI Bookshelf* [online]. © 2024 [cit. 2024-04-27]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK555966/>
- [36] BULKLEY, David, C. Axel INNIS, Gregor BLAHA a Thomas A. STEITZ. Revisiting the structures of several antibiotics bound to the bacterial ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 2010, 2010-10-05, **107**(40), 17158-17163 [cit. 2024-04-27]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1008685107
- [37] SCHWARZ, Stefan, Corinna KEHRENBERG, Benoît DOUBLET a Axel CLOECKAERT. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 2004, 2004-11-01, **28**(5), 519-542 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1574-6976. Dostupné z: doi:10.1016/j.femsre.2004.04.001
- [38] KUCEROVA, Z., H. HRADECKA, K. NECHVATALOVA a K. NEDBALCOVA. Antimicrobial susceptibility of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolates from clinical outbreaks of porcine respiratory diseases. *Veterinary Microbiology* [online]. 2011, **150**(1-2), 203-206 [cit. 2024-04-27]. ISSN 03781135. Dostupné z: doi:10.1016/j.vetmic.2011.01.016
- [39] LU, Junwan, Jinfang ZHANG, Lei XU, et al. Spread of the florfenicol resistance floR gene among clinical *Klebsiella pneumoniae* isolates in China. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* [online]. 2018, **7**(1), 127 [cit. 2024-04-27]. ISSN 2047-2994. Dostupné z: doi:10.1186/s13756-018-0415-0
- [40] SHAW, William V. Chloramphenicol Acetyltransferase: Enzymology and Molecular Biology. *Critical Reviews in Biochemistry* [online]. 2008, 2008-09-26, **14**(1), 1-46 [cit. 2024-04-27]. ISSN 1040-8355. Dostupné z: doi:10.3109/10409238309102789
- [41] OBAYIUWANA, Amarachukwu a Abasiofiok M. IBEKWE. Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Wastewaters from Selected Pharmaceutical Facilities in Nigeria. *Water* [online]. 2020, **12**(7), 1897 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2073-4441. Dostupné z: doi:10.3390/w12071897
- [42] KARIM, Md. Rezaul, Zunita ZAKARIA, Latiffah HASSAN, Nik MOHD FAIZ a Nur Indah AHMAD. Antimicrobial Resistance Profiles and Co-Existence of Multiple Antimicrobial Resistance Genes in mcr-Harboured Colistin-Resistant Enterobacteriaceae Isolates Recovered from Poultry and Poultry Meats in Malaysia. *Antibiotics* [online]. 2023, **12**(6), 1060 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics12061060
- [43] DOUBLET, Benoît, Stefan SCHWARZ, Corinna KEHRENBERG a Axel CLOECKAERT. Florfenicol Resistance Gene floR Is Part of a Novel Transposon. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2005, **49**(5), 2106-2108 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.5.2106-2108.2005
- [44] ADESOJI, Ayodele. T. a Douglas R. CALL. Molecular analysis of florfenicol-resistant bacteria isolated from drinking water distribution systems in Southwestern Nigeria. *Journal of Global Antimicrobial Resistance* [online]. 2020, **23**, 340-344 [cit. 2024-05-02]. ISSN 22137165. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgar.2020.10.005

- [45] NAZARIAN S, Akhondi H., Homenuik K ZHANEL GG, Liu Y WEI C, Nagalli S.] PADDA IS a Schiefe RT. BARZA M. Tetracycline. *NCBI Bookshelf* [online]. © 2024 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK549905/>
- [46] LASHINSKY, Jennifer N., Oryan HENIG, Jason M. POGUE a Keith S. KAYE.] Minocycline for the Treatment of Multidrug and Extensively Drug-Resistant *A. baumannii*: A Review. *Infectious Diseases and Therapy* [online]. 2017, **6**(2), 199-211 [cit. 2024-05-02]. ISSN 2193-8229. Dostupné z: doi:10.1007/s40121-017-0153-2
- [47] CHOPRA, Ian a Marilyn ROBERTS. Tetracycline Antibiotics: Mode of Action,] Applications, Molecular Biology, and Epidemiology of Bacterial Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2001, **65**(2), 232-260 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.65.2.232-260.2001
- [48] Antimicrobial consumption in the EU/EEA (ESAC-Net) - Annual Epidemiological] Report for 2021. *European Centre for Disease Prevention and Control* [online]. 2022 [cit. 2024-05-02]. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/surveillance-antimicrobial-consumption-europe-2021>
- [49] LI, Xian-Zhi a Hiroshi NIKAIDO. Efflux-Mediated Drug Resistance in Bacteria.] *Drugs* [online]. 2004, **64**(2), 159-204 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0012-6667. Dostupné z: doi:10.2165/00003495-200464020-00004
- [50] MØLLER, Thea S. B., Martin OVERGAARD, Søren S. NIELSEN, Valeria] BORTOLAIA, Morten O. A SOMMER, Luca GUARDABASSI a John E. OLSEN. Relation between tetR and tetA expression in tetracycline resistant *Escherichia coli*. *BMC Microbiology* [online]. 2016, **16**(1), 39 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/s12866-016-0649-z
- [51] JONES, C. Hal, Margareta TUCKMAN, Ellen MURPHY a Patricia A. BRADFORD.] Identification and Sequence of a tet (M) Tetracycline Resistance Determinant Homologue in Clinical Isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. 2006, **188**(20), 7151-7164 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00705-06
- [52] ERO, Rya, Xin-Fu YAN a Yong-Gui GAO. Ribosome Protection Proteins—“New”] Players in the Global Arms Race with Antibiotic-Resistant Pathogens. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(10), 5356 [cit. 2024-05-02]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22105356
- [53] DI FRANCESCO, Antonietta, Daniela SALVATORE, Sonia SAKHRIA, et al. High] Frequency and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in the Microbiota of Broiler Chickens in Tunisia. *Animals* [online]. 2021, **11**(2), 377 [cit. 2024-05-07]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani11020377
- [54] CENCI-GOGA, B.T., S. CROTTI, S. COSTARELLI, C. RONDINI, M. KARAMA a] P. BENNETT. Detection of tet(M) Gene from Raw Milk by Rapid DNA Extraction Followed by a Two-Step PCR with Nested Primers. *Journal of Food Protection* [online]. 2004, **67**(12), 2833-2838 [cit. 2024-05-11]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-67.12.2833
- [55] FALAGAS, Matthew E., Petros I. RAFAILIDIS a Dimitrios K. MATTHAIYOU.] Resistance to polymyxins: Mechanisms, frequency and treatment options. *Drug Resistance Updates* [online]. 2010, **13**(4-5), 132-138 [cit. 2024-04-18]. ISSN 13687646. Dostupné z: doi:10.1016/j.drug.2010.05.002
- [56] KWA, Andrea, Sofia K KASIAKOU, Vincent H TAM a Matthew E FALAGAS.] Polymyxin B: similarities to and differences from colistin (polymyxin E). *Expert*

- Review of Anti-infective Therapy* [online]. 2014, 2014-01-10, **5**(5), 811-821 [cit. 2024-04-18]. ISSN 1478-7210. Dostupné z: doi:10.1586/14787210.5.5.811
- [57] MOHAPATRA, Saswat S, Sambit K DWIBEDY a Indira PADHY. Polymyxins, the last-resort antibiotics: Mode of action, resistance emergence, and potential solutions. *Journal of Biosciences* [online]. 2021, **46**(3), 85 [cit. 2024-04-18]. ISSN 0250-5991. Dostupné z: doi:10.1007/s12038-021-00209-8
- [58] EL-SAYED AHMED, Mohamed Abd El-Gawad, Lan-Lan ZHONG, Cong SHEN, Yongqiang YANG, Yohei DOI a Guo-Bao TIAN. Colistin and its role in the Era of antibiotic resistance: an extended review (2000–2019). *Emerging Microbes & Infections* [online]. 2020, **9**(1), 868-885 [cit. 2024-04-18]. ISSN 2222-1751. Dostupné z: doi:10.1080/22221751.2020.1754133
- [59] KAYE, Keith S., Jason M. POGUE, Thien B. TRAN, Roger L. NATION a Jian LI. Agents of Last Resort. *Infectious Disease Clinics of North America* [online]. 2016, **30**(2), 391-414 [cit. 2024-04-18]. ISSN 08915520. Dostupné z: doi:10.1016/j.idc.2016.02.005
- [60] REEVES, Peter R., Matthew HOBBS, Miguel A. VALVANO, et al. Bacterial polysaccharide synthesis and gene nomenclature. *Trends in Microbiology* [online]. 1996, **4**(12), 495-503 [cit. 2024-04-18]. ISSN 0966842X. Dostupné z: doi:10.1016/S0966-842X(97)82912-5
- [61] NANG, Sue C., Jian LI a Tony VELKOV. The rise and spread of mcr plasmid-mediated polymyxin resistance. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2019, 2019-03-04, **45**(2), 131-161 [cit. 2024-04-19]. ISSN 1040-841X. Dostupné z: doi:10.1080/1040841X.2018.1492902
- [62] LIU, Yi-Yun, Yang WANG, Timothy R WALSH, et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2016, **16**(2), 161-168 [cit. 2024-04-19]. ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(15)00424-7
- [63] GELBÍČOVÁ, Tereza, Alžběta BARÁKOVÁ, Martina FLORIANOVÁ, Ivana JAMBOROVÁ, Markéta ZELENDOVÁ, Lucie POSPÍŠILOVÁ, Ivana KOLÁČKOVÁ a Renáta KARPÍŠKOVÁ. Dissemination and Comparison of Genetic Determinants of mcr-Mediated Colistin Resistance in Enterobacteriaceae via Retailed Raw Meat Products. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, 2019-12-12, **10**(2824) [cit. 2024-04-18]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.02824
- [64] CAO, Huiluo, Salim BOUGOUFFA, Tae-Jin PARK, Andes LAU, Man-Ki TONG, Kin-Hung CHOW, Pak-Leung HO a Tricia A. VAN LAAR. Sharing of Antimicrobial Resistance Genes between Humans and Food Animals. *MSystems* [online]. 2022, 2022-12-20, **7**(6), e00775-22 [cit. 2024-05-11]. ISSN 2379-5077. Dostupné z: doi:10.1128/msystems.00775-22
- [65] BHATIA, Rajesh a Rattan Lal ICHHPUJANI. 5 Bacterial Genetics. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 28-33. ISBN 81-8448-154-3.
- [66] BHATIA, Rajesh a Rattan Lal ICHHPUJANI. 5 Bacterial Genetics. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 27-33. ISBN 81-8448-154-3.
- [67] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. 3. Genetika mikroorganismů: 3.3.1 Plazmidy bakterií. In: *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, s. 86-87. ISBN 978-80-7318-973-0.

- [68] BHATIA, Rajesh a Rattan Lai ICHHPUJANI. 5 Bacterial Genetics. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 32. ISBN 81-8448-154-3.
- [69] ŠMARDA, Jiří. 2.6 Nástroje patogenity a patogeneze bakteriálních infekcí: 2.6.4 Perzistoři. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 45. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [70] TELENTI, A, P IMBODEN, F MARCHESI, et al. Detection of rifampicin-resistance mutations in Mycobacterium tuberculosis. *The Lancet* [online]. 1993, **341**(8846), 647-651 [cit. 2024-04-14]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/0140-6736(93)90417-F
- [71] BALTZ, Richard H. Spontaneous and induced mutations to rifampicin, streptomycin and spectinomycin resistances in actinomycetes: mutagenic mechanisms and applications for strain improvement. *The Journal of Antibiotics* [online]. 2014, **67**(9), 619-624 [cit. 2024-04-14]. ISSN 0021-8820. Dostupné z: doi:10.1038/ja.2014.105
- [72] JOHNSTON, Calum, Bernard MARTIN, Gwennaele FICHANT, Patrice POLARD a Jean-Pierre CLAVERYYS. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2014, **12**(3), 181-196 [cit. 2024-05-03]. ISSN 1740-1526. Dostupné z: doi:10.1038/nrmicro3199
- [73] BLOKESCH, Melanie. Natural competence for transformation. *Current Biology* [online]. 2016, **26**(21), R1126-R1130 [cit. 2024-05-03]. ISSN 09609822. Dostupné z: doi:10.1016/j.cub.2016.08.058
- [74] CHIANG, Yin Ning, José R. PENADÉS, John CHEN a Kimberly A. KLINE. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLOS Pathogens* [online]. 2019, 2019-8-8, **15**(8), e1007878 [cit. 2024-05-03]. ISSN 1553-7374. Dostupné z: doi:10.1371/journal.ppat.1007878
- [75] BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ. 3.5.2.2 Rekombinace u bakterií. In: *Obecná mikrobiologie*. Vyd. 2., nezměn. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2010, s. 96-101. ISBN 978-80-7318-973-0.
- [76] NEIL, Kevin, Nancy ALLARD a Sébastien RODRIGUE. Molecular Mechanisms Influencing Bacterial Conjugation in the Intestinal Microbiota. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, 2021-6-4, **12**, 673260 [cit. 2024-05-03]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2021.673260
- [77] ALVAREZ-MARTINEZ, Cristina E. a Peter J. CHRISTIE. Biological Diversity of Prokaryotic Type IV Secretion Systems. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2009, **73**(4), 775-808 [cit. 2024-05-03]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00023-09
- [78] BHATIA, Rajesh a Ratan Lai ICHHPUJANI. 5 Bacterial Genetics. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 32. ISBN 81-8448-154-3.
- [79] MANAIA, Célia M., Jaqueline ROCHA, Nazareno SCACCIA, et al. Antibiotic resistance in wastewater treatment plants: Tackling the black box. *Environment International* [online]. 2018, **115**, 312-324 [cit. 2024-05-04]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2018.03.044
- [80] SCHINDLER, Jiří. 3.5 Multirezistence. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 61. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.

- [81] MURRAY, Christopher J L, Kevin Shunji IKUTA, Fablina SHARARA, et al. Global burden of bacterial antimicrobial resistance in 2019: a systematic analysis. *The Lancet* [online]. 2022, **399**(10325), 629-655 [cit. 2024-05-03]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(21)02724-0
- [82] ZARFEL, Gernot, Herbert GALLER, Josefa LUXNER, et al. Multiresistant Bacteria Isolated from Chicken Meat in Austria. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2014, **11**(12), 12582-12593 [cit. 2024-05-11]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph111212582
- [83] HÖLZEL, Christina S., Karin SCHWAIGER, Katrin HARMS, Helmut KÜCHENHOFF, Anne KUNZ, Karsten MEYER, Christa MÜLLER a Johann BAUER. Sewage sludge and liquid pig manure as possible sources of antibiotic resistant bacteria. *Environmental Research* [online]. 2010, **110**(4), 318-326 [cit. 2024-05-11]. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2010.02.009
- [84] FAO. Gateway to poultry production and products. *Food and Agriculture Organization of the United Nations* [online]. 2023 [cit. 2024-05-04]. Dostupné z: <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/en/>
- [85] SAMTIYA, Mrinal, Karl R. MATTHEWS, Tejpal DHEWA a Anil Kumar PUNIYA. Antimicrobial Resistance in the Food Chain: Trends, Mechanisms, Pathways, and Possible Regulation Strategies. *Foods* [online]. 2022, **11**(19), 2966 [cit. 2024-05-07]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods11192966
- [86] LI, Shaoting, David Ames MANN, Shaokang ZHANG, Yan QI, Richard J. MEINERSMANN, Xiangyu DENG a Paul D. COTTER. Microbiome-Informed Food Safety and Quality: Longitudinal Consistency and Cross-Sectional Distinctiveness of Retail Chicken Breast Microbiomes. *MSystems* [online]. 2020, 2020-10-27, **5**(5), e00589-20 [cit. 2024-05-12]. ISSN 2379-5077. Dostupné z: doi:10.1128/mSystems.00589-20
- [87] GALHANO, Beatriz S. P., Rafaela G. FERRARI, Pedro PANZENHAGEN, Ana Carolina S. DE JESUS a Carlos A. CONTE-JUNIOR. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(5), 923 [cit. 2024-05-07]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923
- [88] MA, Liping, Yu XIA, Bing LI, Ying YANG, Li-Guan LI, James M TIEDJE a Tong ZHANG. Metagenomic Assembly Reveals Hosts of Antibiotic Resistance Genes and the Shared Resistome in Pig, Chicken, and Human Feces. *Environmental Science & Technology* [online]. 2016, 2016-01-05, **50**(1), 420-427 [cit. 2024-05-12]. ISSN 0013-936X. Dostupné z: doi:10.1021/acs.est.5b03522
- [89] WANG, Yanan, Na LYU, Fei LIU, et al. More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environment International* [online]. 2021, **153** [cit. 2024-05-07]. ISSN 01604120. Dostupné z: doi:10.1016/j.envint.2021.106534
- [90] GALHANO, Beatriz S. P., Rafaela G. FERRARI, Pedro PANZENHAGEN, Ana Carolina S. DE JESUS a Carlos A. CONTE-JUNIOR. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. 2021, **9**(5) [cit. 2024-05-12]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923
- [91] MARMION, M., M.T. FERONE, P. WHYTE a A.G.M. SCANNELL. The changing microbiome of poultry meat; from farm to fridge. *Food Microbiology* [online]. 2021,

- 99, 103823 [cit. 2024-05-04]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2021.103823
- [92] KIM, Hyo-Eun, Jin-Jae LEE, Min-Jung LEE a Bong-Soo KIM. Analysis of microbiome in raw chicken meat from butcher shops and packaged products in South Korea to detect the potential risk of foodborne illness. *Food Research International* [online]. 2019, **122**, 517-527 [cit. 2024-05-05]. ISSN 09639969. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodres.2019.05.032
- [93] DEMIROK, E., G. VELUZ, W.V. STUYVENBERG, M.P. CASTAÑEDA, A. BYRD a C.Z. ALVARADO. Quality and safety of broiler meat in various chilling systems. *Poultry Science* [online]. 2013, **92**(4), 1117-1126 [cit. 2024-05-05]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps.2012-02493
- [94] SCHINDLER, Jiří. 4.6 Mikroaerofilní pohyblivé prohýbané tyčky. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 87-88. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [95] SCHINDLER, Jiří. 4.2 Enterobacteriaceae. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 81-82. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [96] LI, YiMing, WeiWei CAO, ShuLi LIANG, Shinji YAMASAKI, Xun CHEN, Lei SHI a Lei YE. Metagenomic characterization of bacterial community and antibiotic resistance genes in representative ready-to-eat food in southern China. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2024-05-08]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-72620-4
- [97] LI, Shaoting, David Ames MANN, Shaokang ZHANG, Yan QI, Richard J. MEINERSMANN, Xiangyu DENG a Paul D. COTTER. Microbiome-Informed Food Safety and Quality: Longitudinal Consistency and Cross-Sectional Distinctiveness of Retail Chicken Breast Microbiomes. *MSystems* [online]. 2020, 2020-10-27, **5**(5), e00589-20 [cit. 2024-05-05]. ISSN 2379-5077. Dostupné z: doi:10.1128/mSystems.00589-20
- [98] ADEOLU, Mobolaji, Seema ALNAJAR, Sohail NAUSHAD a Radhey S. GUPTA. Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2016, 2016-12-01, **66**(12), 5575-5599 [cit. 2023-11-16]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijsem.0.001485
- [99] SCHINDLER, Jiří. 4.2 Enterobacteriaceae. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 76-77. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [10] BHATIA, Rajesh a Rattan Lai ICHHPUJANI. 39 Enterobacteriaceae. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 222-231. ISBN 81-8448-154-3.
- [10] EWING, W. H., J. J. FARMER a D. J. BRENNER. Proposal of Enterobacteriaceae fam. nov., nom. rev. to Replace Enterobacteriaceae Rahn 1937, nom. fam. cons. (Opin. 15, Jud. Comm. 1958), Which Lost Standing in Nomenclature on 1 January 1980. *International Journal of Systematic Bacteriology* [online]. 1980, 1980-10-01, **30**(4), 674-675 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-30-4-674

- [10 BHATIA, Rajesh a Rattan Lai ICHHPUJANI. 39. Enterobacteriaceae. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 222. ISBN 81-8448-154-3.
- [10 RAMATLA, Tsepo, Mpho TAWANA, Kgaugelo E. LEKOTA a Oriel THEKISOE. 3] Antimicrobial resistance genes of *Escherichia coli*, a bacterium of “One Health” importance in South Africa: Systematic review and meta-analysis. *AIMS Microbiology* [online]. 2023, **9**(1), 75-89 [cit. 2024-05-11]. ISSN 2471-1888. Dostupné z: doi:10.3934/microbiol.2023005
- [10 MONTE, Daniel F M, Mateus Lacerda Pereira LEMOS a Celso José Bruno DE OLIVEIRA. 4] Emerging threats: global distribution and diversity of carbapenem resistance genes in *Kluyvera intermedia*. *The Lancet Microbe* [online]. 2024, **5**(4), e310-e311 [cit. 2024-05-13]. ISSN 26665247. Dostupné z: doi:10.1016/S2666-5247(23)00390-7
- [10 EWING, W. H., A. C. MCWHORTER, M. R. ESCOBAR a A. H. LUBIN. 5] *Edwardsiella*, a new genus of Enterobacteriaceae based on a new species, *E. tarda*. *International Bulletin of Bacteriological Nomenclature and Taxonomy* [online]. 1965, 1965-01-01, **15**(1), 33-38 [cit. 2024-05-12]. ISSN 0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-15-1-33
- [10 BHATIA, Rajesh a Rattan Lai ICHHPUJANI. 39 Enterobacteriaceae. In: *Essentials of Medical Microbiology*. 4. Jaypee Brothers Medical Publishers (P), 2008, s. 224. ISBN 81-8448-154-3.
- [10 JANDA, J. Michael a Sharon L. ABBOTT. The Genus *Hafnia*: from Soup to Nuts. 7] *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2006, **19**(1), 12-28 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.19.1.12-28.2006
- [10 MORALES, P., E. FERNANDEZ-GARCIA a M. NUNEZ. Caseinolysis in cheese by 8] Enterobacteriaceae strains of dairy origin. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2003, **37**(5), 410-414 [cit. 2024-05-05]. ISSN 0266-8254. Dostupné z: doi:10.1046/j.1472-765X.2003.01422.x
- [10 SEVILLANO, Laura, Cristhian HERRERA, Álvaro VALDES, Ángela DE LA HOZ, 9] Laura CARDEÑOSO, Diego DOMINGO a Maria Auxiliadora SEMIGLIA. First report of a carbapenemase OXA-48-producing *Hafnia alvei* clinical isolate. *Access Microbiology* [online]. 2023, 2023-06-01, **5**(6), acmi000498.v3. [cit. 2024-05-05]. ISSN 2516-8290. Dostupné z: doi:10.1099/acmi.0.000498.v3
- [11 SKURNIK, David, Amandine NUCCI, Raymond RUIMY, Sigismond LASOCKI, 0] Claudette MULLER-SERIEYS, Philippe MONTRAVERS, Antoine ANDREMONT a Patrice COURVALIN. Emergence of Carbapenem-Resistant *Hafnia*: The Fall of the Last Soldier. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2010, 2010-05-15, **50**(10), 1429-1431 [cit. 2024-05-05]. ISSN 1058-4838. Dostupné z: doi:10.1086/652289
- [11 LUTTMANN, Kelly, Victoria R STARNES, Michael HADDAD a Joan DUGGAN. 1] *Serratia marcescens*, a Rare and Devastating Cause of Endocarditis: A Case Report and Review of the Literature. *Cureus* [online]. 2022, **14**(6), e25572 [cit. 2024-05-05]. ISSN 2168-8184. Dostupné z: doi:10.7759/cureus.25572
- [11 TAVARES-CARREON, Faviola, Karla DE ANDA-MORA, Idalia C. ROJAS- 2] BARRERA a Angel ANDRADE. *Serratia marcescens* antibiotic resistance mechanisms of an opportunistic pathogen: a literature review. *PeerJ* [online]. 2023, **11**, e14399 [cit. 2024-05-05]. ISSN 2167-8359. Dostupné z: doi:10.7717/peerj.14399
- [11 EVANS, Martin E, David J FEOLA a Robert P RAPP. Polymyxin B Sulfate and 3] Colistin: Old Antibiotics for Emerging Multiresistant Gram-Negative Bacteria. *Annals*

- of Pharmacotherapy* [online]. 1999, **33**(9), 960-967 [cit. 2024-05-05]. ISSN 1060-0280. Dostupné z: doi:10.1345/aph.18426
- [11 ZIVKOVIC ZARIC, Radica, Milan ZARIC, Marija SEKULIC, et al. Antimicrobial
4] Treatment of *Serratia marcescens* Invasive Infections: Systematic Review. *Antibiotics* [online]. 2023, **12**(2), 323 [cit. 2024-05-09]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics12020367
- [11 SCHINDLER, Jiří. 4.2 Enterobacteriaceae. In: *Mikrobiologie: pro studenty*
5] *zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 80. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [11 MÜLLER, Hans E., Arnold G. STEIGERWALT a Don J. BRENNER. Isolation of
6] *serratia fonticola* from birds. *Zentralblatt für Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology* [online]. 1986, **261**(2), 212-218 [cit. 2024-05-05]. ISSN 01766724. Dostupné z: doi:10.1016/S0176-6724(86)80038-4
- [11 HAI, P.D., L.T.V. HOA, N.H. TOT, L.L. PHUONG, V.V. QUANG, B.T. THUYET a
7] P.N. SON. First report of biliary tract infection caused by multidrug-resistant *Serratia fonticola*. *New Microbes and New Infections* [online]. 2020, **36**, 100692 [cit. 2024-05-05]. ISSN 20522975. Dostupné z: doi:10.1016/j.nmni.2020.100692
- [11 KHAITLINA, Sofia, Ekaterina BOZHOKINA, Olga TSAPLINA a Tatiana
8] EFREMOVA. Bacterial Actin-Specific Endoproteases Grimelysin and Protealysin as Virulence Factors Contributing to the Invasive Activities of *Serratia*. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2020, **21**(11), 4025 [cit. 2024-05-11]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms21114025
- [11 ORLA-JENSEN, S. THE MAIN LINES OF THE NATURAL BACTERIAL
9] SYSTEM. *Journal of Bacteriology* [online]. 1921, **6**(3), 263-273 [cit. 2024-05-11]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.6.3.263-273.1921
- [12 SCHINDLER, Jiří. 4.5 Gramnegativní nefermentující aerobní tyčky. In:
0] *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 85-87. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.
- [12 SNEATH, P. H. A., VICKI MCGOWAN a V. B. D. SKERMAN. Approved Lists of
1] Bacterial Names. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 1980, 1980-01-01, **30**(1), 225-420 [cit. 2024-05-06]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-30-1-225
- [12 SCALES, Brittan S., Robert P. DICKSON, John J. LIPUMA a Gary B. HUFFNAGLE.
2] Microbiology, Genomics, and Clinical Significance of the *Pseudomonas fluorescens* Species Complex, an Unappreciated Colonizer of Humans. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2014, **27**(4), 927-948 [cit. 2024-05-06]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00044-14
- [12 KUMAR, Harsh, Laura FRANZETTI, Ankur KAUSHAL a Dinesh KUMAR.
3] *Pseudomonas fluorescens*: a potential food spoiler and challenges and advances in its detection. *Annals of Microbiology* [online]. 2019, **69**(9), 873-883 [cit. 2024-05-09]. ISSN 1590-4261. Dostupné z: doi:10.1007/s13213-019-01501-7
- [12 GARRITY, George M., Noel R. KRIEG, Don J. BRENNER a James T. STALEY. The
4] Proteobacteria: part C (The Alpha-, Beta-, Delta-, and Epsilonproteobacteria). In: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2. New York, N.Y: Springer, c2005, s. 575. ISBN 0-387-24145-0.

- [12 MOROTOMI, Masami, Fumiko NAGAI a Yohei WATANABE. Parasutterella
5] secunda sp. nov., isolated from human faeces and proposal of Sutterellaceae fam. nov.
in the order Burkholderiales. *International Journal of Systematic and Evolutionary
Microbiology* [online]. 2011, 2011-03-01, **61**(3), 637-643 [cit. 2024-05-06]. ISSN
1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijss.0.023556-0
- [12 RYAN, Michael P., Ludmila SEVJACHOVA, Rachel GORMAN a Sandra WHITE. The
6] Emergence of the Genus Comamonas as Important Opportunistic Pathogens.
Pathogens [online]. 2022, **11**(9), 1032 [cit. 2024-05-06]. ISSN 2076-0817. Dostupné
z: doi:10.3390/pathogens11091032
- [12 DE VOS, P., K. KERSTERS, E. FALSEN, B. POT, M. GILLIS, P. SEGERS a J. DE
7] LEY. Comamonas Davis and Park 1962 gen. nov., nom. rev. emend., and Comamonas
terrigena Hugh 1962 sp. nov., nom. rev. *International Journal of Systematic
Bacteriology* [online]. 1985, 1985-10-01, **35**(4), 443-453 [cit. 2024-05-06]. ISSN
0020-7713. Dostupné z: doi:10.1099/00207713-35-4-443
- [12 ZÁMOCKÝ, M., J. GODOČÍKOVÁ, F. KOLLER a B. POLEK. Potential application
8] of catalase-peroxidase from Comamonas terrigena N3H in the biodegradation of
phenolic compounds. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2001, **79**(2), 109-117 [cit.
2024-05-06]. ISSN 00036072. Dostupné z: doi:10.1023/A:1010294130534
- [12 ZHUANG, Weiping, Hongliang LIU, Jingxin LI, Lu CHEN a Gejiao WANG.
9] Regulation of Class A β -Lactamase CzoA by CzoR and IscR in Comamonas
testosteroni S44. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2017, 2017-12-22, **8**, 2573 [cit.
2024-05-06]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2017.02573
- [13 VAN, Thi Thu Hao, James CHIN, Toni CHAPMAN, Linh Thuoc TRAN a Peter J.
0] COLOE. Safety of raw meat and shellfish in Vietnam: An analysis of Escherichia coli
isolations for antibiotic resistance and virulence genes. *International Journal of Food
Microbiology* [online]. 2008, **124**(3), 217-223 [cit. 2024-05-07]. ISSN 01681605.
Dostupné z: doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.029
- [13 DI FRANCESCO, C.E., C. SMOGLICA, F. PROFETA, M. FAROOQ, E. DI
1] GIANNATALE, T. TOSCANI a F. MARSILIO. Research Note: Detection of
antibiotic-resistance genes in commercial poultry and turkey flocks from Italy. *Poultry
Science* [online]. 2021, **100**(5) [cit. 2024-05-08]. ISSN 00325791. Dostupné z:
doi:10.1016/j.psj.2021.101084
- [13 NG, Lai-King, Michael R. MULVEY, Irene MARTIN, Geoffrey A. PETERS a Wendy
2] JOHNSON. Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates
of Salmonella Serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*
[online]. 1999, **43**(12), 3018-3021 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0066-4804. Dostupné z:
doi:10.1128/AAC.43.12.3018
- [13 CATTOIR, Vincent, Laurent POIREL, Vincent ROTIMI, Claude-James SOUSSY a
3] Patrice NORDMANN. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone
resistance qnr genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of
Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2007, 2007-08-01, **60**(2), 394-397 [cit. 2024-
05-02]. ISSN 1460-2091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkm204
- [13 NG, L.-K., I. MARTIN, M. ALFA a M. MULVEY. Multiplex PCR for the detection
4] of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* [online]. 2001, **15**(4),
209-215 [cit. 2024-05-07]. ISSN 08908508. Dostupné z: doi:10.1006/mcpr.2001.0363
- [13 MAYNARD, Christine, Sadjia BEKAL, François SANSCHAGRIN, Roger C.
5] LEVESQUE, Roland BROUSSEAU, Luke MASSON, Serge LARIVIÈRE a Josée
HAREL. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles

- of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2004, **42**(12), 5444-5452 [cit. 2024-05-02]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.42.12.5444-5452.2004
- [13 WEISBURG, W G, S M BARNES, D A PELLETIER a D J LANE. 16S ribosomal DNA
6] amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* [online]. 1991, **173**(2), 697-703 [cit. 2024-03-25]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/jb.173.2.697-703.1991
- [13 ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAR, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana
7] KOPTÍKOVÁ. Kapitola VI. Amplifikační nukleových kyselin. In: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 7-9. ISBN 80-210-3841-1.
- [13 ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAR, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana
8] KOPTÍKOVÁ. Kapitola VI. Amplifikační nukleových kyselin. In: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 10. ISBN 80-210-3841-1.
- [13 T042-TECHNICAL BULLETIN: 260/280 and 260/230 Ratios. In:
9] <https://www.thermofisher.com> [online]. c2006-2024 [cit. 2024-03-17]. Dostupné z: https://dna.uga.edu/wp-content/uploads/sites/51/2019/02/Note-on-the-260_280-and-260_230-Ratios.pdf
- [14 ALBERTS, Bruce, Dennis BRAY, Alexander JOHNSON, Julian LEWIS, Martin
0] RAFF, Keith ROBERTS a Peter WALTER. Kapitola 10 DNA-technologie. In: *Základy buněčné biologie: úvod do molekulární biologie buňky*. 2. Ústí nad Labem: Espero, c1998, s. 332-335. ISBN 80-902906-0-4.
- [14 ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAR, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana
1] KOPTÍKOVÁ. Kapitola VI. Amplifikační nukleových kyselin. In: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 73. ISBN 80-210-3841-1.
- [14 ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAR, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana
2] KOPTÍKOVÁ. Kapitola I. Purifikace a separace nukleových kyselin. In: *Metody molekulární biologie*. Brno: Masarykova univerzita, 2005, s. 13-16. ISBN 80-210-3841-1.
- [14 KÁŠ, Jan, Milan KODÍČEK a Olga VALENTOVÁ. Kapitola 1.4 Biochemické
3] separační techniky. In: *Laboratorní techniky biochemie*. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006, s. 32-37. ISBN 80-7080-586-2.
- [14 VÁVROVÁ, Jaroslava. Pohyb nabitých částic v elektrickém poli.
4] <https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/> [online]. 2005 [cit. 2024-03-23]. Dostupné z: https://ciselniky.dasta.mzcr.cz/CD_DS3/hypertext/AJAZE.htm
- [14 Product Information: GelRed® Nucleic Acid Gel Stain, 10,000X. In:
5] <https://biotium.com> [online]. c2024 [cit. 2024-03-23]. Dostupné z: <https://biotium.com/wp-content/uploads/2015/02/PI-41002-41003.pdf>
- [14 ELFO v agarosovém gelu. <https://labguide.cz/> [online]. c2024 [cit. 2024-03-23].
6] Dostupné z: <https://labguide.cz/metody/elektroforetika-separace-nukleovych-kyselin/elfo-v-agarosovem-gelu/>
- [14 ENTEROtest 24 N. In: <https://www.erbalachema.com> [online]. 2011 [cit. 2024-03-
7] 24]. Dostupné z: https://www.erbalachema.com/attachments/MLT00008%20ENTEROtest%2024%20N_G1-hbROm3mpCO.pdf
- [14 SCHINDLER, Jiří. Kapitola 11. Principy diagnostiky infekčních chorob: 11.4
8] Identifikace bakterií. In: *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. Praha: Grada, 2010, s. 201-203. Sestra (Grada). ISBN 978-80-247-3170-4.

- [14] WANG, Xin, I. King JORDAN a Leonard W. MAYER. A Phylogenetic Perspective on Molecular Epidemiology. In: *Molecular Medical Microbiology* [online]. 2. Elsevier, 2015, s. 517-536 [cit. 2024-03-30]. ISBN 9780123971692. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-397169-2.00029-9
- [15] CALOGERO, R A, C L PON, M A CANONACO a C O GUALERZI. Selection of the mRNA translation initiation region by Escherichia coli ribosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. 1988, **85**(17), 6427-6431 [cit. 2024-03-30]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.85.17.6427
- [15] MALYS, Naglis. Shine-Dalgarno sequence of bacteriophage T4: GAGG prevails in early genes. *Molecular Biology Reports* [online]. 2012, **39**(1), 33-39 [cit. 2024-03-30]. ISSN 0301-4851. Dostupné z: doi:10.1007/s11033-011-0707-4
- [15] HARTZ, Dieter, David S. MCPHEETERS, Louis GREEN a Larry GOLD. Detection of Escherichia coli ribosome binding at translation initiation sites in the absence of tRNA. *Journal of Molecular Biology* [online]. 1991, **218**(1), 99-105 [cit. 2024-03-30]. ISSN 00222836. Dostupné z: doi:10.1016/0022-2836(91)90876-8
- [15] SPRIselect User Guide: SPRI Based Size Selection. <https://www.beckman.com> [online]. © 2000-2024 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://www.beckman.com/reagents/genomic/cleanup-and-size-selection/size-selection/spriselect-protocol>
- [15] EREN, Kubra, Nursema TAKTAKOGLU a Ibrahim PIRIM. DNA Sequencing Methods: From Past to Present. *The Eurasian Journal of Medicine* [online]. 2023, 2023-01-18, **54**(Suppl), S47-S56 [cit. 2024-03-30]. ISSN 13088742. Dostupné z: doi:10.5152/eurasianjmed.2022.22280
- [15] National Library of Medicine: Basic Local Alignment Search Tool. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> [online]. 1994 [cit. 2024-04-08]. Dostupné z: https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome
- [15] Návod k použití: Mueller-Hinton agar. In: <https://www.biovendor.cz/> [online]. 2022 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: https://www.biovendor.cz/doc/2/12551/638188094330000000/N%C3%A1vod_98023_MH_Mueller-Hinton%20agar.pdf
- [15] HUDZICKI, Jan. Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol. In: <https://asm.org> [online]. 2009 [cit. 2024-04-07]. Dostupné z: <https://asm.org/getattachment/2594ce26-bd44-47f6-8287-0657aa9185ad/Kirby-Bauer-Disk-Diffusion-Susceptibility-Test-Protocol-pdf.pdf>
- [15] ZAREI-BAYGI, Ali a Adam L. SMITH. Intracellular versus extracellular antibiotic resistance genes in the environment: Prevalence, horizontal transfer, and mitigation strategies. *Bioresource Technology* [online]. 2021, **319**, 124181 [cit. 2024-04-24]. ISSN 09608524. Dostupné z: doi:10.1016/j.biortech.2020.124181
- [15] VAN BOECKEL, Thomas P, Sumanth GANDRA, Ashvin ASHOK, Quentin CAUDRON, Bryan T GRENFELL, Simon A LEVIN a Ramanan LAXMINARAYAN. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. *The Lancet Infectious Diseases* [online]. 2014, **14**(8), 742-750 [cit. 2024-04-24]. ISSN 14733099. Dostupné z: doi:10.1016/S1473-3099(14)70780-7
- [16] RAHMAN, Md. Masudur, Asmaul HUSNA, Hatem A. ELSHABRAWY, et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant Escherichia coli from chicken meat. *Scientific Reports* [online]. 2020, **10**(1) [cit. 2024-04-22]. ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-020-78367-2

- [16 Regulation (EC) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22
1] September 2003 on additives for use in animal nutrition (Text with EEA relevance).
EUR-Lex [online]. 2003 [cit. 2024-05-11]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2003/1831/oj>
- [16 GAROFALO, Cristiana, Carla VIGNAROLI, Giada ZANDRI, Lucia AQUILANTI,
2] Donatella BORDONI, Andrea OSIMANI, Francesca CLEMENTI a Francesca
BIAVASCO. Direct detection of antibiotic resistance genes in specimens of chicken
and pork meat. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2007, **113**(1), 75-
83 [cit. 2024-05-07]. ISSN 01681605. Dostupné z:
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2006.07.015
- [16 GUNDRAN, Romeo S., Paul A. CARDENIO, Marvin A. VILLANUEVA, Fredelon
3] B. SISON, Carolyn C. BENIGNO, Kwanchai KREAUSUKON, Duangporn PICHPOL
a Veerasak PUNYAPORNWITHAYA. Prevalence and distribution of blaCTX-M,
blaSHV, blaTEM genes in extended- spectrum β - lactamase- producing E. coli isolates
from broiler farms in the Philippines. *BMC Veterinary Research* [online]. 2019, **15**(1),
227 [cit. 2024-04-20]. ISSN 1746-6148. Dostupné z: doi:10.1186/s12917-019-1975-9
- [16 SEO, Kwang Won, Yeong Bin KIM, Hye Young JEON, Suk-Kyung LIM a Young Ju
4] LEE. Comparative genetic characterization of third-generation cephalosporin-resistant
Escherichia coli from chicken meat produced by integrated broiler operations in South
Korea. *Poultry Science* [online]. 2018, **97**(8), 2871-2879 [cit. 2024-04-19]. ISSN
00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps/pey127
- [16 RAFIQ, Kazi, Md Rafiqul ISLAM, Nure Alam SIDDIKY, et al. Antimicrobial
5] Resistance Profile of Common Foodborne Pathogens Recovered from Livestock and
Poultry in Bangladesh. *Antibiotics* [online]. 2022, **11**(11), 1551 [cit. 2024-05-07].
ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics11111551
- [16 OKITSU, Naohiro, Satoru KAIEDA, Hisakazu YANO, Ryuichi NAKANO, Yoshio
6] HOSAKA, Ryouichi OKAMOTO, Toshimitsu KOBAYASHI a Matsuhisa INOUE.
Characterization of ermB Gene Transposition by Tn 1545 and Tn 917 in Macrolide-
Resistant *Streptococcus pneumoniae* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*
[online]. 2005, **43**(1), 168-173 [cit. 2024-05-07]. ISSN 0095-1137. Dostupné z:
doi:10.1128/JCM.43.1.168-173.2005
- [16 ADESOJI, Ayodele. T. a Douglas R. CALL. Molecular analysis of florfenicol-resistant
7] bacteria isolated from drinking water distribution systems in Southwestern Nigeria.
Journal of Global Antimicrobial Resistance [online]. 2020, **23**, 340-344 [cit. 2024-05-
08]. ISSN 22137165. Dostupné z: doi:10.1016/j.jgar.2020.10.005
- [16 YU, Zhongjia, Marie JOOSSENS, Anne-Marie VAN DEN ABEELE, Pieter-Jan
8] KERKHOF a Kurt HOUF. Isolation, characterization and antibiotic resistance of
Proteus mirabilis from Belgian broiler carcasses at retail and human stool. *Food
Microbiology* [online]. 2021, **96** [cit. 2024-05-09]. ISSN 07400020. Dostupné z:
doi:10.1016/j.fm.2020.103724
- [16 RIDELL, Jouko a Hannu KORKEALA. Minimum growth temperatures of *Hafnia*
9] *alvei* and other Enterobacteriaceae isolated from refrigerated meat determined with a
temperature gradient incubator. *International Journal of Food Microbiology* [online].
1997, **35**(3), 287-292 [cit. 2024-05-05]. ISSN 01681605. Dostupné z:
doi:10.1016/S0168-1605(96)01248-2
- [17 SÄDE, Elina, Anna MURROS a Johanna BJÖRKROTH. Predominant enterobacteria
0] on modified-atmosphere packaged meat and poultry. *Food Microbiology* [online].

- 2013, **34**(2), 252-258 [cit. 2024-05-05]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2012.10.007
- [17] European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for
1] interpretation of MICs and zone diameters. In: <https://www.eucast.org/> [online]. 2024 [cit. 2024-04-08]. Dostupné z: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Breakpoint_tables/v_14.0_Breakpoint_Tables.pdf
- [17] JAYOL, Aurélie, Marion SALY, Patrice NORDMANN, Armelle MÉNARD, Laurent
2] POIREL a Véronique DUBOIS. Hafnia, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2017, 2017-09-01, **72**(9), 2507-2511 [cit. 2024-05-09]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkx154
- [17] SHEKHAWAT, Sandeep Singh, Niha Mohan KULSHRESHTHA, Rinki MISHRA,
3] Sudipti ARORA, Vivekanand VIVEKANAND a Akhilendra Bhushan GUPTA. Antibiotic resistance in a predominantly occurring Gram-negative bacterial community from treated sewage to assess the need for going beyond coliform standards. *Water Quality Research Journal* [online]. 2021, 2021-08-01, **56**(3), 143-154 [cit. 2024-05-09]. ISSN 1201-3080. Dostupné z: doi:10.2166/wqrj.2021.001
- [17] THOMASSEN, Gunn Merethe Bjørge, Thorben REICHE, Christine Eikås
4] TENNFJORD a Lisbeth MEHLI. Antibiotic Resistance Properties among *Pseudomonas* spp. Associated with Salmon Processing Environments. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(7), 1420 [cit. 2024-05-09]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10071420
- [17] WAUTERS, Georges, Thierry DE BAERE, Anne WILLEMS, Enevold FALSEN a
5] Mario VANEECHOUTTE. Description of *Comamonas aquatica* comb. nov. and *Comamonas kerstersii* sp. nov. for two subgroups of *Comamonas terrigena* and emended description of *Comamonas terrigena*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* [online]. 2003, 2003-05-01, **53**(3), 859-862 [cit. 2024-05-08]. ISSN 1466-5026. Dostupné z: doi:10.1099/ijs.0.02450-0
- [17] KIME, Louise, Christopher P. RANDALL, Frank I. BANDA, et al. Transient Silencing
6] of Antibiotic Resistance by Mutation Represents a Significant Potential Source of Unanticipated Therapeutic Failure. *MBio* [online]. 2019, 2019-10-29, **10**(5), e01755-19 [cit. 2024-05-12]. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.01755-19

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

16S rRNA	16S ribozomální RNA
A	Absorbance
ADO	Adonitol
AMX	Amoxicilin
ARG	Gen antibiotické rezistence
ART	Arabitol
AT	Aztreonam
AZM	Azitromycin
bXY	Xylosidasa
C	Chloramfenikol
CEL	Celobióza
CIP	Ciprofloxacin
CTX	Cefotaxim
ČOV	Čistírna odpadních vod
ddNTP	Dideoxyribonukleotidové báze
DHPS	Dihydropteorátsyntetáza
dNTP	Deoxyribonukleotidové báze
dsDNA	Dvouřetězcová DNA
DUL	Dulcitol
E	Erytromycin
EreA	Erytromycinesteráza
ESBL	Širokospektré β -laktamázy
ESL	Eskulin
EtBr	Ethidium bromid
EU	Evropská unie

FDA	Americký úřad pro kontrolu léčiv
FEP	Cefepim
GLR	β -glukuronidáza
GTP	Guanosintrifosfát
H ₂ S	Sirovodík
HLS	Streptomycin
I	Intermediární
INO	Inositol
IPM	Imipenem
KAT	Kataláza
KPC	<i>Klebsiella pneumoniae</i> karbapenemáza
LAC	Laktóza
LAra4N	4-amino-4-deoxy-L-arabinóza
LPS	Lipopolysacharid
LYS	Lysin
MAL	Malonát
MAN	Manitol
MDR	Multirezistentní bakterie
MFS	Major facilitator superfamily
MHA	Mueller-Hinton agar
MLB	Melobióza
mRNA	Messengerová ribonukleotidová kyselina
MRSA	Meticilin-rezistentní <i>Stafylococcus aureus</i>
NH ₃	Amoniak
ONP	β -galaktosidáza
ORN	Ornitin

OXI	Oxidáza
PABA	Kyselina <i>p</i> -aminobenzoová
PBP	Penicilin binding protein
PCR	Polymerázová řetězová reakce
PCR-RFLP	Polymerázová řetězová reakce-polymorfismus délky restrikčních fragmentů
RPP	Ribosomal protection proteins
RT-PCR	Polymerázová řetězová reakce v reálném čase
qPCR	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
R	Rezistentní
RAF	Rafinóza
S	Citlivý
SAL	Salicin
SCI	Simmons citrár
SOR	Sorbitol
SUC	Sacharóza
TAE pufr	Tris-acetátový pufr
TE	Tetracyklin
TRE	Trehalóza
tRNA	Transferová ribonukleotidová kyselina
URE	Ureáza
VRBL	Violet red bile agar with lactose
VRE	Vankomycin rezistentní enterokoky
WHO	Světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 100bp DNA ladder (Avantor, Litva).....	37
Obrázek 2 Detekce genu <i>blaTEM</i> u DNA izolované z kuřecího a krůtího masa.....	43
Obrázek 3 Postavení identifikovaných bakterií v nomenklatuře.....	51
Obrázek 4 Četnost výskytu antibiotické rezistence u izolovaných bakterií.....	54
Obrázek 5 Detekce genu <i>catA1</i> u izolovaných bakteriálních kmenů.....	57

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam laboratorních pomůcek, přístrojů a softwaru.....	28
Tabulka 2 Spotřební materiál.....	29
Tabulka 3 Složení Violet Red Bile Lactose Agar.....	29
Tabulka 4 Složení Mueller Hinton agar.....	29
Tabulka 5 Složení peptonové vody.....	29
Tabulka 6 Složení fyziologického roztoku.....	30
Tabulka 7 Chemikálie.....	30
Tabulka 8 Seznam antibiotických disků.....	31
Tabulka 9 Seznam použitých primerů.....	31
Tabulka 10 Složení PCR směsi.....	35
Tabulka 11 PCR program při teplotě annealingu 55-58 °C.....	35
Tabulka 12 PCR program při teplotě annealingu 50-52 °C.....	35
Tabulka 13 Výskyt ARG ve vzorcích drůbežího masa.....	43
Tabulka 14 Výskyt genotypové rezistence v rámci jednotlivých skupin/ vzorků.....	46
Tabulka 15 Celkový počet pozitivních ARG a rezistentních vzorků.....	47
Tabulka 16 Seznam identifikovaných kmenů.....	51
Tabulka 17 Určení rezistentních, intermediárních a citlivých bakterií.....	53
Tabulka 18 Výskyt ARG v bakteriálních izolátech kuřecího masa.....	57

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Průměry inhibičních zón – výsledky stanovení citlivosti na antibiotika diskovou difuzní metodou

PŘÍLOHA P I: PRŮMĚRY INHIBIČNÍCH ZÓN

Izolované kmeny	β-laktamy					Polypeptidová	Chinolony	Makrolidy		Tetracykliny	Amfenikoly	Aminoglykosidy
	IPM	FEP	AT	CTX	AMX	CT	CIP	E	AZM	TE	C	HLS
	Průměr inhibiční zóny [mm]											
<i>Hafnia alvei</i> kmen 1D	35	24,5	24,5	31,5	13,5	9	30,5	7	21	21	28	28,5
<i>Hafnia alvei</i> kmen 2D	31	19	23,5	26,5	13	9	32	11,5	32	19,5	30	27,5
<i>Kluyvera intermedia</i>	30,5	19	24	27	12	13	32	0	28	17	27,5	27
<i>Serratia fonticola</i> 1C	31	14,5	26,5	27	12	12	29	11,5	23	20,5	28	30,5
<i>Serratia fonticola</i> 2C	33,5	25	24,5	21,5	10,5	12	16	0	9	22	15	27
<i>Serratia grimesii</i>	29	21	14	28	9	14	37	6	15	18,5	28	26,5
<i>Serratia marcescens</i>	26	22	29	30,5	13	10	33,5	4,5	21	15	28	38,5
<i>Comamonas</i> sp. 1A	25,5	15,5	14,5	22	3,5	6,5	24,5	0	14,5	22	30	26,5
<i>Comamonas</i> sp. 3C	30	21,5	12	29,5	16	20,5	16	0	22	21	25,5	28,5
<i>Comamonas</i> sp. 3D	16	23,5	20	24	6,5	6,5	16	3,5	22,5	22	13	14
<i>Comamonas terrigena</i>	33	20	21	30	4	12	34	4,5	28	23,5	26,5	31,5
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	30,5	10	21,5	24,5	0	13	29	0	26,5	18	15,5	33,5