

Antibiotický rezistom u potravin živočišného původu

Bc. Veronika Ficeriová

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Veronika Ficeriová**
Osobní číslo: **T20050**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Antibiotický rezistom u potravin živočišného původu**

Zásady pro vypracování

1. Vypracujte literární rešerši o antibiotickém rezistomu, popište skupiny rezistentních genů (ARG) vyskytujících se v potravinách a vodě. Zaměřte se také na různé metody (PCR a variace, NGS, ...) studia rezistomu v potravinách, zejména živočišného původu.
2. Popište možnosti rizik přenosu antibiotické rezistence.
3. Experimentálně otestujte některé z popsaných molekulárně biologických metod studia antibiotického rezistomu na vzorcích masa z obchodní sítě a metodu optimalizujte.
4. Výsledky vyhodnoťte, diskutujte a formulujte závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] AMARASIRI, Mohan, Daisuke SANO a Satoru SUZUKI. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* [online]. 2020, 50(19), 2016-2059. ISSN 1064-3389. Dostupné z: doi:10.1080/10643389.2019.1692611
- [2] GAIRE, Tara N., Harvey Morgan SCOTT, Laura SELLERS, T. G. NAGARAJA a Victoriya V. VOLKOVA. Age Dependence of Antimicrobial Resistance Among Fecal Bacteria in Animals: A Scoping Review. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2021, 7. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2020.622495
- [3] CHEN, Zhou, Yanzeng LI, Chengsong YE, Xin HE a Shenghua ZHANG. Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during aerobic co-composting of food waste with sewage sludge. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, 784. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.146950
- [4] 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). ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923
- [5] GUALERZI, Claudio O., Letizia BRANDI, Attilio FABBRETTI a Cynthia L. PON, ed. Antibiotics: targets, mechanisms and resistance. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, [2014], 1 online zdroj (xxiv, 549 stran). Dostupné z: doi:9783527659685

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.**
Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2021**
Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

- diplomová práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému a dostupná k nahlédnutí;
- na moji diplomovou 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 – diplomovou 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 diplomové práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tj. k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové práce využít ke komerčním účelům;
- pokud je výstupem diplomové práce jakýkoliv softwarový produkt, považují 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 diplomové práci pracoval samostatně a použitou literaturu jsem citoval. V případě publikace výsledků budu uveden jako spoluautor.
- že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou obsahově totožné.

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Teoretická část diplomové práce je orientována na antimikrobiální látky obecně i se zaměřením na použití antibiotik u hospodářských zvířat, skupiny antibiotik a jejich mechanismy rezistence. Je zde popsán genetický základ antibiotické rezistence charakterizující mobilní genetické elementy i horizontální genový přenos. Antibiotický rezistom zahrnuje všechny typy genů antibiotické rezistence a jejich prekurzory. Lze jej zkoumat pomocí tradičních nebo molekulárních metod. V praktické části diplomové práce byl pomocí PCR a následné gelové elektroforózy zkoumán výskyt genů antibiotické rezistence – *blaTEM*, *tetA*, *qnrS* a *mcr-1*, *2*, *3*, *4* a *mcr-5* celkem u 28 vzorků chlazeného nebaleného kuřecího masa zakoupeného v maloobchodní síti ve Zlíně. K vytvoření vhodného protokolu PCR pro konkrétní gen/geny byly provedeny optimalizace pomocí gradientové PCR. Žádný z výše zmíněných genů rezistence nebyl u vzorků kuřecího masa detekován. Pro zvýšení záchytu genů rezistence u kuřecího masa lze navrhnout zvýšení počtu testovaných vzorků, optimalizaci PCR metody či případné rozšíření portfolia metod studia antibiotického rezistomu.

Klíčová slova: kuřecí maso, antibiotický rezistom, polymerázová řetězová reakce

ABSTRACT

The theoretical part of the diploma thesis is focused on antimicrobial substances in general and with a focus on the use of antibiotics in livestock and poultry, groups of antibiotics and their mechanisms of resistance. Furthermore, the genetic basis of antibiotic resistance characterising mobile genetic elements and horizontal gene transfer is described here. Antibiotic resistome includes all types of antibiotic resistance genes and their precursors. It can be examined using traditional or molecular methods. In the practical part of the diploma thesis, the occurrence of antibiotic resistance genes – *blaTEM*, *tetA*, *qnrS* and *mcr-1*, *2*, *3*, *4* a *mcr-5* was examined by PCR and agarose gel electrophoresis in a total of 28 samples of chilled unpackaged chicken meat purchased in a retail network in Zlín. Gradient PCR optimizations were performed to create a suitable PCR protocol for a particular gene/genes. None of the above-mentioned resistance genes have been detected in chicken samples. To increase the capture of resistance genes in chicken meat, it is possible to increase the number of tested samples, optimize the PCR method or possibly expand methods for the study of antibiotic resistome.

Keywords: poultry, antibiotic resistome, polymerase chain reaction

PODĚKOVÁNÍ

Chtěla bych poděkovat vedoucí mé diplomové práce Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D. za její vedení, cenné rady a připomínky. Dále také všem pracovníkům a studentům v laboratoři mikrobiologie a molekulární biologie. V neposlední řadě děkuji své rodině za podporu po celou dobu studia.

PROHLÁŠENÍ

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	12
1.1 PRE-ANTIBIOTICKÁ ÉRA	12
1.2 ANTIBIOTICKÁ ÉRA	13
1.3 ROZVOJ A PREVENCE ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	14
1.4 POUŽITÍ ANTIBIOTIK U HOSPODÁŘSKÝCH ZVÍŘAT	16
2 SKUPINY ANTIBIOTIK A MECHANISMY REZISTENCE	20
2.1 AMINOGLYKOSIDY	21
2.2 β -LAKTAMY	22
2.3 GLYKOPEPTIDY	22
2.4 CHINOLONY	23
2.5 CHLORAMFENIKOL	24
2.6 POLYMYXINY	24
2.7 SULFONAMIDY	25
2.8 TETRACYKLINY	25
3 GENETICKÝ ZÁKLAD ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	26
3.1 MOBILNÍ GENETICKÉ ELEMENTY	27
3.2 MECHANISMY HORIZONTÁLNÍHO GENOVÉHO PŘENOSU	29
3.2.1 Konjugace	30
3.2.2 Transformace.....	30
3.2.3 Transdukce	31
3.3 INTEGRATIVNÍ A KONJUGATIVNÍ ELEMENTY	31
3.4 SYSTÉMY TOXIN-ANTITOXIN	32
4 ANTIBIOTICKÝ REZISTOM	33
4.1 MIKROBIOM KUŘECÍHO MASA	34
4.2 ANTIBIOTICKÝ REZISTOM KUŘECÍHO MASA.....	36
4.3 METODY STUDIA REZISTOMU V POTRAVINÁCH	37
II PRAKTICKÁ ČÁST	40
CÍL PRÁCE	41
5 MATERIÁL A METODIKA	42
5.1 MATERIÁL	42
5.1.1 Vzorčky potravin	42
5.1.2 Použité kmeny	42
5.1.3 Přístroje a pomůcky.....	42

5.1.4	Chemikálie	44
5.1.5	Seznam použitých primerů.....	45
5.2	METODY.....	45
5.2.1	Izolace DNA z drůbežího masa.....	45
5.2.2	Izolace DNA z bakteriálních kmenů	46
5.2.3	Měření koncentrace a čistoty DNA.....	47
5.2.4	Disková difuzní metoda	48
5.2.5	Polymerázová řetězová reakce.....	49
5.2.6	Gelová elektroforéza	50
6	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	52
6.1	IZOLACE DNA ZE VZORKŮ KUŘECÍHO MASA.....	52
6.2	STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE FENOTYPOVOU METODOU.....	53
6.3	DETEKCE GENŮ REZISTENCE	56
	ZÁVĚR	64
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	66
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	86
	SEZNAM OBRÁZKŮ	89
	SEZNAM TABULEK.....	90
	SEZNAM PŘÍLOH	91

ÚVOD

Antimikrobiální rezistence je jednou z nejnaléhavějších výzev, kterým svět v současnosti čelí, a představuje hrozbu pro zdravotní péči i bezpečnost potravin. Antimikrobiální látky hrají zásadní roli při zlepšování zdraví a zvyšování efektivity produkce hospodářských zvířat v intenzivních chovech. Od 50. let 20. století se antimikrobiální látky používají v chovu dobytka a drůbeže k prevenci i léčbě nemocí, ke zlepšení účinnosti konverze krmiva a podpoře růstu. Navzdory jejich výhodám přibývá důkazů o tom, že rozsáhlé používání antimikrobiálních látek u zvířat určených k produkci potravin vede k selekci bakterií pro antimikrobiální rezistenci u hospodářských zvířat. Selektce bakterií nejen zvyšuje morbiditu a mortalitu hospodářských zvířat, ale také zvyšuje riziko přenosu rezistentních bakterií na člověka. Geny antimikrobiální rezistence bakterií v trávicím traktu hospodářských zvířat mohou být přeneseny na bakterie, které mohou přijít do kontaktu s lidmi buď přímo nebo z prostředí.

V mnoha evropských zemích bylo poté zakázáno používání antimikrobiálních látek u hospodářských zvířat pro neterapeutické účely. Kromě těchto strategií bylo vyvinuto několik alternativ (použití bakteriofágů, antimikrobiálních peptidů nebo vakcín), kterými mohou být nahrazeny antimikrobiální látky u zvířat určených k produkci potravin. I když jsou tyto strategie zásadní pro omezení prevalence antimikrobiální rezistence u zvířat určených k produkci masa, lze stále detekovat geny antibiotické rezistence v systémech živočišné výroby i přes to, že nebyly podávány žádné antimikrobiální látky.

V posledních letech, s rozvojem technik sekvenování nové generace, umožnily studie charakterizovat sbírku genů antibiotické rezistence (rezistom) v různých prostředích, včetně vody, půdy, trávicího traktu lidí i hospodářských zvířat. Tradičně se k detekci antibiotické rezistence používají přístupy založené na kultivaci a testování antimikrobiální citlivosti.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou substance aktivní proti všem mikroorganismům a jsou pravděpodobně jednou z nejúspěšnějších forem chemoterapie v historii medicíny. Značně přispěla ke kontrole infekčních chorob, jež byly hlavní příčinou nemoci a úmrtnosti lidské populace. Samotná historie antimikrobiálních látek může být rozdělena na pre-antibiotickou a antibiotickou éru (Aminov, 2010).

1.1 Pre-antibiotická éra

Již ve starověké súdánské Núbii (350 – 550 n. l.) byly nalezeny v lidských kosterních pozůstatcích stopy tetracyklinu (Bassett et al., 1980; Nelson et al., 2010). Dalším příkladem byla studie histologických vzorků odebraných z části stehenních kostí koster z pozdního římského období z Egypta. Tyto vzorky vykazovaly přítomnost tetracyklinu pocházejícího ze stravy v této době (Cook et al., 1989). Tetracykliny jsou známé díky své zabudovatelnosti do minerální části kostí i zubní skloviny, a tím poskytují trvalé markery po expozici tetracykliny (Aminov, 2010).

Dohledatelnost užití jiných antimikrobiálních látek u starověké populace je mnohem obtížnější. Jedním z příkladů byly také antibiotické vlastnosti červených půd v Jordánsku, které se používaly (a dodnes používají jako levná alternativa k farmaceutickým produktům) k léčbě kožních infekcí a vedly k objevu mnoha antibiotika produkujících bakterií v těchto půdách (Falkinham et al., 2009). Konkrétně se jednalo o aktinomycety produkující polypeptidové antibiotikum aktinomycin (Sobell, 1985).

Dalším příkladem jsou prostředky používané v tradiční čínské medicíně (TCM, z angl. Traditional Chinese Medicine). Mezi nejznámější patří objev silného antimalarika qinghaosu (artemisinin), který byl extrahován v 70. letech 20. století z rostlin rodu *Artemisia* (pelyněk), používaný čínskými bylinkáři tisíce let jako lék na mnoho nemocí (Cui a Su, 2009). V řadě dalších bylin používaných v TCM se skrývá potenciál k obohacení současně využívaných antimikrobiálních látek (Aminov, 2010).

Zároveň ale mohly tyto léky přispět k akumulaci genů rezistence v lidské populaci. Historii genů antimikrobiální rezistence lze odhalit pomocí fylogenetické rekonstrukce a tato analýza naznačila přítomnost genů rezistence k určitým třídám antibiotik v přírodě dlouho před antibiotickou érou (Aminov a Mackie, 2007; Kobayashi et al. 2007).

1.2 Antibiotická éra

Začátek moderní éry antibiotik je obvykle spojován se jmény Paul Ehrlich a Alexander Fleming. Ehrlichova myšlenka „kouzelné střely“, která selektivně cílí pouze na mikroby způsobující onemocnění, byla založena na pozorování nově dostupného anilinu a dalších syntetických barviv schopných obarvit konkrétní mikroby. Ehrlich tvrdil, že lze syntetizovat chemické sloučeniny schopné účinkovat výhradně na parazita ukrytého v organismu. Tato myšlenka ho přivedla v roce 1904 k zahájení rozsáhlého screeningu s cílem najít lék proti pohlavní nemoci syfilis, která byla v té době endemická a téměř nevyléčitelná. V roce 1909 narazili na organickou sloučeninu arsenu, jež vyléčila králíky infikované syfilis (Ehrlich a Hata, 1910). Navzdory zdlouhavému injekčnímu postupu a vedlejším účinkům byl lék uveden na trh pod názvem Salvarsan a spolu s rozpustnějším a méně toxickým Neosalvarsanem si do objevu penicilinu uchovaly status nejčastěji předepisovaného léku (Mahoney et al., 1943).

Mezi další léčiva patřil například Prontosil (sulfonamido-chrysoidin), který byl syntetizován chemiky Josefem Klarerem a Fritzem Mietzsem a testován na antibakteriální aktivitu Gerhardem Domagkem (Domagk, 1935). Protože byl Prontosil pouhým prekurzorem aktivního léčiva a jeho aktivní část (sulfanilamid) se již několik let používala v chemickém průmyslu jako barvivo, nemohla být jeho výroba patentována. Výroba sulfanilamidu byla levná a snadno modifikovatelná, a tím začala masová výroba sulfonamidových derivátů, což mohlo být jedním z faktorů, proč je rezistence na sulfonamidy jednou z nejrozšířenějších (Aminov, 2010).

Ačkoliv byly antibakteriální vlastnosti plísní známy již od starověku, mezi nejdůležitější událost spojenou s antibiotiky patří objev penicilinu Alexanderem Fleminglem v roce 1929. Alexander Fleming kultivoval na Petriho miskách stafylokoky a po nějakém čase si všimnul narostlé plísně rodu *Penicillium*, v jejímž okolí nerostly zmíněné bakterie. Po svém pozorování se snažil získat zájem chemiků o řešení přetrvávajícího problému s čištěním a stabilizací penicilinu. V roce 1940 se to povedlo oxfordskému týmu vedenému Howardem Floreyem a Ernestem Chainem (Chain et al., 2005).

Období 50. až 70. let 20. století je nazýváno zlatou érou objevů nových tříd antibiotik a od té doby nebyly objeveny žádné nové třídy. Proto je hlavním přístupem k vývoji nových antibiotik modifikace stávajících (Chopra et al., 2002). I přes to, že tento přístup stále

úspěšně poskytuje účinné antimikrobiální látky, je třeba si uvědomit, že dříve či později získají bakterie rezistenci také vůči těmto modifikacím (Aminov, 2010).

1.3 Rozvoj a prevence antibiotické rezistence

Před rozsáhlým používáním penicilinu naznačovaly některé výzkumy tomu, že ho mohou bakterie enzymaticky degradovat (Abraham a Chain, 1940). Jedna z dřívějších studií dospěla k závěru, že syfilis byl léčen arzenikem po dobu asi 40 let a nebyl pozorován náznak zvýšeného výskytu rezistence, a proto doufali, že rozšířené používání penicilinu k ní také nepovede (Rollo et al., 1952). Bohužel to již neplatí pro mnoho patogenních bakterií, včetně zástupců z čeledi *Enterobacteriaceae*, které se staly odolnými nejen vůči původnímu penicilinu, ale i polysyntetickým penicilinům, cefalosporinům a novějším karbapenemům (Kumarasamy et al., 2010). Dalším problémem byl také rozvoj multirezistentních bakterií, které se vyznačují rezistencí k více antibiotikům, způsobujících infekce s vysokou úmrtností (Aminov, 2010).

Rezistence na antibiotika může být obecně rozdělena na rezistenci primární, která je geneticky podmíněná (bakterie je rezistentní bez ohledu na předchozí kontakt s antibiotikem) a rezistenci sekundární (vzniká během léčby po podání antibiotika, kdy se selektují rezistentní kmeny). K sekundární rezistenci patří také přenos genetického materiálu konjugací, transformací či transdukci.

Existuje spousta studií popisujících mechanismy rezistence vůči antibiotikům a tyto mechanismy lze klasifikovat jako související s cílovým místem anebo samotným antibiotikem. Cílová místa mohou být chráněna modifikací (mutace je činí necitlivými vůči působení antibiotik – například mutace v RNA polymeráze), modifikována enzymem (například metylace adeninového zbytku při tvorbě podjednotky 23S rRNA), nahrazena (například ribozomálními ochrannými proteiny), chráněna na buněčné nebo populační úrovni (tvorba ochranné bariéry například sekrecí velkého množství exopolysacharidů). Antimikrobiální látka může být buď modifikována tak, že ztrácí účinnost; zničena anebo vypumpována z buňky (efluxní pumpy) (Aminov, 2010).

Nedávné studie v oblasti antimikrobiálních látek a rezistence naznačují, že ne všechny interakce antibiotika s bakteriemi lze vysvětlit výše zmíněnými koncepty. Byl popsán nový mechanismus rezistence používající koncept „altruismu“, který probíhá na úrovni populace/systému (Lee et al., 2010). Altruismus funguje pro makroorganismy a zdá se být použitelný i pro mikroorganismy, kdy malý počet rezistentních bakterií poskytuje ochranu

pro buňky citlivé na antibiotika, a tím zajišťuje přežití celé populace pod útokem antimikrobiální látky. Navíc v biofilmu je ochrana před antibiotiky nabízena všem bakteriím bez ohledu na příbuznost (Aminov, 2010).

Současný stav v oblasti antimikrobiálních látek, rezistence a chemoterapie se již neomezuje na klinickou mikrobiologii, ale problém se stal komplexním, sjednocujícím mikrobiologii, ekologii, zdravotnictví, pedagogiku, zákonodárné orgány, zemědělství, farmaceutický průmysl i širokou veřejnost (Aminov, 2010).

Možnosti léčby, u již existujících nebo nově objevených obtížně léčitelných bakteriálních infekcí způsobených rezistentními bakteriemi, jsou omezené a mají za následek vysokou morbiditu a mortalitu (Aminov, 2010). Odhaduje se, že infekce způsobené rezistentními bakteriemi zapříčiní do roku 2050 celosvětově 10 milionů úmrtí (Amarasiri et al., 2020). Ačkoliv existují některé potenciální alternativy k léčbě antibiotiky, například pasivní imunizace (Keller a Stiehm, 2000) nebo fágová terapie (Levin a Bull, 2004; Monk et al., 2010), majorita stále spoléhá na objev a vývoj novějších, účinnějších antimikrobiálních látek. Většina antibiotik ze zlaté éry byla izolována z určitého počtu ekologických nik a taxonomických skupin, především z půdních bakterií *Actinomyces*. Mezi možné přístupy objevu nových antibiotik patří prozkoumání jiných ekologických nik, například moře (Hughes a Fenical, 2010; Rahman et al., 2010), propůjčení si antimikrobiálních peptidů a komponent z rostlin a zvířat (Hancock a Sahl, 2006), mimikování přírodních lipopeptidů bakterií a hub (Makovitzki et al., 2006), přístup k nekultivované části mikrobioty prostřednictvím metagenomiky (MacNeil et al., 2001), nebo cesta kompletní syntézy (Aminov, 2010).

Některé léky původně navržené pro jiný účel mohou najít uplatnění jako antimikrobiální látky. Například BPH-652, fosfosulfát, který byl dříve testován na snižování cholesterolu u lidí, zároveň inhibuje důležitý enzym podílející se na virulenci bakterie *Staphylococcus aureus* a tím jej lze považovat za možný lék kontrolující MRSA (methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*) (Liu et al., 2008).

Mezi potenciální cíle zásahu do bakteriálního metabolismu patří biosyntéza mastných kyselin (Su a Honek, 2007), buněčné dělení (Lock a Harry, 2008), biosyntéza aminoacyl-tRNA (Schimmel et al., 1998), quorum sensing (Njoroge a Sperandio, 2009), bakteriální dvoukomponentová signální transdukce (Gotoh et al., 2010) a protonová hybná síla (Diacon et al., 2009). Samotné mechanismy antibiotické rezistence, jakou jsou efluxní

pumpy nebo β -laktamázy mohou být také zaměřeny na obnovu účinnosti antibiotik (Lomovskaya a Bostian, 2006; Bush a Macielag, 2010).

Také strategie zaměřená nejen na cíl může pomoci vytvořit nové antibakteriální terapie (Kohanski, et al., 2010). Léčba kombinující antibiotika s antibiotiky obohacenými fágů prokázala zajímavý potenciál (Lu a Collins, 2009).

Hlavním problémem, se kterým se setkáváme u antibiotické terapie je to, že po zavedení nového antibiotika na něj vzniká rezistence, a proto pokračuje pomyslný závod mezi objevem a vývojem nových antimikrobiálních látek a bakteriemi, jež budou reagovat na tento selektivní tlak vznikem mechanismů rezistence. Existuje mnoho faktorů, které přispívají ke vzniku a šíření antibiotické rezistence (Aminov, 2010).

Významným faktorem je používání antibiotik lidskou populací, protože úroveň infekcí způsobených rezistentními bakteriemi silně koreluje s úrovní spotřeby antibiotik (Goossens et al., 2005). Pacienti mohou například vyžadovat předpis antibiotik, pokud nejsou potřeba (například při virových infekcích), a studie potvrzují, že nedostatek znalostí o antibiotické rezistenci pozitivně koreluje s vyšší prevalencí rezistence (Grigoryan et al., 2007). Dále je důležité dodržování délky užívání léků, což může být u náročnějších dlouhodobých infekcí, jako je tuberkulóza, obtížné. Faktorem přispívajícím k šíření rezistence může být praxe předepisování antibiotik založená na předchozích zkušenostech ze strany doktora (což tvoří většinu vydaných receptů). Vývoj expresních testů ABR (antibiotická rezistence, z angl. antibiotic resistance) by pomohl zahájit nejúčinnější dostupnou terapii, která by se vyhnula problémům spojeným s přítomným rezistentním patogenem (Aminov, 2010).

Jiná je situace v zemích, kde je právě prodej antimikrobiálních látek regulován nedostatečně a antibiotika jsou dostupná bez lékařského předpisu. Samoléčba postrádá atributy úspěšné léčby, jako je správná diagnóza, vhodný výběr antibiotik, správné použití, jeho dodržování a sledování účinnosti léčby (Aminov, 2010).

1.4 Použití antibiotik u hospodářských zvířat

Intenzivní chov hospodářských zvířat do značné míry závisí na používání antibiotik (Van Boeckel et al., 2015). Antibiotika se u zvířat nepoužívají pouze terapeuticky k léčbě infekčních onemocnění a prevenci pooperačních infekcí, ale mohou se také přidávat v nízkých koncentracích do krmiva pro zvířata jako stimulanty růstu nebo jako profylaxe pro zvýšení produktivity a zisku farmy (Hao et al., 2014; Turnidge, 2004). Enterálním

onemocněním (např. průjem po odstavení) lze obvykle předejít podáváním subterapeutických dávek antibiotik (Hao et al., 2014; Turnidge, 2004). Například nízké dávky tetracyklinů se běžně podávaly, a nyní stále ještě v některých zemích podávají, ke snížení morbidity a podpoře zvýšení hmotnosti zvířat (Hao et al., 2014). Taková neterapeutická spotřeba antibiotik je sice ekonomicky výhodná, ale obvykle se podává prostřednictvím krmiva celé skupině zvířat (Zhao et al., 2021).

Švédsko bylo prvním průkopníkem zákazu antibiotického růstového stimulantu (AGP, z angl. antibiotic growth promoter). Zákaz AGP ve Švédsku (1986), Finsku (1996) a Dánsku (1998) (Levy, 2014) následovalo v roce 2006 Spojené království a další země Evropské unie (EU), což vedlo k nižší spotřebě antibiotik (zejména tetracyklinu a kolistinu) (Cogliani et al., 2011). Celosvětová spotřeba antibiotik u zvířat však dramaticky roste s lidskou poptávkou po potravinách živočišného původu. S nedostatkem regulace nebo zásahu v převážně rozvojových zemích bude spotřeba pravděpodobně nadále růst kvůli posunu z extenzivního zemědělství k rozsáhlým průmyslovým systémům v zemích se středními příjmy (Van Boeckel et al., 2015). Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD, z angl. Organization for Economic Cooperation and Development) předpověděla 67% nárůst celosvětové spotřeby antibiotik u zvířat (z 63 151 tun antibiotik na 105 596 tun) v období 2010 až 2030, přičemž Čína a Spojené státy se na celkovém růstu budou podílet asi ze 40 % (Van Boeckel et al., 2015).

Na základě konceptu Jedno zdraví (One health) byl v roce 2015 Světovou organizací pro zdraví zvířat (OIE, z angl. World Organization for Animal Health) zahájen globální akční plán o antimikrobiální rezistenci a více než 100 zemí vytvořilo své národní akční plány proti antimikrobiální rezistenci u zvířat (Góchez et al., 2019). Čínská vláda zveřejnila v roce 2017 „Národní akční plán pro kontrolu bakterií živočišného původu rezistentních vůči antibiotikům (2016–2020)“ s integrovaným konceptem Jedno zdraví (Xiao a Li, 2016). Před tímto krokem směřovala v Číně téměř polovina roční produkce antibiotik v celkovém množství 105 000 tun do živočišného průmyslu (Collignon a Voss, 2015). Intenzivní chov hospodářských zvířat v Číně pravděpodobně učinil z čínských farem jedno z největších ohnisek genů antibiotické rezistence na celém světě (Van Boeckel et al., 2019).

Spotřeba antibiotik se v jednotlivých zemích liší – v Jižní Koreji bylo v roce 2007 hlášeno relativně časté používání antibiotik pro živočišnou výrobu (0,91 kg na tunu hospodářských zvířat) ve srovnání s Japonskem (0,35 kg/t), USA (0,14 kg/t), Novým Zélandem (0,04 kg/t), Dánskem (0,04 kg/t) a Švédskem (0,03 kg/t) (Won-Sup, 2007). Pro měření spotřeby

antibiotik u zvířat byly použity různé metriky, a proto je potřeba standardizovat definici dávků, aby bylo možné lépe informovat o účinnosti kroků konkrétních zemí při řešení globální krize antimikrobiální rezistence (Cuong et al., 2018). Za tímto účelem vytvořila OIE globální databázi antibiotik určených k použití u zvířat a zveřejnila metodiku sběru dat v roce 2019 pro globální rozvoj monitoringu a dozoru (Góchez et al., 2019).

Spotřeba antibiotik není u živočišných druhů jednotná. Nedávná revize v roce 2018 shrnula používání antibiotik pro živočišnou výrobu v zemích s nízkými a středními příjmy a zdůraznila, že dávkování antibiotik bylo nejvyšší u kuřat (138 dávek/1000 zvířecích dnů), následováno prasaty (40) a dojným skotem (10) (Van Boeckel et al., 2015). Ve srovnání s Dánskem připadalo více než 80 % spotřeby antibiotik u zvířat na prasata a skot, pouze 1 % na kuřata (DANMAP, 2016). V jedné metagenomické studii analyzovali vzorky stolice ze 181 prasat a 178 drůbežích farem z devíti evropských zemí a zjistili vyšší výskyt genů u prasat, zatímco drůbeží rezistomy byly zase rozmanitější (Munk et al., 2018).

Pro hospodářská zvířata se používají antibiotika úzkospektrální (makrolidy, penicilin G) i širokospektrální (většina aminoglykosidů, sulfonamidů a tetracyklinů). Světová zdravotnická organizace (WHO, z angl. World Health Organization) sestavila seznam kriticky důležitých antibiotik používaných v boji proti životu ohrožujícím rezistentním infekcím u lidí. Mezi tato antibiotika patří několik aminoglykosidů, tetracyklinů, chinolonů, makrolidů a karbapenemů, z nichž byly některé schváleny pro použití ve veterinárních léčivech nebo jako stimulanty růstu (např. aminoglykosid amikacin, makrolid tylosin, kyselina nalidixová z třídy chinolonů) (Collignon et al., 2009). Použití těchto antibiotik u zvířat může potenciálně zvýšit možnost výskytu rezistentních lidských patogenů. Nedávno bylo na čínských akvakulturních farmách odhaleno aplikování více než dvacet různých antibiotik včetně chloramfenikolu, ciprofloxacinu a erythromycinu, které se používají pro klinické účely u lidí (Liu et al., 2017). V Bangladéši bylo nejméně sedm různých antibiotik včetně sulfadiazinu, erythromycinu a trimethoprimu podáváno s krmivem (přibližně 70 %) nebo aplikováno přímo (23 %) do akvakultury ryb a měkkýšů za účelem léčby onemocnění a jako stimulanty růstu (Ali et al., 2016). Je proto potřeba zdůraznit, že v rozvojových zemích je používání antibiotik u hospodářských zvířat málo monitorováno a intervenováno, v důsledku čehož může dojít k používání typů antibiotik nepovolených pro zvířata (Zhao et al., 2021).

Zdá se, že používání antibiotik u zvířat podporuje výskyt rezistentních bakterií v chovech zvířat. Antibiotika v krmivu mohou selektovat geny rezistence k antibiotikům a mobilní

genetické elementy ve střevních mikrobiomech zvířat (Ghosh a LaPara, 2007; Xiao et al., 2016; Yazdankhah et al., 2014; Zhao et al., 2018). Existuje však diskuse, zda nízká koncentrace stimulantů růstu zvířat představuje významné riziko zvyšující se rezistence lidských patogenů (Ashbolt et al., 2013; Turnidge, 2004). Zastánci AGP tvrdí, že u takto nízkých dávek antibiotik nemusí selekce rezistentních genů ani nastat (nebo je účinek minimální) a výhody spojené s AGP převažují nad riziky (Turnidge, 2004). Odpůrci se domnívají, že určité části antibiotik podávaných zvířatům jsou vylučovány jako bioaktivní molekuly ve zvířecích výkalech spolu s vybranými geny rezistence, rezistentními bakteriemi a mobilními genetickými elementy (Berendonk et al., 2015). V důsledku toho se rezidua antibiotik dostanou do životního prostředí a mohou vyvolat selekční tlak na místní bakterie a způsobit environmentální vývoj a přenos genů rezistence na lidské patogeny (Ashbolt et al., 2013; Chee-Sanford et al., 2009).

Nedávné studie naznačují, že rozptýlení rezistentních genů/bakterií z ohnisek, včetně zvířecích farem, významněji přispívá k environmentálnímu šíření genů rezistence než environmentální selekce in situ (Brandt et al., 2015; Karkman et al., 2019; Zhu et al., 2017). Celkem 74 % předchozích publikací poskytlo důkazy o přenosu antimikrobiální rezistence mezi zvířaty a člověkem, z toho 18 % naznačovalo přenos ze zvířat na člověka, zatímco u zbývajících 56 % studií nebylo možné určit směr přenosu (Muloj et al., 2018).

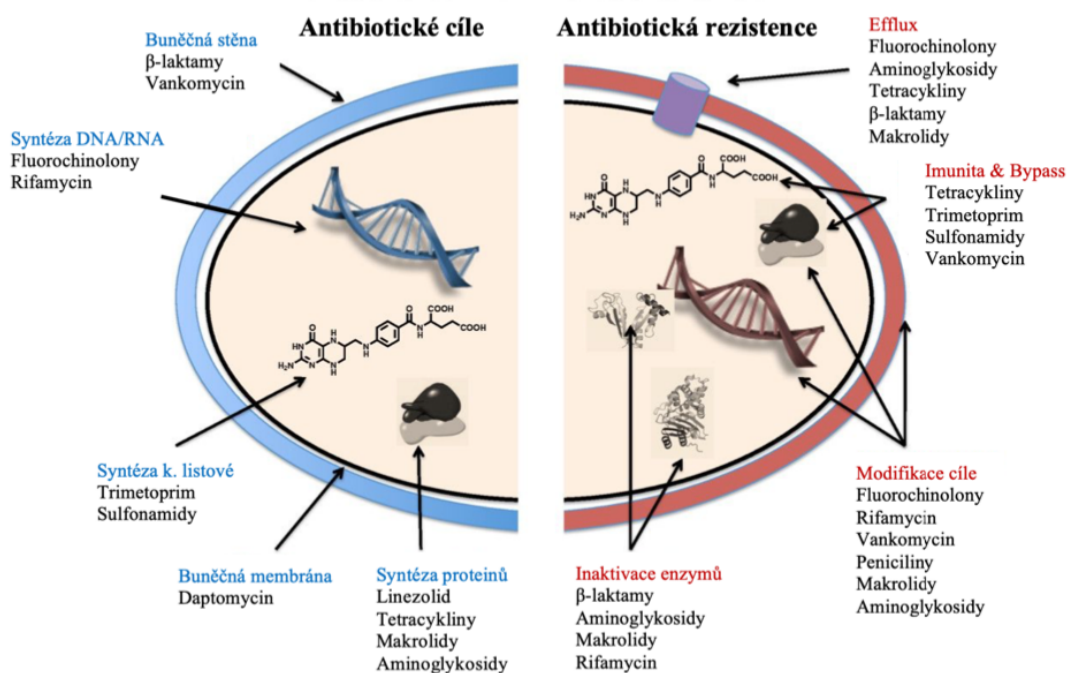
Farmy se zvířaty určenými k produkci potravin jsou považovány za ohniska rozvoje a šíření antimikrobiální rezistence, kdy je zvířecí mikrobiom bohatým rezervoárem genů antibiotické rezistence (Argudín et al., 2017). Geny rezistence na tetracyklin a sulfonamidy byly nejčastěji hlášeny na farmách zvířat z různých zemí a obsáhle zkoumány pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakci (Ghosh a LaPara, 2007; Olonitola et al., 2015). V nedávno publikované studii bylo shromážděno 901 publikovaných dat o genech antibiotické rezistence z let 2000 až 2018 ze zemí Asie, Afriky a Ameriky s nízkými a středními příjmy (Van Boeckel et al., 2019). U těchto zemí byl popsán více než 50% nárůst rezistence (Jia et al., 2017). Antibiotika a rezistentní bakterie se mohou dostat do životního prostředí také prostřednictvím zemědělského odpadu, hnoje a biopevných látek (Chen et al., 2021).

2 SKUPINY ANTIBIOTIK A MECHANISMY REZISTENCE

Slovo antibiotikum se skládá z termínu *anti* (z řec. proti) a *bios* (z řec. život) a odkazuje na substanci, jež působí proti bakteriím. Původně se tento termín používal u substancí (např. penicilin, streptomycin) produkovaných nebo odvozených z jiných živých organismů, jako jsou bakterie nebo houby se schopností ukončit (baktericidní) či zastavit (bakteriostatické) růst bakterií. Časem se tento termín začal užívat většinou lidí pro všechny léky používané v boji proti bakteriálním infekcím. Další substance (ocet, chlór, alkohol, kovy – př. měď) mají antibakteriální aktivitu, ale k antibiotikům se neřadí (Wilson, 2019).

Antibiotika se běžně používají při léčbě a prevenci infekcí. Dle struktury a stupně afinity k cílovému místu se dělí na peniciliny, cefalosporiny, tetracykliny, aminoglykosidy, makrolidy, sulfonamidy, chinolony, diaminopyrimidiny, polymyxiny a karbapenemy (Sengupta et al., 2013; Bi et al., 2015; Liu et al., 2016).

Antibiotika, která jsou specifická svým účinkem na různé bakteriální druhy, cílí na (Obr. 1): (i) ovlivnění syntézy buněčné stěny (β -laktamy), (ii) mechanismus syntézy proteinů prostřednictvím interakce s ribozomálními podjednotkami (tetracyklin, chloramfenikol, aminoglykosidy, atd.), (iii) narušení mechanismu nukleových kyselin (Rifampicin, fluorochinolony), (iv) narušení metabolických drah (analogy kyseliny listové, sulfonamidy) a (v) narušení struktury bakteriální membrány (polymyxiny; Walsh, 2010) (Sultan et al., 2018).



Obrázek 1. Přehled antibiotických cílů a mechanismů antibiotické rezistence (Wright, 2010; upraveno)

2.1 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy byly poprvé zavedeny jako antibiotika ve 40. letech 20. století a jsou stále celosvětově používány (Gualerzi et al., 2013). Mezi členy této třídy patří například amikacin, arbekacin, gentamicin, netilmicin, tobramycin, streptomycin (Sultan et al., 2018). Aminoglykosidy se získávají při fermentaci *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Bacillus* a nevratně inhibují syntézu proteinů a buněčné membrány. Jsou především aktivní vůči gramnegativním bakteriím. Chemicky se skládají z aminocukrů připojených přes glykosidické vazby k jádru, kterým může být streptamin, 2-deoxystreptamin nebo streptidin. Bylo objeveno několik přírodních i semisyntetických derivátů s cílem zlepšit problémy s toxicitou (zejména ototoxicitou a nefrotoxicitou) a bojovat proti zvýšené rezistenci. Studie zdůraznily důležitost počtu a polohy aminoskupiny pro antibakteriální aktivitu. Nedávno se zájem o tuto skupinu opět zvýšil kvůli jejich spektru aktivity a pozorované synergické aktivitě s jinými třídami antibiotik (Houghton et al., 2010).

Hlavní mechanismus rezistence na aminoglykosidy zahrnuje modifikaci enzymů. Podle druhu modifikace jsou klasifikovány tři hlavní třídy proteinů: AAC (acetyltransferázy), ANT (nukleotidyltransferázy nebo adenyltransferázy) a APH (fosfotransferázy) (Kotra et al., 2000; Ramírez a Tolmanský, 2010).

2.2 β -laktamy

β -laktamová antibiotika, objevená ve 30. letech 20. století a produkovaná *Penicillium*, jsou širokou třídou antibiotik, jež se vyznačuje přítomností β -laktamového kruhu. Na základě substitucí centrálního β -laktamového jádra lze rozlišit podtřídy β -laktamů. Peniciliny včetně penamů, karbapenamů a oxopenamů obsahují nasycený pentacykl, penemy a karbapenemy nenasycený pentacykl a cefalosporiny včetně cefemů, karbacefemů a oxacefemů nenasycený hexacykl (Gualerzi et al., 2013). Mezi karbapenemy řadíme například ertapenem, faropenem, imipenem, meropenem (Sultan et al., 2018). Všechny β -laktamy působí na biosyntézu buněčné stěny a cílí na enzymy proteinu vázajícího penicilin (PBP, z angl. penicillin binding protein), které se účastní biosyntézy peptidoglykanu. U cefalosporinů aktivních především vůči grampozitivním bakteriím vznikly díky modifikacím postranního řetězce nové generace semisyntetických cefalosporinů, jež mají výrazně lepší gramnegativní antimikrobiální vlastnosti. Mezi baktamy je jediný široce klinicky používaný aztreonam. Kombinací β -laktamu s inhibítorem β -laktamázy vznikla antibiotika, mezi která řadíme například kyselinu klavulanovou, sulbaktam nebo tazobaktam (Gualerzi et al., 2013).

Rezistence bakterií se získává produkcí β -laktamáz, jako jsou širokospektré β -laktamázy (ESBL, z angl. extended spectrum β -lactamases), ESBL geny (*blaCTX-M*, *blaSHV*, *blaTEM*), plazmidy zprostředkované enzymy AmpC a β -laktamázy hydrolyzující karbapenem (karbapenemázy). Nicméně například *Stenotrophomonas maltophilia* mají endogenní metalo β -laktamázy (MBL) L1, díky kterým jsou odolné vůči karbapenemům (Sánchez, 2015). Rezistence ke karbapenemům mezi grampozitivními bakteriemi se získává mutacemi v penicilin vázajících proteinech (PBPs), avšak u gramnegativních bakterií je nižší penetrace léku dosažena snížením exprese purinových proteinů vnější membrány (Bonomo a Szabo, 2006). Trojstranná efluxní pumpa vylučující karbapenemy z periplazmatického prostoru také přispívá k rezistenci (Poirel et al., 2007; Walsh, 2010).

2.3 Glykopeptidy

Glykopeptidy mají strukturu makrocyclických peptidů s rozptýlenými přemostěnými aromatickými skupinami a sacharidovými postranními řetězci spojenými glykosidickými vazbami. Mezi zástupce této skupiny patří například teikoplanin nebo vankomycin, které účinkují na jednotky peptidoglykanu (Sultan et al., 2018). Vankomycin zavedený do klinické praxe v roce 1959 byl izolován ze *Streptomyces orientalis* (dnes *Amycolatopsis orientalis*). Glykopeptidová antibiotika jsou omezená na léčbu infekcí způsobených grampozitivními

bakteriemi, protože nemohou proniknout vnější membránou gramnegativních bakterií (Gualerzi et al., 2013). Vankomycinová rezistence vznikla produkcí modifikovaného peptidoglykanového prekurzoru d-Ala-d-Lac (VanA, VanB, VanD) nebo d-Ala-d-Ser (VanC, VanE, VanG), na které vykazují glykopeptidy sníženou vazebnou afinitu. Operony *vanA* a *vanB* jsou umístěny na plazmidech, ale i chromozomu (Klare et al., 2003; Depardieu et al., 2007). Rezistenci způsobují také efluxní pumpy AcrF (Sultan et al., 2018).

2.4 Chinolony

Chinolony jsou skupinou syntetických širokospektrálních antibiotik (Gualerzi et al., 2013). Základní strukturou je chinolonové jádro s typickou cyklickou skupinou vázanou přes dusík a různé substituenty v polohách C(6) a/nebo C(7) (Sultan et al., 2018). Většina klinicky používaných chinolonů patří do podskupiny fluorochinolonů, které mají připojený atom fluoru. V roce 1962 byla zavedena do klinické praxe kyselina nalidixová, jež je považována za předchůdce všech členů chinolonů (Gualerzi et al., 2013). Mezi chinolony se řadí také cinoxacin, kyselina pipemidová, ciprofloxacin a další. Obecně inhibují dva základní bakteriální enzymy – DNA gyrázu a topoizomerázu IV v různém rozsahu v závislosti na patogenu (Sultan et al., 2018).

Ačkoliv bylo zjištěno, že mechanismus rezistence pro chinolony je omezen na chromozomy, byly popsány tři mechanismy zprostředkované plazmidy (Courvalin, 2008; Martinez-Martinez et al., 2008). Chromozomálně kódovaná rezistence způsobuje sníženou permeabilitu vnější membrány spojenou se ztrátou porinu, zatímco nadměrná exprese přirozeně existujících efluxních pump vytváří mutace DNA gyrázy a topoizomerázy IV (Hooper, 2000; Jacoby, 2005). V genech *gyrA*, *gyrB*, *parC* a *parE* kódující podjednotky DNA gyrázy a topoizomerázy IV byly nalezeny mutace determinující chinolonovou rezistenci. Mezi první rozpoznány gen rezistence vůči chinolonům zprostředkovaný plazmidy patří *qnr*, na jehož základě bylo objeveno pět nových linií genu – *qnrA*, *qnrB*, *qnrC*, *qnrD* a *qnrS*. Druhým typem plazmidově umístěného genu rezistence je *cr* varianta (*aac(6)-Ib-cr*) kódující aminoglykosid acetyltransferázu (Park et al., 2006; Jacoby et al., 2015). Třetím popsaným druhem je *qepA*, plazmidem zprostředkovaná efluxní pumpa (QepA2 u *E. coli*) schopná vyloučit hydrofilní fluorochinolony jako například ciprofloxacin (Périchon et al., 2007).

2.5 Chloramfenikol

Chloramfenikol se skládá z nitrobenzenového kruhu tvořeného nitro a dichloracetylovou skupinou. Patří zde také například azidamfenikol nebo thiamfenikol. Způsob účinku chloramfenikolu je inhibice syntézy proteinů. Rezistence na chloramfenikol působí jako širokospektrální mechanismus zahrnující enzymatickou inaktivaci acetylací zprostředkovanou chloramfenikol acetyltransferázami (CATs, z angl. chloramphenicol acetyltransferases) (Schwarz et al., 2004; Wright, 2005). Kromě enzymové inaktivace se zde řadí také inaktivace fosfotransferázami, mutace v cílovém místě, bariéry permeability a efluxní pumpy (Schwarz et al., 2004).

2.6 Polymyxiny

Polymyxiny patří díky své struktuře mezi cyklické peptidy s dlouhým lipofilním postranním řetězcem (Gualerzi et al., 2013). Kolistin (polymyxin E) se skládá z cyklického heptapeptidu s tripeptidovým postranním řetězcem acylovaným mastnou kyselinou na amino konci (Sultan et al., 2018). Polymyxiny jsou produkovány grampozitivní bakterií *Bacillus polymyxa* a jsou selektivně toxické pro gramnegativní bakterie díky jejich specifičnosti pro molekulu lipopolysacharidu (LPS), která charakterizuje vnější membrány gramnegativních bakterií. Hydrofobní konec je důležitý při poškození membrány, což připomíná způsob účinku podobný detergentu. Polymyxin B, nonapeptid postrádající hydrofobní konec, se váže na LPS a způsobuje určitý stupeň dezorganizace membrány, ale bakteriální buňku nezabíjí. Kolistin byl schválen pro klinické užití v roce 1958, ale jeho toxicita (zejména nefrotoxicita) omezila jeho použití na topické (místní) aplikace. V současné době bylo použití polymyxinů obnoveno především na léčbu infekcí způsobených multirezistentními gramnegativními bakteriemi (Gualerzi et al., 2013).

Rezistence k polymyxinu je řízena dvousložkovými systémy PhoP/PhoQ a PmrA/PmrB (Olaitan et al., 2014), které reagují na koncentraci kationtů (vápník, železo, hořčík) a změny pH. Tyto systémy se zabývají změnami LPS, jež mají za následek polymyxinovou rezistenci. Přidání kationtových skupin na lipid A v důsledku mutací vytváří méně anionický lipid A, což způsobuje menší fixaci polymyxinů. Polymyxiny zůstávají jednou z posledních tříd antibiotik, u kterých není známo, že by se rezistence šířila z buňky na buňku pomocí plazmidu. V současné době se v Číně šíří rezistence na kolistin na plazmidu – gen *mcr-1* (Liu et al., 2016), je však již popsána na pěti kontinentech (Asie, Evropa, Afrika, Severní

a Jižní Amerika) (Schwarz a Johnson, 2016). V následujících letech bylo objeveno již několik variant až devět variant genu *mcr* (*mcr-1* až *mcr-9*) (Sultan et al., 2018).

2.7 Sulfonamidy

Sulfonamidy mají ve své struktuře společnou arylsulfonamidovou skupinu. Sulfonamidová rezistence v chromozomu se objevuje prostřednictvím mutací v genu *folP*, kódujícím dihydropteroátsyntázu (DHPS; Grape 2006). Získaná rezistence na sulfonamidy byla identifikována v 60. letech 20. století a po 80. letech 20. století byly popsány plazmidy zprostředkované geny *sul1* a *sul2* (Swedberg a Sköld, 1983; Rådström a Swedberg, 1988). Poté byl také rozpoznán třetí gen zprostředkovaný plazmidem *sul3* (Perreten a Boerlin, 2003).

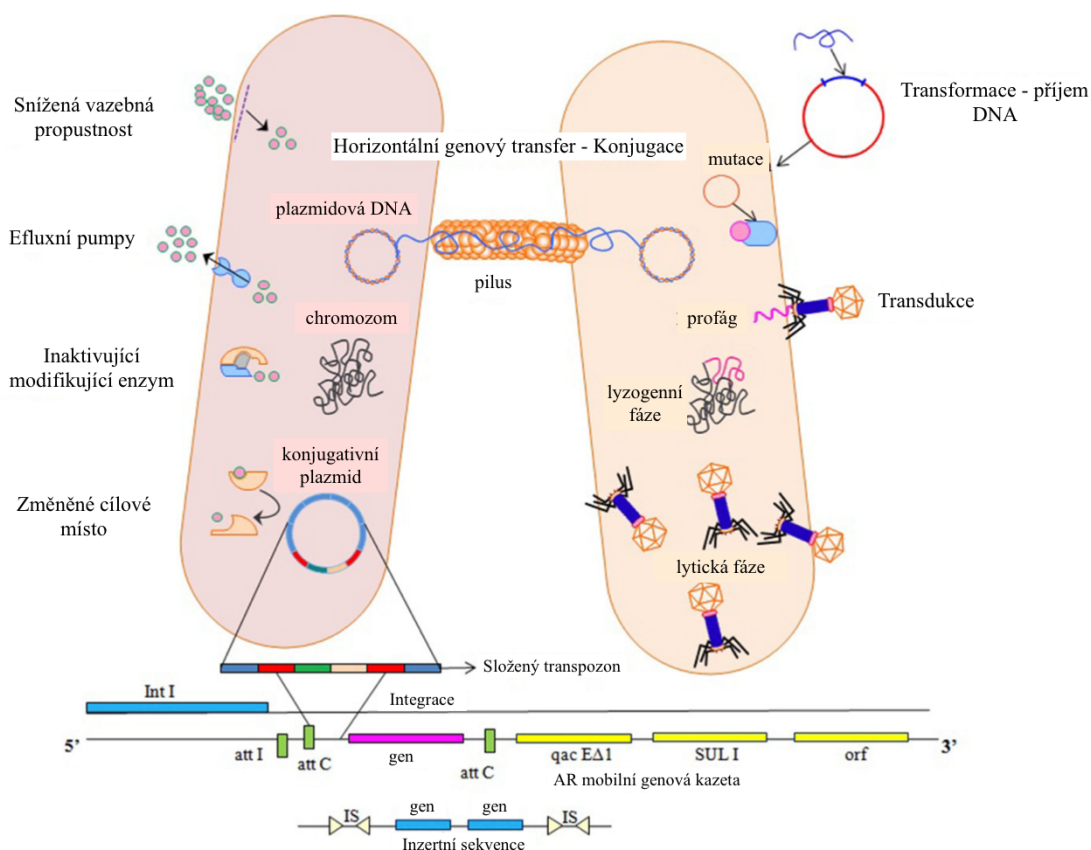
2.8 Tetracykliny

Tetracykliny se vyznačují polycyklickou strukturou, kdy sdílí společnou oktahydrotetracenovou kostru. Obvykle je produkují kmeny *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces rimosus* a nověji *Micromonospora* a *Actinomadura brunea*. Tyto molekuly se váží na syntézu proteinů inhibujících ribozomy a jsou klasifikovány jako širokospektrální antibiotika. První člen chlorotetracyklin (aureomycin) byl objeven koncem 40. let 20. století (Gualerzi et al., 2013). Mezi zástupce této třídy patří například tetracyklin, docycylin, thiacyklin, tigecylin. Jejich mechanismus akce je zaměřen na 30S ribozomální podjednotku. Mechanismy rezistence na tetracyklin mají tři klíčové strategie: energeticky závislé efluxní pumpy (ABC efluxní pumpy), ribozomální ochranné proteiny (RPPs, TetO) nebo enzymatickou inaktivaci (TetX) (Roberts, 2002).

3 GENETICKÝ ZÁKLAD ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Bakterie se na této planetě objevily před miliardami let, během kterých si zdokonalily své schopnosti při ochraně před toxickými chemikáliemi. Bakterie jsou kompetentní udržet a přenést geny odpovědné za antimikrobiální rezistenci jako součást mobilních genetických elementů (MGEs, z angl. mobile genetic elements) – plazmidy, transpozony, integrony. Transpozony a integrony díky své genomové plasticitě přispěly velkou měrou k fitness a odolnosti bakterií k přežití v různých prostředích. Integrony, typicky transportované plazmidy nebo uzavřené v transpozonech, hrají důležitou roli u superbakterií (Xu et al., 2011). Vzhledem ke své schopnosti přemisťovat se mezi hostitelskými genomy hrají MGEs zásadní funkci, protože působí jako prostředky pro získání genů rezistence a jejich postupnou propagaci (Sultan et al., 2018).

Rezistence vůči antibiotikům udělené chromozomálně nebo mobilními genetickými elementy je dosaženo (i) snížením permeability membrány pro antibiotika poklesem příjmu nebo zvýšením efluxu, (ii) inaktivací léčiva hydrolyzou nebo modifikací, (iii) změnou v cíli léčiva a snížením vazebné permeability a (iv) mutací, viz obrázek (Obr. 2) (Walsh, 2000).



Obrázek 2. Mechanismy antibiotické rezistence (Walsh, 2000; upraveno)

3.1 Mobilní genetické elementy

Plazmidy, které zprostředkovávají horizontální přenos genů, jsou zodpovědné za globální šíření rezistence u grampozitivních, ale i gramnegativních bakterií (Carattoli, 2013). Velikost plazmidů se liší od méně než jedna kilobáze až po několik megabází (Shintani et al., 2015). Plazmidy obsahují geny kódující funkce pro udržování plazmidu a poté doplňkové geny, které jsou přínosem pro hostitelskou buňku. V plazmidech rezistence jsou tyto doplňkové oblasti tvořeny jedním nebo více geny rezistence a souvisejícími mobilními prvky (inzerní sekvence, transpozony, integrony) (Partridge et al., 2018).

Replikace plazmidu začíná v definované oblasti, počátku (*ori*), spouští se buď transkriptem RNA nebo častěji vazbou iniciačního proteinu (Rep) kódovaného genem *rep* ležícím na plazmidu. Plazmidy tedy kódují vlastní iniciaci replikace, ale obvykle pro samotnou syntézu DNA využívají hostitelský chromozomálně kódovaný replikační aparát (helikáza, primáza, polymeráza atd.) (Partridge et al., 2018).

Plazmidy nesoucí rezistenci na běžně používaná antibiotika jsou většinou konjugativní; další jsou mobilizovatelné. Konjugativní plazmidy vykazují širokou (bez omezení hostitele v rámci dělení) i úzkou (omezení na malý počet příbuzných bakteriálních skupin) škálu hostitelů. Geny získané homologní rekombinací, integrací a excizí z hostitelského chromozomu se přemísťují z dárcovských do recipientních buněk pomocí konjugace. Mobilizovatelné plazmidy nesou geny pro přenos DNA nezbytné pro strukturu relaxozomu, ale postrádají geny nezbytné pro tvorbu pilusu. Studie odhalily, že přenos plazmidu může také probíhat, i když mobilizující plazmid a mobilizovaný plazmid jsou ve dvou různých bakteriálních buňkách (Andersen a Sandaa, 1994; Sia et al., 1996). Tento příjem, při kterém jeden kmen mající samopřenosný plazmid získává druhý plazmid od příjemce, je známý jako retrotransfer. Zpětný přenos probíhá ve dvou fázích – samopřenosný plazmid se přesune od dárce k příjemci a probíhá mobilizace plazmidu od příjemce zpět k dárci (Ankenbauer, 1997). Retrotransfer pravděpodobně hraje významnou úlohu ve vývoji systému přenosu plazmidů (Sultan et al., 2018).

Transponovatelné elementy (TE) jsou sekvence DNA, které poskytují genomu flexibilitu (Na'was et al., 2013). Jednotkové transpozony byly tradičně považovány za prvky větší než inzerní sekvence zahrnující gen pro transpozázu a vnitřní gen, který může kódovat rezistenci na antibiotika (Partridge et al., 2018). Díky tomu, že jsou schopny měnit svou pozici, mohou měnit své genetické pozadí se změnou genetického nastavení lokusu, kam se vkládají

(Wicker et al., 2007; Shapiro, 2010). Na základě jejich role při identifikaci a rekombinaci konkrétních sekvencí jsou TE kategorizovány do dvou tříd: (1) složené transpozony (třída I) a (2) komplexní transpozony (třída II). Třída I nebo retro-transpozony fungují kopírováním RNA z DNA transkripcí a RNA do DNA reverzní transkripcí, tím se vloží do genomu na různém místě (Kapitonov a Jurka, 2008). Transpozony třídy II působí jako tzv. cut and paste (vyjmout a vložit) a nezahrnují meziproduct RNA (Wicker et al., 2007). Ačkoli transpozony poskytují rezistenci vůči antibiotikům díky existenci dodatečného genu na plazmidu, existují šance, že transpozony mohou přeskočit z chromozomální DNA na plazmidovou DNA (Wagner, 2006).

Inzertní sekvence (ISs; velikost <2,5 kb) jsou základní formou mobilních genetických elementů šířených v bakteriích. ISs tvoří více než devatenáct rodin, které mají rozdílnou velikost (Wagner et al., 2007). Obsahují otevřený čtecí rámec, jenž kóduje transpozázový enzym obklopený invertovanými repetitivními sekvencemi 10 až 40 párů bazí na obou koncích. Enzym transpozáza stříhá cílovou DNA a vkládá inzertní sekvenci (Sultan et al., 2018). Tradičně nebyly ISs považovány za nositele „passenger“ genů, ale mohou přesouvat geny rezistence jako součást složeného transpozonu, oblastí ohraničené dvěma kopiemi stejné nebo příbuzné IS, které se mohou pohybovat jako jedna jednotka (Partridge et al., 2018).

Integrony přispívají k fitness a odolnosti bakterií k přežití v různých prostředích. Jejich kategorizace je založena na aminokyselinových sekvencích integrázy IntI, třída 1 (IntI1), třída 2 (IntI2), třída 3 (IntI3) a třída 4 (IntI4). Integráza IntI1, IntI2 a IntI3 je spojená s mobilními genetickými elementy, zatímco IntI4 s chromozomálními integrony (Sultan et al., 2018).

Integrony třídy 1 jsou asociované se získkem a mobilizací genů rezistence na antibiotika. Skládají se z genu integrázy, genu rezistence ke kvarterním amoniovým sloučeninám (*qacE1*) a genu rezistence k sulfonamidům (*sulI*) (Cambray et al., 2010). Integrony třídy 1 jsou spojeny s různými kazetami genů rezistence, ale většina integronů obsahuje *aadA* kódující rezistenci na streptomycin-spektinomycin. Často jsou také detekovány determinanty rezistence na trimethoprim (Fluit a Schmitz, 2004; Mazel, 2006; Cambray et al., 2010).

Integrony třídy 2 obsahují segment s pěti *tns* geny (*tnsA*, *tnsB*, *tnsC*, *tnsD*, *tnsE*) asociovaný s pohybem a inzercí v rámci bakteriálního chromozomu (Hansson et al., 2002; Labbate et al., 2009). Mají často nefunkční gen *intI2* kvůli vnitřnímu stop kodonu a pravděpodobně

v důsledku toho obsahují omezenou škálu kazet (Ramírez a Pineiro, 2010). Klasická struktura integronů třídy 2 obsahuje řadu genových kazet, včetně streptotricin acetyltransferázy (*satI*), adenyltransferázy (*aadA1*), dihydrofolát reduktázy (*dhfrA1*; Hansson et al., 2002; Xu et al., 2009).

Integrony třídy 3 byly poprvé identifikovány u *Serratia marcescens* v roce 1993 a poté nalezeny asociované s *blaGES-1* u *Klebsiella pneumoniae* (Sultan et al., 2018). Jsou podobné spíše integronům třídy 1 a zdá se, že jsou spojeny s určitými transpozony (Collis et al., 2002).

Integrony třídy 4 se liší od ostatních integronů rezistence především začleněním stovky kazet a vysokou podobností mezi místy *attC* těchto sestavených kazet (Poirel et al., 2010). Integrony třídy 4 nesou genové kazety pro antibiotika chloramfenikol a fosfomycin (Fluit a Schmitz, 2004).

Genová kazeta je malý mobilní prvek (zhruba 0,5 – 1 kb) sestávající z jednoho genu (občas dvou) typicky postrádajícího promotor a rekombinační místo *attC*. Genové kazety mohou existovat ve volné kruhové formě, ale jsou nereplikativní a obvykle se nacházejí vložené do integronu charakterizovaného genem *intI*, rekombinačním místem *attI* a promotorem (Pc). Díky rekombinaci mezi místem *attI* integronu a místem *attC* kazety může být kazeta vložena do integronu. Do stejného integronu lze vložit více kazet a tím vzniká pole kazet, které může poskytnout multirezistenci (Partridge et al., 2018).

3.2 Mechanismy horizontálního genového přenosu

Antibiotika sama o sobě rezistenci nezpůsobují, ale častá a vysoká expozice antibiotik bakteriím vytváří selekční tlak, který spouští strategie rezistence bakterií. Získání genů rezistence horizontálním přenosem zahrnujícím mobilní genetické elementy je považováno za hlavní cestu šíření a zvýšení antimikrobiální rezistence (Xu et al., 2011). Jejich přítomnost na MGEs usnadňuje přenos na nepříbuzné bakterie v procesu označovaném jako horizontální přenos genů (HGT, horizontal gene transfer) prostřednictvím konjugace, transdukce nebo transformace (viz Obr. 2) (Aminov a Mackie, 2007; Martinez, 2008). Pohyb genů propůjčuje příjemci nové metabolické schopnosti a tím mu pomáhá v adaptaci na nové ekologické niky (Sultan et al., 2018). Frekvence HGT závisí do značné míry na vlastnostech mobilního genetického elementu, charakteristikách dárcovské a recipientní populace a prostředí. Kromě konjugace, transdukce a transformace se v přírodě mohou vyskytovat další méně známé mechanismy přenosu DNA (Keese, 2008).

3.2.1 Konjugace

Konjugace je přenos DNA, ke kterému dochází mezi živými bakteriálními buňkami a vyžaduje přímý kontakt mezi dárcovskou a recipientní buňkou (Verraes et al., 2013). Konjugace potřebuje autonomně se replikující genetické elementy známé jako konjugativní plazmidy, jež využívají pilus proteinové struktury k vytvoření spojení mezi buňkami (Sultan et al., 2018). Geny antimikrobiální rezistence jsou velmi často přítomny na MGEs (plazmidy, transpozony) a mohou být doplňkově asociovány s inzerčními sekvencemi, integrony a genovými ostrůvky. Protože mnoho genů antimikrobiální rezistence bylo nalezeno na MGE, je konjugace považována za hlavní způsob přenosu těchto genů mezi bakteriemi (Mathur a Singh, 2005).

Konjugace je však omezena řadou molekulárních a epidemiologických faktorů: (1.) ekosystém by měl umožnit kontakt mezi kmeny; (2.) kmeny by měly mít určitou pohyblivost (sami o sobě nebo vnějšími faktory); (3.) existuje nekompatibilita plazmidů; (4.) genetické pozadí buňky by mělo umožnit integraci (spojení) integrativních mobilních elementů (IME) a (5.) určité systémy MGEs by neměly být vyloučeny z buňky v důsledku zapříčinění buněčné smrti (Verraes et al., 2013).

Zdá se, že u gramnegativních bakterií se konjugace řídí obecným mechanismem, jenž začíná tvorbou konjugativních pilusů. Grampozitivní bakterie používají alternativní mechanismy k dosažení buněčného kontaktu jako například feromony indukovaný přenos plazmidu u enterokoků nebo přenos plazmidu zprostředkovaný agregací u *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* (Andrup et al., 1993).

3.2.2 Transformace

Transformace bakterií je proces příjmu holé DNA z prostředí bakteriálními buňkami (Kelly et al., 2009). Bakteriální DNA se nejprve uvolňuje z bakteriálních buněk pasivně po smrti a lýze nebo u některých bakterií aktivně v určitém bodě růstového cyklu (Lorenz a Wackernagel, 1994; Matsui et al., 2003). DNA je vychytávána kompetentními bakteriemi z okolí a poté stabilně začleněna do akceptorové buňky. Nakonec dochází k expresi včleněné DNA (Verraes et al., 2013).

Teoreticky může být transformací přenesena jakákoli bakteriální chromozomální nebo extrachromozomální DNA. Některé bakteriální druhy jsou přirozeně kompetentní (*Campylobacter* spp., *Bacillus subtilis*, *Streptococcus* spp.) (Seitz a Blokesch, 2013). Doba, při které dochází k transformaci, závisí na druhu bakterií. Přirozeně transformovatelné druhy

jsou schopné kompetence v průběhu logaritmické růstové fáze (*Acinetobacter* spp.), jiné jsou kompetentní krátkou dobu (*Streptococcus pneumoniae*) a některé bakterie (např. *Bacillus subtilis*) rozvíjí kompetence pouze na začátku stacionární fáze (Johnsborg et al., 2007). Kompetence některých bakteriálních druhů, například *Escherichia coli*, mohou být indukovány in vitro chemickými nebo fyzikálními podmínkami – přítomnost CaCl₂, EDTA, teplotní posuny, elektrošoky nebo osvětlení (Cérémonie et al., 2004; 2006; Davison, 1999).

Dosud nebyl prokázán význam přenosu genu antimikrobiální rezistence v potravinářských produktech transformací, což je způsobeno nižší frekvencí a obtížností detekce ve srovnání s konjugací. V lidských i zvířecích střevech a během zpracování potravin je DNA citlivější na působení nukleáz DNA, fyzikální (např. teplo) a chemickou degradaci. Avšak složitá potravinová matrice a prostředí zpracování potravin (např. biofilmy) mohou DNA chránit (Straub et al., 1999). DNA může být také chráněna jednotlivými složkami potravin (např. argininem, maltolem) (Van den Eede et al., 2004; Bauer et al., 2004).

3.2.3 Transdukce

Transdukce je proces přenosu zprostředkovaný bakteriofágy. Nejprve se bakteriofág připojí k bakterii a vstříkne jeho genetický materiál, potenciálně včetně hostitelské bakteriální DNA. Po vstupu do bakteriální buňky musí být DNA stabilizována buď vytvořením autonomně se replikujícího prvku anebo integrací do bakteriální DNA. Jakmile je cizí DNA stabilizována v bakteriální buňce, může řídit produkci částic nových fágů. Tímto způsobem lze přenést bakteriální plazmid a/nebo genomovou DNA různých délek z jedné bakterie do druhé v závislosti na účastnícím se fágovi. Rozsah hostitelů je spíše omezený kvůli hostitelské specifitě bakteriofágů, a proto k transdukci obecně dochází mezi blízce příbuznými bakteriálními kmeny. Přenos genů antimikrobiální rezistence je zaznamenán pouze zřídka (Verraes et al., 2013).

3.3 Integrativní a konjugativní elementy

Integrativní a konjugativní elementy (ICEs, z angl. integrative a conjugative elements) jsou odlišné mobilní elementy, které byly nalezeny u grampozitivních i gramnegativních bakterií (Burrus et al., 2002). Jedná se o samopřenosné integrační prvky kódující konjugační aparát. Podporují vlastní mobilizaci usnadňující horizontální přenos genů rezistence na antibiotika, faktorů virulence a různých bakteriálních znaků. ICEs mají tři genetické moduly: (i) modul integrace a excize; (ii) konjugační modul; (iii) regulační modul. Moduly obsahují různé pole

genů kódující proteiny fungující odlišnými mechanismy. ICEs obsahují gen kódující integrázu (Int), která podporuje integraci a excizi z chromozomu hostitelského organismu (Boyd a Almagro-Moreno, 2009). Některé ICEs mohou nést systém toxin-antitoxin (Wozniak a Waldor, 2009). Na rozdíl od plazmidů se ICEs nenacházejí extrachromozomálně, protože postrádají autonomní replikaci. Kromě rezistence na antibiotika (Böltner et al., 2002; Whittle et al., 2002) vykazují integrativní a konjugativní elementy například rezistenci na těžké kovy (Böltner et al., 2002; Davies et al., 2009) nebo schopnost degradovat aromatické sloučeniny (Ravatn et al., 1998). Kromě toho byly rozpoznány komplexní vlastnosti jako schopnost obývat eukaryotického hostitele, fixovat dusík (Sullivan a Ronson, 1998) nebo podporovat virulenci a vývoj biofilmu (Drenkard a Ausubel, 2002; He et al., 2004; Davies et al., 2009).

3.4 Systémy toxin-antitoxin

Systémy toxin-antitoxin (TA), původně identifikovány jako moduly kódované na plazmidu, se často vyskytují na chromozomu většiny bakterií z prostředí (Xie et al., 2018). Systémy TA poskytují odolnost bakteriálním populacím ve stresových podmínkách jako je nedostatek živin nebo právě tlak antibiotik (Harms et al., 2016). Obecně jsou TA systémy složeny ze stabilního toxinu kódujícího proteiny a labilního antitoxinu kódujícího RNA nebo antitoxické proteiny (Lee a Lee, 2016). Toxiny působí na různé cíle, aby narušily určité buněčné procesy, jako je replikace DNA, syntéza buněčné stěny nebo syntéza proteinů. Volné toxiny způsobují klidový stav bakteriálních buněk, což může podporovat bakteriální toleranci vůči antibiotikům (Gerdes a Maisonneuve, 2012).

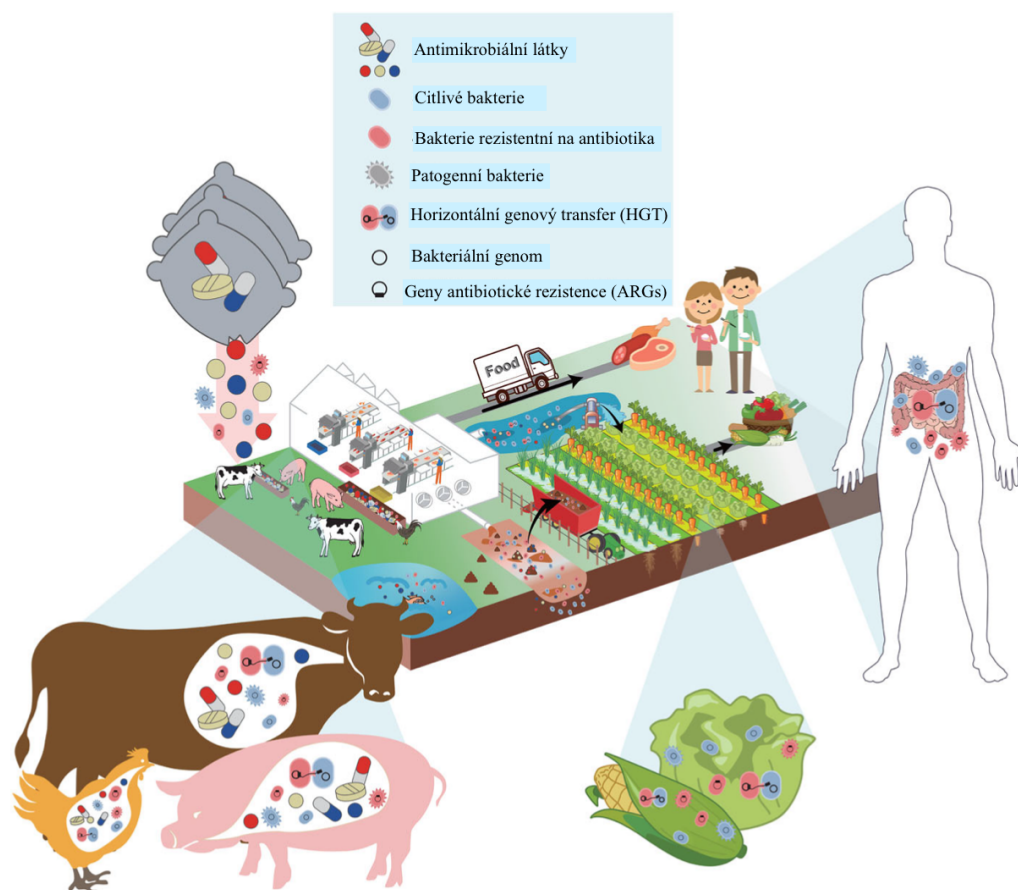
4 ANTIBIOTICKÝ REZISTOM

Termín antibiotický rezistom byl poprvé použit v roce 2006 skupinou Gerryho Wrighta, který definoval půdní rezistom jako determinanty rezistence přítomné v půdě, čímž dokázal vyšší prevalenci multirezistence v populaci environmentálních bakterií, než bylo dříve předpokládáno (D'Costa et al., 2006). Později byl rezistom definován jako soubor všech genů antibiotické rezistence a jejich prekurzorů v patogenních i nepatogenních bakteriích (Wright, 2007). Po publikaci velkého množství studií o rezistomu byla dále definice upřesněna označením typů rezistence, jako je získaná rezistence (vertikálně nebo horizontálně přenosná, taxonově nespecifická), vnitřní rezistence (pouze vertikálně přenosná, specifická pro taxony), tichá rezistence (fenotypově citlivá, funkční, ale nevyjádřená) a protorezistence (fenotypově citlivá, s malou/žádnou aktivitou, dokud nezmutuje) (Perry et al., 2014). Souhrnně lze říci, že antibiotický rezistom zahrnuje všechny typy genů antibiotické rezistence, jejich prekurzory a některé mechanismy potenciální rezistence, které vyžadují evoluci nebo změny v kontextu exprese k udělení rezistence (Kim a Cha, 2021).

Dřívější spekulace byly potvrzeny a kriticky zhodnocené nové poznatky byly shrnuty následovně: (i) antimikrobiální rezistence je prastará a všudypřítomná v různých mikrobiomech (D'Costa et al., 2011; Finley et al., 2013; Pawlowski et al., 2016); (ii) antibiotický rezistom je složitý a různorodý (D'Costa et al., 2007; Dantas a Sommer, 2012); (iii) environmentální rezistom je zdrojem a rezervoárem genů antibiotické rezistence (Finley et al., 2013; D'Costa et al., 2007; Forsberg et al., 2012); (iv) rezistom je obecně určen strukturou mikrobiálního společenství v přirozeném prostředí (Forsberg et al., 2014); (v) antropogenní činnosti utvářejí environmentální rezistom (Perry a Wright, 2014); (vi) mobilní genetické elementy jsou zodpovědné za přenos genů antibiotické rezistence (Perry a Wright, 2013) a (vii) tyto geny proudí mezi lidmi, zvířaty a životním prostředím (Hu et al., 2017).

Koncept One-Health je definován jako spolupráce více oborů (pracujících lokálně, celostátně i globálně) k dosažení optimálního zdraví lidí, zvířat a životního prostředí prostřednictvím politiky, výzkumu, vzdělávání a praxe (Rubin et al., 2013; Gronvall et al., 2014). Obecně platí, že infekční nemoci, včetně zoonóz, jsou hlavními obavami a cíli přístupu One-Health. Antimikrobiální rezistence, jež přímo souvisí s těmito nemocemi, byla považována za jednu ze tří priorit One-Health na tripartitním zasedání Organizace pro výživu a zemědělství (FAO, z angl. Food and Agriculture Organization), Světové organizace

pro zdraví zvířat (OIE) a Světové zdravotnické organizace (WHO) v roce 2011 (WHO et al., 2011). Na obrázku (Obr. 3) jsou zobrazeny dráhy přenosu genů antibiotické rezistence nebo rezistentních bakterií ze zvířat na člověka v rámci One-Health, kdy šipky zobrazují potenciální cesty přenosu rezistentních bakterií/genů (Zhao et al., 2021).



Obrázek 3. Dráhy přenosu bakterií/genů antibiotické rezistence ze zvířat na člověka
(Zhao et al., 2021; upraveno)

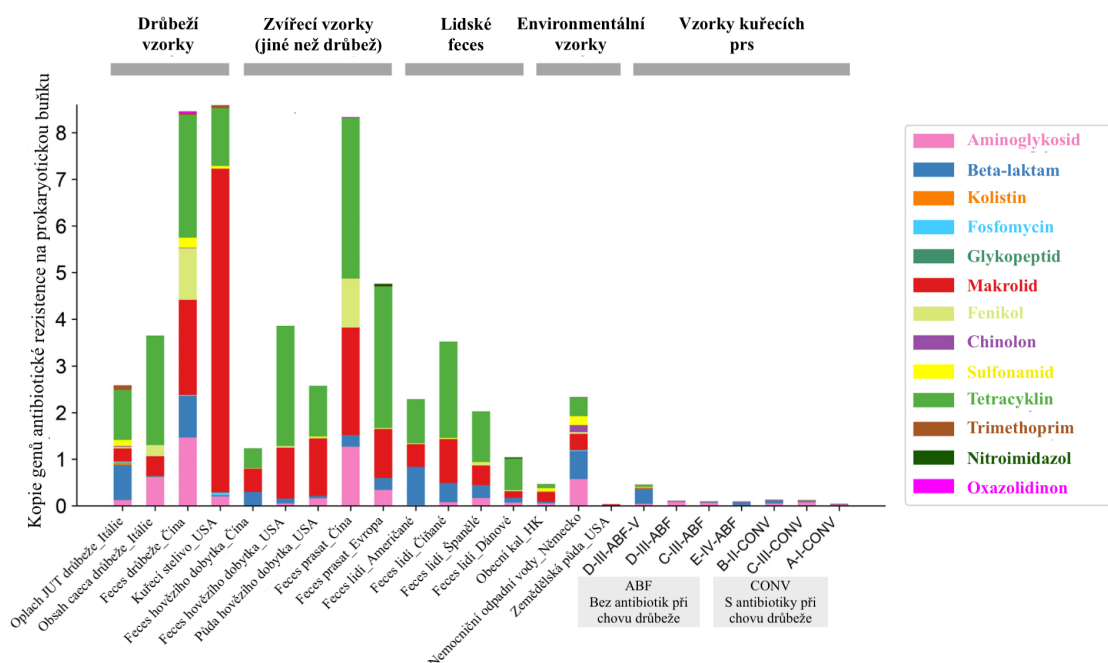
4.1 Mikrobiom kuřecího masa

Spotřeba kuřecího masa celosvětově neustále roste (Ritchie a Roser, 2017). Syrové kuřecí maso je základní potravinou s relativně vysokou mikrobiální zátěží (~4,5 log CFU/ml celkových aerobů v kuřecím výplachu) (USDA FSIS, 2012). Složení a rozmanitost mikrobiomu se mění během chovu, zpracování drůbeže (paření, šubání, kuchání, oplach, chlazení, zrání), maloobchodního prodeje, skladování a ovlivňuje jej typ balení a způsob zpracování. Některé příklady zahrnují mikrobiální kontaminaci v důsledku prasknutí střeva

a rozlití jeho obsahu během vykuchání (Gill, 2005), ošetření zařízení (Bailey et al., 1986) a mytí jatečně upravených těl (Kemp et al., 2000).

Dle americké studie zkoumající diverzitu mikroflóry kuřecích prsou byly dominantní bakterie vakuově balených produktů rozmanitější s fakultativně anaerobními bakteriemi (rody *Aeromonas*, *Buttiauxella*, *Carnobacterium*, *Hafnia*, *Serratia*) ve srovnání se vzorky v atmosféře propustné pro vzduch, kde byly v čele psychrotrofní bakterie rodu *Pseudomonas* a *Shewanella*. Obligátně aerobní gramnegativní *Pseudomonas* byly dominantní také na kuřecích řízcích v balení s modifikovanou atmosférou (MAP, z angl. modified atmosphere packaging) s vyšším procentem kyslíku (Rouger et al., 2018) a na hovězích řízcích skladovaných v chladničce na vzduchu (Ercolini et al., 2011). Přítomnost *Pseudomonas* na vakuově balených vzorcích potvrzuje přítomnost zbytků kyslíku ve vakuových obalech (Li et al., 2020).

Mikrobiomy kuřecích prsou se lišily od jiných mikrobiomů (jiné části drůbeže, skotu nebo prasečí trus) nižším zastoupením genů antibiotické rezistence k tetracyklinům, aminoglykosidům a makrolidům. Tato antibiotika představovala největší objem tuzemského prodeje lékařsky významných antimikrobiálních léčiv u hospodářských zvířat v roce 2017 (FDA CVM, 2018). Nízký výskyt genů antibiotické rezistence na kuřecích prsou byl potvrzen bez ohledu na použití antibiotik v chovu. Bylo zjištěno, že u hovězích výrobků nebyly potvrzeny žádné geny antibiotické rezistence a zásahy během porážky by mohly snižovat přenos těchto genů na spotřebitele (Noyes et al., 2016). Podobné výsledky byly naměřeny mezi konvenčními a bezantibiotikovými produkty z mletého hovězího masa (Vikram et al., 2018) a hovězím dobyt看kem (Vikram et al., 2017). Vyšší výskyt genů rezistence je potvrzen u hustě osídlené populace, jako je půda hospodářských zvířat a střevní (fekální) mikrobiomy (Li et al., 2020). Revue z roku 2021 (Gaire et al., 2021) zabývající se epidemiologickými studiemi u zvířat určených k produkci potravin naznačuje, že enterická antimikrobiální rezistence se mění s tím, jak hostitel stárne (Gaire et al., 2021). Pro představu byl vytvořen graf (Obr. 4) normalizovaného množství genů antibiotické rezistence v mikrobiomech kuřecích prsou a dalších vzorků z různých zdrojů. Četnost každé třídy genů antibiotické rezistence byla vypočtena jako součet normalizovaných četností genů patřících do této třídy (Li et al., 2020).



Obrázek 4. Normalizované množství genů antibiotické rezistence v různých živočišných mikrobiomech (Li et al., 2020; upraveno)

4.2 Antibiotický rezistom kuřecího masa

V intenzivních chovech drůbeže se často používají antimikrobiální látky jako tetracyklin, bacitracin, tylosin, salinomycin, virginiamycin a bambermycin (Cuong et al., 2018; Diarra a Malouin, 2014). V USA představují tetracykliny více než dvě třetiny antimikrobiálních látek podávaných při chovu drůbeže (Ronquillo a Hernandez, 2017), zatímco v Evropské unii představují pouze 37 % (Carvalho a Santos, 2016). Amoxycilin, oxytetracyklin a ceftriaxon následované ofloxacinem a norfloxacinem jsou nejběžněji používanými u drůbeže v Číně (Xu et al., 2020). Stejně jako u předchozí americké studie (Li et al., 2020), u studie zaměřené na 49 základních genů rezistence k antibiotikům identifikovaných v drůbežím trusu odebraném z 9 evropských zemí převládaly tetracyklinové a makrolidové geny rezistence (Ma et al., 2016).

Nedávná studie v Číně porovnávala fekální rezistom kuřat na drůbežích farmách s těmi na trzích s živou drůbeží v Číně. Pro obě místa byly častější geny antibiotické rezistence na aminoglykosidy, tetracykliny, MLS (makrolidy, linkosamidy a streptograminová antibiotika, z angl. macrolides, lincosamides, streptogramines) a β -laktamy. Kromě toho byly tyto třídy antibiotik častěji detekovány u drůbeže na trhu (Wang et al., 2021), což by mohlo být způsobeno změnami mikrobiomu zvýšeným stresem ptáků (Ma et al., 2021).

Několik studií zkoumalo použití specifických antimikrobiálních látek na profily fekálního rezistomu drůbeže. Například podávání ampicilinu vedlo ke zvýšení většiny β -laktamových i bacitracinových genů rezistence a snížení genů spojených s rezistencí k tetracyklinům v kuřecím trusu (Zhou et al., 2020). Terapeutické dávky chlortetracyklinu v krmivu zvýšily výskyt rezistence na tetracyklin (*tetA* a *tetW*) a snížily četné multirezistentní geny ve výkalech brojlerů. Tato reakce na chlortetracyklin byla přisuzována poklesu populace *Escherichia*, hlavního hostitele multirezistentních genů, a obohacení *Bifidobacterium*, které obsahuje více *tetW* (Xiong et al., 2018).

4.3 Metody studia rezistomu v potravinách

Existuje několik metod identifikace rezistentních bakterií (fenotypová rezistence) a jejich příslušných genů rezistence (genotypová rezistence). Tradiční metody jsou primárně založeny na kultivaci mikroorganismů za specifických podmínek. Ačkoli jsou jednoduché a snadno proveditelné, zahrnují také spoustu nevýhod, jako je existence životaschopných nekultivovatelných mikroorganismů nebo dlouhá doba jejich množení (Lee et al., 2017; Braga et al., 2013; Ekong et al., 2017; Chahorm a Prakitchaiwattana, 2018).

Na druhé straně jsou molekulární metody, jež jsou založeny na amplifikaci cílových genů – polymerázová řetězová reakce (PCR, z angl. polymerase chain reaction), multiplexní PCR, reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR, z angl. reverse transcriptase PCR), PCR kombinovaná s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP, z angl. restriction fragment length polymorphism), kvantitativní PCR (qPCR, z angl. quantitative PCR) neboli PCR v reálném čase (z angl. real-time PCR), náhodně amplifikovaná polymorfnní DNA (RAPD, z angl. random amplified polymorphic DNA); mikročipy (z angl. microarrays), metagenomika a celogenomové sekvenování (WGS, z angl. whole-genom sequencing) (Rodrigues et al., 2020; Nakajima et al., 2009; Frasao et al., 2017). I když jsou dražší než tradiční kultivace, spousta těchto technik má velké výhody, jako je rychlá doba provádění qPCR a identifikace všech rezistomů ve vzorku pomocí metagenomiky. Každá metoda má i své nevýhody, například doba provádění, nízká reprodukovatelnost výsledků, nestabilita molekuly RNA, specifická vybavení, technici schopní ji provést a bioinformatická odbornost (Rodrigues et al., 2020; Rasmussen, 2012; Rovira et al., 2019). Tabulka (Tab. 1) uvádí souhrn výhod a nevýhod nejběžnějších tradičních a molekulárních metod identifikace mikroorganismů a genů antimikrobiální rezistence (Galhano et al., 2021).

Tabulka 1. Výhody a nevýhody tradičních a molekulárních metod identifikace mikroorganismů a genů antimikrobiální rezistence (Galhano et al., 2021)

Metoda	Princip	Výhody	Nevýhody
Tradiční	Morfologické a biochemické charakteristiky kolonií	Nízká cena, vysoká citlivost, zlatý standard pro identifikaci mikroorganismů (MO)	Doba provedení, životaschopné nekultivovatelné kmeny, nízká specifita
Konvenční PCR	Exponenciální amplifikace specifických sekvencí DNA a RNA	Amplifikace životaschopných genů nekultivovatelných MO	Nedetekuje životaschopnost buněk
Multiplexní PCR	Současná amplifikace několika cílů najednou	Amplifikace různých typů genů současně	Primery s podobnou teplotou annealingu (nasedání)
RT-PCR	Molekula RNA se přepisuje na molekulu komplementární DNA (cDNA), poté klasická PCR	Detekce živých buněk, molekula cDNA má vysokou čistotu, vysoká specifita	Nestabilita molekuly RNA
PCR-RFLP	Fragmenty DNA jsou získány štěpením DNA restrikčními enzymy (endonukleázami)	Náklady, snadné navrhování, není potřeba drahé materiály, snadné provedení	Některé enzymy mohou být drahé, zpoždění v zisku výsledků
qPCR	Kvantifikace je umožněna fluorescenčními sondami na specifických primerech emitující detekovatelné signály	Kratší reakční čas, určuje relativní a absolutní počet MO	Vysoká cena, interference MO z prostředí
Mikročipy (microarray)	Hybridizací vzorku DNA a sekvenčně specifických DNA sond navázaných na povrchu čipu	Nevyžaduje předchozí kultivaci bakterií, detekce několika genů rezistence současně na stejném substrátu	Vyžaduje přechozí znalosti o studovaných genomových oblastech, oblast je předem determinována, což způsobuje ztrátu dalších informací

Metagenomika	Sekvenování genetického materiálu pomocí sekvenační databáze	Detekce celého mikrobimu, není nutná předchozí kultivace, objev nekultivovatelných MO, nové geny a MO	Potřeba přechodí znalosti v bioinformatice, vysoké náklady, výzva dosažení hlubokého sekvenování složitějších mikrobiomů
Celogenomové sekvenování	Sestavení pomocí programů; krátká čtení sekvencí (kontigy) se porovnávají pomocí algoritmů s referenčními databázemi	Snadno dostupný a účinný nástroj v rezistenci vůči antibiotikům, vhodné pro rutinní kontrolu infekcí, objev nových genů	Neshody genotypu WGS a fenotypu antimikrobiální rezistence, neustálá aktualizace algoritmů a databází

II. PRAKTICKÁ ČÁST

CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo stanovit antibiotický rezistom, tudíž zjistit přítomnost genů rezistence (rezistomu) v DNA izolované ze vzorků chlazených kuřat dostupných v maloobchodní tržní síti Zlínského kraje ČR.

5 MATERIÁL A METODIKA

V této kapitole je shrnut veškerý materiál použitý při praktické části diplomové práce a metodické postupy.

5.1 Materiál

5.1.1 Vzorky potravin

Celkem bylo v maloobchodní síti ve Zlíně v období od 29. 11. 2021 do 3. 12. 2021 zakoupeno 20 chlazených kuřecích křídél třídy jakosti A a 10 chlazených kuřecích špalíčků třídy jakosti A. Polovina kuřecích křídél pocházela z řeznictví B, zatímco druhá polovina a všechny špalíčky z řeznictví A. Maso bylo prodáváno jako nebalené a chov i porážka kuřat probíhaly v Polsku. Podrobný seznam vzorků je uveden v Příloze P I.

5.1.2 Použité kmeny

Kmeny *Escherichia coli* izolované z volně žijících zvířat, charakterizované a uložené ve sbírce ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně (Pavličková, 2016), byly použity jako pozitivní kontroly při PCR reakcích (Tab. 2).

Tabulka 2. Specifikace pozitivních kontrol (Pavličková, 2016)

Označení	Rok izolace	Původ	Geny rezistence
2	2010	bažant	<i>qnrS, blaTEM, aphA1</i>
2H	2010	bažant	<i>qnrS, blaTEM, aphA1</i>
2MB	2014	bažant	<i>sul1, qnrS, tetA, int, qac, mer, aphA1, sul2</i>
3MB	2014	bažant	<i>tetB, aphA1, blaOXA-7</i>
2FB	2014	bažant	<i>aphA1, blaCTX-M-1g</i>

5.1.3 Přístroje a pomůcky

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Bio Vortex V1 (BIOSAN, Lotyšsko)
- Centrifuga minispin plus (Eppendorf, Německo)
- Denzitometr McFarland typ DEN-1 (Biosan, USA)
- Elektrický zdroj pro elektroforézu EV243 (Consort, Belgie)
- Elektroforetická vana s příslušenstvím (Owl Separation Systems, Inc., USA)

- Erlenmayerova baňka (Simax, ČR)
- Hřebeny (Owl Separation Systems, Inc., USA)
- IKA® MS1 shaker (IKA, Německo)
- Kádinky, 25 ml (Simax, ČR)
- Laminární box, Telstar Bio II – A (KRD, Velká Británie)
- Lednice s mrazicím boxem CSA34020 (BEKO, Turecko)
- Mikrovlnná trouba (Electrolux, Švédsko)
- Mini-centrifuga CD-1008 (PHOENIX Instrument, Německo)
- Mini-centrifuga HERMLE Z 100 M (Hermle LaborTechnik, Německo)
- Multifunkční modulární reader INFINITE 200 PRO (Tecan, Švýcarsko)
- Odměrný válec (Simax, ČR)
- PCR box AURA PCR™ (BIOAIR, Itálie)
- Petriho misky plastové
- Počítač s programem Gene Snap (SynGene, Indie)
- Stomacher Classic – IUL (BioTech, ČR)
- Termocykler Aeris™ (ESCO, Singapur)
- Termostat ($t = 37\text{ °C}$) (Nanbei Instrument, Čína)
- Termostatový blok Bio TDB-100 (Biosan, USA)
- UV-Transluminátor InGeniusLHR (SYNGENE, Velká Británie)
- Váhy KB d = 0,1 g (KERN, Německo)
- Další pomůcky: kovová lžice, mikrotenové sáčky, nitrilové rukavice, nůžky, pinzeta, plynový kahan, pravítko, prkénko, skalpel, sterilní gáza, sterilní jednorázové kličky, sterilní mikrozkušavky (1,5 a 2 ml), sterilní pinzeta, sterilní špičky, stojánek na mikrozkušavky, stojánek na stripy, stripy po 8 kusech s víčky, zápalky, zkumavky

5.1.4 Chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- Antibiotické disky charakterizované v tabulce (Tab. 4) (HIMEDIA, India; Oxoid Ltd., Velká Británie)
- DNeasy® *mericon* Food Kit (50) (QIAGEN, Německo)
- DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (QIAGEN, Německo)
- Etanol 70% (Sigma-Aldrich, USA)
- Etanol 96% (Sigma-Aldrich, USA)
- GelRed® Nucleic acid gel stain (Biotium, USA)
- GoTaq® G2 Hot Start Green Master Mix (Promega™, USA)
 - Složení: GoTaq DNA polymeráza, 400 μM dATP, 400 μM dGTP, 400 μM dCTP, 400 μM dTTP, 4 mM MgCl₂; pH = 8,5
- Chloroform (Sigma-Aldrich, USA)
- Masopeptonový agar (HIMEDIA, India)
 - Složení: výtažek z masa, pepton, sůl, agar
- Mueller-Hinton agar (HIMEDIA, India)
 - Složení: hovězí výtažek, pepton z kaseinu, škrob a agar
- Nuclease-Free H₂O (Promega™, USA)
- Nutrient agar (HIMEDIA, India)
 - Složení: masový extrakt, pepton z masa a agar
- Sterilní destilovaná voda
- 1x TAE pufr (Sigma-Aldrich, USA)
 - Složení: 20 mM Tris-base, 10 mM acetát sodný, 0,5 mM EDTA; pH = 7,4
- 100 bp DNA ladder (VWR Peqlab, ČR)

5.1.5 Seznam použitých primerů

Sekvence PCR primerů a velikost hledaného produktu je uvedena v tabulce (Tab. 3). Všechny primery byly dodány firmou IDT, USA anebo Metabion international AG, Německo.

Tabulka 3. Seznam použitých primerů

Primer	F/R	Sekvence (5'-3')	Velikost amplikonu [bp]
blaTEM	F	GAGTATTCAACATTTTCGT	857
	R	ACCAATGCTTAATCAGTGA	
mcr-1	F	AGTCCGTTTGTTCCTTGTTGGC	320
	R	AGATCCTTGGTCTCGGCTTG	
mcr-2	F	CAAGTGTGTTGGTCGCAGTT	715
	R	TCTAGCCCGACAAGCATACC	
mcr-3	F	AAATAAAAATTGTTCCGCTTATG	929
	R	AATGGAGATCCCCGTTTTT	
mcr-4	F	TCACTTTCATCACTGCGTTG	1116
	R	TTGGTCCATGACTACCAATG	
mcr-5	F	ATGCGGTTGTCTGCATTTATC	1644
	R	TCATTGTGGTTGTCCTTTTCTG	
qnrS	F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	600
	R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC	
tetA	F	GGCCTCAATTTCTGACG	372
	R	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC	

5.2 Metody

5.2.1 Izolace DNA z drůbežního masa

Prvním krokem izolace DNA bylo navážení 10 g kuřecího masa s kůží a přidání 20 ml sterilní destilované vody do mikrotenového sáčku. Poté byla tato směs homogenizována v Stomacheru po dobu 180 sekund a výsledná směs zfiltrována přes sterilní gázu do kádinky. Dále následovala samotná izolace DNA pomocí komerční soupravy DNeasy® *mericon* Food Kit (50) (QIAGEN, Německo). Níže je popsán postup izolace DNA:

1. Z filtrátu byly odebrány 2 ml, které byly centrifugovány při 14 500 rpm (otáčky za minutu, z angl. revolutions per minute) po dobu 10 minut a laboratorní teplotě. Supernatant byl odpipetován a peleta na dně zkumavky využita v dalších krocích.
2. K peletu buněk byl přidán 1 ml pufru Food Lysis a 2,5 μ l proteinázy K. Tato směs byla jemně promíchána při nižších otáčkách na vortexu.
3. Zkumavka byla umístěna do termobloku předehřátého na 60 °C a inkubována po dobu 30 minut, během kterých byla pravidelně promíchávána na vortexu. Po inkubaci následovalo vychladnutí při pokojové teplotě.
4. Poté byla provedena centrifugace při 2 500 rpm po dobu 5 minut a laboratorní teplotě.
5. Do čisté 2 ml eppendorf zkumavky bylo napipetováno 500 μ l chloroformu a z původní zkumavky byl odebrán supernatant, který byl poté přenesen do zkumavky s chloroformem.
6. Supernatant s chloroformem byl 6x zvortexován po dobu 15 sekund a poté proběhla centrifugace při 14 000 rpm po dobu 15 minut a laboratorní teplotě.
7. Do čisté eppendorf zkumavky bylo napipetováno 350 μ l pufru PB a přidán veškerý supernatant z kroku 6. Tato směs byla zvortexována tak, aby došlo k dokonalému promíchání a 700 μ l bylo přepipetováno do kolonky přiložené ke komerčnímu kitu.
8. Následovala centrifugace při 14 500 rpm po dobu 2 minut a laboratorní teplotě, tekutina ze zásobní kolonky byla odlita a do kolonky byl napipetován zbytek z kroku 7. Opět byla provedena centrifugace při 14 500 rpm po dobu 2 minut a laboratorní teplotě a tekutina ze zásobní kolonky vylita.
9. Do kolonky bylo přidáno 500 μ l pufru AW2 a kolonka byla zcentrifugována při 14 500 rpm po dobu 2 minut a laboratorní teplotě. Tekutina ze zásobní kolonky byla vylita a centrifugace proběhla ještě jednou za stejných podmínek s následným vyjitím tekutiny.
10. Kolonka byla umístěna do 1,5 ml eppendorf zkumavky a na její membránu bylo přidáno 150 μ l pufru EB. Dále proběhla centrifugace při 14 500 rpm po dobu 2 minut a laboratorní teplotě, kolonka byla vyjmuta a v eppendorf zkumavce zůstala izolovaná DNA, která byla uchovávána při -20 °C.

5.2.2 Izolace DNA z bakteriálních kmenů

Zmražené kmeny byly nejprve přeočkovány pomocí sterilní bakteriologické kličky na masopeptonový agar a kultivovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po kultivaci

mikroorganismů byla vytvořena bakteriální suspenze ve sterilní destilované vodě a následně proběhla izolace DNA komerční soupravou DNeasy® Blood & Tissue Kit (250) (QIAGEN, Německo). Níže je popsán postup izolace DNA:

1. Z bakteriální suspenze byly odebrány 2 ml do eppendorf zkumavky, proběhla centrifugace při 7 500 rpm po dobu 10 minut a laboratorní teplotě a supernatant byl vylit.
2. K buněčné peletě bylo přidáno 180 µl pufru ATL.
3. Dále následovalo přidání 20 µl Proteinázy K a tato směs byla jemně promíchána na vortexu. Zkumavka byla umístěna do termobloku předehřátého na 56 °C a inkubována po dobu 10 minut, během kterých byla pravidelně promíchávána na vortexu. Po inkubaci následovalo vychladnutí při pokojové teplotě.
4. K obsahu zkumavky bylo přidáno 200 µl pufru AL, mícháno na vortexu a dále přidáno 200 µl 96% ethanolu.
5. Po dokonalém promísení na vortexu byl veškerý obsah napipetován do kolonky přiložené ke komerčnímu kitu a proběhla centrifugace při 8 000 rpm po dobu 1 minuty a laboratorní teplotě.
6. Tekutina ze zásobní kolonky byla vylita a do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru AW1. Směs byla centrifugována při 8 000 rpm po dobu 1 minuty a laboratorní teplotě a zbylá tekutina v zásobní kolonce opět vylita.
7. Do kolonky bylo přidáno 500 µl pufru AW2. Směs byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 3 minut a laboratorní teplotě a tekutina v zásobní kolonce byla vylita.
8. Kolonka byla umístěna do eppendorf zkumavky a na membránu bylo přidáno 200 µl pufru AE, poté proběhla inkubace při laboratorní teplotě po dobu 1 minuty a obsah byl centrifugován při 8 000 rpm po dobu 1 minuty a laboratorní teplotě. Kolonka byla vyjmuta a v eppendorf zkumavce zůstala izolovaná DNA, která byla uchována při -20 °C.

5.2.3 Měření koncentrace a čistoty DNA

Koncentrace a čistota DNA byly měřeny spektrofotometricky multifunkčním modulárním readerem INFINITE 200 PRO (Tecan, Švýcarsko). Níže je popsán postup měření:

1. Nejprve byl přístroj zapnut včetně počítače, který je s přístrojem propojený.

2. V programu Infinite 200 PRO bylo nejprve vybráno výchozí nastavení (Default script), poté aplikace (Applications) a zvoleno měření koncentrace a čistoty dsDNA.
3. Byla vyjmuta destička NanoQuant přiložená k přístroji a očištěna 70% etanolem.
4. Na destičku NanoQuant byly napipetovány 2 μ l elučního roztoku, kterým byl v případě izolace DNA z drůbežního masa pufr EB a v případě izolace DNA z pozitivních kmenů pufr AE.
5. Destička NanoQuant byla vložena do přístroje a byla změřena koncentrace a čistota DNA pufrů neobsahujících DNA.
6. V dalším kroku byla destička vyjmuta, vysušena a na stejné jamky v destičce byly napipetovány 2 μ l vzorků obsahujících DNA.
7. Destička NanoQuant byla opět vložena do přístroje a bylo provedeno měření koncentrace a čistoty DNA tentokrát ve vzorcích. Výsledky byly zaznamenány v programu Microsoft Office Excel.
8. Po měření byla destička očištěna 70% etanolem a připravena na další měření.

5.2.4 Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda je způsob semikvantitativního stanovení citlivosti nebo rezistence k antimikrobiálním látkám, kdy se kladou papírové disky obsahující antibiotikum na agarové plotny. Při kultivaci difunduje antimikrobiální látka z disku do okolí agaru a její účinnost se projeví vytvořením tzv. inhibiční zóny kolem disku, kdy se měří její průměr (od kraje ke kraji). Výsledkem je citlivost, intermediární rezistence nebo rezistence bakterie k testovanému antibiotiku o určité koncentraci. Seznam antibiotických disků, koncentrací a průměrů inhibičních zón je charakterizován v tabulce (Tab. 4).

Vybrané kmeny *E. coli* ze sbírky ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně (Pavličková, 2016) nesoucí geny rezistence (*qnrS*, *tetA*, *blaTEM*) byly naočkovány na živný agar (Nutrient agar) a inkubovány při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Po inkubaci bylo připraveno inokulum ve sterilním fyziologickém roztoku o zákalu 0,5 stupňů McFarlandovy stupnice. Na Mueller-Hinton agar byl napipetován 1 ml kultury v roztoku. Po zaschnutí byly na misky položeny pomocí sterilní pinzety vždy 4 testované disky s antibiotiky charakterizované v tabulce (Tab. 4). Poté proběhla inkubace při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin.

Tabulka 4. Seznam antibiotických disků, koncentrací a limitů průměrů inhibičních zón (EUCAST, 2022)

Antibiotikum	Skupina	Zkratka	Koncentrace [μg]	S ≥ [mm]	R < [mm]
Aztreonam	Monobaktamy	ATM30	30	26	21
Cefuroxim	Cefalosporiny	CXM30	30	50	19
Ciprofloxacín	Fluorochinolony	CIP5	5	25	22
Doxycyklin	Tetracykliny	DO30	30	¹	¹
Kolistin	Polymyxiny	CL10	10	²	²
Meropenem	Karbapenemy	MEM10	10	22	16
Streptomycin	Aminoglykosidy	S300	300	³	³
Tetracyklin	Tetracykliny	TE10	10	¹	¹

Legenda: S ... citlivý (susceptible, standard dosing regimen)

R ... rezistentní (resistant)

Mezi S a R je I = intermediárně rezistentní (susceptible, increased exposure)

¹ ... EUCAST ustoupila u *Enterobacteriaceae* od zařazení breakpointů kvůli nevhodnosti použití antibiotika k léčbě infekcí způsobených tímto rodem

² ... pro rezistenci ke kolistinu se doporučuje použití metody MIC (minimální inhibiční koncentrace, z angl. minimum inhibitory concentration test)

³ ... není stanoven pro *Escherichia coli*

5.2.5 Polymerázová řetězová reakce

Pro směs na polymerázovou řetězovou reakci (PCR) byl připraven MasterMix, PCR voda, potřebné primery, DNA a pozitivní kontroly (pokud byly k dispozici). Poté bylo vše promícháno na vortexu a dle tabulky (Tab. 5) do 1,5 ml eppendorf zkumavky připravena směs na PCR, která byla zvortexována. Tato směs byla poté rozplněna do stripů po osmi kusech a byl přidán určitý objem DNA. Do posledních stripů náležela pozitivní kontrola ověřující správný průběh reakce a negativní kontrola prokazující, že nedošlo ke kontaminaci směsi. Po rozplnění a zavíčkování stripů byla směs odstředěna v centrifuze. Posledním a zároveň nejpodstatnějším krokem bylo umístění stripů do termocycleru, na kterém byl nastaven program dle tabulky (Tab. 6).

Tabulka 5. Rozpis PCR směsi

Reakce	<i>blaTEM</i>	<i>mcr-1-5</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>
Komponenty	Objem komponent (µl)			
MasterMix	10	12,5	10	10
PCR H ₂ O	7	5,5	7	7
Primer Fw (10 µM)	1	0,5	1	1
Primer Rv (10 µM)	1	0,5	1	1
DNA	1	2	1	1
Celkem	20	25	20	20

Tabulka 6. Program PCR reakcí

	<i>blaTEM</i>	<i>mcr-1-5</i>	<i>qnrS</i>	<i>tetA</i>
1. úvodní denaturace DNA	94 °C 3 min	94 °C 15 min	94 °C 3 min	95 °C 15 min
2. denaturace DNA	94 °C 30 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s	94 °C 30 s
3. připojení primerů	55 °C 1 min	58 °C 90 s	58 °C 45 s	56 °C 30 s
4. amplifikace DNA	68 °C 3 min	72 °C 1 min	68 °C 3 min	72 °C 1 min
5. počet cyklů kroku 2. – 4.	30	25	30	30
6. závěrečná amplifikace DNA	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min	72 °C 10 min
7. chlazení	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞	4 °C / ∞

5.2.6 Gelová elektroforéza

Pro vizualizaci PCR produktů byla použita agarózová gelová elektroforéza. Nejprve byl dle tabulky (Tab. 7) připraven 1,5% agarózový gel, kdy byla smíchána agaróza s 1x TAE pufrem. Tato směs byla rozvařena v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy a byla zchlazena pod proudem studené vody do teploty zhruba 60 °C. Po vychladnutí byly přidány dvě kapky barvy GelRed® Nucleic acid gel stain. Agaróza byla spolu s barvou promíchána a nalita do předem připravené formy s umístěnými hřebeny. Poté byly odstraněny veškeré bublinky a gel se nechal utuhnout. Po zatuhnutí byly odstraněny hřebeny a gel byl ve formě umístěn do elektroforetické vany naplněné 1x TAE pufrem.

Do jamek zatuhnutého gelu bylo napipetováno 5 µl PCR produktů a do první a poslední jamky každého řádku 2 µl velikostního markeru (žebřík, z angl. ladder) usnadňujícího orientaci výšky PCR produktů (bandů). Pro všechny gelové elektroforézy byl použit marker o velikosti 100 bp. Kromě ladderu byla nanesena také pozitivní a negativní kontrola

v množství stejném jako DNA. Poté byla elektroforetická vana zavřena víkem, připojena ke zdroji elektrického napětí a dle tabulky (Tab. 7) zvolen příslušný program. PCR produkty obsahující molekuly DNA jsou záporně nabitě, a proto v elektrickém poli migrují gelem směrem ke kladně nabitě anodě.

Po uplynutí času potřebného k elektroforetické separaci byl gel vložen do UV transluminátoru, kdy je gel zesponu osvícen pomocí UV světla a vyfocen. Tato fotografie se zobrazí v programu Gene Snap (SynGene) na PC a vyhodnotí se pozitivita vzorku.

Tabulka 7. Rozpis přípravy agarózového gelu a podmínky elektroforézy

	1,5 % gel (velká vana)
Agaróza (g)	3
1x TAE (ml)	200
Barva GelRed® (μl)	10
Elektrické napětí (V)	180
Čas (min)	45

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo zjištění přítomnosti genů rezistence – *qnrS*, *tetA*, *blaTEM* (simplex PCR) a *mcr-1-5* (multiplex PCR) ve vzorcích kuřecího masa z maloobchodní sítě. U pozitivních kontrol ze sbírky ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně (Pavličková, 2016), jež nesly výše zmíněné geny rezistence, byla navíc testována antibiotická rezistence fenotypově.

6.1 Izolace DNA ze vzorků kuřecího masa

Pro další práci bylo nejdříve nutné izolovat DNA z kuřecího masa. Dále byla, pro účely použití jako pozitivní kontrola k plánovaným PCR, izolována DNA z pěti bakteriálních kmenů (Tab. 2), u nichž byl dříve potvrzen výskyt hledaných genů rezistence (Pavličková, 2016). Veškerá izolovaná DNA byla podrobena kontrole čistoty a koncentrace DNA.

Čistá DNA obsahuje zbytky purinů a její absorpční maximum je při 260 nm. Mezi časté kontaminanty patří RNA, organická rozpouštědla, detergenty a proteiny, které absorbují stejně jako DNA při 260 nm a jejich absorpční maximum je při 280 nm. V praxi se tedy používá poměr absorbancí při 260 a 280 nm. U čisté DNA by se tato hodnota měla pohybovat v rozmezí 1,8 a 2,0 (Li et al., 2014). Z celkového počtu vzorků podrobených izolaci DNA byly na základě výsledků vyřazeny dva vzorky (č. 7 a 21), u kterých byla čistota DNA nedostatečná. Poměr absorbancí při 260 a 280 nm byl naměřen v rozmezí nejnižší hodnoty rovné 1,64 a nejvyšší 2,29. Kromě kvality templátové DNA může optimalizace kvantity DNA výrazně přispět k úspěšnosti PCR reakcí. Přestože je vhodné stanovit množství v ng/μl, jak bylo stanoveno v diplomové práci, relevantní jednotkou pro úspěšný PCR experiment je počet molekul, díky kterému zjistíme, kolik kopií templátu DNA obsahuje sekvenci komplementární k primerům PCR. Optimum se pohybuje mezi 10^4 a 10^7 molekul (Lorenz, 2012). Koncentrace DNA měla nejnižší hodnotu 1,5 ng/μl a nejvyšší 19,1 ng/μl. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v Příloze P I.

Zvolené pozitivní kontroly byly podrobeny izolaci DNA a následné kontrole čistoty a koncentrace DNA. Výsledky analýzy jsou zaznamenány v tabulce (Tab. 8).

Tabulka 8. Výsledky měření čistoty a koncentrace DNA u pozitivních kontrol

Označení	Koncentrace [ng/μl]	Poměr absorbancí při 260 a 280 nm [ng/μl]
2	13,6	2,06
2H	28,7	2,13
2MB	18,2	1,96
3MB	14,7	2,01
2FB	10,9	2,02

6.2 Stanovení antibiotické rezistence fenotypovou metodou

Pozitivní kontroly byly nejprve vybrány na základě nesoucích genů antibiotické rezistence (Pavličková, 2016) a poté podrobeny diskové difuzní metodě. Při hodnocení antimikrobiálního účinku se provedlo měření průměru vzniklých inhibičních zón v mm pomocí pravítka a tyto hodnoty (Tab. 9) byly porovnány s EUCAST (z angl. European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) breakpointy (EUCAST, 2022) (Tab. 4).

Tabulka 9. Velikost inhibičních zón a výsledky diskové difuzní metody u pozitivních kontrol (vyhodnoceno dle EUCAST, 2022)

Vzorky	2H	2MB	3MB	2FB
Antibiotikum	Velikost zóny inhibice (mm)			
ATM30	21	31	28	28
CXM30	6	6	6	6
CIP5	31	39	40	36
DO30	20	15	11	21
CL10	13	17	17	16
MEM10	19	24	23	20
S300	29	19	30	24
TE10	20	9	7	22

Legenda: oranžově označené ... rezistentní
 modře označené ... intermediárně rezistentní
 zeleně označené ... citlivý
 neoznačené ... nejsou stanoveny breakpointy

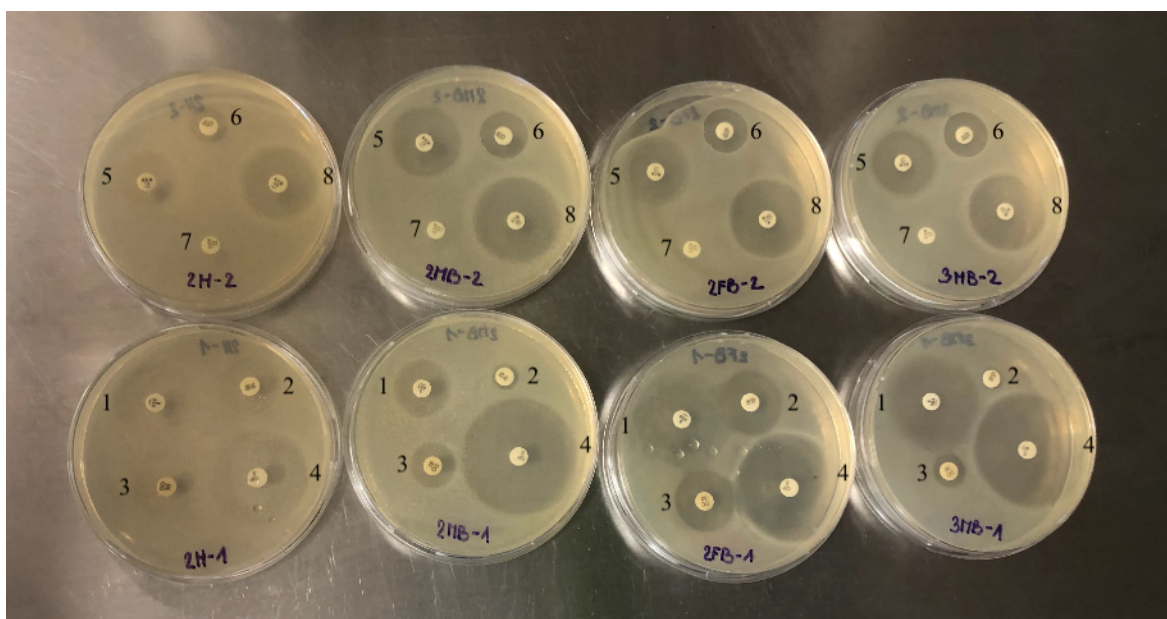
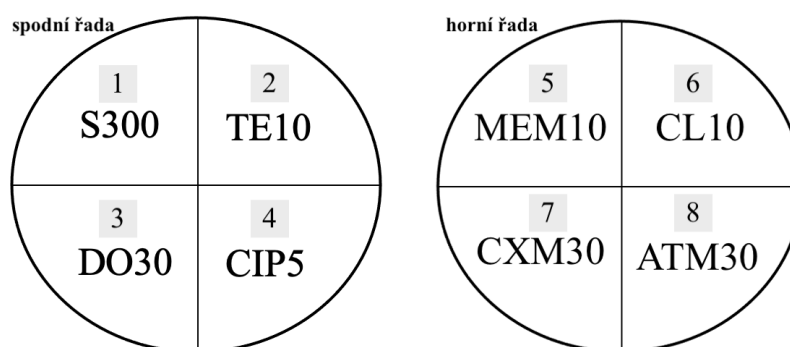
Byly porovnány geny antibiotické rezistence (Tab. 2) a velikosti inhibičních zón diskové difuzní metody (Tab. 9). Všechny pozitivní kontroly by měly nést rezistenci

k aminoglykosidům (gen *aphA1*) – antibiotikum streptomycin (S300). Kontrola s označením 2H by měla být dále rezistentní k fluorochinolonům (gen *qnrS*) – antibiotikum ciprofloxacin (CIP5) a beta-laktamovým antibiotikům (gen *blaTEM*) – antibiotikum meropenem (MEM10), aztreonam (ATM30) a cefuroxim (CXM30). Z tabulky (Tab. 9) vyplývá, že tento vzorek je fenotypově rezistentní k cefuroximu (<19 mm) a intermediárně rezistentní k aztreonamu (21 – 25 mm) i meropenemu (16 – 21 mm). Rezistenci k streptomycinu nebylo možné zhodnotit kvůli nestanoveným breakpointům. Pozitivní kontrola 2MB by měla být rezistentní k fluorochinolonům (gen *qnrS*) a tetracyklinům (gen *tetA*) – antibiotikum tetracyklin (TE10) a doxycyklin (DO30). Z tabulky (Tab. 9) je patrná fenotypická rezistence k cefuroximu (<19 mm). Pozitivní kontrola označená jako 3MB nesla gen rezistence k tetracyklinům (*tetA*) a gen rezistence k beta-laktamovým antibiotikům (*blaOXA-7*). Z tabulky (Tab. 9) je patrná fenotypová rezistence pouze k cefuroximu (<19 mm). Poslední pozitivní kontrola – 2FB nesla gen rezistence k beta-laktamovým antibiotikům (*blaCTX-M-Ig*) a tabulka (Tab. 9) prokazuje rezistenci k cefuroximu (<19 mm) a intermediární rezistenci k meropenemu (16 – 21 mm).

Výsledky porovnání genotypové (Tab. 2) a fenotypové (Tab. 9 + Obr. 5) metody se ne ve všech případech shodují. U rezistence k fluorochinolonům jsou shodné výsledky kmenů 3MB (citlivý) a 2FB (citlivý), zatímco kmeny 2H (citlivý) a 2MB (citlivý) jsou pozitivní na gen *qnrS*, a tudíž by měly být vůči ciprofloxacinu rezistentní. Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, genotypová i fenotypová, byla v souladu, až na kmen 2MB. Kmen 2MB byl rezistentní k antibiotiku cefuroxim. Je ale možné, že nesl jiný (netestovaný) gen antibiotické rezistence k beta-laktamovým antibiotikům než *blaTEM*, *blaOXA-7* a *blaCTX-M-Ig*. Kmeny 2H, 3MB a 2FB potvrdily diskovou difuzní metodou rezistenci k cefuroximu prokázanou geny rezistence k beta-laktamovým antibiotikům. Kmen 2H byl navíc intermediárně rezistentní k aztreonamu i meropenemu a kontrola 2FB intermediárně rezistentní k meropenemu. Kmeny byly vhodně zvoleny jako pozitivní kontroly pro reakci prokazující gen *blaTEM* i *tetA*. Pro reakci detekující gen rezistence *qnrS* by byla potřeba volba jiného kmene.

V jedné studii z roku 2010 (Scaria et al., 2010) proběhlo srovnání detekce antibiotické rezistence pomocí minimální inhibiční koncentrace (MIC) a microarray genů rezistence. Použití microrarray (mikročipů) přineslo větší rozlišení genů rezistence, kdy některé vzorky nevykazovaly žádnou rezistenci na úrovni MIC, ale vykazovaly přítomnost genů rezistence v mikročipové analýze. Tento fakt poukazuje na možnost kmenů, jež obsahují tyto geny, ale

neexprimují je (tzv. tiché geny rezistence) (Scaria et al., 2010). V další studii, z roku 2019 (Lepuschitz et al., 2019), bylo získáno několik odlišných fenotypových a genotypových antimikrobiálních nálezů. Všechny sekvenované izoláty obsahovaly gen *tet(34)* kódující enzym inaktivující tetracyklin, zatímco všechny izoláty byly citlivé na tetracykliny. Je tedy možné, že za podmínek *in vitro* testů citlivosti nebyl tento gen exprimován. U 6/46 environmentálních a 3/8 klinických izolátů byl přítomen gen *catB9* kódující chloramfenikol acetyltransferázu a udělující rezistenci k chloramfenikolu, ale žádný z izolátů nebyl odolný vůči chloramfenikolu (Lepuschitz et al., 2019). Podobný problém nastává u některých genů rezistence, jako například gen *mcr-9*, který za normálních podmínek neuděluje rezistenci ke kolistinu a bývá chybně fenotypově charakterizován jako citlivý (Kieffer et al., 2019). Na základě těchto poznatků je nejvhodnějším způsobem kombinace fenotypových a genotypových metod, a proto byla u stejných vzorků kuřecího masa provedena genotypová (tato práce) i fenotypová (Zaymlová, 2022) analýza antibiotické rezistence.



Obrázek 5. Disková difuzní metoda (vlastní fotografie a schéma)

6.3 Detekce genů rezistence

Celkový počet vzorků podrobených detekci genů rezistence pomocí PCR byl 28. U všech těchto vzorků byla provedena detekce genů *blaTEM*, *tetA*, *qnrS* a *mcr-1* až *mcr-5*. Byly testovány také některé další geny rezistence, jejichž amplifikace neproběhla úspěšně. Jednou z možností optimalizace bylo provedení PCR s teplotním gradientem. Někdy totiž došlo u původní PCR k nevhodnému určení teploty annealingu neboli nasedání primerů, a proto byla provedena reakce v teplotním gradientu, který pomohl určit vhodnou teplotu annealingu. Vhodně zvolená teplota nasedání primerů je velmi důležitá. Při nízké teplotě se vytváří nespecifické produkty, kdy primery nasedají na sekvence, jež jsou komplementární jen částečně. Naopak při vysoké teplotě se může vytvořit nedostatečné množství produktu z důvodu nízké hybridizace primerů. V některých případech tato optimalizace PCR s teplotním gradientem nepomohla a docházelo ke vzniku zmíněných nespecifických produktů. Příčin mohlo být několik, například nedostatečná čistota a koncentrace DNA, potřebná optimalizace PCR nebo nevhodně zvolená metoda izolace DNA z kuřecích vzorků. Jedním ze způsobů optimalizace PCR je příprava nových činidel používaných do reakční směsi. Postupných přidáváním vždy nového činidla lze zjistit, které způsobovalo neúspěšnost experimentu (Lorenz, 2012).

Tvorba primerových dimerů, kdy primery přednostně nasedají na jiný primer v reakci, je zobrazena na agarózovém gelu jako malý produkt, menší než 100 bp. Při této chybě je nejvhodnější změnit poměr templátu k primeru, protože pokud je koncentrace primeru v nadbytku nad koncentrací templátu, je pravděpodobnější, že primery nasednou k sobě než k templátové DNA. Problém může být vyřešen přidavkem dimethylsulfoxidu (DMSO), polárním rozpouštědlem schopným rozpouštět polární i nepolární sloučeniny nebo použitím metody Hot Start PCR. Tato metoda využívá Hot Start DNA polymeráz, jejichž enzymatická aktivita je reverzibilně blokována. K odblokování této aktivity dojde při prvním cyklu PCR a tím je zajištěno, že při přípravě PCR směsi nedochází k amplifikaci úseků s primery nespecificky vázanými na DNA (Lorenz, 2012).

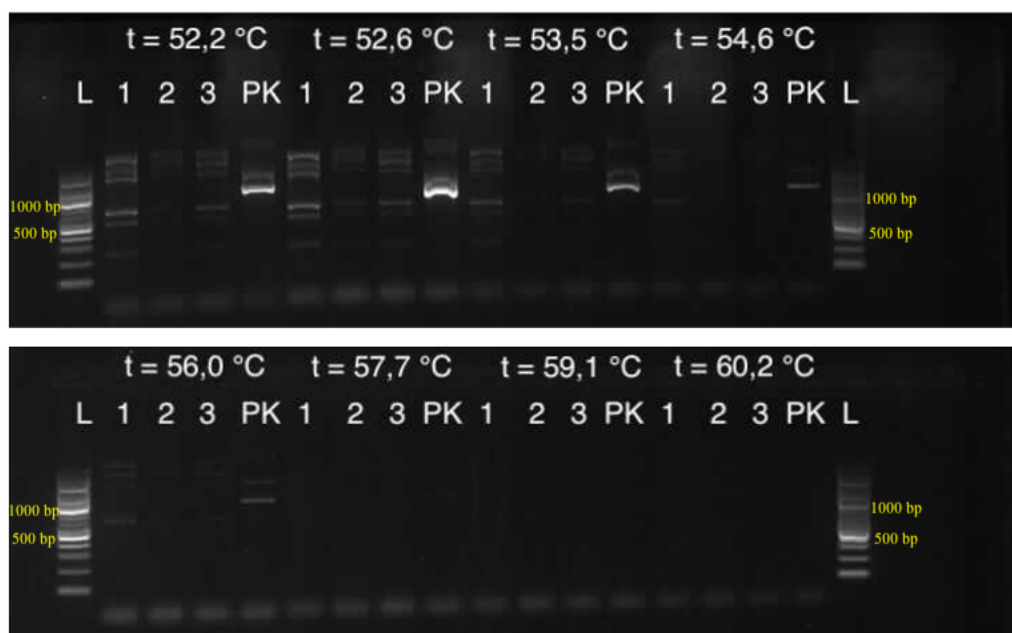
Poslední možností je navrhnutí nových primerů vhodnějších pro tuto reakci. Nespecifické produkty jsou vyobrazeny jako pásy s proměnlivou délkou vytvářející žebříkový efekt na agarózovém gelu, jak je patrné na obrázku (Obr. 6). Nejvhodnější řešení spočívá ve změně podmínek PCR reakce zvyšující její specifitu. Nedostatek produktů PCR je pravděpodobně způsoben příliš specifickými reakčními podmínkami. Jednou z vhodných analýz je kontrola obsahu G-C. PCR oblasti bohaté na G-C (obsah G-C > 60 %) představují

pro PCR spoustu problémů (Lorenz, 2012). Pro zlepšení specifčnosti byly vyvinuty různé strategie, jako je nested PCR využívající dvou samostatných sad primerů (Zhong et al., 2016); touchdown PCR, kdy primery nasedají při teplotě vyšší o 5 – 10 °C než je jejich T_m (teplota tání, z angl. melting temperature) a v následujících cyklech se teplota nasedání postupně snižuje až ke konečné teplotě nižší o 2 – 5 °C než je jejich T_m (Green a Sambrook, 2018). V posledních letech se v systému PCR používají nanomateriály, včetně kovových nanočástic, polovodičových kvantových teček, uhlíkových nanomateriálů a polymerních nanočástic (Zhong et al., 2016).

Studie z roku 2015 (Hou et al., 2015) rozdělila kuřecí, kachní a husí vzorky do tří skupin. Jedna skupina byla použita přímo pro extrakci DNA. Vzorky druhé skupiny byly vařeny při 100 °C po dobu 15 minut a poté použity pro extrakci DNA. Třetí skupina byla autoklávována při 121 °C po dobu 15 minut a poté použita pro extrakci DNA. Všechny vzorky první skupiny byly úspěšně amplifikovány a ze vzorků DNA z druhé a třetí skupiny byly amplifikovány pouze specifické produkty (Hou et al., 2015). Z této studie vyplývá, že by přímá extrakce DNA měla být vhodně zvolenou metodou.

První reakcí bylo testování přítomnosti genu 16S rRNA u náhodně vybraných vzorků k potvrzení správně provedené izolace DNA. Tento gen kóduje podjednotku ribozomu o velikosti 16S nesenou prokaryotickými organismy. Všechny vybrané vzorky (č. 1, 4, 6, 8, 11, 13, 17, 20, 24, 29) byly pozitivní. Díky těmto výsledkům byla potvrzena nepřítomnost inhibitorů PCR u těchto vzorků.

Další reakcí byla detekce genu *aphA1* kódující rezistenci k aminoglykosidům. U této reakce vznikla spousta nespecifických produktů, kdy se i po druhé PCR, tentokrát s teplotním gradientem (Obr. 6), tyto nespecifické produkty stále objevovaly. Bohužel žádná z původně označených pozitivních kontrol nesoucí gen *aphA1* nebyla překvapivě prokázána jako pozitivní. Mezi reakce, u kterých by bylo potřeba několik optimalizací PCR, patří multiplex PCR genů kódujících rezistenci k tetracyklinům (*tetA*, *tetB*, *tetO*, *tetM*, *tetK*) inspirovaná protokolem z roku 2001 (Ng et al., 2001), simplexní PCR genu *aadA1* nesoucího rezistenci k aminoglykosidům, multiplexní PCR s geny kódujícími rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům (*blaTEM*, *blaOXA-7*) a multiplex PCR genů rezistence k chloramfenikolu (*catA1*), erytromycinu (*ereA*) a beta-laktamovým antibiotikům (*blaCIT-M*).



Obrázek 6. Fotografie gelu – *aphA1* (gradientová PCR) a nespecifické produkty

1 – 3 ... testované vzorky

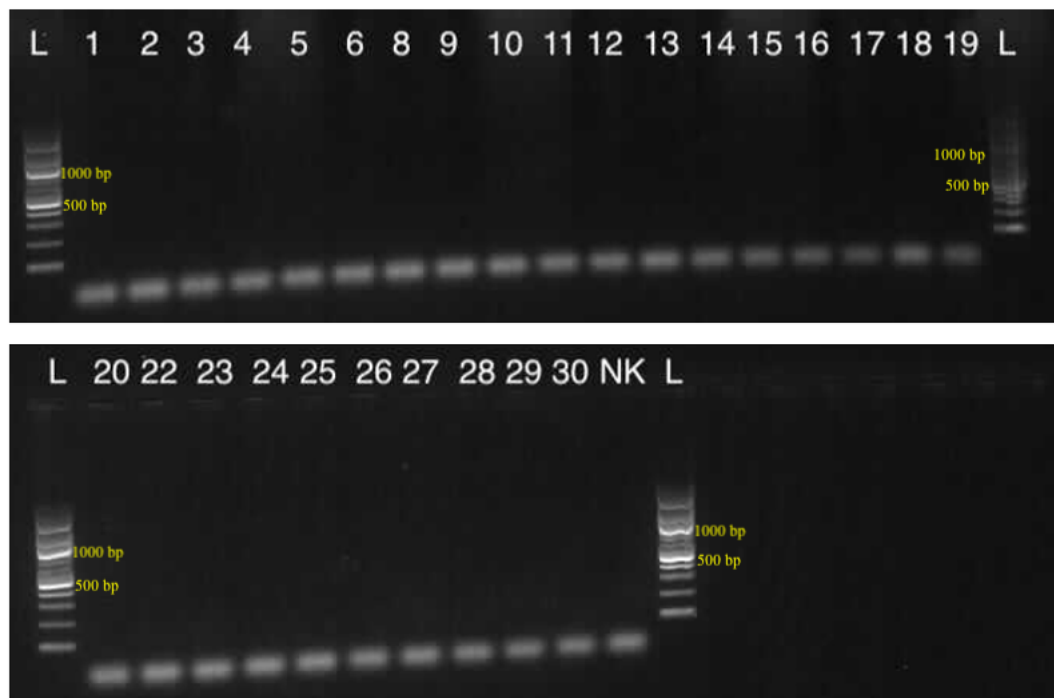
t ... určitá teplota

PK ... pozitivní kontrola (2MB)

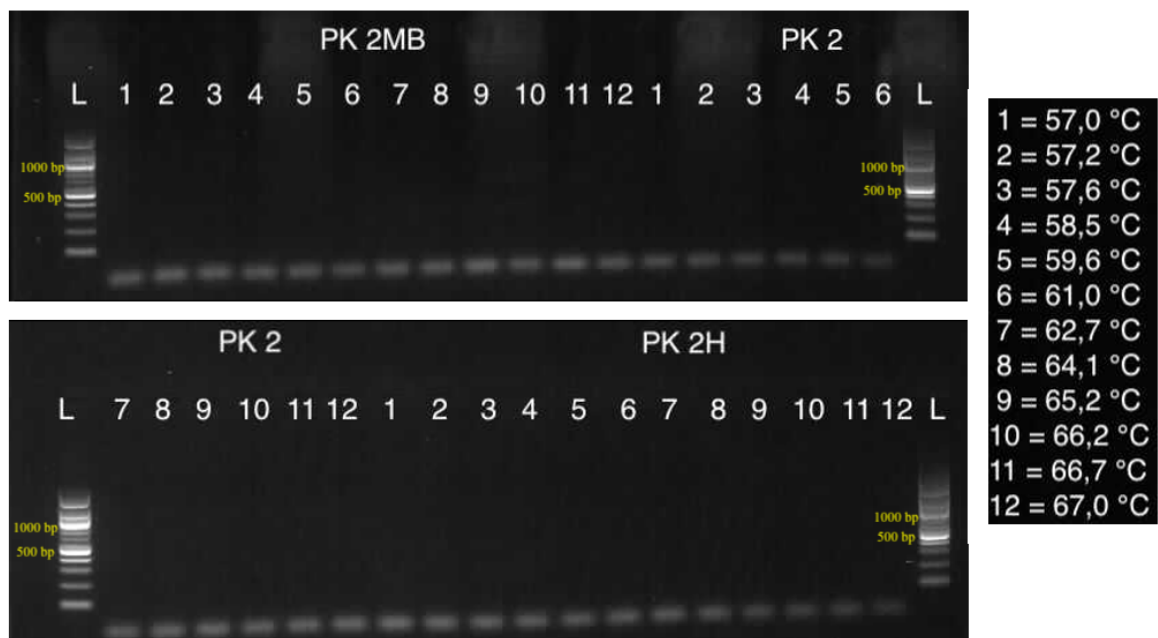
L ... 100 bp ladder (žebřík/velikostní marker)

Mezi další reakci patřila multiplex PCR genů *mcr-1,-2,-3,-4,-5* kódující rezistenci ke kolistinu. Tato reakce byla inspirována protokolem (Rebello, et al., 2018) s některými úpravami. Ze všech 28 vzorků nebyl žádný potvrzen jako pozitivní (Obr. 7).

Následující reakcí byla simplex PCR genu *qnrS* kódující rezistenci k fluorochinolonům, u které nevyšly žádné nespecifické produkty. Problémem bylo, že vybraná pozitivní kontrola 2MB, jež měla obsahovat tento gen, byla negativní. Na základě tohoto výsledku byla provedena PCR s teplotním gradientem u pozitivních kontrol obsahujících gen *qnrS* (2MB, 2, 2H) a všechny vybrané teploty v rozmezí 57 a 67 °C vyšly také negativně – viz obrázek (Obr. 8). Tímto se potvrdilo, že původní PCR reakce proběhla v pořádku a lze spekulovat o tom, že tento kmen mohl ztratit plazmid nesoucí tento gen či mohl být dříve analyzován chybně jako pozitivní (nesoucí gen *qnrS*). Disková difuzní metoda navíc neprokázala rezistenci ani intermediární rezistenci pozitivních kontrol 2MB a 2H k fluorochinolonům, konkrétně ciprofloxacinu (Tab. 9).



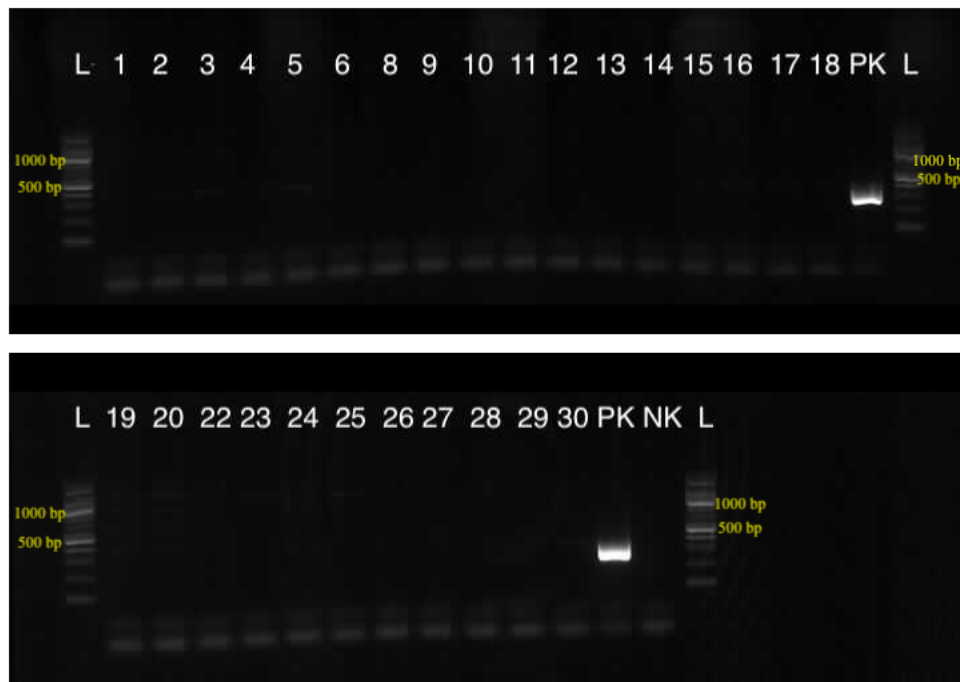
Obrázek 7. Fotografie gelu – *mcr-1* až *mcr-5*
 1 – 30 ... testované vzorky
 NK ... negativní kontrola
 L ... 100 bp ladder (žebřík/velikostní marker)



Obrázek 8. Fotografie gelu – *qnrS* (gradientová PCR)
 1 – 12 ... různé teploty gradientu
 PK ... pozitivní kontroly (2MB, 2, 2H)
 L ... 100 bp ladder (žebřík/velikostní marker)

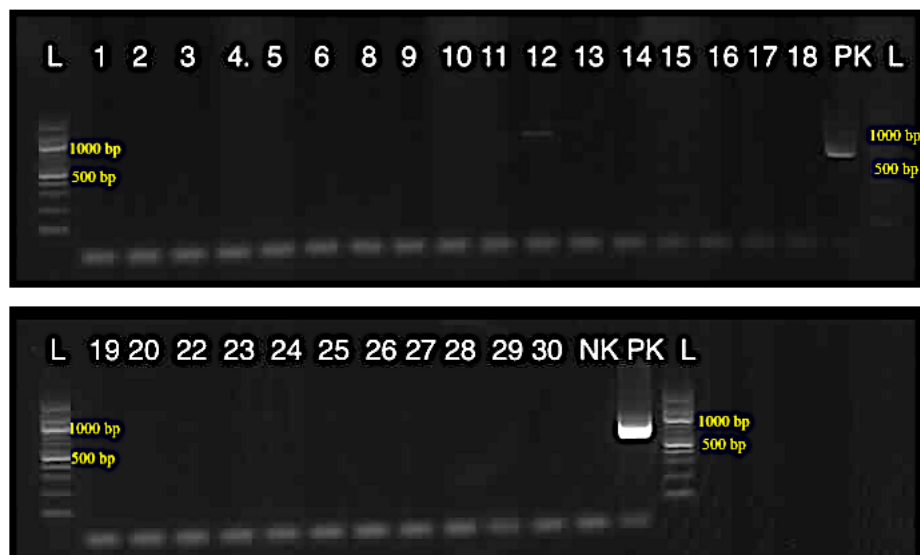
Stejně jako v případě vytvoření falešně pozitivního výsledku, může docházet k falešně negativním výsledkům. Mezi příčiny patří lidská chyba, technické problémy, nízká cílová koncentrace v klinickém vzorku a nerozpoznání cílového místa kvůli mutacím a inhibici (Burkardt, 2000). Chemická podstata inhibice může být velmi různorodá: může za to biologický materiál přítomný v klinickém vzorku (hemoglobin, heparin, některé hormony), detegenty a rozpouštědla pocházející z přípravy vzorku (dodecylsulfát sodný, ethanol, atd.) a/nebo částicové látky (Rolf, 1992; Mahony et al., 1998). Nejjednodušším způsobem překonání inhibice je opakování PCR testu. Důvodem je to, že podobně jako cílové molekuly, mohou být molekuly/materiál inhibitoru přítomny v nízké koncentraci a nerovnoměrně distribuovány. V takovém případě existuje šance, že druhý alikvot klinického vzorku nevykazuje inhibici. Pokud takový postup nepomůže, může být druhým krokem určité ředění vzorku. Nevýhodou této metody je, že cílová DNA bude rovněž naředěna a její koncentrace by poté mohla klesnout pod detekční limit testu (Burkardt, 2000). Jiní autoři doporučují vzorek ohřát, ochladit, zmrazit nebo nechat stát z důvodu lability některých inhibitorů (Verkooyen et al., 1996; Berg et al., 1997; Toye et al., 1998). Zdlouhavějším způsobem by bylo čištění nukleové kyseliny. V poslední době byly představeny komerční systémy pro purifikaci nukleových kyselin. Nejvhodnějším řešením by bylo sekvenování cílové DNA a porovnání sekvence se sekvencí primerů (Burkardt, 2000).

Následujícími simplexními reakcemi byla PCR genu kódujícího rezistenci k tetracyklinům (*tetA*) (Obr. 9) a poté k beta-laktamovým antibiotikům (*blaTEM*) (Obr. 10). Obě reakce vyšly negativní pro všechny testované vzorky. Reakce proběhly úspěšně, což bylo ověřeno pozitivní a negativní kontrolou.



Obrázek 9. Fotografie gelu – *tetA*

1 – 30 ... testované vzorky
 PK ... pozitivní kontrola (2MB)
 NK ... negativní kontrola
 L ... 100 bp ladder (žebřík/velikostní marker)



Obrázek 10. Fotografie gelu – *blaTEM*

1 – 30 ... testované vzorky
 PK ... pozitivní kontrola (2H)
 NK ... negativní kontrola
 L ... 100 bp ladder (žebřík/velikostní marker)

Žádný z testovaných osmi genů nebyl nalezen u 28 testovaných vzorků kuřecího masa. V japonské studii z roku 2009 (Ahmed et al., 2009) porovnávaly výsledky PCR a DNA sekvenování. Gen rezistence k beta-laktamáze *blaTEM-1* byl identifikován u 17,3 % izolátů *Escherichia coli* a v jednom z izolátů rodu *Salmonella*. Gen *blaTEM-1* byl dříve identifikován v sérovarech *Salmonella* z maloobchodního prodeje masa ve Spojených státech a v Čínské lidové republice (Chen et al., 2004). Výsledky analýz naznačují, že nejhojnějšími geny u kuřat jsou *blaCMY-2* a *blaCTX-M-2* produkované širokospektrými beta-laktamázi produkující *E. coli*. Zároveň neexistují žádné zprávy o *E. coli* rezistentní na karbapenem a kolistin izolované z kuřat ve Vietnamu nebo Japonsku (Nakayama et al., 2022).

Izoláty *E. coli* byly již dříve použity k detekci genů *mcr* pomocí multiplexní PCR. Výsledky ukázaly, že při multiplexní PCR (*mcr-1* až *mcr-5*) byl detekován pouze gen *mcr-1*, a to u všech zbývajících izolátů (35/36) (Nakayama et al., 2022). V řadě evropských zemí byla zjištěna vyšší prevalence gramnegativních bakterií s geny *mcr* u drůbeže, zejména krůt, ve srovnání s prasaty a skotem. Mezi lety 2002 a 2014 byla prokázána prevalence genu *mcr-1* 1,2 % u rezistentních *E. coli* z kuřat. Tyto izoláty byly detekovány především v Německu, Nizozemsku a Francii. Přímé PCR testování genů ukázalo vysokou prevalenci *mcr-1* v Číně a přítomnost *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* a *mcr-5* v kloakálních a orofaryngeálních výtěrech z drůbeže. Gen *mcr-1* byl identifikován až ve 31,8 % vzorků drůbeže. Celkově je však obtížné porovnávat údaje o prevalenci plazmidy zprostředkované rezistenci ke kolistinu v jednotlivých zemích kvůli rozdílům v metodických postupech používaných v různých studiích. Ve studii z roku 2019 (Gelbíčová et al., 2019) bylo zjištěno, že výskyt *Enterobacteriaceae* s genem *mcr-1* převládá ve vzorcích krůtího masa a jater ze zemí EU a mimo EU. Vzorky masa a jater kuřete a jiné drůbeže byly shledány negativní na přítomnost bakterií nesoucí geny *mcr-1* až *mcr-5* (Gelbíčová et al., 2019).

Studie zkoumající fluorochinolonovou rezistenci u *E. coli* pocházející z brojlerů popsala 54 (54/65; 83,08 %) vzorků pozitivních na *E. coli*. Test citlivosti na antibiotika odhalil, že z těchto 54 izolátů bylo potvrzeno 18 (33,33 %) izolátů rezistentních na alespoň jedno fluorochinolonové antibiotikum. Pomocí PCR bylo zjištěno, že z 18 *E. coli* byl u 13 (72,22 %) z nich potvrzen přítomný gen rezistence *qnrS*. Žádný z izolátů nebyl shledán pozitivní na *qnrA* (Mahmud et al., 2018).

Studie z Bangladéše zkoumající multirezistentní izoláty *E. coli* pocházející z brojlerů i nosnic potvrdila u 77,17 % gen *tetA*, který byl nejrozšířenější, následovaný *sulI* (kódující rezistenci k sulfonamidům; 45,94 %), *aadA1* (pro rezistenci na streptomycin; 34,65 %), *ereA*

(pro rezistenci na erythromycin; 31,23 %), *aac-3-IV* (pro rezistenci na gentamicin; 24,67 %) a dva geny *cmlA* (22,05 %) a *catA1* (7,09 %) kódující rezistenci na chloramfenikol (Rahman et al., 2020).

Možnostmi řešení vyššího zachytu genů rezistence k antibiotikům by kromě výše zmíněných bylo zvýšení počtu testovaných vzorků; změna druhu vzorků – namísto kuřecích křídel a špalíčků například droby; popřípadě zkoumání masa z velkoobchodu. Dalším řešením by mohla být změna metodiky na některou z uvedených v tabulce (Tab. 1). Konkrétně například sekvenování nové generace, které se svou rychlostí a přesností diagnostiky stává velmi přínosným v oblasti mikrobiologie. Genomy patogenů poskytují množství informací charakterizující dané bakterie včetně citlivosti na léky a vzájemných vztahů různých patogenů. Ačkoli je použití této metody stále v oblasti klinické diagnostiky cenově náročné a časově omezené, pokračuje snaha o snižování nákladů na sekvenování a zlepšování výpočetních algoritmů (Behjati a Tarpey, 2013).

ZÁVĚR

V současné době existuje jasný důkaz o používání antimikrobiálních látek u hospodářských zvířat, který vede k selekci a odolnosti mikrobů vůči antibiotikům, globálnímu šíření antimikrobiálních látek, patogenů přenášených potravinami a genů antibiotické rezistence pomocí různých cest přenosu a složek prostředí. Úplný obraz šíření genů antibiotické rezistence je však stále nejasný. Zároveň rozmanitost potravin a jejich mikrobiomů vyžaduje rozšíření výzkumu na více potravinových matic, aby bylo možné lépe prozkoumat a vyhodnotit oblast bezpečnosti a kvality potravin.

Tato diplomová práce se v teoretické části zabývá antimikrobiálními látkami obecně i se zaměřením na použití antibiotik u hospodářských zvířat, skupiny antibiotik a jejich mechanismy rezistence. V dalších kapitolách je rozebírán genetický základ antibiotické rezistence charakterizující mobilní genetické elementy i horizontální genový přenos a nový pojem antibiotický rezistom včetně metod využívaných k jeho studiu. V praktické části diplomové práce byl pomocí PCR a následné gelové elektroforézy zkoumán výskyt genů antibiotické rezistence – *blaTEM*, *tetA*, *qnrS* a *mcr-1*, *2*, *3*, *4* a *mcr-5* u celkem 28 vzorků chlazeného kuřecího masa (špalíčků a křídel) zakoupených v řeznictví Zlínského kraje. Pozitivní kontroly byly vybrány ze sbírky ÚIOŽP FT UTB ve Zlíně na základě potvrzených genů rezistence a byla u nich provedena disková difuzní metoda, která sloužila k porovnání fenotypu a genotypu. K vytvoření vhodného protokolu PCR byly provedeny optimalizace pomocí gradientové PCR. Celkové výsledky lze shrnout tak, že nepřítomnost testovaných genů rezistence v kuřecím mase by mohla být považována za pozitivní zprávu, nicméně vzhledem k pilotní studii bude potřeba zvýšit počet testovaných vzorků, optimalizovat PCR metodu a případně rozšířit portfolio metod studia antibiotického rezistomu.

V nadcházejících letech je nezbytností nepřetržité sledování spotřeby veterinárních antibiotik a antimikrobiální rezistence z pohledu konceptu „Jedno zdraví“, který pokrývá celé spektrum živočichů, včetně člověka a různých složek životního prostředí jako je voda, půda a vzduch. Je důležité standardizovat metody a vytvořit globální databáze ke zlepšení porozumění příspěvku živočišných produktů ke zvyšování prevalence genů antibiotické rezistence u humánních patogenů. Je poukázáno na důležitost použití kombinovaných metod pro co nejpřesnější identifikaci genů rezistence. Aby byla zajištěna potřebná spolehlivost a přesnost genetických determinant antimikrobiální rezistence, je metagenomika zdůrazněna jako kompletnější metoda ve srovnání s jinými molekulárními metodami. Velkou výhodou metagenomiky je získání všech informací o mikrobiomu přítomném ve studovaném vzorku.

Avšak neexistuje žádná lepší nebo horší technika stanovení antimikrobiální rezistence a nejlepší pohled na věc je kombinace výhod, které každá metoda nabízí.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ABRAHAM, Edward P.; CHAIN, Ernst. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. *Nature*, 1940, 146.3713: 837-837.

AHMED, Ashraf M.; SHIMABUKURO, Hirofumi; SHIMAMOTO, Tadashi. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant strains of *Escherichia coli* and *Salmonella* from retail chicken meat in Japan. *Journal of Food Science*, 2009, 74.7: M405-M410.

ALI, Hazrat, et al. An assessment of chemical and biological product use in aquaculture in Bangladesh. *Aquaculture*, 2016, 454: 199-209.

AMARASIRI, Mohan; SANO, Daisuke; SUZUKI, Satoru. Understanding human health risks caused by antibiotic resistant bacteria (ARB) and antibiotic resistance genes (ARG) in water environments: Current knowledge and questions to be answered. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2020, 50.19: 2016-2059.

AMINOV, Rustam I. A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology*, 2010, 1: 134.

AMINOV, Rustam I.; MACKIE, Roderick I. Evolution and ecology of antibiotic resistance genes. *FEMS Microbiology Letters*, 2007, 271.2: 147-161.

ANDERSEN, Sigrid Rita; SANDAA, RUTH-ANNE. Distribution of tetracycline resistance determinants among gram-negative bacteria isolated from polluted and unpolluted marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 1994, 60.3: 908-912.

ANDRUP, L. A. R. S.; DAMGAARD, JESPER; WASSERMANN, KARSTEN. Mobilization of small plasmids in *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* is accompanied by specific aggregation. *Journal of Bacteriology*, 1993, 175.20: 6530-6536.

ANKENBAUER, Robert G. Reassessing forty years of genetic doctrine: retrotransfer and conjugation. *Genetics*, 1997, 145.3: 543.

ARGUDÍN, Maria Angeles, et al. Bacteria from animals as a pool of antimicrobial resistance genes. *Antibiotics*, 2017, 6.2: 12.

ASHBOLT, Nicholas J., et al. Human health risk assessment (HHRA) for environmental development and transfer of antibiotic resistance. *Environmental health perspectives*, 2013, 121.9: 993-1001.

BAILEY, J. S., et al. Chlorine spray washing to reduce bacterial contamination of poultry processing equipment. *Poultry Science*, 1986, 65.6: 1120-1123.

BASSETT, Everett J., et al. Tetracycline-labeled human bone from ancient Sudanese Nubia (AD 350). *Science*, 1980, 209.4464: 1532-1534.

BAUER, Torsten, et al. Effect of food components and processing parameters on DNA degradation in food. *Environmental Biosafety Research*, 2004, 3.4: 215-223.

BEHJATI, Sam; TARPEY, Patrick S. What is next generation sequencing?. *Archives of Disease in Childhood-Education and Practice*, 2013, 98.6: 236-238.

BERENDONK, Thomas U., et al. Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature reviews microbiology*, 2015, 13.5: 310-317.

BERG, E. S., et al. False-negative results of a ligase chain reaction assay to detect *Chlamydia trachomatis* due to inhibitors in urine. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 1997, 16.10: 727-731.

BI, Dexi, et al. Mapping the resistance-associated mobilome of a carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* strain reveals insights into factors shaping these regions and facilitates generation of a 'resistance-disarmed' model organism. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2015, 70.10: 2770-2774.

BÖLTNER, Dietmar, et al. R391: a conjugative integrating mosaic comprised of phage, plasmid, and transposon elements. *Journal of bacteriology*, 2002, 184.18: 5158-5169.

BONOMO, Robert A.; SZABO, Dora. Mechanisms of multidrug resistance in *Acinetobacter* species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical infectious diseases*, 2006, 43.Supplement_2: S49-S56.

BOYD, E. Fidelma; ALMAGRO-MORENO, Salvador; PARENT, Michelle A. Genomic islands are dynamic, ancient integrative elements in bacterial evolution. *Trends in microbiology*, 2009, 17.2: 47-53.

BRAGA, Patricia Aparecida Campos, et al. Bacterial identification: from the agar plate to the mass spectrometer. *RSC advances*, 2013, 3.4: 994-1008.

BRANDT, Kristian K., et al. Ecotoxicological assessment of antibiotics: a call for improved consideration of microorganisms. *Environment International*, 2015, 85: 189-205.

BURKARDT, Hans-Joachim. Standardization and quality control of PCR analyses. 2000.

- BURRUS, Vincent, et al. Conjugative transposons: the tip of the iceberg. *Molecular microbiology*, 2002, 46.3: 601-610.
- BUSH, Karen; MACIELAG, Mark J. New β -lactam antibiotics and β -lactamase inhibitors. *Expert opinion on therapeutic patents*, 2010, 20.10: 1277-1293.
- CAMBRAY, Guillaume; GUEROUT, Anne-Marie; MAZEL, Didier. Integrons. *Annual review of genetics*, 2010, 44: 141-166.
- CARATTOLI, Alessandra. Plasmids and the spread of resistance. *International journal of medical microbiology*, 2013, 303.6-7: 298-304.
- CARVALHO, Isabel T.; SANTOS, Lúcia. Antibiotics in the aquatic environments: a review of the European scenario. *Environment international*, 2016, 94: 736-757.
- CÉRÉMONIE, Hélène, et al. Isolation of lightning-competent soil bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70.10: 6342-6346.
- CÉRÉMONIE, Hélène, et al. Natural electrotransformation of lightning-competent *Pseudomonas* spp. strain N3 in artificial soil microcosms. *Applied and environmental microbiology*, 2006, 72.4: 2385-2389.
- COGLIANI, Carol; GOOSSENS, Herman; GREKO, Christina. Restricting antimicrobial use in food animals: lessons from Europe. *Microbe*, 2011, 6.6: 274.
- COLLIGNON, P., et al. World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies for the use of antimicrobials in food production animals. *Clinical infectious diseases*, 2009, 49.1: 132-141.
- COLLIGNON, Peter; VOSS, Andreas. China, what antibiotics and what volumes are used in food production animals?. *Antimicrobial Resistance and Infection Control*, 2015, 4.1: 1-4.
- COLLIS, Christina M., et al. Characterization of the class 3 integron and the site-specific recombination system it determines. *Journal of bacteriology*, 2002, 184.11: 3017-3026.
- COOK, Megan; MOLTO, E. L.; ANDERSON, C. Fluorochrome labelling in Roman period skeletons from Dakhleh Oasis, Egypt. *American journal of physical anthropology*, 1989, 80.2: 137-143.

COURVALIN, Patrice. New plasmid-mediated resistances to antimicrobial agents. *Archives of microbiology*, 2008, 189.4: 289-291.

CUI, Liwang; SU, Xin-zhuan. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. *Expert review of anti-infective therapy*, 2009, 7.8: 999-1013.

CUONG, Nguyen V., et al. Antimicrobial usage in animal production: a review of the literature with a focus on low-and middle-income countries. *Antibiotics*, 2018, 7.3: 75.

D'COSTA, Vanessa M., et al. Sampling the antibiotic resistome. *Science*, 2006, 311.5759: 374-377.

D'COSTA, Vanessa M., et al. Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, 2011, 477.7365: 457-461.

D'COSTA, Vanessa M.; GRIFFITHS, Emma; WRIGHT, Gerard D. Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current opinion in microbiology*, 2007, 10.5: 481-489.

DANMAP. Use of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. ISSN 1600-2032. 2016.

DANTAS, Gautam; SOMMER, Morten OA. Context matters — the complex interplay between resistome genotypes and resistance phenotypes. *Current opinion in microbiology*, 2012, 15.5: 577-582.

DAVIES, Mark R., et al. A novel integrative conjugative element mediates genetic transfer from group G *streptococcus* to other β -hemolytic *streptococci*. *Journal of bacteriology*, 2009, 191.7: 2257-2265.

DAVISON, John. Genetic exchange between bacteria in the environment. *Plasmid*, 1999, 42.2: 73-91.

DEPARDIEU, Florence, et al. Modes and modulations of antibiotic resistance gene expression. *Clinical microbiology reviews*, 2007, 20.1: 79-114.

DIACON, Andreas H., et al. The diarylquinoline TMC207 for multidrug-resistant tuberculosis. *New England Journal of Medicine*, 2009, 360.23: 2397-2405.

DIARRA, Moussa S.; MALOUIN, François. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 282.

DOMAGK, Gerhard. Ein beitrage zur chemotherapie der bakteriellen infektionen. *DMW-Deutsche Medizinische Wochenschrift*, 1935, 61.07: 250-253.

DRENKARD, Eliana; AUSUBEL, Frederick M. *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature*, 2002, 416.6882: 740-743.

EHRlich, Paul; HATA, S. Die experimentelle chemotherapie der Spirillosen. Berlin: *Julius Springer*, 1910.

EKONG, Pius S., et al. Bayesian estimation of true prevalence, sensitivity and specificity of three diagnostic tests for detection of *Escherichia coli* O157 in cattle feces. *Preventive veterinary medicine*, 2017, 148: 21-27.

ERCOLINI, Danilo, et al. Monitoring of microbial metabolites and bacterial diversity in beef stored under different packaging conditions. *Applied and environmental microbiology*, 2011, 77.20: 7372-7381.

EUCAST: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters [online]. Verze 12.0, 2022 [cit. 2022-04-13].

FALKINHAM III, Joseph O., et al. Proliferation of antibiotic-producing bacteria and concomitant antibiotic production as the basis for the antibiotic activity of Jordan's red soils. *Applied and environmental microbiology*, 2009, 75.9: 2735-2741.

FDA CVM. 2018. 2017 summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. Center for Veterinary Medicine, US Food and Drug Administration, Washington, DC. <https://www.fda.gov/media/119332/download>.

FINLEY, Rita L., et al. The scourge of antibiotic resistance: the important role of the environment. *Clinical infectious diseases*, 2013, 57.5: 704-710.

FLUIT, A. C.; SCHMITZ, F.-J. Resistance integrons and super-integrons. *Clinical microbiology and infection*, 2004, 10.4: 272-288.

FORSBERG, Kevin J., et al. The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 2012, 337.6098: 1107-1111.

FORSBERG, Kevin J., et al. Bacterial phylogeny structures soil resistomes across habitats. *Nature*, 2014, 509.7502: 612-616.

FRASAO, Beatriz da Silva; MARIN, Victor Augustus; CONTE-JUNIOR, Carlos Adam. Molecular detection, typing, and quantification of *Campylobacter* spp. in foods of animal origin. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 2017, 16.4: 721-734.

GAIRE, Tara N., et al. Age Dependence of Antimicrobial Resistance Among Fecal Bacteria in Animals: A Scoping Review. *Frontiers in veterinary science*, 2021, 1174.

GALHANO, Beatriz SP, et al. Antimicrobial resistance gene detection methods for bacteria in animal-based foods: a brief review of highlights and advantages. *Microorganisms*, 2021, 9.5: 923.

GELBÍČOVÁ, Tereza, et al. Dissemination and comparison of genetic determinants of mcr-mediated colistin resistance in *Enterobacteriaceae* via retailed raw meat products. *Frontiers in microbiology*, 2019, 10: 2824.

GERDES, Kenn; MAISONNEUVE, Etienne. Bacterial persistence and toxin-antitoxin loci. *Annual review of microbiology*, 2012, 66: 103-123.

GHOSH, Sudeshna; LAPARA, Timothy M. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME journal*, 2007, 1.3: 191-203.

GILL, C. O. Sources of microbial contamination at slaughtering plants. In: *Improving the safety of fresh meat*. Woodhead Publishing, 2005. p. 231-243.

GÓCHEZ, Delfy, et al. OIE annual report on antimicrobial agents intended for use in animals: methods used. *Frontiers in veterinary science*, 2019, 317.

GOOSSENS, Herman, et al. Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance: a cross-national database study. *The Lancet*, 2005, 365.9459: 579-587.

GOTOH, Yasuhiro, et al. Two-component signal transduction as potential drug targets in pathogenic bacteria. *Current opinion in microbiology*, 2010, 13.2: 232-239.

GRAPE, Malin. *Molecular basis for trimethoprim and sulphonamide resistance in Gram negative pathogens*. Karolinska Institutet (Sweden), 2006.

GREEN, Michael R.; SAMBROOK, Joseph. Touchdown polymerase chain reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2018, 2018.5: pdb. prot095133.

GRIGORYAN, Larissa, et al. Attitudes, beliefs and knowledge concerning antibiotic use and self-medication: a comparative European study. *Pharmacoepidemiology and drug safety*, 2007, 16.11: 1234-1243.

GRONVALL, Gigi, et al. One health security: an important component of the global health security agenda. *Biosecurity and bioterrorism: biodefense strategy, practice, and science*, 2014, 12.5: 221-224.

GUALERZI, Claudio O., et al. (ed.). Antibiotics: targets, mechanisms and resistance. První vydání. *John Wiley & Sons*, 2013, s. 1-22.

HANCOCK, Robert EW; SAHL, Hans-Georg. Antimicrobial and host-defense peptides as new anti-infective therapeutic strategies. *Nature biotechnology*, 2006, 24.12: 1551-1557

HANSSON, Karin, et al. IntI2 integron integrase in Tn 7. *Journal of bacteriology*, 2002, 184.6: 1712-1721.

HAO, Haihong, et al. Benefits and risks of antimicrobial use in food-producing animals. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 288.

HARMS, Alexander; MAISONNEUVE, Etienne; GERDES, Kenn. Mechanisms of bacterial persistence during stress and antibiotic exposure. *Science*, 2016, 354.6318: aaf4268.

HE, J. Baldini RL, Deziel E, Saucier M, Zhang Q, Liberati NT, Lee D, Urbach J, Goodman HM, and Rahme LG. The broad host range pathogen *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 carries two pathogenicity islands harboring plant and animal virulence genes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 2530-2535.

HOOPER, David C. Mechanisms of action and resistance of older and newer fluoroquinolones. *Clinical infectious diseases*, 2000, 31.Supplement_2: S24-S28.

HOU, Bo, et al. Development of a sensitive and specific multiplex PCR method for the simultaneous detection of chicken, duck and goose DNA in meat products. *Meat science*, 2015, 101: 90-94.

HOUGHTON, Jacob L., et al. The future of aminoglycosides: the end or renaissance?. *ChemBioChem*, 2010, 11.7: 880-902.

HU, Yongfei; GAO, George F.; ZHU, Baoli. The antibiotic resistome: gene flow in environments, animals and human beings. *Frontiers of medicine*, 2017, 11.2: 161-168.

HUGHES, Chambers C.; FENICAL, William. Antibacterials from the sea. *Chemistry–A European Journal*, 2010, 16.42: 12512-12525.

CHAHORM, Kanchana; PRAKITCHAIWATTANA, Cheunjit. Application of Reverse Transcriptase-PCR-DGGE as a rapid method for routine determination of *Vibrio* spp. in foods. *International journal of food microbiology*, 2018, 264: 46-52.

CHAIN, E., et al. The classic: penicillin as a chemotherapeutic agent. *Clinical Orthopaedics and Related Research®*, 2005, 439: 23-26.

CHEE-SANFORD, J. C., et al. Fate and transport of antibiotic residues and antibiotic resistance genetic determinants during manure storage, treatment, and land application. *J Environ Qual*, 2009, 38: 1086-1108.

CHEN, Sheng; ZHAO, Shaohua; WHITE, David G. et al. Characterization of multiple-antimicrobial-resistant *Salmonella* serovars isolated from retail meats. *Applied and Environmental Microbiology*, 2004, 70.1: 1-7.

CHEN, Zhou, et al. Fate of antibiotics and antibiotic resistance genes during aerobic co-composting of food waste with sewage sludge. *Science of The Total Environment*, 2021, 784: 146950.

CHOPRA, Ian; HESSE, Lars; O'NEILL, Alexander. Discovery and development of new anti-bacterial drugs. In: *Pharmacochemistry library*. Elsevier, 2002. p. 213-225.

JACOBY, George A. Mechanisms of resistance to quinolones. *Clinical infectious diseases*, 2005, 41.Supplement_2: S120-S126.

JACOBY, George A.; STRAHILEVITZ, Jacob; HOOPER, David C. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Plasmids: Biology and Impact in Biotechnology and Discovery*, 2015, 475-503.

JIA, Baofeng, et al. CARD 2017: expansion and model-centric curation of the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic acids research*, 2016, gkw1004.

JOHNSBORG, Ola; ELDHOLM, Vegard; HÅVARSTEIN, Leiv Sigve. Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. *Research in microbiology*, 2007, 158.10: 767-778.

KAPITONOV, Vladimir V.; JURKA, Jerzy. A universal classification of eukaryotic transposable elements implemented in Repbase. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9.5: 411-412.

KARKMAN, Antti; PÄRNÄNEN, Katariina; LARSSON, D. G. Fecal pollution can explain antibiotic resistance gene abundances in anthropogenically impacted environments. *Nature communications*, 2019, 10.1: 1-8.

KEESE, Paul. Risks from GMOs due to horizontal gene transfer. *Environmental biosafety research*, 2008, 7.3: 123-149.

KELLER, Margaret A.; STIEHM, E. Richard. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clinical microbiology reviews*, 2000, 13.4: 602-614.

KELLY, B. G.; VESPERMANN, A.; BOLTON, D. J. Horizontal gene transfer of virulence determinants in selected bacterial foodborne pathogens. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47.5: 969-977.

KEMP, G. Kere; ALDRICH, M. L.; WALDROUP, A. L. Acidified sodium chlorite antimicrobial treatment of broiler carcasses. *Journal of food protection*, 2000, 63.8: 1087-1092.

KIEFFER, Nicolas, Guilhem ROYER, Jean-Winoc DECOUSSER, et al. *Mcr-9*, an Inducible Gene Encoding an Acquired Phosphoethanolamine Transferase in *Escherichia coli*, and Its Origin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2019, 63(9), e00965-19. DOI: 10.1128/AAC.00965-19. ISSN 0066-4804

KIM, Dae-Wi; CHA, Chang-Jun. Antibiotic resistome from the One-Health perspective: understanding and controlling antimicrobial resistance transmission. *Experimental & Molecular Medicine*, 2021, 53.3: 301-309.

KLARE, Ingo, et al. Occurrence and spread of antibiotic resistances in *Enterococcus faecium*. *International journal of food microbiology*, 2003, 88.2-3: 269-290.

KOBAYASHI, Takeshi, et al. Molecular evidence for the ancient origin of the ribosomal protection protein that mediates tetracycline resistance in bacteria. *Journal of molecular evolution*, 2007, 65.3: 228-235.

KOHANSKI, Michael A.; DWYER, Daniel J.; COLLINS, James J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nature Reviews Microbiology*, 2010, 8.6: 423-435.

KOTRA, Lakshmi P.; HADDAD, Jalal; MOBASHERY, Shahriar. Aminoglycosides: perspectives on mechanisms of action and resistance and strategies to counter resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000, 44.12: 3249-3256.

KUMARASAMY, Karthikeyan K., et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *The Lancet infectious diseases*, 2010, 10.9: 597-602.

LABBATE, Maurizio; CASE, Rebecca Josephine; STOKES, Hatch W. The integron/gene cassette system: an active player in bacterial adaptation. *Horizontal gene transfer*, 2009, 103-125.

LEE, Hae-Won, et al. Identification of microbial communities, with a focus on foodborne pathogens, during kimchi manufacturing process using culture-independent and-dependent analyses. *LWT-Food Science and Technology*, 2017, 81: 153-159.

LEE, Henry H., et al. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature*, 2010, 467.7311: 82-85.

LEE, Ki-Young; LEE, Bong-Jin. Structure, biology, and therapeutic application of toxin-antitoxin systems in pathogenic bacteria. *Toxins*, 2016, 8.10: 305.

LEPUSCHITZ, Sarah, et al. Phenotypic and genotypic antimicrobial resistance traits of *Vibrio cholerae* non-O1/non-O139 isolated from a large Austrian lake frequently associated with cases of human infection. *Frontiers in microbiology*, 2019, 2600.

LEVIN, Bruce R.; BULL, James J. Population and evolutionary dynamics of phage therapy. *Nature Reviews Microbiology*, 2004, 2.2: 166-173.

LEVY, Sharon. Reduced antibiotic use in livestock: how Denmark tackled resistance. 2014.

LI X., Wu Y., Zhang L., Cao Y., Li Y., Li J., Li Z., Wu G. Comparison of three common DNA concentration measurement methods. *Analytical Biochemistry*, 2014, 451, 18-24.

LI, Shaoting, et al. Microbiome-informed food safety and quality: Longitudinal consistency and cross-sectional distinctiveness of retail chicken breast microbiomes. *Msystems*, 2020, 5.5: e00589-20.

LIU, Chia-I., et al. A cholesterol biosynthesis inhibitor blocks *Staphylococcus aureus* virulence. *Science*, 2008, 319.5868: 1391-1394.

LIU, Y. Y., et al. Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-I in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *Lancet Infect Dis*, 2016, 6.2: 161-168.

LIU, Xiao; STEELE, Joshua Caleb; MENG, Xiang-Zhou. Usage, residue, and human health risk of antibiotics in Chinese aquaculture: a review. *Environmental Pollution*, 2017, 223: 161-169.

LOCK, Rowena L.; HARRY, Elizabeth J. Cell-division inhibitors: new insights for future antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2008, 7.4: 324-338.

LOMOVSKAYA, Olga; BOSTIAN, Keith A. Practical applications and feasibility of efflux pump inhibitors in the clinic — a vision for applied use. *Biochemical pharmacology*, 2006, 71.7: 910-918.

LORENZ, Michael G.; WACKERNAGEL, Wilfried. Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiological reviews*, 1994, 58.3: 563-602.

LORENZ, Todd C. Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, 2012, 63: e3998.

LU, Timothy K.; COLLINS, James J. Engineered bacteriophage targeting gene networks as adjuvants for antibiotic therapy. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106.12: 4629-4634.

MA, Liping, et al. Metagenomic assembly reveals hosts of antibiotic resistance genes and the shared resistome in pig, chicken, and human feces. *Environmental science & technology*, 2016, 50.1: 420-427.

MA, Tao; MCALLISTER, Tim A.; GUAN, Le Luo. A review of the resistome within the digestive tract of livestock. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2021, 12.1: 1-20.

MACNEIL, I. A., et al. Expression and isolation of antimicrobial small molecules from soil DNA libraries. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 2001, 3.2: 301-308.

MAHMUD, Shahin; NAZIR, KHM Nazmul Hussain; RAHMAN, Md Tanvir. Prevalence and molecular detection of fluoroquinolone-resistant genes (*qnrA* and *qnrS*) in *Escherichia coli* isolated from healthy broiler chickens. *Veterinary world*, 2018, 11.12: 1720.

MAHONEY, John F.; ARNOLD, R. C.; HARRIS, A. D. Penicillin treatment of early syphilis — a preliminary report. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, 1943, 33.12: 1387-1391.

MAHONY, J., et al. Urine specimens from pregnant and nonpregnant women inhibitory to amplification of *Chlamydia trachomatis* nucleic acid by PCR, ligase chain reaction, and transcription-mediated amplification: identification of urinary substances associated with inhibition and removal of inhibitory activity. *Journal of clinical microbiology*, 1998, 36.11: 3122-3126.

MAKOVITZKI, Arik; AVRAHAMI, Dorit; SHAI, Yechiel. Ultrashort antibacterial and antifungal lipopeptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103.43: 15997-16002.

MARTINEZ-MARTINEZ, Luis, et al. Plasmid-mediated quinolone resistance. *Expert review of anti-infective therapy*, 2008, 6.5: 685-711.

MARTINEZ, José L. Antibiotics and antibiotic resistance genes in natural environments. *Science*, 2008, 321.5887: 365-367.

MATHUR, Shalini; SINGH, Rameshwar. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International journal of food microbiology*, 2005, 105.3: 281-295.

MATSUI, Kazuaki; ISHII, Nobuyoshi; KAWABATA, Zen'ichiro. Release of extracellular transformable plasmid DNA from *Escherichia coli* cocultivated with *algae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69.4: 2399-2404.

MAZEL, Didier. Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology*, 2006, 4.8: 608-620.

MONK, A. B., et al. Bacteriophage applications: where are we now?. *Letters in applied microbiology*, 2010, 51.4: 363-369.

MULOI, Dishon, et al. Are food animals responsible for transfer of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* or their resistance determinants to human populations? A systematic review. *Foodborne pathogens and disease*, 2018, 15.8: 467-474.

MUNK, P., et al. Group E, Lund O, Hald T, Pamp SJ, Vigre H, Heederik D, Wagenaar JA, Mevius D, Aarestrup FM (2018) Abundance and diversity of the faecal resistome in slaughter pigs and broilers in nine European countries. *Nat Microbiol*, 3.8: 898-908.

NA'WAS, Tarek, et al. Transposable elements in *Escherichia coli* antimicrobial resistance. 2013.

NAKAJIMA, Osamu; AKIYAMA, Hiroshi; TESHIMA, Reiko. Real-time polymerase chain reaction method for detecting contamination of beef by material from genetically engineered cattle. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 2009, 32.8: 1313-1316.

NAKAYAMA, Tatsuya, et al. Abundance of colistin-resistant *Escherichia coli* harbouring *mcr-1* and extended-spectrum β -lactamase-producing *E. coli* co-harboring *blaCTX-M-55* or-65 with *blaTEM* isolates from chicken meat in Vietnam. *Archives of Microbiology*, 2022, 204.2: 1-9.

NELSON, Mark L., et al. Brief communication: mass spectroscopic characterization of tetracycline in the skeletal remains of an ancient population from Sudanese Nubia 350–550 CE. *American journal of physical anthropology*, 2010, 143.1: 151-154.

NG, L.-K., et al. Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and cellular probes*, 2001, 15.4: 209-215.

NJOROGE, Jacqueline; SPERANDIO, Vanessa. Jamming bacterial communication: new approaches for the treatment of infectious diseases. *EMBO molecular medicine*, 2009, 1.4: 201-210.

NOYES, Noelle R., et al. Resistome diversity in cattle and the environment decreases during beef production. *Elife*, 2016, 5: e13195.

OLAITAN, Abiola O.; MORAND, Serge; ROLAIN, Jean-Marc. Mechanisms of polymyxin resistance: acquired and intrinsic resistance in bacteria. *Frontiers in microbiology*, 2014, 5: 643.

OLONITOLA, Olayeni Stephen; FAHRENFELD, Nicole; PRUDEN, Amy. Antibiotic resistance profiles among mesophilic aerobic bacteria in Nigerian chicken litter and associated antibiotic resistance genes. *Poultry science*, 2015, 94.5: 867-874.

PARK, Chi Hye, et al. Prevalence of *aac(6)Ib-cr* encoding a ciprofloxacin-modifying enzyme in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006.

PARTRIDGE, Sally R., et al. Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical microbiology reviews*, 2018, 31.4: e00088-17.

PAVLÍČKOVÁ, Silvie. *Charakterizace kmenů Escheria coli izolovaných z potravin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2016, 154 s. Dostupné také z: <http://hdl.handle.net/10563/39384>. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Holko, Ivan.

PAWLOWSKI, Andrew C., et al. A diverse intrinsic antibiotic resistome from a cave bacterium. *Nature communications*, 2016, 7.1: 1-10.

PÉRICHON, Bruno; COURVALIN, Patrice; GALIMAND, Marc. Transferable resistance to aminoglycosides by methylation of G1405 in 16S rRNA and to hydrophilic fluoroquinolones by QepA-mediated efflux in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007, 51.7: 2464-2469.

PERRETEN, Vincent; BOERLIN, Patrick. A new sulfonamide resistance gene (*sul3*) in *Escherichia coli* is widespread in the pig population of Switzerland. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2003, 47.3: 1169-1172.

PERRY, Julie A.; WESTMAN, Erin Louise; WRIGHT, Gerard D. The antibiotic resistome: what's new?. *Current opinion in microbiology*, 2014, 21: 45-50.

PERRY, Julie; WRIGHT, Gerard. The antibiotic resistance “mobilome”: searching for the link between environment and clinic. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 138.

PERRY, Julie A.; WRIGHT, Gerard D. Forces shaping the antibiotic resistome. *BioEssays*, 2014, 36.12: 1179-1184.

POIREL, Laurent, et al. A novel IncQ plasmid type harbouring a class 3 integron from *Escherichia coli*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 2010, 65.8: 1594-1598.

POIREL, Laurent; PITOUT, Johann D.; NORDMANN, Patrice. Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. 2007.

RÅDSTRÖM, P.; SWEDBERG, G. O. T. E. RSF1010 and a conjugative plasmid contain *sulII*, one of two known genes for plasmid-borne sulfonamide resistance dihydropteroate synthase. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1988, 32.11: 1684-1692.

RAHMAN, Hafizur, et al. Novel anti-infective compounds from marine bacteria. *Marine drugs*, 2010, 8.3: 498-518.

RAHMAN, Md, et al. Isolation and molecular characterization of multidrug-resistant *Escherichia coli* from chicken meat. *Scientific Reports*, 2020, 10.1: 1-11.

RAMÍREZ, M. S.; PINEIRO, S. Group AIS, Centró D, Argentinian Integron Study Group. 2010. *Novel insights about class, 2*: 699-706.

RAMÍREZ, Maria S.; TOLMASKY, Marcelo E. Aminoglycoside modifying enzymes. *Drug resistance updates*, 2010, 13.6: 151-171.

RASMUSSEN, Henrik Berg. Restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified fragments (PCR-RFLP) and gel electrophoresis-valuable tool for genotyping and genetic fingerprinting. In: *Gel electrophoresis-principles and basics*. InTechopen, 2012.

RAVATN, Roald, et al. Chromosomal integration, tandem amplification, and deamplification in *Pseudomonas putida* F1 of a 105-kilobase genetic element containing the chlorocatechol degradative genes from *Pseudomonas* spp. strain B13. *Journal of bacteriology*, 1998, 180.17: 4360-4369.

REBELO AR, et al. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, *mcr-1*, *mcr-2*, *mcr-3*, *mcr-4* and *mcr-5* for surveillance purposes. *Euro Surveill.* 2018;23(6):pii=17-00672. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672>

RITCHIE, Hannah; ROSER, Max. Meat and dairy production. *Our World in Data*, 2017.

ROBERTS, Mariyn C. Resistance to tetracycline, macrolide-lincosamide-streptogramin, trimethoprim, and sulfonamide drug classes. *Molecular biotechnology*, 2002, 20.3: 261-283.

RODRIGUES, Grazielle Lima, et al. Frequency of antimicrobial resistance genes in *Salmonella* from Brazil by in silico whole-genome sequencing analysis: An overview of the last four decades. *Frontiers in Microbiology*, 2020, 1864.

ROLF, A. Substances affecting PCR: inhibition or enhancement. *PCR: Clinical diagnostics and Research*, 1992, 51-60.

ROLLO, I. M.; WILLIAMSON, J. Acquired resistance to penicillin and to neoarsphenamine in *Spirochaeta recurrentis*. *British journal of pharmacology and chemotherapy*, 1952, 7.1: 33.

RONQUILLO, Manuel Gonzalez; HERNANDEZ, Juan Carlos Angeles. Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: review of impact and analytical methods. *Food control*, 2017, 72: 255-267.

ROUGER, Amélie, et al. Diversity of bacterial communities in French chicken cuts stored under modified atmosphere packaging. *Food Microbiology*, 2018, 70: 7-16.

ROVIRA, Pablo, et al. Characterization of the microbial resistome in conventional and “raised without antibiotics” beef and dairy production systems. *Frontiers in microbiology*, 2019, 1980.

RUBIN, Carol, et al. Review of institute of medicine and national research council recommendations for one health initiative. *Emerging Infectious Diseases*, 2013, 19.12: 1913.

SÁNCHEZ, María Blanca. Antibiotic resistance in the opportunistic pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 658.

SCARIA, Joy, et al. Comparison of phenotypic and genotypic antimicrobial profiles in *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* from the same dairy cattle farms. *Molecular and cellular probes*, 2010, 24.6: 325-345.

SEITZ, Patrick; BLOKESCH, Melanie. Cues and regulatory pathways involved in natural competence and transformation in pathogenic and environmental Gram-negative bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 2013, 37.3: 336-363.

SENGUPTA, Saswati; CHATTOPADHYAY, Madhab K.; GROSSART, Hans-Peter. The multifaceted roles of antibiotics and antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, 2013, 4: 47.

SHAPIRO, James A. Mobile DNA and evolution in the 21st century. *Mobile DNA*, 2010, 1.1: 1-14.

SHINTANI, Masaki; SANCHEZ, Zoe K.; KIMBARA, Kazuhide. Genomics of microbial plasmids: classification and identification based on replication and transfer systems and host taxonomy. *Frontiers in microbiology*, 2015, 6: 242.

SCHIMMEL, Paul; TAO, Jianshi; HILL, Jason. Aminoacyl tRNA synthetases as targets for new anti-infectives. *The FASEB journal*, 1998, 12.15: 1599-1609.

SCHWARZ, Stefan, et al. Molecular basis of bacterial resistance to chloramphenicol and florfenicol. *FEMS microbiology reviews*, 2004, 28.5: 519-542.

SCHWARZ, Stefan; JOHNSON, Alan P. Transferable resistance to colistin: a new but old threat. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2016, 71.8: 2066-2070.

SIA, Elaine Ayres; KUEHNER, Denise M.; FIGURSKI, David H. Mechanism of retrotransfer in conjugation: prior transfer of the conjugative plasmid is required. *Journal of bacteriology*, 1996, 178.5: 1457-1464.

SOBELL, Henry M. Actinomycin and DNA transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1985, 82.16: 5328-5331.

STRAUB, JOACHIM A.; HERTEL, CHRISTIAN; HAMMES, WALTER P. A 23S rDNA-targeted polymerase chain reaction–based system for detection of *Staphylococcus aureus* in meat starter cultures and dairy products. *Journal of food protection*, 1999, 62.10: 1150-1156.

SU, Zhengding; HONEK, John F. Emerging bacterial enzyme targets. *Current opinion in investigational drugs (London, England: 2000)*, 2007, 8.2: 140-149.

SULLIVAN, John T.; RONSON, Clive W. Evolution of rhizobia by acquisition of a 500-kb symbiosis island that integrates into a phe-tRNA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95.9: 5145-5149.

SULTAN, Insha, et al. Antibiotics, resistome and resistance mechanisms: a bacterial perspective. *Frontiers in microbiology*, 2018, 2066.

SWEDBERG, G.; SKÖLD, O. Plasmid-borne sulfonamide resistance determinants studied by restriction enzyme analysis. *Journal of Bacteriology*, 1983, 153.3: 1228-1237.

TOYE, B., et al. Inhibition of PCR in genital and urine specimens submitted for *Chlamydia trachomatis* testing. *Journal of clinical microbiology*, 1998, 36.8: 2356-2358.

TURNIDGE, John. Antibiotic use in animals — prejudices, perceptions and realities. *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 2004, 53.1: 26-27.

USDA FSIS. The nationwide microbiological baseline data collection program: raw chicken parts survey, January 2012 – August 2012. Food Safety and Inspection Service, US Department of Agriculture, Washington, DC, 2012.

VAN BOECKEL, Thomas P., et al. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2015, 112.18: 5649-5654.

VAN BOECKEL, Thomas P., et al. Global trends in antimicrobial resistance in animals in low-and middle-income countries. *Science*, 2019, 365.6459: eaaw1944.

VAN DEN EEDE, G., et al. The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants. *Food and Chemical Toxicology*, 2004, 42.7: 1127-1156.

VERKOOYEN, R. P., et al. Detection of PCR inhibitors in cervical specimens by using the AMPLICOR *Chlamydia trachomatis* assay. *Journal of Clinical Microbiology*, 1996, 34.12: 3072-3074.

VERRAES, Claire, et al. Antimicrobial resistance in the food chain: a review. *International journal of environmental research and public health*, 2013, 10.7: 2643-2669.

VIKRAM, Amit, et al. Impact of “raised without antibiotics” beef cattle production practices on occurrences of antimicrobial resistance. *Applied and environmental microbiology*, 2017, 83.22: e01682-17.

VIKRAM, Amit, et al. Similar levels of antimicrobial resistance in US food service ground beef products with and without a “raised without antibiotics” claim. *Journal of food protection*, 2018, 81.12: 2007-2018.

WAGNER, Andreas. Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes. *Molecular biology and evolution*, 2006, 23.4: 723-733.

WAGNER, Andreas; LEWIS, Christopher; BICHSEL, Manuel. A survey of bacterial insertion sequences using IScan. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35.16: 5284-5293.

WALSH, Christopher. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 2000, 406.6797: 775-781.

WALSH, Timothy R. Emerging carbapenemases: a global perspective. *International journal of antimicrobial agents*, 2010, 36: S8-S14.

WANG, Yanan, et al. More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets. *Environment International*, 2021, 153: 106534.

WHITTLE, G.; SHOEMAKER, N. B.; SALYERS, A. A. The role of Bacteroides conjugative transposons in the dissemination of antibiotic resistance genes. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 2002, 59.12: 2044-2054.

WICKER, T.; SABOT, F. Hua-Van A., Bennetzen JL, Capy P., Chalhoub B., Flavell A., Leroy P., Morgante M., Panaud O., Paux E., SanMiguel P., Schulman AH A unified classification system for eukaryotic transposable elements. *Nat. Rev. Genet*, 2007, 8.12: 973.

WILSON, Mary E. *Antibiotics: What Everyone Needs to Know*®. Oxford University Press, 2019, s. 1.

WON-SUP, Y. Antibiotics in livestock harm human beings. *The Korea Times*, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, et al. High-level technical meeting to address health risks at the human-animal ecosystems interfaces: Mexico city, Mexico 15-17 November 2011.

WOZNIAK, Rachel AF; WALDOR, Matthew K. A toxin–antitoxin system promotes the maintenance of an integrative conjugative element. *PLoS genetics*, 2009, 5.3: e1000439.

WRIGHT, Gerard D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced drug delivery reviews*, 2005, 57.10: 1451-1470.

WRIGHT, Gerard D. The antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Reviews Microbiology*, 2007, 5.3: 175-186.

WRIGHT, Gerard D. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC biology*, 2010, 8.1: 1-6.

XIAO, L., et al. September 2016. A reference gene catalogue of the pig gut microbiome. *Nat Microbiol*. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol>, 2016.

XIAO, Yonghong; LI, Lanjuan. China's national plan to combat antimicrobial resistance. *The Lancet Infectious Diseases*, 2016, 16.11: 1216-1218.

XIE, Yingzhou, et al. TADB 2.0: an updated database of bacterial type II toxin–antitoxin loci. *Nucleic acids research*, 2018, 46.D1: D749-D753.

XIONG, Wenguang, et al. Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes. *Microbiome*, 2018, 6.1: 1-11.

XU, Hai, et al. Class 1 and class 2 integrons in multidrug-resistant gram-negative bacteria isolated from the Salmon River, British Columbia. *Canadian journal of microbiology*, 2011, 57.6: 460-467.

XU, Jingyi, et al. Antibiotic use in chicken farms in northwestern China. *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 2020, 9.1: 1-9.

XU, Zhenbo, et al. Occurrence and characteristics of class 1 and 2 integrons in *Pseudomonas aeruginosa* isolates from patients in southern China. *Journal of Clinical Microbiology*, 2009, 47.1: 230-234.

YAZDANKHAH, Siamak; RUDI, Knut; BERNHOFT, Aksel. Zinc and copper in animal feed—development of resistance and co-resistance to antimicrobial agents in bacteria of animal origin. *Microbial ecology in health and disease*, 2014, 25.1: 25862.

ZAYMLOVÁ, Kateřina. *Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, 2022. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Fakulta technologická, Ústav inženýrství ochrany životního prostředí. Vedoucí práce Janalíková, Magda.

ZHAO, Yi, et al. Feed additives shift gut microbiota and enrich antibiotic resistance in swine gut. *Science of the Total Environment*, 2018, 621: 1224-1232.

ZHAO, Yi, et al. Antibiotic resistome in the livestock and aquaculture industries: Status and solutions. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 2021, 51.19: 2159-2196.

ZHONG, Yong, et al. Enhancing the specificity of polymerase chain reaction by graphene oxide through surface modification: zwitterionic polymer is superior to other polymers with different charges. *International journal of nanomedicine*, 2016, 11: 5989.

ZHOU, Yang, et al. Antibiotic administration routes and oral exposure to antibiotic resistant bacteria as key drivers for gut microbiota disruption and resistome in poultry. *Frontiers in microbiology*, 2020, 1319.

ZHU, Yong-Guan, et al. Microbial mass movements. *Science*, 2017, 357.6356: 1099-1100.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAC	acetyltransferázy
ABR	antibiotická rezistence (z angl. antibiotic resistance)
AGP	antibiotický růstový stimulátor (z angl. antibiotic growth promoter)
ANT	nukleotidyltransferázy nebo adenyltransferázy
APH	fosfotransferázy
CATs	chloramfenikol acetyltransferázy (z angl. chloramphenicol acetyltransferases)
DHPS	dihydropteroátsyntáza
DMSO	dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ESBL	širokospektré β -laktamázy (z angl. extended spectrum β -lactamases)
EU	Evropská unie
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Organizace pro výživu a zemědělství (z angl. Food and Agriculture Organization)
HGT	horizontální přenos genů (z angl. horizontal gene transfer)
ICEs	integrativní a konjugativní elementy (z angl. integrative a conjugative elements)
IME	integrativní mobilní elementy (z angl. integrative mobile elements)
ISs	inzerní sekvence (z angl. insertion sequences)
LPS	lipopolysacharid
MAP	balení s modifikovanou atmosférou (z angl. modified atmosphere packaging)
MBL	metalo β -laktamázy (z angl. metallo β -lactamases)

MGEs	mobilní genetické elementy (z angl. mobile genetic elements)
MIC	minimální inhibiční koncentrace (z angl. minimum inhibitory concentration)
MLS	makrolidy, linkosamidy a streptograminová antibiotika (z angl. macrolides, lincosamides, streptogramines)
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i> (z angl. methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
OECD	Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (z angl. Organization for Economic Cooperation and Development)
OIE	Světová organizace pro zdraví zvířat (World Organization for Animal Health)
PBP	protein vázající penicilin (z angl. penicillin binding protein)
PCR	polymerázová řetězová reakce (z angl. polymerase chain reaction)
PCR-RFLP	PCR kombinovaná s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (z angl. restriction fragment length polymorphism)
qPCR	kvantitativní PCR (z angl. quantitative PCR) neboli PCR v reálném čase (z angl. real-time PCR)
RAPD	náhodně amplifikovaná polymorfní DNA (z angl. random amplified polymorphic DNA)
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální RNA
tRNA	transferová RNA
RPM	otáčky za minutu (z angl. revolutions per minute)
RT-PCR	reverzní transkriptázová PCR (z angl. reverse transcriptase PCR)
TA	systémy toxin-antitoxin
TAE	tris-acetát-EDTA (z angl. tris-acetate-EDTA)
TCM	tradiční čínská medicína (z angl. Traditional Chinese Medicine)
TE	transponovatelné elementy (z angl. transposable elements)

ÚIOŽP FT UTB	Ústav inženýrství ochrany životního prostředí Fakulty technologické Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně
WGS	celogenomové sekvenování (z angl. whole-genom sequencing)
WHO	Světová zdravotnické organizace (z angl. World Health Organization)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1. Přehled antibiotických cílů a mechanismů antibiotické rezistence (Wright, 2010; upraveno).....	21
Obrázek 2. Mechanismy antibiotické rezistence (Walsh, 2000; upraveno).....	26
Obrázek 3. Dráhy přenosu bakterií/genů antibiotické rezistence ze zvířat na člověka (Zhao et al., 2021; upraveno).....	34
Obrázek 4. Normalizované množství genů antibiotické rezistence v různých živočišných mikrobiomech (Li et al., 2020; upraveno).....	36
Obrázek 5. Disková difuzní metoda (vlastní fotografie a schéma).....	55
Obrázek 6. Fotografie gelu – <i>aphA1</i> (gradientová PCR) a nespecifické produkty.....	58
Obrázek 7. Fotografie gelu – <i>mcr-1</i> až <i>mcr-5</i>	59
Obrázek 8. Fotografie gelu – <i>qnrS</i> (gradientová PCR)	59
Obrázek 9. Fotografie gelu – <i>tetA</i>	61
Obrázek 10. Fotografie gelu – <i>blaTEM</i>.....	61

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Výhody a nevýhody tradičních a molekulárních metod identifikace mikroorganismů a genů antimikrobiální rezistence (Galhano et al., 2021).....	38
Tabulka 2. Specifikace pozitivních kontrol (Pavličková, 2016).....	42
Tabulka 3. Seznam použitých primerů.....	45
Tabulka 4. Seznam antibiotických disků, koncentrací a limitů průměrů inhibičních zón (EUCAST, 2022)	49
Tabulka 5. Rozpis PCR směsi.....	50
Tabulka 6. Program PCR reakcí.....	50
Tabulka 7. Rozpis přípravy agarózového gelu a podmínky elektroforézy.....	51
Tabulka 8. Výsledky měření čistoty a koncentrace DNA u pozitivních kontrol.....	53
Tabulka 9. Velikost inhibičních zón a výsledky diskové difuzní metody u pozitivních kontrol (vyhodnoceno dle EUCAST, 2022)	53

SEZNAM PŘÍLOH

Příloha P I: Seznam vzorků

PŘÍLOHA P I: SEZNAM VZORKŮ

Označení	Původ	Řeznictví	Koncentrace DNA [ng/μl]	Poměr absorbancí při 260 a 280 nm
K1	Kuřecí špalíček	A	11,8	-
K2	Kuřecí špalíček	A	10,4	1,96
K3	Kuřecí špalíček	A	8,0	1,95
K4	Kuřecí špalíček	A	5,4	2,08
K5	Kuřecí špalíček	A	11,1	1,91
K6	Kuřecí křídlo	A	11,1	2,22
K7	Kuřecí křídlo	A	2,2	2,75
K8	Kuřecí křídlo	A	5,5	2,29
K9	Kuřecí křídlo	A	16,0	1,76
K10	Kuřecí křídlo	A	5,2	2,00
K11	Kuřecí křídlo	A	5,9	1,79
K12	Kuřecí křídlo	A	6,7	1,97
K13	Kuřecí křídlo	A	2,3	1,64
K14	Kuřecí křídlo	A	7,3	2,09
K15	Kuřecí křídlo	A	8,0	1,95
K16	Kuřecí křídlo	B	12,6	1,91
K17	Kuřecí křídlo	B	19,1	1,75
K18	Kuřecí křídlo	B	10,5	1,81
K19	Kuřecí křídlo	B	5,2	1,68
K20	Kuřecí křídlo	B	11,0	1,90
K21	Kuřecí špalíček	A	0,7	3,50
K22	Kuřecí špalíček	A	8,0	1,74
K23	Kuřecí špalíček	A	3,7	1,85
K24	Kuřecí špalíček	A	6,4	1,78
K25	Kuřecí špalíček	A	3,2	1,78
K26	Kuřecí křídlo	B	1,5	2,14
K27	Kuřecí křídlo	B	4,2	2,10
K28	Kuřecí křídlo	B	6,9	1,97
K29	Kuřecí křídlo	B	2,9	1,71
K30	Kuřecí křídlo	B	6,6	1,78