

Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin

Bc. Kateřina Zaymlová

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. Kateřina Zaymlová**
Osobní číslo: **T20046**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Forma studia: **Kombinovaná**
Téma práce: **Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování

1. Sepište literární rešerši o bakteriích rezistentních na antibiotika (ARB), zaměřte se na enterobakterie v potravinách a vodním prostředí.
2. Popište u nich výskyt všech skupin genů pro antibiotickou rezistenci (ARG) a vyhledejte různé metody jejich detekce.
3. Experimentálně izolujte kmeny enterobakterií z potravin živočišného původu, proveďte jejich identifikaci a stanovte výskyt antibiotické rezistence genotypicky i fenotypicky.
4. Výsledky vyhodnotte, diskutujte s aktuální odbornou literaturou 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 [cit. 2021-8-24]. 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 [cit. 2021-8-24]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2020.622495
- [3] GALHANO, Beatriz S. P., Rafaela G. FERRARI, Pedro PANZENHAGEN, Ana Carolina S. DE JESUS a Carlos A. CONTE-JUNIOR. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(5) [cit. 2021-8-24]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923
- [4] 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
- [5] LIU, Yi, Wenzhi LIU, Xiaomei YANG, Jie WANG, Hui LIN a Yuyi YANG. Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, 773 [cit. 2021-8-24]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2021.145643

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

Čeleď *Enterobacteriaceae* zahrnuje významné rody z hlediska patogenity a lidského zdraví. Jsou součástí střevní mikroflóry lidí i zvířat a mimo jiné se hojně vyskytují i ve vodě, půdě a na rostlinách. Ačkoliv je většina nepatogenní, zahrnuje tato čeleď také podmíněně patogenní či patogenní původce vážných onemocnění. Mezi takové rody se řadí např. *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Enterobacter* apod. Problémem u takových rodů je stále častěji se objevující rezistence k antibiotikům, jejíž dopadem je neúčinnost antimikrobních látek při léčbě infekcí a zvyšující se mortalita. Tato práce byla zaměřena na stanovení antibiotické rezistence u kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* ke 20 různým antibiotikům diskovou difúzní metodou. Bylo prokázáno, že všech 39 izolovaných kmenů z kuřecího masa bylo rezistentní alespoň k jednomu antibiotiku. Nejčastěji se vyskytující rezistencí je rezistence na peniciliny, cefalosporiny a linkosamidy (klindamycin). Výsledky této práce dokazují, že antibiotická rezistence je u izolátů z kuřecího masa velmi rozšířená a může tak přispívat k šíření rezistence, což je celosvětový problém zejména u zásobních antibiotik typu kolistin.

Klíčová slova: *Enterobacteriaceae*, antibiotika, antibiotická rezistence, disková difúzní metoda

ABSTRACT

Enterobacteriaceae is a family of important genera in terms of pathogenicity and human health. They are part of the intestinal microflora of humans and animals and are also present in water, soil and plants. Although most are non-pathogenic, this family also includes conditionally pathogenic agents of serious diseases. Such genera include for example *Salmonella*, *Escherichia*, *Yersinia*, *Enterobacter* etc. The problem with these genera is the increasing resistance to antibiotics, the impact of which is the ineffectiveness of antimicrobials in the treatment of infections and higher mortality. This work was focused on determining the antibiotic resistance of *Enterobacteriaceae* strains to 20 different antibiotics by disk diffusion method and each strain was found to be resistant to at least one antibiotic. The most common resistance is resistance to penicillins, cephalosporins and lincosamides (clindamycin). The results of this work prove that antibiotic resistance is very widespread in chicken isolates and can contribute to the spread of resistance, which is a worldwide problem, especially with colistin-type antibiotics,

Keywords: *Enterobacteriaceae*, antibiotics, antibiotic resistance, disk diffusion method

Ráda bych poděkovala vedoucí této diplomové práce, Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D., za možnost zabývat se tématem, které mě zajímá a za odborné vedení při jeho zpracování. Dále děkuji paní laborantce Ing. Olze Vlčkové a dalším pracovníkům mikrobiologické laboratoře a v neposlední řadě také mým nejbližším za podporu.

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

OBSAH

ÚVOD.....	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 POTRAVINY A KRMIVA ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU	12
2 ČELEĎ <i>ENTEROBACTERIACEAE</i>	15
2.1 ROD <i>ESCHERICHIA</i>	15
2.1.1 Onemocnění	15
2.1.2 Patogenní <i>Escherichia coli</i>	16
2.2 ROD <i>ENTEROBACTER</i>	17
2.3 ROD <i>SALMONELLA</i>	18
3 ANTIBIOTIKA A ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	20
3.1 MECHANISMUS ÚČINKU.....	21
3.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny.....	21
3.1.2 Narušení syntézy plazmatické membrány.....	22
3.1.3 Inhibice proteosyntézy	22
3.1.4 Narušení syntézy nukleových kyselin.....	22
3.2 SKUPINY ANTIBIOTIK.....	23
3.2.1 Beta-laktamová antibiotika	23
3.2.2 Aminoglykosidy	24
3.2.3 Tetracykliny	24
3.2.4 Makrolidy	25
3.2.5 Linkosamidy.....	25
3.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE.....	26
3.4 BAKTERIE REZISTENTNÍ NA ANTIBIOTIKA A GENY REZISTENCE	27
3.4.1 Enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz	28
3.4.2 Bakterie se získanou rezistencí ke kolistinu.....	28
3.4.3 Rezistence k sulfonamidům	29
3.4.4 Rezistence k tetracyklinům	29
3.4.5 Šíření rezistence k antimikrobiálním látkám.....	30
3.5 MOŽNOSTI DETEKCE GENŮ PRO ANTIBIOTICKOU REZISTENCI	33
3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	34

3.5.2	Reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR)	34
3.5.3	PCR v kombinaci s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP).....	35
3.5.4	Real-Time PCR (qPCR).....	35
3.5.5	Mikročipy	35
3.5.6	Sekvenování celého genomu a metagenomika	36
II	PRAKTICKÁ ČÁST	37
4	CÍL PRÁCE	38
5	MATERIÁL A METODY	39
5.1	PŘÍSTROJE	39
5.2	POMŮCKY A CHEMIKÁLIE	39
5.3	VZORKY KUŘECÍHO MASA	42
5.4	IZOLACE BAKTERIÁLNÍCH KMENŮ	43
5.5	IDENTIFIKACE KMENŮ	43
5.6	STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	45
6	VÝSLEDKY A DISKUZE	46
6.1	IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ	46
6.2	STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	48
6.2.1	Rod <i>Escherichia</i>	51
6.2.2	Rod <i>Enterobacter</i> a <i>Klebsiella</i>	52
6.2.3	Rod <i>Salmonella</i>	53
6.2.4	Rod <i>Serratia</i>	53
6.2.5	Rod <i>Yersinia</i>	55
6.2.6	Rod <i>Citrobacter</i>	55
6.2.7	Rody <i>Leclercia</i> , <i>Kluyvera</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Raoultella</i> , <i>Buttiauxella</i> , <i>Hafnia</i>	56
6.2.8	Multirezistence	58
6.2.9	<i>Aeromonas</i> (čeleď <i>Aeromonadaceae</i>).....	59
	ZÁVĚR	60
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	61
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	76
	SEZNAM OBRÁZKŮ;.....	78
	SEZNAM TABULEK.....	79

ÚVOD

Rezistence na antibiotika, tedy odolnost mikroorganismů vůči nim, je zejména v poslední době poměrně velkým problémem, a to jak v rozvojových, tak ve vyspělých zemích. Jejím rozšiřování mimo špatné hygieny napomáhá chybné užívání antibiotik vlivem jejich zbytečného podávání, často jen na žádost pacientů, kteří si neuvědomují dlouhodobá rizika.

Antimikrobiální rezistence u bakteriálních patogenů je výzvou, která je spojena s vysokou morbiditou a mortalitou. Rozvoj multirezistence má za následek obtížnou léčitelnost či dokonce neléčitelnost mnoha nebezpečných infekcí antibiotiky. V současnosti existuje nedostatek účinných terapií a preventivních opatření a pouze několik nových antibiotik, jejichž vývoj může nabízet nové léčebné možnosti a alternativní antimikrobiální terapii.

Konkrétně mezi čeledí *Enterobacteriaceae* najdeme zástupce, u nichž se antibiotická rezistence může stát velkým ohrožením, protože tyto kmeny jsou původci mnoha onemocnění nebezpečných pro lidskou populaci. Jednat se může například o patogenní druhy *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Shigella* spp., *Yersinia enterocolitica* apod.

V posledních desetiletích došlo k dramatickému celosvětovému nárůstu lidských patogenních bakterií, které jsou odolné vůči jednomu nebo více antibiotikům a také Světová zdravotnická organizace (WHO) se snaží ohledně tohoto tématu vyvolat osvětu a apelovat na své členské země za účelem výrazného omezení používání antimikrobiálních léčiv.

Tato diplomová práce se zabývá izolací bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ze vzorků chlazeného kuřecího masa získaného z maloobchodních sítí ve Zlínském kraji, jejich následnou identifikací a sledováním antibiotické rezistence ke 20 různým antibiotikům metodou diskové difúzní metody.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 POTRAVINY A KRMIVA ŽIVOČIŠNÉHO PŮVODU

Enterobacteriaceae rezistentní na antibiotika jsou pravidelně detekovány u hospodářských zvířat. Jako patogeny způsobují obtížně léčitelné infekce a jako komenzály mohou sloužit jako zdroj genů rezistence pro jiné bakterie. Jatka produkují značné množství odpadních vod obsahujících bakterie rezistentní na antimikrobiální látky, které se uvolňují do životního prostředí (Esemu et al., 2022). Mezi významné zdroje těchto bakterií je z potravin živočišného původu řazeno maso hovězí a kuřecí, problémem se ukázalo také krmivo, tzv. RMBD a v neposlední řadě jsou to odpadní vody.

Extraintestinální patogenní *Escherichia coli* (ExPEC) je nejčastější příčinou extraintestinálních infekcí získaných v komunitě a v nemocnicích. Hypotéza, že rezervoárem lidské ExPEC mohou být potravinová zvířata, byla předmětem zkoumání několika skupin po celém světě (Ferrareso, 2022). Experimentální studie ukazující sdílený patogenní potenciál lidského ExPEC a ptačí patogenní *E. coli* naznačují, že tyto extraintestinální *E. coli* mohou pocházet ze stejných bakteriálních linií, případně mohou mít společné evoluční kořeny. Důsledné pozorování specifických linií lidského ExPEC v drůbeži nebo drůbežích produktech a zřídka v jiných masných komoditách podporuje hypotézu, že pro lidský ExPEC může existovat drůbeží rezervoár. Časová prodleva mezi získáním lidského ExPEC (ve střevě) a infekcí je zásadní výzvou, před kterou stojí studie, které se pokoušejí přisoudit přenos ExPEC drůbeži nebo jiným zdrojům životního prostředí (Manges, 2015). Pokud by byl i zlomek všech lidských infekcí ExPEC, zejména těch antimikrobiálně rezistentních, způsoben zavedením multirezistentních linií ExPEC prostřednictvím kontaminovaných potravinových produktů, dopad pro veřejné zdraví, produkci potravin živočišné výroby a bezpečnost potravin bude významný (Dale, 2015).

Co se masného průmyslu týče, ke kontaminaci většinou dochází kvůli nedostatečným hygienickým podmínkám a manipulaci na jatkách. Navíc uchycení bakterií a tvorba biofilmu na různých površích usnadňují křížovou kontaminaci. Kůže, obsah trávicího systému a kontaminovaná voda mohou být zdrojem například stafylokoků, escherichií a také *Bacillus cereus* (Bakhtiary et al., 2016).

Různé procesy na jatkách, jako je eviscerace, mohou kontaminovat jatečně upravená těla a zařízení střevními bakteriemi. Nejčastěji detekovanými fekálními koliformy na jatkách jsou rody *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella* (Guentzel, 1996). Enterokoky rezistentní na antibiotika byly izolovány z dobytka, drůbeže a prasat. (Bakhtiary et al., 2016).

Pseudomonády jsou hlavní příčinou procesů kažení masa, primárně kvůli jejich metabolické univerzálnosti a schopnosti produkovat extracelulární proteázy a lipázy způsobují oxidaci, změnu barvy, tvorbu slizké nebo kašovitě formy a degradaci zvířecích tkání (Wang, 2018).

Kontaminace masa rezistentními kmeny *Staphylococcus aureus* a *E. coli* se během procesu porážky podle jedné ze studií dramaticky zvýšila, což naznačuje druhotnou kontaminaci z prostředí jatek. Četnost izolace salmonel v produktech ze surového hovězího masa je vyšší než *E. coli* O157, což je dáno vyšší schopností přežití salmonel mimo střeva zvířat (Bakhtiary et al., 2016).

Jedna ze studií analyzovala odpadní vodu ze sedmi jatek (prasat a drůbeže) na *Enterobacteriaceae*, které nesou beta-laktamázu (ESBL) s rozšířeným spektrem a jsou odolné vůči kolistinu. Rezistentní bakterie byly pravidelně detekovány ve zde sledovaných odpadních vodách. Všechny 25 bakteriálních kmenů produkujících ESBL (19 *E. coli* a šest *K. pneumoniae*) izolovaných z drůbežích jatek bylo odolných vůči více léčivům. Na jatkách prasat bylo 64 % (12 z 21 *E. coli* [57 %] a všechny čtyři detekované *K. pneumoniae* [100 %]) rezistentní na více léčiv. Pokud jde o kolistin, rezistentní *Enterobacteriaceae* byly detekovány u 54 % vzorků drůbeže a 21 % vzorků prasečí vody. Rezistence na karbapenem nebyla detekována. Rezistentní bakterie byly nalezeny přímo při vypouštění odpadních vod z jatek do vodních útvarů, což zdůrazňuje úlohu jatek pro kontaminaci povrchových vod v životním prostředí (Bachmann et al., 2021).

Biochemicky podobné, ale geneticky různorodé členy *Enterobacteriaceae* ze zdrojů pitné a rekreační vody vykazovaly různou citlivost na antibiotika. Kontaminace vodních zdrojů patogeny odolnými vůči antibiotikům představuje hrozbu pro lidské zdraví (Kumar, 2012).

V neposlední řadě je problémem krmení domácích mazlíčků dietami na bázi syrového masa (RMBD), které je stále oblíbenější, ale může představovat riziko kvůli kontaminaci patogenními a antimikrobiálně rezistentními (AMR) bakteriemi (Ahmed et al., 2021).

Dle jedné ze studií z 51 vzorků RMBD 72,5 % nesplňovalo mikrobiologické standardy pro *Enterobacteriaceae* stanovené předpisy EU pro vedlejší produkty živočišného původu určené pro krmivo pro domácí zvířata. *Salmonella* byla detekována u 3,9 % vzorků. Bakterie rezistentní vůči antibiotikům byly nalezeny v 62,7 % vzorků, většina z nich vykazovala rezistenci na cefalosporiny třetí generace díky produkci beta-laktamáz s rozšířeným spektrem (ESBL) včetně CTX-M-1, který je rozšířený u hospodářských zvířat, a CTX-M-15, což je celosvětově nejběžnější varianta ESBL. Izoláty rezistentní na kolistin a

aminoglykosidy, produkující MCR-1 a RMTB, byly identifikovány ve 3,9, respektive 2 % vzorků. Většina AMR *Escherichia coli* patřila do komenzálních skupin A nebo B1 a byla spojena s klonálními komplexy CC155 a CC10. Dva patřily ke vznikajícím extraintestinálním patogenním CC648 a jeden ke globálně šířené uropatogenní sekvenci *E. coli* typu ST69, což naznačuje zoonotický potenciál. Mikrobiologická kvalita a vysoká prevalence *Enterobacteriaceae* produkujících AMR v RMBD vyvolávají obavy o zdraví zvířat a veřejnosti (Nüesch-Inderbinen et al., 2019).

2 ČELEĎ *ENTEROBACTERIACEAE*

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* mohou způsobovat střevní infekce a lze je nalézt mimo potravin živočišného původu také ve vodě či v půdě, dále pak v zelenině, ovoci apod. (Knothe et al., 1969).

Řadí se mezi gramnegativní, nesporotvorné tyčinky se schopností růst v širokém teplotním rozmezí 22–37 °C. Jsou buď nepohyblivé, nebo se pohybují pomocí peritrichálních bičíků. Běžně se využívají jako ukazatelé mikrobiální kvality a hygieny, jsou to tzv. indikátorové mikroorganismy (zejména koliformní bakterie) (Baylis, 2006). Většina z nich je nepatogenní, případně podmíněně patogenní, ale některé druhy mohou být nebezpečnými patogeny a původci vážných nemocí. Běžně tvoří katalázu, ale jsou oxidáza negativní. Mezi nejvýznamnější zástupce této čeledi jsou uváděny rody *Enterobacter*, *Escherichia*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*. (Knothe et al., 1969)

2.1 Rod *Escherichia*

Hlavním zástupcem rodu *Escherichia* je bezpochyby bakterie *Escherichia coli*. Theodor Escherich poprvé popsal *E. coli* v roce 1885, izoloval ji z výkalů novorozenců. V roce 1935 byl kmen *E. coli* prokázán jako příčina vypuknutí průjmu mezi kojenci (Hacker, 2007). Gastrointestinální trakt většiny teplokrevných zvířat je kolonizován *E. coli* během několika hodin nebo několika dní po narození. Bakterie je přijímána v potravinách nebo ve vodě, ale může být i získávána přímo od jiných osob manipulujících s kojencem (Todar, 2020).

2.1.1 Onemocnění

Escherichia coli přetrvává jako jedna z nejčastějších příčin několika běžných bakteriálních infekcí u lidí a zvířat. Tato bakterie je prominentní příčinou enteritidy, infekce močových cest, septikémie a dalších klinických infekcí, jako je neonatální meningitida. Dále je spojena s průjmem u domácích a hospodářských zvířat. Terapeutická léčba infekcí způsobených *E. coli* je ale ohrožena vznikem antimikrobiální rezistence. Prevalence multirezistentních kmenů *E. coli* se celosvětově zvyšuje především v důsledku šíření mobilních genetických prvků, jako jsou plazmidy. Vzestup multirezistentních kmenů se vyskytuje také v Evropě. Šíření rezistence je proto v evropských zemích stále větším problémem v oblasti veřejného zdraví. (Allocati, et al., 2013)

2.1.2 Patogenní *Escherichia coli*

Koliformní bakterie obecně a zvláště právě *E. coli* jsou ideálním indikátorem fekální kontaminace a možného výskytu dalších patogenů. Ačkoli celkový počet hlášených sérotypů *E. coli* přesahuje 700, bylo zjištěno pouze malé procento spojené s gastrointestinálními chorobami přenášenými potravinami od mírného průjmu až po hemoragickou kolitidu a dokonce smrtelnou meningitidu (Jang et al., 2017).

Na základě odlišných sérotypů O: H, vlastností virulence a klinických syndromů jsou průměrné kmeny *E. coli* rozděleny do šesti hlavních kategorií, kterými jsou:

EPEC-enteropatogenní *E. coli*, neboli dyspeptická, ta byla dříve častým původcem průjmu u novorozenců a malých dětí. V současnosti se však v rozvinutých zemích vyskytují vzácně. Adherují k buňkám střevního epitelu, ve kterém působením cytotoxinů narušují transport kapalin a elektrolytů.

ETEC-enterotoxická *E. coli*, ta je příčinou průjmů dětí i dospělých zejména v rozvojových zemích s teplým klimatem. Onemocnění je často označováno jako cestovatelské průjmy. Adherují se na enterocyty tenkého střeva a vodnatý průjem spouští sekreci termolabilního a/nebo termostabilního enterotoxinu.

EIEC-enteroinvazivní *E. coli* vyvolávají onemocnění průběhem se podobající bacilární úplavici.

A/EEC-attaching and effacing *E. coli* (zatím nemá jednotné označení v českém jazyce), vyvolává onemocnění zejména u skotu, pro člověka je patogenní jen příležitostně.

EAEC-enteroagregativní *E. coli* vyvolávající dlouhodobé průjmy zejména u dětí, onemocnění probíhá obvykle bez horečnatých stavů.

EHEC-enterohemoragická *E. coli* tvoří toxiny podobné toxinům produkovaným bakteriemi *Shigella dysenteriae* typ 1, které nazýváme verotoxiny nebo také shigatoxiny (Stx). Od názvu toxinů je odvozen další název této skupiny *E. coli*-STEC (shigatoxigenní *E. coli*) (Bartošková, 2014).

Shiga toxiny jsou považovány za nejdůležitější faktory virulence STEC. Existují dva hlavní typy shiga toxinů; *stx1* a *stx2* kódované *stx1* a *stx2* geny. Kromě toxinů shiga přispívají k lidské nemoci i další faktory virulence, jako jsou geny kódující buněčnou adhezi apod. (Ally et al., 2021).

Nejznámějším zástupcem EHEC skupiny je sérotyp O157:H7, ale na onemocnění v Evropské unii se podílí i další sérotypy jako např. O26, O91, O103, O145 a O111.

Některé kmeny EHEC/STEC produkující toxiny mohou vyvolávat závažná alimentární onemocnění, zejména u malých dětí. Klinické příznaky se projevují krvavým průjmem (hemoragickou kolitidou), který může přecházet do stádia akutní nedostatečnosti ledvin (HUS-hemolyticko-uremického syndromu) a způsobovat poškození ledvin nebo i smrt pacienta (Baranzoni et al., 2016).

Skot a další přežvýkavci, jako jsou ovce a kozy, byly identifikovány jako přirozené, asymptomatické nosiče STEC (Tseng et al., 2014). Ke kontaminaci životního prostředí může docházet prostřednictvím volně žijících zvířat a jeho odpadu na pastvinách, užívání statkových hnojiv, odpadních vod z jatek nebo čistíren odpadních vod a poté v něm přetrvávat (Singh et al., 2015). Kontaminace vodních ploch těmito patogenními *E. coli* představuje významné zdravotní riziko pro lidské zdraví konzumací kontaminované vody při koupání a může také kontaminovat produkty akvakultury, jako jsou měkkýši (Bibbal et al., 2018).

2.2 Rod *Enterobacter*

Jedná se o gramnegativní rovnou tyčinku, je pohyblivá díky peritrichálním bičíkům. Je to nesporulující fakultativně anaerobní mikroorganismus, který na neselektivních půdách tvoří žluté nebo bezbarvé kolonie. Při růstu v bujónu má tendenci sedimentovat. Tato bakterie vykazuje odolnost ke kyselému pH a extrémní odolnost k vysoušení a tepelnému záhřevu (Grimont, 2006). Rod *Enterobacter* je členem tzv. ESKAPE skupiny, která obsahuje hlavní patogeny rezistentní na antibiotika. (Davin-Regli A., 2019)

Znalosti o rodu *Enterobacter* a jeho roli v lidských onemocněních se v posledních letech exponenciálně rozšířily. Výskyt infekcí v nemocnicích a komunitě se zvýšil a byly rozpoznány nové klinické syndromy. U tohoto rodu byl zaznamenán vysoký výskyt mnohačetné ATB rezistence, zejména na cefalosporiny a terapeutické možnosti pro pacienty infikované mnohonásobně rezistentními kmeny se značně omezily. Prediktivně nejaktivnějšími možnostmi mohou být karbapenemy, alternativně fluorochinolony. *Enterobacter* spp. se s blížícím se přelomem století zdají být dobře přizpůsobené pro přežití, a dokonce i proliferaci (Sanders, 1997).

Enterobacter jsou v přírodě všudypřítomné, vzhledem k jejich výskytu ve střevním traktu zvířat je následkem jejich široká distribuce v půdě, vodě a odpadních vodách, nacházejí se také v rostlinách. U lidí je známo, že mnoho druhů *Enterobacter* působí jako oportunní patogeny, včetně *E. cloacae*, *E. aerogenes* a *E. agglomerans* (Rogers, 2022). Patogenní *Enterobacter* může být příčinou očních a kožních infekcí, meningitidy, bakterémie (bakteriální infekce krve), zápalu plic a infekcí močových cest. V mnoha případech je onemocnění způsobené *E. cloacae* nebo *E. aerogenes* spojeno s expozicí organismům v nozokomiálních podmínkách, jako jsou nemocnice nebo pečovatelské domy (Grimont, 2006). Vzhledem k jeho patogenitě a časté rezistenci k různým antibiotikům je vhodné zaměřit se na tuto nebezpečnou bakterii u širší škály potravin, konkrétně u kuřecího masa, které se v naší populaci těší velké oblibě, ale i dalším druhům, kde se *Enterobacter* také vyskytuje (Aksu, 2019).

2.3 Rod *Salmonella*

Taxonomicky jsou známy dva druhy salmonel, a to *Salmonella enterica* a *S. bongori*. Dělí se ale na více než 2500 sérotypů lišící se antigeny O a H. Významným zdrojem jsou ptáci, konkrétně jejich zažívací ústrojí, kde jsou salmonely schopny přežít a na člověka jsou často přenášeny prostřednictvím vajec. Maso je rizikové zejména při nesprávné manipulaci (Tiwari et al., 2004).

Salmonely jsou trvale uváděny jako přední mezinárodní zdroje alimentárních lidských nemocí (Sha, 2013). U patogenity salmonel mají hlavní roli 2 kategorie toxinů. Endotoxin je spojen s lipidem A lipopolysacharidu buněčné stěny a pokud se uvolní do krevního řečiště infikovaného organismu po lýze bakteriálních buněk, může endotoxin produkovat horečku.

V salmonele bylo identifikováno také několik proteinových toxinů. Aktivita enterotoxinu vyvolává odpověď epiteliálních buněk, která má za následek akumulaci tekutiny v lumen střeva. Tepelně labilní cytotoxin způsobuje strukturální poškození střevní epiteliální buňky, pravděpodobně inhibicí syntézy proteinu (Gast, 2020).

Jedním z významných patogenních sérotypů salmonel je *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sérovar Typhi, který je odpovědný za břišní tyfus, což je dlouhodobé systémové onemocnění provázené průjmem (Marzano et al., 2003).

Netyfové sérotypy poddruhu *Salmonella enterica* jsou významné zejména z hlediska konzumace kuřecího masa, drůbež patří mezi nejdůležitější rezervoáry salmonel v přírodě.

Bakterie mají schopnost pronikat do hlubších vrstev sliznice, tím se dostat až do krevního řečiště a rozšířit se po celém těle.

Onemocnění vyvolané těmito bakteriemi je známé jako salmonelóza a typickými příznaky jsou prudké průjmy v doprovodu s křečemi, horečkami a zvracením. V souvislosti s tím hrozí nebezpečí dehydratace a selhání ledvin. Mladého zdravého člověka by toto onemocnění při vhodné léčbě nemělo výrazně ohrozit, nebezpečné je ale pro malé děti a starší či nemocné osob (Dvořák, 2021).

3 ANTIBIOTIKA A ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Antibiotikum je lék používaný k léčbě bakteriálních infekcí, nemají tedy žádný vliv na virové infekce. Původně to byla látka produkovaná jedním mikroorganismem, která selektivně inhibuje růst jiného. Od té doby byla ale vyrobena syntetická antibiotika, obvykle chemicky příbuzná těm přírodním, která plní srovnatelné úkoly. V roce 1926 Alexander Fleming objevil penicilin, látku produkovanou houbami, která byla schopna inhibovat růst bakterií. V roce 1939 Edward Chain a Howard Florey dále penicilin studovali a později s ním provedli pokusy na lidech. Fleming, Florey a Chain sdíleli Nobelovu cenu v roce 1945 za jejich práci, která tak zahájila éru antibiotik (Stöppler, 2021).

Než se bakterie namnoží a způsobí příznaky, imunitní systém je obvykle může zničit. Bílé krvinky napadají škodlivé bakterie, a i když se příznaky objeví, imunitní systém si obvykle dokáže s infekcí poradit a zahnat ji. Někdy je však počet škodlivých bakterií nadměrný a imunitní systém proti všem nemůže bojovat. V takovém případě jsou právě užitečná antibiotika (Anderson, 2021). Antibiotika na bázi penicilinu, jako je ampicilin, amoxicilin a penicilin G, jsou stále k dispozici k léčbě různých infekcí a existují již dlouhou dobu. Existuje několik typů moderních antibiotik, která jsou ve většině zemí obvykle dostupná pouze na lékařský předpis. Lokální antibiotika jsou k dispozici volně v podobě krémů a mastí (Felman, 2019).

Antibiotika jsou rozdělována do mnoha skupin podle různých hledisek, například dle původu na aktinomycety, kam se řadí například aminoglykosidy, TTC a makrolidy, dále to mohou být jiné bakterie (zejména bacily), kam patří např. bacitracin a polymyxin a další skupinou jsou mikroskopické houby (*Penicillium*, *Aspergillus*), tam se řadí peniciliny (Biology LibreTexts, 2020).

Podle typu účinku se antibiotika dělí na bakteriostatická a baktericidní. Mezi ta bakteriostatická se řadí zejména chloramfenikol, tetracykliny, makrolidy, sulfonamidy apod., mezi baktericidní peniciliny, cefalosporiny, streptomycin, polymyxiny a další.

Antibiotika se dělí také dle spektra účinku, konkrétně na úzkospektrální, jejich cílená účinnost je obvykle na jednu skupinu (př. proti stafylokokům, *M. tuberculosis* apod.) a širokospektrální, která jsou účinná proti více skupinám (G+ i G - bakteriím) (Kompaníková, 2014).

3.1 Mechanismus účinku

Antimikrobiální látky zahrnují široké spektrum sloučenin, které se liší jak chemickým složením a strukturou, tak svým použitím a účinkem, jakým vůči mikroorganismům působí. (Brazas et al., 2005).

Účinek antibiotik je závislý na tom, kterou strukturu v buňce zasáhne. Podle místa působení se dělí do čtyř skupin:

1. Inhibice syntézy buněčné stěny
2. Narušení syntézy plazmatické membrány
3. Inhibice proteosyntézy
4. Narušení syntézy nukleových kyselin

(Bursová, 2014).

3.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Gramnegativní bakterie jsou běžně odolnější vůči antimikrobním látkám než bakterie grampozitivní, což je následkem odlišné struktury jejich buněčné stěny. 90-95 % buněčné stěny grampozitivních bakterií je totiž tvořeno peptidoglykanem, ke kterému jsou připojeny další molekuly, jako je kyselina teichoová a proteiny (Nazzaro et al., 2013).

U G⁺ bakterií díky jejich buněčné stěně mohou hydrofobní molekuly lehce pronikat do buněk a na stěnu tak působit i uvnitř cytoplazmy. Právě hydrofobnost je důležitou charakteristikou některých antibiotik (Burt, 2004).

Naopak u G⁻ bakterií je tato stěna složitější, její součástí je 2-3 mm peptidoglykanová vrstva, která je slabší než u G⁺ bakterií. Vnější membrána leží mimo tuto vrstvu a spolu s peptidoglykanem je spojena Braunovým lipoproteinem, který je na něj kovalentně vázán a je zabudován do membrány (Nazzaro et al., 2013). Tato vnější membrána je tvořena fosfolipidy a lipopolysacharidy, na povrchu má také receptory pro cukry, aminokyseliny a vitamíny a zabraňuje vniknutí hydrofilních antibiotik a jejich vazbě na proteiny (Beveridge, 1999).

Antibiotika, která způsobují inhibici buněčné stěny jsou například cefalosporiny, peniciliny, dále vankomycin a bacitracin (Votava, 2005).

3.1.2 Narušení syntézy plazmatické membrány

Cytoplazmatická membrána je tvořena dvěma vrstvami fosfolipidů a nese odpovědnost za stabilitu a osmotickou integritu buňky (Bailey, 2019). Polypeptidy kolistin a polymyxin B mají na dané fosfolipidy detergentní účinek, čímž poškozují membránu a ta ztrácí svou permeabilitu a neporušenost (Bednář, 1996). Kolistin tvoří vazbu s anionty lipopolysacharidů, to vede k vytěsnění vápníku a hořčíku z membrány a dochází ke změně v její propustnosti, unikají ionty a následuje smrt buňky. V klinické praxi jsou tato dvě antibiotika aplikována proti kmenům gramnegativních bakterií (Falagas, 2005).

3.1.3 Inhibice proteosyntézy

Mezi antibiotika působící na úrovni bakteriální proteosyntézy patří např. makrolidy, linkosamidy, tetracykliny, oxazolidinony a chloramfenikol. Antibiotika těchto skupin působí zejména bakteriální ribozomy, nicméně mimo to ovlivňují také funkci ribozomů lidských, což naznačuje, že toxicita takových antibiotik je poměrně značná.

Inhibice proteosyntézy způsobuje zastavení růstu bakterie, tedy bakteriostatický účinek, ke smrti bakteriální buňky nedochází. K zabití bakterie je zapotřebí funkční imunitní systém pacienta (Arenz, 2016).

Proteosyntézu inhibují také aminoglykosidy, mají také řadu dalších účinků, jako indukce tvorby kyslíkových radikálů, ovlivnění funkce buněčné membrány apod. Aminoglykosidy jsou jediná antibiotika patřící do této skupiny, která působí baktericidně. Vliv mají zejména na gramnegativní bakterie, a to tak, že působí na malé podjednotce ribozomu 30S a dojde tak k nesprávnému čtení (tzv. misreading). Výsledkem toho je syntéza nefunkčních proteinů. Na G (-) bakterie působí také tetracykliny, ty mají účinek bakteriostatický a působí též na podjednotce 30S. V tomto případě dochází k zabránění vazby aminoacyl-tRNA na ribozom a výsledkem je zástava elongace proteinu (Štefan, 2019).

3.1.4 Narušení syntézy nukleových kyselin

Tento princip je založen na topoizomerázách a jejich inhibitorech. Jako topoizomerázy se označují enzymy, které se podílí na změně terciární struktury DNA bez vlivu na primární a sekundární strukturu. Účastní se replikace DNA, jsou schopny vlákno rozštěpit a opět spojit rozrušený řetězec (Goedecke, 2007).

Jsou rozlišovány zejména 2 skupiny, a to topoizomeráza I. třídy, která štěpí jen jedno vlákno dvoušroubovice a druhé proklouzne volným prostorem, který se takto vytvořil. Dalším typem je potom topoizomeráza II. třídy, která je schopna rozštěpit obě vlákna dvoušroubovice (Dostál, 2009).

Tento systém je založen na fungování inhibitorů topoizomeráz, které zabraňují cílovým buňkám účelně zacházet se svou DNA a znemožňují tak využít genetickou informaci, která je v nich uložena (Gualerzi et al., 2013). To by nutně nemuselo znamenat letální účinek, jelikož by pouze došlo k zastavení metabolismu (statický efekt), díky inhibitorům topoizomeráz ale obvykle dojde k zablokování DNA ve stavu, kdy je přerušeno buď jedno, případně obě její vlákna na více místech, jelikož sbalování a rozbalování dvoušroubovice probíhá paralelně na různých úsecích molekuly. Tím je narušena stabilita celé molekuly a dochází k mnohačetnému poškození vláken, což je stav vedoucí ke smrti buňky.

Mezi přirozené inhibitory patří např. kamptotecin, inhibitory I. třídy se běžně nevyužívají. Inhibitory bakteriálních izomeráz II. třídy zahrnují antibiotika (chinolonová ATB, novobiocin) i cytostatika (Beneš, 2018).

3.2 Skupiny antibiotik

3.2.1 Beta-laktamová antibiotika

Nejdůležitějšími ze skupiny beta-laktamových antibiotik jsou zejména peniciliny a cefalosporiny. Jejich mechanismus účinku je v zásadě stejný, tlumí syntézu peptidoglykanů bakteriální buněčné stěny, rozdíl v působení mezi jednotlivými peniciliny a cefalosporiny podmiňuje rozdílná afinita k buněčným receptorům, dále schopnost pronikat přes buněčnou stěnu bakterií a odolnost vůči beta-laktamázám (Simon, 1996).

Jádro molekuly penicilinu je tvořeno kyselinou 6-aminopenicilanovou, zatímco u cefalosporinů je to kyselina 7-aminocefalosporanová. Důležitou roli v účinku hraje dostupnost penicilinových receptorů, obsah peptidoglykanů v buněčné stěně a lipidy v ní uložené (Beneš, 2018).

Rezistence bakterií vůči penicilinům může mít různé příčiny, nejčastěji je to:

1. Produkce enzymů beta-laktamáz, které otevírají beta-laktamový kruh ve struktuře ATB a zbavují ho tak antibiotického účinku
2. Nepřítomnost příslušných vazeb receptorů, špatná penetrace ATB buněčnou stěnou bakterií
3. Chybějící aktivizace autolytických bakteriálních enzymů v b. stěně bakterií, jež znemožňuje usmrcení bakterie
4. Nepřítomnost bakteriální stěny (např. u mykoplazmat)
5. Nemožnost syntézy buněčné stěny

(Simon, 1996).

3.2.2 Aminoglykosidy

Jde o přirozené produkty bakterií rodu *Streptomyces* (ve svém názvu mají koncovku mycin) a *Micromonospora* (koncovka micin). Aminoglykosidy, které obsahují 2-deoxystreptamin, se běžně dělí na 3 podskupiny podle chemické příbuznosti a výchozího produkujícího mikroorganismu (Beneš, 2018).

Mimo působení na ribozomy (inhibice proteosyntézy) také dezintegrují buněčnou stěnu bakterií. Nejdříve dojde k poškození právě buněčné membrány a následně dojde k vazbě na 30S podjednotku ribozomu. Zde aminoglykosidy překáží v procesu spárování mezi jednotlivými triplety mRNA a odpovídajícími antikodony na tRNA. Tím je porušeno čtení informace, kterou mRNA obsahuje a ve stejném čase dochází k zablokování přesunu tRNA s navázaným peptidovým řetězcem z místa na místo ve velké podjednotce (Beneš, 2018).

3.2.3 Tetracykliny

Tetracyklinová antibiotika jsou polyketidové sloučeniny, které obsahují základní oktahydrotetracen-2-karboxamidový řetězec. Do této skupiny je řazen chlortetracyklin, který byl izolován v roce 1940 z kmene *Streptomyces aureofaciens* a oxytetracyklin (přirozená antibiotika), dále doxycyklin, lymecyklin a minocyklin (semisyntetická antibiotika).

Jejich mechanismus účinku je založen na inhibici syntézy proteinů reverzibilní vazbou na 30S podjednotku ribozomu, konkrétně jde o inhibici vazby aminoacyl-tRNA na komplex mRNA-ribozom. Účinek je bakteriostatický, nicméně rezistence je u řady bakterií a zejména enterobakterií vysoká (Kolář et al., 2020).

3.2.4 Makrolidy

Makrolidová antibiotika se vyznačují velkým makrocyclickým laktonovým kruhem, ke kterému je připojen jeden nebo více deoxy cukrů (obvykle kladinóza a desosamin). Více než 2000 makrolidů bylo izolováno z různorodých přírodních zdrojů, jako jsou aktinobakterie, houby, rostliny, hmyz a obratlovci. Téměř všechna dnes používaná makrolidová antibiotika jsou chemické deriváty přirozeně se vyskytujících makrolidů, zejména erytromycin, který je odvozen od aktinobakterie *Saccharopolyspora erythraea* (Capelo-Martínez, 2020).

Klinicky relevantní makrolidy spadají do kategorie makrolidů se 14-, 15-, 16členným laktonovým kruhem, zatímco ty s jinými antimikrobiálními a imunosupresivními aktivitami mohou mít rozmanitější kruhové struktury. Prototypový erytromycin má 14členný laktonový kruh (Capelo-Martínez, 2020).

Primární mechanismus účinku makrolidových antibiotik spočívá ve vazbě na bakteriální ribozom k inhibici sestavení proteinu a poté translace. Toho je dosaženo prostřednictvím vazby na 50S podjednotku ribozomu, konkrétně na 23S RNA, což způsobuje sterické bránění pohybu peptidu. Tyto interakce jsou obecně bakteriostatické, ale pro klaritromycin a azitromycin působící na *S. pyogenes*, *S. pneumoniae* a *H. influenzae* jsou tyto interakce baktericidní (Vannuffel, 1996).

3.2.5 Linkosamidy

Dvěma hlavními antibiotiky tvořící tuto skupinu jsou linkomycin, vykazující biologickou aktivitu proti bakteriím (zejména grampozitivním) a také prvokům, dále pak jeho derivát klindamycin. Obě antibiotika jsou široce používána v klinické praxi. Jsou bakteriostatická, inhibují syntézu proteinů u citlivých bakterií; ve vyšších koncentracích však mohou být baktericidní. Klindamycin je obvykle mnohem aktivnější než linkomycin při léčbě bakteriálních infekcí, zejména těch, které jsou způsobeny anaerobními druhy (Pechère, 1986).

Rezistence na linkomycin a klindamycin může být způsobena metylací 23S ribozomální RNA, modifikací antibiotik specifickými enzymy nebo aktivním efluxem z bakteriální buňky (Pechère, 1986).

Jedná se o glykosidická antibiotika obsahující aminový postranní řetězec. Stejně jako makrolidy se používají jako náhražky penicilinu, aby se minimalizovalo riziko přecitlivělosti na penicilin. Linkosamidy inhibují 50S podjednotku bakteriálních ribozomů, ale v místě odlišném od místa vázaného makrolidy. Při současném použití linkosamidů s makrolidy je však účinnost snížena. Ribozomální účinek linkosamidů má za následek bakteriostatický účinek, nicméně klindamycin může být v určitých koncentracích baktericidní (Noli, 1999).

3.3 Antibiotická rezistence

Antimikrobiální látky, jako jsou například právě antibiotika, jsou nedílnou součástí jak humánní, tak veterinární medicíny. Jsou nepostradatelné při léčbě infekčních onemocnění způsobených bakteriemi (nikoliv viry) (EFSA, 2014).

Jako rezistence je obecně označována schopnost mikrobiální populace přežít účinek inhibiční koncentrace dané antimikrobiální látky. Některé mikroorganismy jsou přirozeně (primárně) rezistentní k některým antimikrobiálním látkám.

Přirozená rezistence je geneticky podmíněná rezistence k některým antimikrobiálním látkám, bez ohledu na to, zda došlo k předchozímu kontaktu mikroorganismu s danou látkou (Peterson, 2018). Příkladem může být rezistence gramnegativních střevních tyčinek vůči penicilinu a makrolidům, rezistence streptokoků k aminoglykosidům či enterokoků a listerií k cefalosporinům.

U mikroorganismů je stále více sledována získaná (sekundární) rezistence. Tento typ rezistence vzniká při působení antimikrobiální látky na populaci mikroorganismů, kdy se pod selekčním tlakem antimikrobiální látky selektují rezistentní kmeny. Může se jednat o rezistenci negenetického i genetického původu. V prvním případě může rezistence vzniknout např. v důsledku ztráty specifických receptorových struktur. Sekundární rezistence genetického původu může být chromosomální (např. spontánní mutace) či extrachromosomální (reprezentovaná např. plasmidy či transpozony) (Bursová, 2014).

Většina bakterií má mechanismy, které jim umožňují sdílet genetický materiál, jako je konjugace. Tyto mechanismy umožňují genům kódujícím rezistenci vůči antibiotikům pohybovat se mezi bakteriemi nejen stejného druhu, ale také různých druhů a rodů.

Genetický materiál kódující rezistenci je často „klonální“ (tj. identický v širokém spektru bakterií) a může se snadno pohybovat mezi bakteriemi stejného druhu a také různých druhů a rodů, zejména je-li přenášen v plazmidu nebo transpozonu. Například gen *vanA*, který kóduje rezistenci na vankomycin, je nesen v transpozonu a snadno se pohybuje mezi enterokokovými druhy a potenciálně mezi dalšími gram pozitivními koky, např. stafylokoky. Důkazy o přenosu *vanA* z VRE na kmen MRSA byl pozorován u pacienta na renální dialýze ve Spojených státech (Collignon, 2002).

Velkým problémem dnešní doby multirezistence, kdy je mikroorganismus současně rezistentní k většímu počtu antimikrobiálních látek. Jako další je třeba zmínit také zkříženou rezistenci, jedná se o současnou necitlivost mikroorganismů na ATB s podobnou chemickou strukturou a stejným mechanismem účinku (Bursová, 2014). To znamená, že pokud je např. izolát *E. coli* rezistentní vůči některému cefalosporinu první generace, bude tedy rezistentní i vůči ostatním cefalosporinům stejné generace. Mimo to, pokud se izolát stane odolným vůči cefalosporinům třetí generace, pak bude odolný také vůči všem cefalosporinům první a druhé generace. Klinicky významnou multirezistentní bakterií je například *Staphylococcus aureus* rezistentní k meticilinu (MRSA), Enterokok rezistentní k vankomycinu (VRE), multirezistentní *Pseudomonas aeruginosa* a multirezistentní *Acinetobacter baumannii* (Štefan, 2019).

Používání antibiotik v nadměrné míře (a často také nesprávně) je spojeno s šířením mikroorganismů rezistentních vůči těmto látkám, což to je důvodem neúčinnosti léčby a představuje vážné riziko pro veřejné zdraví (EFSA, 2014).

3.4 Bakterie rezistentní na antibiotika a geny rezistence

Bakterie se stávají rezistentními vůči antibiotikům buď genetickými mutacemi, nebo získáním genů pro rezistenci na antibiotika (ARG). Antimikrobiální rezistence představuje problém při dosahování všeobecného zdravotního pokrytí a brání dosažení cílů udržitelného rozvoje souvisejících se zdravím, potravinovou bezpečností, čistou vodou a hygienou (Amarasiri et al., 2020).

Šíření bakteriální rezistence k antibiotikům je výsledkem celé řady příčin. Ty se vzájemně kombinují a zvyšují tak nebezpečí, které tato záležitost vyvolává. (Kolář, 2019) Multirezistentní kmeny bakterií způsobující infekce, které nelze léčit stávajícími antimikrobiálními léky, jsou významným nebezpečím pro klinickou medicínu a jsou označovány souhrnným termínem jako „superbugs“ (Wein, 2014). Tato skupina zahrnuje

enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz, bakterie se získanou rezistencí ke kolistinu, multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, vankomycin-rezistentní enterokoky, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) a bakterie se získanou rezistencí k aminoglykosidům (Kolář, 2019).

3.4.1 Enterobakterie s produkcí širokospektrých beta-laktamáz

Odolnost enterobakterií k beta-laktamovým antibiotikům je založena zejména na mechanismu produkce enzymů, tzv. beta-laktamáz. Velká pozornost je věnována primárně širokospektrálním beta-laktamázám typu ESBL a AmpC (Kolář et al., 2011).

Infekce způsobené kmeny produkujícími ESBL jsou považovány za vážný globální zdravotní problém, protože tyto infekce jsou spojeny s vyšší morbiditou a mortalitou. Produkce ESBL je mechanismus rezistence, při kterém je hydrolyzován beta-laktamový kruh antimikrobiálních látek, jako jsou peniciliny a cefalosporiny (Gazal et al., 2021). Až do roku 2000 byly typy ESBL blaSHV a blaTEM nejběžnějšími genotypy ESBL nalezenými u kmenů *Enterobacteriaceae*. Odpovídající geny byly často nalezeny na plazmidech, které usnadňují jejich rychlé šíření mezi různými bakteriálními druhy (Pishtiwan, 2019). Většina ESBL se řadí do skupiny SHV nebo TEM a vzniká bodovou mutací genu původních enzymů (SHV1, TEM1), v důsledku toho dochází k záměně AK v aktivním centru enzymu a je tak ovlivněna jeho aktivita (Sauer, 2006).

Typy blaCTX-M byly zaznamenány jako nejběžnější genotypy mezi kmeny *Enterobacteriaceae* způsobující lidské infekce na celém světě (zejména blaCTX-M-15). Existují další varianty β -laktamáz, jako je AmpC β -laktamáza, které mohou zprostředkovat rezistenci na několik antibiotik, jako jsou peniciliny, cefamyciny (např. cefoxitin a cefotetan) a oxyiminocefalosporiny. Rezistence k širokospektrým β -laktamům zprostředkovaná ESBL a enzymy AmpC β -laktamázy představuje velkou zdravotní zátěž, zejména v rozvojových zemích, kde je míra rezistence vysoká (Mohamed et al., 2020).

3.4.2 Bakterie se získanou rezistencí ke kolistinu

Počátečním místem působení kolistinu je bakteriální buněčná membrána. Kolistin se váže na LPS a fosfolipidy ve vnější buněčné membráně gramnegativních bakterií a kompetitivně vytěsňuje dvojmocné kationty (Ca^{2+} a Mg^{2+}) z fosfátových skupin membránových lipidů, což vede k narušení vnější buněčné membrány, úniku intracelulárního obsahu a bakteriální smrti (Biswas et al., 2012).

Rezistence bakterií ke kolistinu podmiňují zejména chromozomální mechanismy, konkrétně modifikace struktury lipidu A, kompletní ztráta LPS v důsledku mutace genů zodpovědných za syntézu lipidu A, redukce exprese kofaktorů zahrnutých v syntéze LPS a v neposlední řadě snížení regulace proteinů podílejících se na exportu a stabilizaci prekurzorů vnější membrány. Významným nebezpečím je plazmidově kódovaná a transferabilní rezistence ke kolistinu, podmíněná geny *mcr*. Od prvního popisu tohoto typu rezistence v roce 2016 počet jejího výskytu narůstá a byla popsána také u kmene *Acinetobacter baumannii* izolovaného z krutích jater zakoupených v České republice (Kolář, 2019).

3.4.3 Rezistence k sulfonamidům

Hlavním důvodem šíření determinant rezistence k těmto antimikrobiálním látkám je jejich přítomnost na R plazmidech. Intenzivní užívání sulfonamidů po jejich uvedení do veterinární a humánní medicíny pravděpodobně stimulovalo rozvoj R plazmidů obsahujících tyto geny rezistence (Rådström et al., 1991). V 3'-konzervativní oblasti integronů třídy 1, které jsou součástí velkých konjugativních plazmidů a transpozonů skupiny Tn21, je lokalizován gen *sul1* a s šířením integronů třídy 1 v bakteriální populaci se i tento gen automaticky šíří.

Dále gen *sul2* byl popsán u G – bakterií, a to z různých ekologických nik, který je uložen na malém konjugativním plazmidu pGC05 a nekonjugativních plazmidech pBP1 a RSF1010. Tyto plazmidy pBP1 a RSF1010 nesou geny odpovědné za rezistenci ke streptomycinu. Z tohoto důvodu bývá rezistence k těmto dvěma typům antimikrobiálních látek úzce spjata. U *E. coli* byl také popsán gen *sul3* (Huovinen et al., 1995).

3.4.4 Rezistence k tetracyklinům

Rezistence na tetracyklin je normálně způsobena získem nových genů často spojených buď s mobilním plazmidem nebo transpozonem (Roberts, 1996). Dosud bylo charakterizováno nejméně 40 různých genů rezistence na tetracyklin, jedná se o geny *tet*, které se účastní buď aktivního efluxu léčiva, dalšími důvody rezistence jsou i ribozomální ochrana nebo enzymatická modifikace léčiva (Hedayatianfard et al., 2014).

Gramnegativní tetracyklinové efluxní proteiny jsou spojeny s represoproteiny, které v nepřítomnosti tetracyklinu blokují transkripci represorových a strukturních efluxních genů. Na rozdíl od toho se zdá, že exprese efluxních genů grampozitivních tetracyklinů a některých genů pro ochranu ribozomů je regulována zeslabením transkripce mRNA.

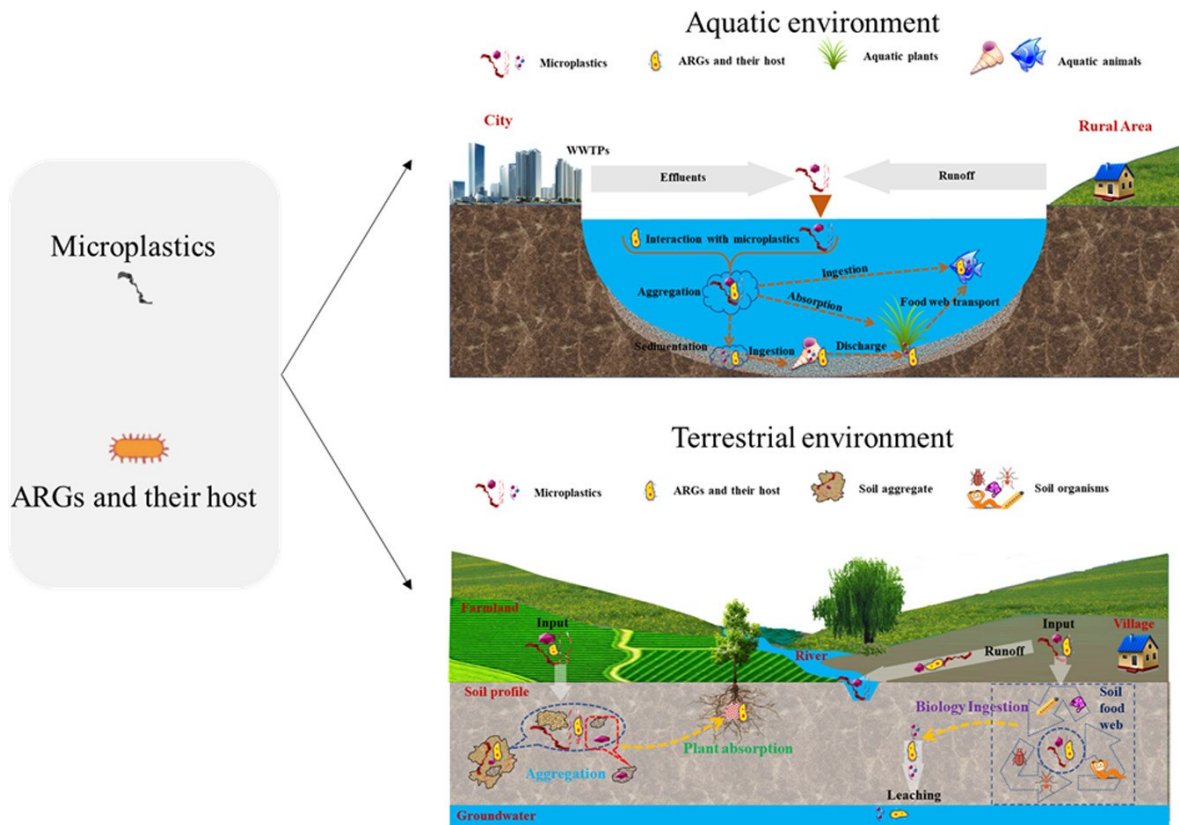
Specifické geny rezistence na tetracyklin byly identifikovány u 32 gramnegativních a 22 grampozitivních rodů (Roberts, 1996).

Z genů *tet* jsou u gramnegativních bakterií uváděny *tetA*, *tetB*, *tetD*, *tetE* a *tetG*, u grampozitivních se zase významně vyskytují *tetK*, *tetL*, *tetM*, *tetO* a *tetS* (Hedayatianfard et al., 2014).

3.4.5 Šíření rezistence k antimikrobiálním látkám

Intenzivní používání antibiotik pro humánní, veterinární a zemědělské účely má za následek jejich neustálé uvolňování do životního prostředí. Spolu s antibiotiky se do odpadních vod vnášejí bakterie odolné vůči antibiotikům (ARB) a geny rezistence vůči antibiotikům (ARG). Čistírny odpadních vod (ČOV) jsou považovány za pravděpodobná ohniska pro šíření antibiotické rezistence v životním prostředí, protože nabízejí vhodné podmínky pro proliferaci ARB i pro horizontální přenos ARG mezi různými mikroorganismy (Li, 2022). Ve skutečnosti jsou v ČOV v různých zemích detekovány geny propůjčující rezistenci ke všem třídám antibiotik spolu s mobilními genetickými prvky (MGE), jako jsou plazmidy, transpozony, bakteriofágy, integrony. (Partridge et al., 2018). Významnými šířiteli AMR jsou potravinová zvířata, pochopení dynamiky antimikrobiální rezistence je zásadní, protože tělesná hmota a fekální produkce potravinových zvířat se zvyšují s věkem. AMR mezi fekálními bakteriemi větších starších zvířat tedy představuje větší hromadnou zátěž pro přenos AMR prostřednictvím hnoje z produkčních systémů do životního prostředí. Největší přímé riziko přenosu AMR na spotřebitele představují fekální bakterie při porážce zvířete a kontaminace jatečně upravených těl (Gaire et al., 2021).

Předmětem velkého zájmu veřejnosti, vzhledem k jejich potencionálnímu riziku pro lidské zdraví, jsou v dnešní době v souvislosti s geny antibiotické rezistence mikroplasty. Ty mohou vytvářet odlišná bakteriální společenství a absorbovat znečišťující látky z okolního prostředí, které poskytují potenciální hostitele a vyvíjejí možný selekční tlak ARG (Obr. 1). Selektivní obohacení ARG a bakterií rezistence na antibiotika na mikroplastech bylo potvrzeno v různých prostředích. Mikroplasty by mohly být nositelem ARG mezi prostředím a zvířaty. Akumulace polutantů a hustá bakteriální společenství na mikroplastech poskytují příznivé podmínky pro vyšší přenosovou rychlost a evoluci ARG (Liu et al., 2021).



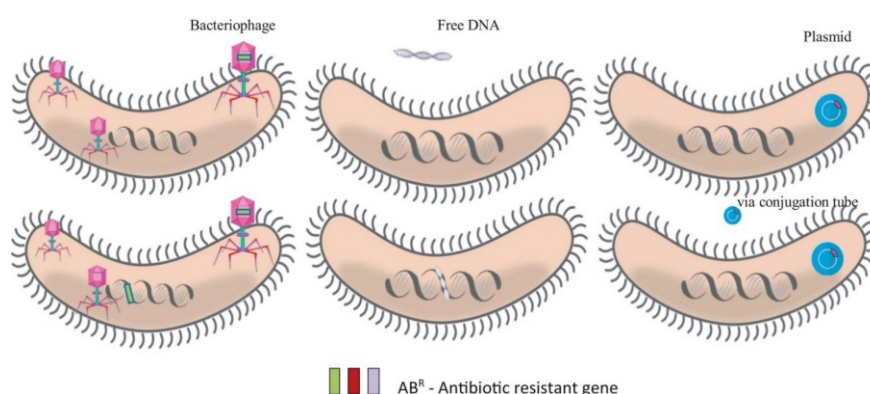
Obrázek 1. Šíření ARG prostřednictvím mikroplastů (Liu et al., 2021, upraveno)

Bakterie mohou získat rezistenci vůči antibiotikům dvěma způsoby, a to produkcí ARG spontánní genovou mutací a získání ARG horizontálním přenosem genů (HGT). Přenosové režimy těchto dvou způsobů se však liší. První se přenáší především na potomstvo prostřednictvím vertikálního přenosu genů (VGT), zatímco druhý má potenciál přenášet ARG rychleji, mohou se přenášet mezi různými bakteriemi, dokonce i mezi různými druhy. HGT zahrnuje především 3 cesty: konjugaci, přirozenou transformaci a transdukcí (Li, 2022).

Horizontální přenos genů (HGT) je jedním z nejznámějších a nejrozšířenějších procesů mezi bakteriálními populacemi pro přenos genů a jejich obohacení o nové vlastnosti nebo vlastnosti (Obr. 2). Jde o proces výměny genů mezi organismy, které nejsou ve vztahu rodič-potomek (Soucy et al., 2015). Tato výměna genetického materiálu může mít jak příznivé, tak i nepříznivé důsledky. Je primárním mechanismem šíření antibiotické rezistence u bakterií a je dosahováno procesy konjugace (prostřednictvím plazmidu a konjugativních transpozonů), transdukcí (prostřednictvím bakteriofágů) nebo transformací (prostřednictvím inkorporace do chromozomu chromozomální DNA, plazmidu a jiná nahá

DNA). Hraje také zásadní roli ve vývoji mikroorganismů rezistentních vůči lékům a přenosu genů virulence (Kunhikannan, 2021).

Mutacemi pak mohou být například mutace bodové, delece (tedy odstranění části genu), případně substituce (náhrada genu) či adice jednoho nebo několika párů bází v deoxyribonukleové kyselině. Ty mají za následek výměnu jedné a více aminokyselin ve struktuře peptidu. Dochází tak k syntéze bílkovinného produktu, jehož schopnost vázat antibiotikum je omezená (Spížek, 1999).



Obrázek 2. Zisk antibiotické rezistence – mechanismus horizontálního přenosu genů mezi bakteriálními populacemi (Kunhikannan, 2021, upraveno)

Antibiotika jsou uvolňována do životního prostředí několika cestami, jako jsou klinická zařízení, lidský nebo zvířecí odpad, používání produktů obsahujících antibakteriální látky a prostřednictvím potravin a krmiv, které jsou doplněny antibiotiky a podávány zvířatům (Kunhikannan, 2021).

Uvnitř ČOV může pod selekčním tlakem antibiotik, kovů a dalších chemických látek docházet k horizontálnímu přenosu genů (HGT) (Karkman et al., 2018). Mnoho studií potvrdilo, že ČOV nejsou schopny zcela odstranit antibiotika, ARB a ARG. Vypouštění odpadních vod z ČOV do prostředí včetně povrchových vod, podzemních vod, mořského prostředí a půdy, kde mohou environmentální mikroorganismy interagovat s ARB a ARG, může vést k rozvoji antibiotické rezistence u mikroorganismů z těchto prostředí (Ben et al., 2019).

3.5 Možnosti detekce genů pro antibiotickou rezistenci

Je známo několik metod identifikace rezistentních bakterií (fenotypové metody) a jejich příslušných genů rezistence (genotypové metody). Tradiční metody jsou primárně založeny na kultivaci mikroorganismů za specifických podmínek. Ačkoli jsou jednoduché a snadno proveditelné, některé aspekty nejsou tak výhodné. Existence životaschopných nekultivovatelných mikroorganismů nebo dlouhá doba, po kterou se určité mikroorganismy mohou v prostředí množit, bývá překážkou. Na druhé straně molekulární metody jsou založeny na amplifikaci cílových genů (tj. RFLP), celogenomovém sekvenování a metagenomice (Galhano et al., 2021).

I když je v současné době k dispozici rostoucí počet fenotypových a genotypových charakterizačních metod pro detekci AMR, existují u každé z těchto metod určitá omezení (Anjum, 2015).

Nejběžněji používanou technikou pro identifikaci antimikrobiální citlivosti je stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Účelem této metody je kvantifikovat minimální koncentraci antimikrobiální látky, která inhibuje zjevný růst bakterií. Bakterie se očkují na agar nebo do bujónu a sleduje se mikrobiální růst. Pomocí těchto metod nicméně není možné stanovit rezistenci u životaschopných nekultivovatelných bakterií. (Wiegand, 2008).

Mezi nejběžněji využívané fenotypové metody se řadí diluční mikrometoda, kde se hodnota MIC odečítá v jamkách mikrotitrační destičky (Burt, 2004), agarová diluční metoda prováděná na agarových půdách Mueller Hinton, disková difúzní metoda s použitím disků různě koncentrovaných antibiotik a E-test složený z nepropustného nosiče s předem definovaným antimikrobiálním gradientem, jenž se umísťuje na agarovou plotnu. E-test je v podstatě kombinací obou zmíněných metod (Galhano et al., 2021).

V současné době vědci přiklání k použití genotypových metod kvůli množství informací, které lze těmito technikami rychle získat (Anjum, 2015). Dále jsou popsány jednotlivé genotypové metody stanovení antibiotické rezistence.

Geny antibiotické rezistence (ARG) kódují schopnost bakteriálních buněk růst v přítomnosti antibiotik. Dosahují toho kódováním různých funkcí, jako je čerpání antibiotika z buňky (efflux), degradace antibiotika nebo modifikace cíle (např. chemická modifikace za účelem vytvoření buněčné stěny, která již není citlivá). Po extrakci DNA ze zkoumaného vzorku jsou ARG typicky identifikovány metodami založenými na PCR nebo v poslední době genomickými nebo metagenomickými technikami (Luby et al., 2016).

Detekce evolučních ohnisek antibiotické rezistence (DARE) nedávno navrhlo následující cíle pro monitorování: integron třídy 1 (*int1*), sulfonamidové ARG (*sul1* a *sul2*), β -laktamové ARG (*bla*CTX-M a *bla*TEM), chinolonové ARG (*qnrS* a *6-ib-Cr*), makrolidové ARG (*ermB* a *ermF*), kazetový marker ARG *aac*, glykopeptidové ARG (*vanA*) a dále meticilinové ARG (*mecA*) (Berendonk et al., 2015).

3.5.1 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda PCR je vysoce citlivá, poskytuje relativně rychlé výsledky (2–3 h) a přímou informaci o požadované sekvenci DNA. Jedná se o enzymatický test využívající oligonukleotidové primery, které jsou komplementární k přilehlým oblastem cíle pro amplifikaci cílových genů nebo genových fragmentů. Je dostupná široká škála primerů, které cílí na specifické ARG. (Chee-Sanford et al., 2001). Jde o poměrně novou techniku pro *in vitro* amplifikaci DNA nebo RNA organismu nebo genového defektu bez nutnosti kultivace (Wages, 2005).

Princip PCR je jednoduchý, vyžaduje třístupňový cyklický proces: denaturaci dvouřetězcové DNA, annealing primerů a syntézu DNA, kdy přirůstá vlákno komplementární DNA k původní molekule DNA ve směru od 5' konce k 3' konci (Schochetman, 1998).

Nevýhodou může být, že PCR je závislá na extrakci DNA, která se bude lišit v účinnosti napříč matricemi a pravděpodobně bude procházet inhibitory, které mohou interferovat s PCR. Tato omezení mohou vést k falešným negativům. Na druhé straně může být PCR náchylná k nespecifickým reakcím (tj. amplifikaci nesprávného cíle), což vede naopak k falešně pozitivním výsledkům. PCR sama o sobě neposkytuje informace o tom, zda byl cílový ARG skutečně exprimován v prostředí (Luby et al., 2016).

3.5.2 Reverzní transkriptázová PCR (RT-PCR)

Při reakci využívající RT-PCR se molekula RNA přepisuje na molekulu komplementární DNA (cDNA). Po tomto postupu se amplifikace provádí pomocí standardní PCR. Jde o metodu vysoké specifity, senzitivity a spolehlivosti (Galhano et al., 2021). Ukázalo se, že molekula cDNA vytvořená z počáteční RNA má vyšší úroveň čistoty ve srovnání s molekulou DNA odebranou přímo z cíle. Standardní molekula DNA obsahuje nečistoty, jako jsou proteiny, které se nenacházejí v molekule cDNA. Proto je cDNA specifitější a snáze rozpoznatelná primery (Tang, 2017).

3.5.3 PCR v kombinaci s polymorfismem délky restrikčních fragmentů (PCR-RFLP)

Po rozštěpení několika vzorků DNA pomocí restrikčních endonukleáz enzymů se projevují rozdíly v délce vzniklých DNA restrikčních fragmentů. Ty je dále možné detekovat gelovou elektroforézou. Tyto rozdíly způsobují odchylky v sekvenci původních řetězců DNA, pokud obsahují řetězec nukleotidů pro rozpoznání restrikčních endonukleáz, dochází ke štěpení dvoušroubovice DNA, pokud ho neobsahují, ke štěpení nedochází (Rasmussen, 2012).

U salmonel byla technika PCR–RFLP schopna identifikovat mutace v oblasti genu *gyrA* určující rezistenci na chinolony u kmenů rezistentních na kyselinu nalidixovou ve vzorcích drůbeže, což ukazuje, že takové bodové mutace mohou účinně přispívat k AMR (Galhano et al., 2021).

3.5.4 Real-Time PCR (qPCR)

Díky qPCR je možné detekovat a kvantifikovat amplifikovanou část DNA během celého procesu amplifikace. Tato kvantifikace je umožněna zahrnutím fluorescenčních sond do specifických primerů, které emitují detekovatelné signály (Bell, 2015). Přidání fluorescenčních sond k amplifikacím PCR umožňuje monitorování amplifikace v reálném čase a oproti konvenční PCR je reakční doba kratší (Galhano et al., 2021).

Někdy pro klinický výsledek AMR nestačí pouze přítomnost genu rezistence. Pokud například přítomnost genů β -laktamázy v některých klinicky izolovaných bakteriích nekoreluje dobře s účinkem léčby penicilinem, je možné, že přítomnost genu rezistence nerozhoduje o selhání léčby, protože úroveň genové exprese může být příliš nízká. V této souvislosti je použití RT-qPCR zásadní pro kvantifikaci úrovně exprese genů AMR (Galhano et al., 2021).

3.5.5 Mikročipy

Technika pomocí mikročipů je dalším možným způsobem pro zkoumání genetické AMR u bakterií. Tato technologie umožňuje studium genové exprese hybridizací oligonukleotidových sekvencí, které budou čistit a amplifikovat specifické molekuly RNA ze vzorku, který je středem zájmu. To umožňuje jeho použití pro několik účelů, zejména pro identifikaci funkce určitých genů (Galhano et al., 2021). Použití mikročipů při detekci genů AMR lze optimalizovat několika hybridizačními procesy a provádět současně na stejném substrátu (např. skle, membráně nebo gelové podložce), který má mnoho sond.

Další velkou výhodou je, že není nutná předchozí kultivace bakterií, protože vzorek DNA lze přímo izolovat za účelem vytvoření mikročipů (Gheyas, 2013).

3.5.6 Sekvenování celého genomu a metagenomika

Díky schopnosti sekvenovat celý mikrobiom je metagenomika účinným nástrojem při studiu a objevování nových genů rezistence. Jde o současnou a velmi účinnou techniku, která by měla být více prozkoumána ve studiích zahrnujících řetězec produkce masa (EFSA, 2019).

Analýza mikrobiálního genomu se striktně opírá o technologii sekvenování DNA. Genom je soubor molekul DNA, ve kterých jsou uspořádány geny a variabilní sekvence a poskytují základní informace pro vznik mikroorganismu (Shen et al., 2021).

Primární výhodou těchto metod je, že obcházejí PCR, a tím i nutnost selektovat genetické cíle, jako jsou specifické ARG a mobilní genetické elementy. Kolektivní genomy v daném vzorku (metagenomy) lze sekvenovat v jediném kroku (např. získáním 10–1000 Gb sekvencí DNA v jedné dráze HiSeq 2500 Illumina) (Luby et al., 2016). Geny rezistence na antibiotika nebo jiné zájmové cíle (např. plazmidy, transpozony a faktory virulence) pak mohou být detekovány a kvantifikovány vyhledáváním v online databázích pomocí veřejně dostupných nástrojů, jako je MG-RAST, tzv. Integrovaná databáze mikrobiálního genomu (IMG) nebo projekt Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD) (Meyer et al., 2008).

Sestavy vytvořené z malých čtení sekvencí se nazývají kontigy, které mohou být anotovány pro hledání genů rezistence. Hledání genů rezistence se většinou provádí metodami (např. BLAST, USEARCH, DIAMOND), které berou v úvahu podobnost kontigů s geny obsaženými v referenčních databázích, jak je uvedeno výše. Výběr databáze závisí jak na účelu každé studie (tj. geny rezistence, geny virulence, proteiny), tak na spolehlivosti sekvence uložené v každé databázi. Došlo také ke zlepšení poměru nákladů a přínosů sekvenačních technologií a celogenomové sekvenování se tak stalo snadno dostupným a účinným nástrojem při sledování rezistence vůči antibiotikům (Galhano et al., 2021).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo izolovat bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* ze vzorků chlazeného kuřecího masa získaných z různých řeznictví Zlínského kraje, provést jejich identifikaci a stanovit u nich výskyt antibiotické rezistence k celkem 20 antibiotikům diskovou difúzní metodou.

5 MATERIÁL A METODY

5.1 Přístroje

Váhy KB d = 0,1 g (KERN, Německo)

Stomacher Classic IUL (BioTech, Česká republika)

Spiral Plater EDDY JET 2 (IUL Instruments, Španělsko)

Sphere Flash – Automatic Colony Counter (IUL Instruments, Španělsko)

Zákaloměr Densi-La-Meter (Erba Lachema, Česká republika)

Třepačka VX-200 Vortex Mixer (Labnet International, USA)

Počítačový program TNW pro vyhodnocování Enterotestů (Erba Lachema, Česká republika)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Mikroskop s imerzním objektivem (Leica Microsystems, Německo)

5.2 Pomůcky a chemikálie

Odměrný válec (Simax, Česká republika)

OXItest detekční proužky (Erba Lachema, Česká republika)

Enterotesty Mikrolatest ENTEROtest 24 N (Erba Lachema, ČR)

Sterilní pinzeta, sterilní nůžky, mikrotenové sáčky, nitrilové rukavice, kádinky, plynový kahan, sirky, Petriho misky, sterilní očkovací kličky, podložní sklíčka, sterilní plastové zkumavky, stojan na zkumavky, pipetové špičky

Chemikálie

Chlorid sodný

3 % peroxid vodíku

Krystalová violet

Lugolův roztok

Safranin

Ethanol

Imerzní olej

Parafín

Roztoky a živná média

Fyziologický roztok – 0,95 % roztok chloridu sodného v destilované vodě

VRBA – Violet Red Bile Agar (HIMEDIA, Indie) byl použit pro kultivaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*

Složení (g/l): pepton 7 g, kvasničný extrakt 3 g, laktóza 10 g, směs žlučových solí 1,5 g, NaCl 5 g, neutrální červeň 0,03 g, krystalová violet' 0,002 g, agar 15 g

Konečné pH při 25 °C = 7,4 ± 0,2

Nutrient agar (HIMEDIA, Indie) byl použit pro přeočkování kultivovaných kmenů čeledi *Enterobacteriaceae*

Složení (g/l): pepton 5 g, NaCl 5 g, HM pepton B (ekvivalent hovězího výtažku) 1,5 g, kvasničný extrakt 1,5 g, agar 15 g

Konečné pH při 25 °C = 7,4 ± 0,2

Mueller Hinton Agar (HIMEDIA, Indie) byl použit pro provedení diskové difúzní metody

Složení (g/l): ekvivalent hovězího výtažku 300 g, ekvivalent hydrolyzátu kyseliny kaseinové (acicase) 17,5 g, škrob 1,5 g, agar 17 g

Konečné pH při 25 °C = 7,3 ± 0,1

Dále byly použity následující antibiotické disky:

Peniciliny:

Ampicilin AMP10 (HIMEDIA, Indie)

Ampicilin/Sulbactam A/S10 (HIMEDIA, Indie)

Amoxicilin AMX10 (HIMEDIA, Indie)

Cefalosporiny:

Cefuroxim CXM30 (HIMEDIA, Indie)

Cefazolin CZ30 (HIMEDIA, Indie)

Cefoxitin CX30 (HIMEDIA, Indie)

Ceftriaxon CTR30 (HIMEDIA, Indie)

Cefalotin CEP30 (HIMEDIA, Indie)

Ceftazidime CAZ30 (HIMEDIA, Indie)

Tetracykliny:

Tetracyklin TE10 (HIMEDIA, Indie)

Doxycyklin Hydrochlorid DO30 (HIMEDIA, Indie)

Aminoglykosidy:

Amikacin AK30 (Oxoid, UK)

Gentamycin G120 (HIMEDIA, Indie)

Linkosamidy:

Klindamycin CD2 (HIMEDIA, Indie)

Makrolidy:

Azitromycin AZM15 (HIMEDIA, Indie)

Sulfonamidy:

Sulfametoxazol trimetoprim SXT25 (Oxoid, UK)

Fluorochinolony:

Ciprofloxacin CIP5 (HIMEDIA, Indie)

Karbapenemy:

Imipenem IPM10 (HIMEDIA, Indie)

Amfenikoly:

Chloramfenikol C30 (HIMEDIA, Indie)

Polymyxiny:

Kolistin CL10 (HIMEDIA, Indie)

5.3 Vzorky kuřecího masa

Celkem bylo zakoupeno a mikrobiologické analýze podrobeno 30 vzorků kuřecího masa, z toho bylo 20 kuřecích křídel a 10 kuřecích špalíčků (Tab. 1.). Vzorky byly zakoupeny v řeznictvích maloobchodní sítě ve Zlíně v období listopad/prosinec 2021.

Tabulka 1. Vzorky použité k izolaci kmenů a jejich původ

Vzorek	Část	Řeznictví	Vzorek	Část	Řeznictví
K1	špalíček	SU	K16	křídlo	RM
K2	špalíček	SU	K17	křídlo	RM
K3	špalíček	SU	K18	křídlo	RM
K4	špalíček	SU	K19	křídlo	RM
K5	špalíček	SU	K20	křídlo	RM
K6	křídlo	SU	K21	špalíček	SU
K7	křídlo	SU	K22	špalíček	SU
K8	křídlo	SU	K23	špalíček	SU
K9	křídlo	SU	K24	špalíček	SU
K10	křídlo	SU	K25	špalíček	SU
K11	křídlo	SU	K26	křídlo	RM
K12	křídlo	SU	K27	křídlo	RM
K13	křídlo	SU	K28	křídlo	RM
K14	křídlo	SU	K29	křídlo	RM
K15	křídlo	SU	K30	křídlo	RM

Vysvětlivky:

SU = Slezské uzeniny (Výrobce: Těšínské jatky, s.r.o., Na Olšinách 361/1, 73701 Český Těšín; Kuřecí křídla/špalíčky: Maso-drůbeží maso, třída jakosti A; Chov v: Polsko; Porážka v: Polsko)

RM = Rostislav Matula (Lehotice 105; Kuřecí křídla/špalíčky: Maso-drůbeží maso, třída jakosti A; Chov v: Polsko; Porážka v: Polsko)

5.4 Izolace bakteriálních kmenů

Mikrobiologická analýza byla provedena následovně. Bylo odváženo 5 g kůže a masa do sterilního sáčku a bylo přidáno 45 ml fyziologického roztoku. Po homogenizaci ve Stomacheru byla provedena inokulace pomocí Spiral Plateru na živnou půdu VRBA vzhledem k její vhodné selektivitě. Naočkované misky byly inkubovány při 37 °C/24 h.

Druhý den byla použita čtečka a software Sphere Flash ke zjištění počtů bakterií na miskách. Různé morfologické typy byly izolovány křížovým roztěrem na Nutrient agar, z každého vzorku byly izolovány maximálně 4 kolonie.

5.5 Identifikace kmenů

Vzhledem k tomu, že čeleď *Enterobacteriaceae* tvoří gramnegativní bakterie, základní identifikaci byla provedena pomocí Gramova barvení, tedy zafixováním kolonie na podložním sklíčku a jejím následným obarvením krystalovou violetí (60 s), Lugolovým roztokem (30 s), opláchnutím acetonem a konečným dobarvením safraninem (60 s). Po opláchnutí destilovanou vodou a osušením preparátu byly bakterie pozorovány mikroskopem s imerzním objektivem. U gramnegativních tyčinek byly provedeny další testy. Např. oxidázový test, jehož principem je detekce chromoxidázy pomocí barevné reakce ethyloxethyl-parafenylendiaminu s alfa-naftolem za vzniku indofenolové modři.

Pozitivní výsledek u tohoto testu je očekáván u G (-) bakterií produkujících cytochromoxidázu. Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou oxidáza-negativní, což znamená, že modré zbarvení se na proužku neprojeví.

Testovaná kultura byla pomocí kličky nanášena na povrch testovacího proužku a sledovala se barevná reakce. V případě pozitivní reakce se v místě nánosu kultury projevilo tmavomodré zbarvení (oxidáza + bakterie), v případě reakce negativní (oxidáza – bakterie) zůstal proužek nezbarven.

Jako další byl prováděn test na katalázu, u této kontroly je využíván enzym peroxidáza, kdy bakterie tvořící tento enzym vyvolají pozitivní reakci v podobě vznikajícího kyslíku (způsobeno rozkladem peroxidu vodíku na vodu a kyslík, který je katalyzován katalázou).

Na podložní sklíčko byla kapátkem nanášena kapka 3 % peroxidu vodíku. V něm se následně pomocí kličky rozmíchala testovaná kultura a sledovala se vznikající reakce. Bakterie sledované čeledi (tedy *Enterobacteriaceae*) jsou kataláza pozitivní, což znamená, že

po rozmíchání kultury se začaly tvořit bubliny kyslíku (v případě kataláza-negativní bakterie by nebyla zaznamenána žádná reakce).

Pro identifikaci izolovaných kmenů byl použit ENTEROtest 24 N, který tvoří destička s 4x 24 jamkami (pro identifikaci 4 kmenů) obsahující dehydratované roztoky různých chemických látek, které mění barvu a slouží k odečtení výsledku. Jedná se o soupravu umožňující rozlišení a určení druhu bakterie na základě jejich požadavků a využití různých substrátů.

Pro provedení se z čerstvé bakteriální kultury nachystalo inokulum ve 3 ml sterilního fyziologického roztoku, které odpovídalo zákalu 1 stupni McFarlanda. Do každé jamky bylo mikropipetou nadávkováno 100 μ l tohoto inokula a prvních 5 jamek se zakápllo parafínem, aby se vytvořilo anaerobní prostředí.

Destičky vložené do inkubačního PE sáčku se nechaly v termostatu při 37 °C inkubovat do druhého dne a po vyjmutí se podle barevné srovnávací stupnice pro tuto soupravu odečetly výsledky. Ty se následně zanesly do počítačového identifikačního programu TNW, který testy vyhodnotil porovnáním s databází.

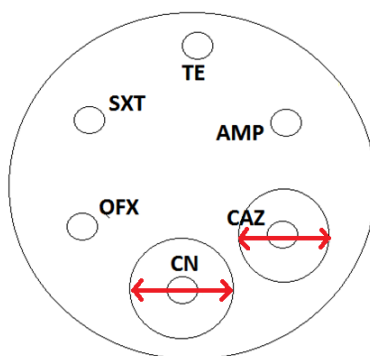
5.6 Stanovení antibiotické rezistence

Disková difúzní metoda byla použita ke stanovení antibiotické rezistence izolovaných bakteriálních kmenů u celkem 20 antibiotik, která jsou vypsána v kapitole 5.2.

Jako první bylo z testovaných kmenů připraveno do zkumavek inokulum o zákalu 0,5 stupňů McFarlanda, které bylo 1 ml pipetou nanášeno na povrch půdy Mueller Hinton v Petriho miskách tak, aby byl celý rovnoměrně pokryt.

Co nejdříve po rozlití inokula se sterilní jehlou postupně přitiskly disky všech sledovaných antibiotik a plotny se nechaly inkubovat v termostatu při 37 °C přibližně 18 hodin.

Po inkubaci bylo třeba změřit velikost inhibičních zón (Obr.3) a podle srovnání s výsledky stránky EUCAST (EUCAST, 2022) označit kmen buď jako citlivý, rezistentní nebo intermediární.



Obrázek 3. Měření inhibičních zón při diskové difúzní metodě (Přáda, 2011, upraveno)

6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Hlavním cílem této diplomové práce bylo izolovat bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* ze vzorků chlazeného kuřecího masa, identifikovat je a stanovit u nich rezistenci k 20 antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou.

6.1 Identifikace bakteriálních izolátů

V této práci byla provedena izolace bakterií na půdě pro koliformní bakterie VRBA. Celkem bylo izolováno 39 bakteriálních kolonií různých morfolozických typů. Tyto kmeny byly v čisté kultuře barveny diagnostickým barvením dle Grama. V mikroskopu byly pozorovány gramnegativní tyčinky. Další provedené testy byly oxidázový a katalázový test. Enterobakterie jsou kataláza pozitivní a oxidáza negativní, u všech 39 kmenů byly tyto vlastnosti potvrzeny.

Vzhledem k těmto výsledkům bylo potvrzeno, že všechny kmeny náleží do čeledi *Enterobacteriaceae* a byly provedeny identifikační mikrotesty ENTEROtest 24 N. Získané výsledky identifikace jsou sepsány v následující tabulce (Tab. 2.).

Tabulka 2. identifikace izolovaných bakterií dle Enterotestů 24 N (Erba Lachema)

Označení kmene	Identifikace	Identifikační skóre	T-index	Výsledná identifikace
K2B	<i>Serratia fonticola</i>	99,97	0,732	<i>Serratia fonticola</i>
K2D	<i>Yersinia bercovieri</i>	90,28	0,384	<i>Yersinia</i> sp. *
K3A	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	99,96	0,876	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
K3B	<i>Serratia fonticola</i>	99,9	0,527	<i>Serratia</i> sp. *
K3C	<i>Citrobacter farmeri</i>	92,37	0,854	<i>Citrobacter farmeri</i>
K4B	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	100	0,716	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
K5A	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	97,83	0,859	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>

Pokračování Tabulky 2.

Označení kmene	Identifikace	Identifikační skóre	T-index	Výsledná identifikace
K5B	<i>Escherichia hermanii</i>	96,49	0,609	<i>Escherichia</i> sp.
K6A	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	89,76	0,937	<i>Buttiauxella gaviniae</i>
K7A	<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i>	73,29	1	<i>Klebsiella</i> sp.
K7B	<i>Serratia fonticola</i>	99,9	0,527	<i>Serratia</i> sp. *
K7D	<i>Yersinia aldoveae</i>	89,26	0,509	<i>Yersinia</i> sp. *
K8A	<i>Escherichia hermanii</i>	99,47	0,985	<i>Escherichia hermanii</i>
K8B	<i>Citrobacter farmeri</i>	99,81	0,875	<i>Citrobacter farmeri</i>
K9A	<i>Citrobacter freundii</i>	98,46	0,939	<i>Citrobacter freundii</i>
K9B	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	99,35	0,821	<i>Leclercia adecarboxylata</i>
K9C	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	90	0,668	<i>Buttiauxella</i> sp.
K9D	<i>Yersinia ruckeri</i>	89,71	1	<i>Yersinia ruckeri</i>
K10A	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	83,34	0,994	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>
K10E	<i>Serratia fonticola</i>	100	0,479	<i>Serratia</i> sp. *
K11B	<i>Serratia fonticola</i>	99,3	0,671	<i>Serratia</i> sp.
K12A	<i>Escherichia coli</i>	100	0,479	<i>Escherichia</i> sp. *
K12B	<i>Serratia marcescens</i>	98,49	0,662	<i>Serratia</i> sp.
K13C	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>diarizonae</i>	96,31	0,388	<i>Salmonella</i> sp. *
K13D	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	62,12	0,629	<i>Buttiauxella</i> sp. *

Pokračování Tabulky 2.

Označení kmene	Identifikace	Identifikační skóre	T-index	Výsledná identifikace
K14A	<i>Kluyvera georgiana</i>	89,28	1	<i>Kluyvera georgiana</i>
K14C	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	92,72	0,73	<i>Buttiauxella gaviniae</i>
K15B	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99,13	1	<i>Raoultella ornithinolytica</i>
K16B	<i>Escherichia coli</i>	100	0,644	<i>Escherichia coli</i>
K17B	<i>Enteroaacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	94,65	0,735	<i>Enteroaacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>
K18A	<i>Serratia grimesii</i>	94,06	0,921	<i>Serratia grimesii</i>
K18B	<i>Serratia marcescens</i>	98,65	0,875	<i>Serratia marcescens</i>
K20C	<i>Serratia fonticola</i>	99,97	0,732	<i>Serratia fonticola</i>
K22A	<i>Escherichia hermannii</i>	44,35	0,639	<i>Escherichia</i> sp.
K22C	<i>Serratia fonticola</i>	100	0,9	<i>Serratia fonticola</i>
K23C	<i>Hafnia alvei</i>	99,4	0,827	<i>Hafnia alvei</i>
K24C	<i>Yersinia mollaetii</i>	76,67	0,438	<i>Yersinia</i> sp. *
K26C	<i>Serratia fonticola</i>	99,99	0,838	<i>Serratia fonticola</i>
K29B	<i>Escherichia hermannii</i>	44,35	0,639	<i>Escherichia</i> sp. *

*snížená pravděpodobnost správné identifikace

6.2 Stanovení antibiotické rezistence

Všechny kmeny uvedené v Tabulce 2 byly podrobeny stanovení antibiotické rezistence diskovou difúzní metodou vůči 20 antibiotikům (viz seznam v kapitole 5.2.). Zjištěné výsledky jsou uvedeny v Tabulkách 3 a 4 jako počty, respektive procenta výskytu rezistentních či intermediárních kmenů ze všech testovaných.

Vysvětlivky:

B = *Buttiauxella* spp., **C** = *Citrobacter* spp., **E** = *Enterobacter* spp., **Es** = *Escherichia* spp., **H** = *Hafnia* spp., **K** = *Klebsiella* spp., **Klu** = *Kluyvera* spp., **L** = *Leclercia* spp., **R** = *Raoultella* spp., **S** = *Salmonella* spp., **Se** = *Serratia* spp., **Y** = *Yersinia* spp.

Nejčastěji byla zastoupena rezistence k cefuroximu a cefazolinu (výskyt u všech izolátů), dále 97,4 % kmenů vykazovalo rezistenci k ampicilinu a klindamycinu a celkem na 92,3 % kmenů nebyl účinný ampicilin/sulbactam. Vysoce rezistentní byly izoláty také vůči amoxicilinu, ze 39 kmenů jich bylo rezistentních 36, tedy 84,6 %. Tyto výsledky jsou důvodem ke zvýšené pozornosti, jelikož stoupající bakteriální rezistence je rychle se šířícím problémem.

Většina izolovaných kmenů byla rezistentní převážně na peniciliny (ampicilin, ampicilin sulbactam a amoxicilin) a cefalosporiny (cefuroxim, cefazolin, cefoxitin a méně ceftriaxon).

6.2.1 Rod *Escherichia*

Výrazná rezistence byla sledována v případě této diplomové práce u ampicilinu, kdy se jako necitlivé projeví všechny kmeny, větší procento rezistence (38 %) potvrdili také Meyer a kol. (Meyer et al., 2007).

Získané výsledky se shodují také se studií Hera (2005), ve které zaznamenali nejvyšší rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům (Hera et al., 2005). U kmenů použitých pro výzkum diplomové práce se vyskytovala 100 % rezistence k ampicilinu a ampicilin/sulbactamu i k amoxicilinu, patřících do skupiny penicilinů. Ze skupiny cefalosporinů nevykazovaly citlivost k cefuroximu a cefazolinu, dále 50 % bylo rezistentní k cefoxitinu a rezistentní či intermediární kmeny byly také k ceftriaxonu (33,3 %). Citlivé byly z této skupiny tedy pouze k ceftazidimu a cefalotinu.

Jedna slovenská studie zkoumala rezistenci u izolátů *E. coli* u brojlerů z různých farem a zde došli k závěru, že nejvíce rezistentní je k chinolonovým antibiotikům. V této diplomové práci se prokázalo 16,7 % kmenů rezistentních k ciprofloxacinu. Dále zmiňují vysokou rezistenci k ampicilinu (39 %), kterou se podařilo dokázat, či tetracyklinu (39 %) (Kmet', 2010), kdy z použitých izolátů vykazovalo rezistenci 16,7 %. To, že izoláty rodu *Escherichia* ze vzorků kuřat použitých v diplomové práci vykazovaly nižší rezistenci, než je udáváno ve starších studiích, by dle věstníku ÚSKVBL o spotřebě antibiotik v letech 2010-2017 mohlo být způsobeno poměrně výrazným snižováním spotřeby tetracyklinových antibiotik

v těchto letech. V roce 2010 tato spotřeba byla přes 28 000 kg/rok, o 3 roky později, v roce 2013 klesla až na cca 19 000 kg/rok a v roce 2017 už se pohybovala kolem 13 000 kg/rok (Pokludová et al., 2019). Větší procento rezistence k tetracyklinům uvádí i Meyer a kol. (57 %), studie je ale provedená v roce 2007 a méně potvrzených rezistentních kmenů k tetracyklinu a doxycyklinu (16,7 %) v roce 2022 potvrzuje úspěšné snižování spotřeby těchto antibiotik a tím i potlačení šíření rezistence. 16,7 % izolátů bylo rezistentních také k ciprofloxacinu ze skupiny fluorochinolonů. Dále Meyer a kol. uvádí, že ze 42 izolovaných kmenů *Escherichii* bylo 37 % rezistentní na sulfametoxazol/trimetoprim a také 18,4 % kmenů vykazovalo rezistenci k chloramfenikolu. Co se týče sulfametoxazol/trimetoprimu, v případě kmenů izolovaných z použitých vzorků kuřecího masa pro diplomovou práci, byla rezistence k těmto antibiotikům 33,3 %, což je odpovídající výsledkům zmíněné studie. U chloramfenikolu použité kmeny vykazovaly nulovou rezistenci, to může být na jednu stranu připsáno znatelnému rozdílu počtu použitých kmenů pro diplomovou práci a ve studii Meyera a kol., na druhou stranu ani u dalších sledovaných bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* nebyla pozorována rezistence k této antimikrobiální látce.

Poměrně zajímavý byl výsledek u klindamycinu patřícího do skupiny linkosamidů, ke kterému byly všechny kmeny rezistentní. V souvislosti s tímto antibiotikem se většina studií věnuje převážně rodu *Staphylococcus* a některé rodu *Streptococcus*, kde jsou uváděny vysoké hodnoty rezistence. Co se týče *E. coli*, např. Heir a kol. zaznamenali vyšší počty rezistentních kmenů ke klindamycinu než k ostatním antibiotikům (Heir et al., 2004).

6.2.2 Rod *Enterobacter* a *Klebsiella*

Také u rodu *Klebsiella* a *Enterobacter* byl zaznamenán problém s cefalosporiny, kdy dle Patersona (2006) asi 20 % infekcí způsobených rodem *Klebsiella* zahrnuje kmeny, které nejsou citlivé na cefalosporiny. Taková rezistence je způsobená získáním plazmidů obsahujících geny, které kódují širokospektré beta-laktamázy, a tyto plazmidy často nesou také jiné geny rezistence. Dále některé kmeny *Enterobacter cloacae* jsou producenty ESBL a AmpC, které propůjčují rezistenci vůči cefalosporinům 3. i 4. generace (Paterson, 2006).

V této práci bylo zjištěno, že z cefalosporinů byl izolát rodu *Klebsiella* rezistentní k cefuroximu a cefoxitimu a intermediární k cefazolinu. Stejně jako u rodu *Escherichia* byl rod *Klebsiella* rezistentní také ke všem penicilinům (tedy AMP10, A/S10 a AMX10). Mimo jiné vykazoval rezistenci také k tetracyklinu.

Rezistence ke všem penicilinům byla pozorována stejně tak u rodu *Enterobacter*, z cefalosporinů byly všechny kmeny rezistentní k cefuroximu a cefazolinu a 75 % jich vykazovalo rezistenci k cefoxitinu. Pro porovnání, Cosgrove (2002) ve své studii zmiňuje, že rezistence u tohto rodu je již běžná a v roce 1999 až 34 % izolátů bylo k cefalosporinům rezistentní (Cosgrove, 2002). Šíření rezistence *Enterobacter* spp. k cefalosporinům potvrzují také novější výzkumy, např. studie Potze z roku 2006 udává, že z 201 izolovaných kmenů jich rezistenci vykazovalo 90 (tedy 44,8 %) (Potz et al., 2006).

Dále Kumar a kol. uvádí, že 87 % izolátů rodu *Enterobacter* a 83 % *Klebsiella* bylo rezistentních k cefadroxilu, který se též řadí do skupiny cefalosporinů (Kumar et al., 2013). Rezistence k těmto antibiotikům je tedy stále aktuálním problémem

6.2.3 Rod *Salmonella*

I u salmonel získaných pro tuto diplomovou práci převládala rezistence k penicilinům a cefalosporinům. Oba izoláty byly rezistentní k ampicilinu a ampicilin/sulbactamu a jeden k amoxicilinu, podobná čísla uvádí i Kamboh (100 % rezistence k ampicilinu a 93 % k amoxicilinu). Z cefalosporinů nebyly získané salmonely ze vzorků pro tuto práci citlivé k ceftazidimu, cefuroximu a cefazolinu, 50 % jich bylo rezistentních k ceftriaxonu. Z použitých antimikrobiálních látek cefalosporinové skupiny byly salmonely citlivé pouze k cefalotinu. Dle Kumara a kol. 100 % izolátů rodu *Salmonella* bylo rezistentních k cefadroxilu, který se též řadí do skupiny cefalosporinů (Kumar et al., 2013). Mimo to byly všechny salmonely použité v této diplomové práci rezistentní ke klindamycinu a 50 % z nich také k doxycyklinu. Podobných výsledků dosáhli také Wang a kol. (2021), kteří sledovali rezistenci u izolátů rodu *Salmonella* z kuřecího masa a výsledkem byla 87,5 % rezistence k ampicilinu a 75 % k doxycyklinu, z tetracyklinů ale navíc zjistili 62,5 % rezistenci k tetrycyklinu (Wang et al., 2021), kterou se potvrdit nepodařilo, na vině je pravděpodobně menší množství získaných izolátů a klesající trend používání tetracyklinů ve veterinární i humánní medicíně.

6.2.4 Rod *Serratia*

Dalším získaným rodem ze vzorků kuřat byl rod *Serratia*, který měl z celkového počtu kmenů poměrně velké zastoupení. Výsledky byly relativně zajímavé, jelikož mimo již tradiční rezistence k penicilinům a cefalosporinům vykazovaly tyto kmeny rezistenci také k některým dalším antibiotikům. Z penicilinů byly všechny kmeny rodu *Serratia* rezistentní

k ampicilinu a ampicilin/sulbactamu a 90,9 % i k amoxicilinu. Z cefalosporinových antibiotik byly všechny kmeny rezistentní k cefuroximu a cefazolinu, dále bylo 81,8 % kmenů rezistentních k cefoxitinu a 54,5 % k ceftriaxonu.

Mimo penicilinů a cefalosporinů ale na rozdíl od již výše zmíněných kmenů byla v této práci prokázána také rezistence ke kolistinu, a to u 54,5 % izolátů. Dále také k sulfametoxazol trimetoprimu (sulfonamidy), ke kterému byl jeden izolát rezistentní a jeden intermediární. Všechny salmonely byly rezistentní také ke klindamycinu ze skupiny linkosamidů. Velice podobných výsledků, co se týče citlivosti rodu *Serratia* k antimikrobiálním látkám, dospěli se svou studií Powell a Macron, kteří uvedli, že ze 7 000 izolátů *Serratia* spp. bylo 100 % citlivých k imipenemu, 98,2 % k amikacinu, 94,2 % ke gentamycinu, dále 89,4 % k ceftazidimu a 89,5 % k ciprofloxacinu. Velkou míru citlivosti pozorovali také u ceftriaxonu, a to až u 90,4 % izolátů (Powell, 2008), což je jediný rozdíl oproti výsledkům této práce, kde citlivost k tomuto antibiotiku byla výrazně nižší, a to 45,5 %. To ale mohlo být způsobeno mnoha různými vlivy, jedním z nich je enormní rozdíl v počtu sledovaných izolátů tohoto rodu, dále výsledky diskové difúzní metody ovlivňuje také tloušťka živné půdy apod. Stejně tak poskytuje téměř totožné výsledky i studie od Liou a kol., kteří popisují celkem 99,3 % izolátů citlivých k imipenemu, 93,8 % k ceftazidimu a 87,8 % k amikacinu. Mimo to ale také uvádí přítomnost rezistence na sulfametoxazol/trimetoprim, konkrétně se jedná o 39,2 % izolátů (Liou et al., 2014) a ta byla získanými výsledky potvrzena (18,2 %).

Konkrétně u rodu *Serratia* se studie příliš nezaměřují na rezistenci ke kolistinu, ale existují výzkumy, které potvrzují poměrně vysokou míru rezistence k této látce u celé čeledi *Enterobacteriaceae*. Například Qadi a kol. uvádí, že až 41 % sledovaných izolátů zmíněné čeledi vykazovalo ke kolistinu rezistenci (Qadi et al., 2021). Rhouma a kol. upozorňují na to, že objev nechromozomálního mechanismu rezistence na kolistin u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* vedl ke znepokojení mezi lékaři i veterináři. Použití kolistinu u hospodářských zvířat bylo označeno jako zodpovědné za vznik rezistence na toto antibiotikum u *Enterobacteriaceae* (Rhouma et al., 2016). Veškeré zjištěné skutečnosti dokazují, že mimo penicilinů a cefalosporinů je rizikem také rezistence ke kolistinu, a to napříč celou čeledí, vzhledem k jeho podávání potravinovým zvířatům a rizikem šíření rezistence. Mimo rezistentní *E. coli*, shodně se studií Rhoumy a kol. (2016), se podařilo pomocí této diplomové práce identifikovat takové kmeny i v řadách rodu *Serratia*.

6.2.5 Rod *Yersinia*

Spektrum antibiotik, ke kterým yersinie vykazovaly rezistenci, bylo oproti výsledkům u ostatních získaných rodů poměrně rozmanité. Rezistentní byly kmeny k ampicilinu, který je v této souvislosti často zmiňován i v ostatních studiích, ampicilin/sulbactamu a amoxicilinu, tedy ke všem použitým penicilinům. Z cefalosporinů to byl tradičně cefuroxim a dále pouze cefazolin a 25 % kmenů nebylo citlivých také k cefoxitinu, z hlediska cefalosporinových antibiotik je tak u yersinií spektrum rezistence o něco slabší, než u zbytku izolovaných rodů. U 75 % izolátů byla zjištěna rezistence ke klindamycinu (linkosamidy), 25 % kmenů bylo rezistentních také k sulfametoxazol/trimetoprimu patřícího do skupiny sulfonamidů a dále k azitromycinu (makrolidy). Co se týče právě azitromycinu, rezistenci k této látce mimo yersinií vykazoval ze všech 12 získaných rodů už jen rod *Citrobacter*. V neposlední řadě bylo 25 % izolátů intermediárních k ciprofloxacinu, který je řazen mezi fluorochinolony, rezistence u tohoto rodu je tedy rozšířena napříč všemi skupinami a hrozí tak nebezpečí z hlediska humánního i veterinárního, např. *Yersinia pestis*, *Y. pseudotuberculosis* a *Y. enterocolitica* patří mezi velmi významné lidské patogeny spojené s horečkami, infekcemi trávicího traktu a průjmy, záněty kloubů či perianálními vředy a vředy tlustého střeva. Takové infekce se nejčastěji léčí tetracyklinem, 50 % izolátů ale bylo k tetracyklinu intermediární, což poukazuje na vznikající hrozbu v souvislosti s léčbou infekcí způsobených touto bakterií.

Stejně jako v této práci, i v různých studiích bylo spektrum ATB, ke kterým kmeny nebyly citlivé, poměrně rozmanité. V některých případech se uvádí jako neúčinný například ampicilin, tetracyklin, chloramfenikol, imipenem a další, v dalších studiích jsou ale tyto látky uváděny jako účinné, a naopak rezistence je prokázána u sulfonamidů či doxycyklinu (Lei & Kumar, 2022).

6.2.6 Rod *Citrobacter*

Jde o poměrně častého lidského příležitostného patogena působícího ve střevě, močových cestách a různé druhy mohou způsobovat bakterémie, meningitidu či mozkové abscesy u novorozenců a kojenců (Doran, 1999). Zástupce tohoto rodu se podařilo též izolovat a bylo zjištěno, že 100 % kmenů je rezistentních ke všem použitým penicilinům (AMP10, A/S25, AMX10) a k některým cefalosporinům (CXM30, CZ30 a 50 % izolátů i k CX30). Mimo tyto skupiny vykazovaly izoláty 100 % rezistenci i ke klindamycinu a 50 % jich nebylo citlivých k azitromycinu (makrolidy). Pouze málo studií se zabývá rodem *Citrobacter* v souvislosti

s kuřecím masem, nicméně Pepperell a kol. uvádí rezistenci izolátů získaných z databáze SENTRY, většina dle studie vykazovala rezistenci právě k cefalosporinům a penicilinům, dále sledovali zvyšující se výskyt rezistence i k aminoglykosidům a chinolonům (Pepperell et al., 2002), u izolátů použitých pro tuto práci se mimo cefalosporinů a penicilinů zjistila rezistence ke klindamycinu (linkosamidy) a azitromycinu (makrolidy). Rezistenci k penicilinům (ampicilin a amoxicilin) potvrzují ve své studii také Metri a kol., analýza byla provedena u pacientů s pozitivní kultivací moči na *Citrobacter* (Metri et al., 2013). Právě tato antibiotika se často používají jako perorální terapie u infekcí močových cest, nicméně vysoká míra rezistence demonstrována jak v této studii, tak potvrzená při výzkumu pro diplomovou práci naznačuje, že by léčiva měla být nahrazena.

6.2.7 Rody *Leclercia*, *Kluyvera*, *Klebsiella*, *Raoultella*, *Buttiauxella*, *Hafnia*

Co se týče dalších rodů, které se podařilo izolovat ze vzorků chlazených kuřat, najít k nim studie zabývající se jejich rezistencí bylo složitější. To je pravděpodobně způsobeno tím, že jde o méně běžné patogeny.

Konkrétně *Leclercia* je velmi zřídka uváděný lidský patogen a literatura zabývající se jeho dopady je poměrně omezená. Nicméně například Choudhary a kol. uvádí, že sledované izoláty byly rezistentní k aminoglykosidům a fluorochinolonům a v menší míře také k cefalosporinům. Klinický význam rodu *Leclercia* je také vzhledem k jeho multirezistenci nejistý a mohl by působit jako skrytý zdroj ohrožení veřejného zdraví (Choudhary et al., 2017). Z jediného izolátu získaného pro tuto práci se sice nepodařilo potvrdit rezistenci k aminoglykosidům či fluorochinolonům, pravidlem se ale zdá být rezistence minimálně k některému antimikrobiku z řady cefalosporinů. V tomto případě jde o cefuroxim, k němuž byla *Leclercia* rezistentní a dále cefazolin, kdy byl izolát intermediární. Z dalších antibiotik se prokázala rezistence už jen ke klindamycinu. Bylo by vhodné tedy zaměřit výzkum z řad čeledi *Enterobacteriaceae* konkrétně na rod *Leclercia* pro získání více přesnějších výsledků ohledně nebezpečí rezistence jak k aminoglykosidům a fluorochinolonům, tak k dalším skupinám antibiotik.

K cefalosporinům a také penicilinům vykazoval rezistenci i rod *Kluyvera*, z cefalosporinů nebyl citlivý k cefuroximu, cefazolinu a cefoxitinu, z penicilinů šlo o ampicilin a ampicilin/sulbactam. Na problematiku ESBL a enzymy typu CTX-M u rodů jako *Kluyvera* či *Klebsiella* upozorňuje i D'Andrea a kol., kteří se zabývají vznikem a šířením vysoce rizikových multirezistentních klonů (D'Andrea et al., 2013). Rezistenci k penicilinům

a cefalosporinům rodu *Kluyvera* zmiňuje dále i Mutoh a kol. ve studii z roku 2019 (Mutoh et al., 2019). Rezistenci k ampicilinu potvrzuje pomocí diskové difúzní metody mimo jiné i Farmer (Farmer, 2015). Pár studií upozorňuje také na rezistenci k fluorochinolonům, například Huang a kol., kteří sledovali tento rod izolovaný z kuřecích jater, potvrdili přítomnost izolátů rezistentních k ciprofloxacinu (Huang et al., 2011).

Kmeny rodu *Klebsiella* byly nejvíce rezistentní ze skupiny penicilinů k ampicilinu a amoxicilinu (100 %), ze skupiny cefalosporinů k cefuroximu, cefazolinu a cefoxitinu (100 %), z dalších antibiotik nebyly citlivé k tetracyklinu a doxycyklinu. Izoláty rodu *Klebsiella* získaných z kuřecího masa se zabývají i Projahn a kol., kteří potvrzují produkci ESBL a rezistenci k penicilinům a cefalosporinům (Projahn et al., 2019). Na kuřecí maso se v souvislosti s *Klebsiella* spp. mnoho studií nezaměřuje, rezistenci k cefuroximu a dalším cefalosporinům ale potvrzuje i Schumacher, a to u izolátů získaných z infikovaných pacientů (Schumacher et al., 2009).

U kmenů rodu *Raoultella* byla pozorována 100 % rezistence k ampicilinu, amoxicilinu, cefuroximu, cefazolinu, cefoxitinu a klindamycinu, opakuje se tedy podobný/stejný vzorec jako u již zmíněných rodů. K podobným výsledkům dospěli i Hajjar a kol., kdy rezistenci k ampicilinu a cefalosporinům vykazovalo až 69-100 % izolátů z infikovaných jedinců (Hajjar et al., 2020). Podle Sêkowske a kol. z testovaných kmenů rodu *Raoultella* produkovalo cca 13 % ESBL a většina kmenů byla rezistentní na imipenem (99 %), gentamycin (93,3 %) a ciprofloxacín (92,4 %) (Sêkowska, 2020).

Podle informací získaných z poměrně malého množství studií zabývajících se touto bakterií v souvislosti s rezistencí a jejími živočišnými zdroji, by bylo vhodným doporučením tuto bakterii nadále sledovat a zaměřit se na možné zdroje šíření rezistence k antibiotikům. I z jediného izolátu, který byl získán z kuřecího masa použitého v tomto výzkumu, byla pozorována rezistence hned k několika antibiotikům a vzhledem k problémům, které *Raoultella* může způsobovat, by určitě bylo na místě se tomuto mikroorganismu věnovat podrobněji.

Nejméně účinnými antibiotiky vůči izolátům rodu *Buttiauxella* se ukázaly být všechny použité peniciliny, tedy ampicilin, ampicilin/sulbactam (100 % rezistence) a amoxicilin (75 %), z cefalosporinů cefuroxim, cefazolin (100 % rezistence), cefoxitin (75 %), ceftazidim a ceftriaxon (25 %). 100 % rezistentní byly kmeny i ke klindamycinu a 25 % kmenů také k tetracyklinu. Je tak poměrně překvapivé, že k tomuto rodu je publikováno opravdu malé

množství studií zabývajících se jeho živočišnými zdroji a hrozícím nebezpečím z hlediska možností léčby infekcí. Rezistenci k alespoň jednomu ze sledovaných antibiotik udávají i Lauková a kol., kteří zkoumali vzorky fekálií získaných od zvěře, kde mezi neúčinnými antibiotiky byl např. klindamycin, amikacin a další (Lauková et al., 2018).

Posledním rodem, který se podařilo izolovat, je *Hafnia*. Všechny kmeny byly rezistentní k ampicilinu, ampicilin/sulbactamu a amoxicilinu, dále k cefuroximu, cefazolinu a ceftriaxonu. Mimo zmíněná antibiotika bylo 100 % izolátů rezistentních k oběma sledovaným tetracyklinovým antibiotikům, tedy k tetracyklinu i doxycyklinu a také ke klindamycinu (linkosamidy).

6.2.8 Multirezistence

Multirezistence je definována jako rezistence ke 4 a více antibiotikům a v této práci bylo zjištěno, že všechny izolované kmeny byly z celkem 20 sledovaných antibiotik rezistentní minimálně na 5 z nich, většinou ale na více. Např. rody *Escherichia*, *Serratia* a *Yesinia* byly rezistentní k 10 antibiotikům, což je 50 % z celkového množství použitých antimikrobiálních látek. Multirezistenci tak vykazovalo 39 z 39 izolátů, tedy 100 %. Tu potvrdili např. u rodů *Escherichia* (66,99 % rezistentních izolátů) a *Klebsiella* (63,33 %) izolovaných z komerčně chovaných brojlerů také Kamboh a kol. (Kamboh et al., 2018). Potz a kol. poukazuje na problematiku rezistence také u rodu *Salmonella*, kde ze získaných izolátů z kuřat vykazovalo multirezistenci přes 69 % (Poz et al., 2006). Qin a kolektiv sledovali izoláty rodu *Citrobacter* a potvrdili, že jsou producenty ESBL a 100 % izolátů bylo multirezistentních (Qin et al., 2021). Multirezistenci rodu *Citrobacter* se zabývali také Pepperell a kol., kteří uvedli, že tyto bakterie jsou často rezistentní vůči cefalosporinům v důsledku nadměrné exprese jejich chromozomální beta-laktamázy. (Pepperell et al., 2002). Multirezistentní kmeny nesoucí AmpC β -laktamázu, širokospektrální β -laktamázu a další mechanismy rezistence jsou spojeny s vyšší mírou úmrtnosti v nemocnicích (Liu et al., 2018).

Dále např. multirezistenci izolátů *Raoultella ornithinolytica* získaných ze zvířat z farem potvrzuje také studie Pasové a kol. (2021). Uvádí, že zatím není známo, zda zvířata z farmy mohou působit jako rezervoáry pro multirezistentní kmeny *Raoultella ornithinolytica*, nicméně tento problém se ukazuje být hrozbou (Pas a kol., 2021). Multirezistenci u rodu *Raoultella* zmiňují i Hajjar a kol. (Hajjar et al., 2020). Toto je nicméně jen pár příkladů a studií na toto téma bylo provedeno opravdu velké množství. Je tedy zjevné, že napříč čeledí

Enterobacteriaceae jsou vědci s tímto problémem obeznámeni a riziko rezistence a multirezistence je celosvětovým problémem.

6.2.9 *Aeromonas* (čeleď *Aeromonadaceae*)

Při izolaci a následné identifikaci bakteriálních kmenů izolovaných z VRBL agarů bylo zjištěno poměrně velké zastoupení aeromonád (*Aeromonas caviae*, *A. hydrophila* i *A. sobria*). Je známo, že rod *Aeromonas* způsobuje u lidí různé nemoci a jsou spojeny se střevními a extraintestinálními infekcemi. Tento rod má rostoucí význam jako nově vznikající patogen a je nesporné, že kmeny *Aeromonas* mohou produkovat mnoho různých faktorů virulence, jako jsou enterotoxiny, hemolyziny nebo cytotoxiny a velkou roli u nich hraje i antibiotická rezistence (Altwegg et al., 2008).

V přenosu této bakterie na člověka hrají důležitou roli ryby a kuřata a ve studii Praveena a kol. (2016) právě zoonotický význam rodu *Aeromonas* zdůrazňují. Byla zde zjištěna vysoká prevalence kmenů produkujících toxiny mezi izoláty tohoto rodu (Praveen et al., 2016). Drůbeží maso a jeho produkty jsou široce konzumovány lidmi po celém světě a infekce bakteriemi rodu *Aeromonas* u drůbeže byly hlášeny v různých částech světa s ničivými dopady. Také studie, kterou u aeromonád izolovaných z kuřat pomocí diskové difúzní metody provedl Igbinosa, uvádí vysokou rezistenci k různým antibiotikům napříč jejich skupinami (Igbinosa, 2014).

Vzhledem k výsledkům různých studií a výsledkům, které byly získány v této diplomové práci, by vhodným doporučením bylo mimo enterobakterií sledovat také aeromonády, které v kuřecím mase mají opravdu velké zastoupení a jedná se o rizikové patogeny s hrozbou šíření antibiotické rezistence.

ZÁVĚR

Antibiotická rezistence je z hlediska účinnosti antibiotik velkým problémem. V důsledku infekcí způsobených bakteriemi odolnými k antimikrobiálním látkám zemřou v Evropě každoročně desítky tisíc lidí. Cílem práce bylo provést izolaci a identifikaci kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* ze vzorků masa chlazených kuřat zakoupených v maloobchodní síti Zlínského kraje a stanovit rezistenci k antibiotikům diskovou difúzní metodou. Takto bylo získáno celkem 39 kmenů patřících do různých rodů sledované čeledi (šlo o rody *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Kluyvera*, *Leclercia*, *Raoultella*, *Salmonella*, *Serratia* a *Yersinia*). Vyšetřením vzorků v této práci byla zjištěna vysoká prevalence bakterií sledované čeledi rezistentních k antimikrobiálním látkám. Rezistentní k alespoň jednomu antibiotiku byly všechny izoláty. Nejvíce rezistentních kmenů bylo vůči cefalosporinům a penicilinům. Všechny izoláty byly rezistentní také ke klindamycinu ze skupiny linkosamidů. Rizikem je také rezistence k antibiotiku poslední instance – kolistinu, a to napříč celou čeledí. Rezistence ke kolistinu u druhů *Escherichia coli* i dalších rodů z čeledi *Enterobacteriaceae* se stala celosvětově pravidelně sledovanou.

Vzhledem ke snaze v České republice i ve světě použití antibiotik regulovat, by se dala očekávat nižší spotřeba antibiotik, a tedy klesající, nebo alespoň nezvyšující se trend rezistence. Výsledky diplomové práce ale ukazují, že tato problematika je stále aktuální.

Ze získaných kmenů čeledi *Enterobacteriaceae* byly všechny rezistentní k cefuroximu a cefazolinu (cefalosporiny), dále 97,4 % k ampicilinu (peniciliny) a klindamycinu (linkosamidy). Většina kmenů byla rezistentní i k dalším penicilinům (ampicilin/sulbactam 92,3 %, amoxicilin 84,6 %). Dále vykazovalo 61,5 % izolátů rezistenci k cefoxitinu, 28,2 % k ceftriaxonu, 20,5 % k tetracyklinu, 15,4 % ke kolistinu, 12,8 % k sulfametoxazol trimetoprimu a 10,3 % k doxycyklinu. Menší procento (5,1 %) bylo rezistentní i k ciprofloxacinu, ceftazidimu a azitromycinu.

Závěrem lze konstatovat, že dosažené výsledky dokazují, že fenomén antibiotické rezistence se u izolátů z kuřecího masa vyskytuje velmi významným podílem a může tak přispívat k šíření rezistence, což je celosvětový problém napříč skupinami antibiotik.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

AHMED, Fahad. Raw meat based diet (RMBD) for household pets as potential door opener to parasitic load of domestic and urban environment. Revival of understated zoonotic hazards? A review. *One Health* [online]. 2021, **13** [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2021.100327>

AKSU, Filiz, Sema SANDIKÇI, Ghasan ISSA, Aksem AKSOY, Harun AKSU a ALTUNATMAZ. Prevalence of Cronobacter spp. in various foodstuffs and identification by multiplex PCR. *Food Science and Technology*. 2019, **39**(3), 729-734. ISSN ISSN 1678-457X. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1590/fst.06818>

ALLOCATI, Nerino, Michele MASULLI, Mikhail ALEXEYEV a Carmine DI ILIO. Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2013, **10**(12), 6235-5254 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:[10.3390/ijerph10126235](https://doi.org/10.3390/ijerph10126235)

ALLY, Antony C., Silvester RESHMA, P.S. DIVYA, et al. Faecal contamination and prevalence of pathogenic E. coli in shellfish growing areas along south-west coast of India. *Regional Studies in Marine Science* [online]. 2021, **44**(5) [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.rsma.2021.101774>

ALTWEGG, Martin, Heinrich K. GEISS a Bishara J. FREIJ. Aeromonas As A Human Pathogen. *Critical Reviews in Microbiology* [online]. 2008, **16**(4), 253-286 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3109/10408418909105478>

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 [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1080/10643389.2019.1692611>

ANDERSON, Leigh Ann, PharmDr. Antibiotics Guide. *Drugs.com* [online]. 2021 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.drugs.com/article/antibiotics.html>

ANJUM, Muna. Screening methods for the detection of antimicrobial resistance genes present in bacterial isolates and the microbiota. *Future microbiology* [online]. 2015, **10**(3) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://www.futuremedicine.com/doi/10.2217/fmb.15.2>

Antibiotic Classifications. *Biology LibreTexts* [online]. Boundless.com, 2020 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z:

[https://bio.libretexts.org/Courses/Northwest_University/MKBN211%3A_Introductory_Microbiology_\(Bezuidenhout\)/07%3A_Antimicrobial_Drugs/7.01%3A_Overview_of_Antimicrobial_Therapy/7.1.05%3A_Antibiotic_Classifications](https://bio.libretexts.org/Courses/Northwest_University/MKBN211%3A_Introductory_Microbiology_(Bezuidenhout)/07%3A_Antimicrobial_Drugs/7.01%3A_Overview_of_Antimicrobial_Therapy/7.1.05%3A_Antibiotic_Classifications)

Antimikrobiální rezistence. *Bezpečnost potravin, EFSA* [online]. 2014 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z:

<https://www.bezpecnostpotravin.cz/UserFiles/Infografiky/Antimikrobialni%20rezistence.pdf>

ARENZ, Stefan a Daniel WILSON. Bacterial Protein Synthesis as a Target for Antibiotic Inhibition. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* [online]. 2016, 6(9) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:10.1101/cshperspect.a025361

ARMER, J.J. Kluyvera. *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* [online]. 2015 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/9781118960608.gbm01151>

BACHMANN, Timo et al. Antibiotic-Resistant Enterobacteriaceae in Wastewater of Abattoirs. *Antibiotics* [online]. 2021, 10(5) [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10050568

BAILEY, Regina. Cell Membrane Function and Structure. *ThoughtCo.* [online]. 2019 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://www.thoughtco.com/cell-membrane-373364>

BAKHTIARY, Farzaneh et al. Evaluation of bacterial contamination sources in meat production line. *Journal of Food Quality* [online]. 2016, 39, 750-756 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:10.1111/jfq.12243

BARANZONI, Gian Marco et al. Characterization of Shiga Toxin Subtypes and Virulence Genes in Porcine Shiga Toxin-Producing Escherichia coli. *Frontiers in microbiology* vol. 7 574. 21 Apr. 2016, doi:10.3389/fmicb.2016.00574

BARTOŠKOVÁ, Lenka, PhD. a Ing. Alena HANULÍKOVÁ. Mikrobiální původci alimentárních onemocnění. *Státní zemědělská a potravinářská inspekce* [online]. 2014 [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: <https://www.szpi.gov.cz/clanek/mikrobialni-puvodci-alimentarnich-onemocneni.aspx?q=Y2hudW09NQ%3D%3D>

- BAYLIS, C.L. *Food Spoilage Microorganisms: 22 - Enterobacteriaceae* [online]. 1. Woodhead Publishing Limited, 2006 [cit. 2022-05-01]. ISBN 978-1-85573-966-6. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781855739666500225>
- BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. Praha: Marvil, 1996. ISBN 80-238-0297-6.
- BELL, Jeffrey A., Jason D. WECKSTEIN, Alan FECCHIO a Vasyl V. TKACH. A new real-time PCR protocol for detection of avian haemosporidians. *Parasites & Vectors* [online]. 2015, **8**(383) [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s13071-015-0993-0>
- BEN, Yujie. Human health risk assessment of antibiotic resistance associated with antibiotic residues in the environment: A review. *Environmental Research* [online]. 2019, **169**, 483-493 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.11.040>
- BENEŠ, Jiří. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. 1. Grada, 2018, s. 308-311. ISBN 978-80-271-0636-3.
- BERENDONK, T. et al., Tackling antibiotic resistance: the environmental framework. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2015, (13), 310-317 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro3439>
- BEVERIDGE, TJ. Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of Bacteriology* [online]. 1999, **181**(16), 4725-4733 [cit. 2022-04-23]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:[10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999](https://doi.org/10.1128/JB.181.16.4725-4733.1999)
- BIBBAL, Delphine et al. Mixing of Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* in a wastewater treatment plant receiving city and slaughterhouse wastewater. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* [online]. 2018, **221**(2), 355-363 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.ijheh.2017.12.009](https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.12.009)
- BISWAS, Silpak. Colistin: An Update on the Antibiotic of the 21st Century. *Expert Review of Anti-Infective Therapy* [online]. 2012, **10**(8), 917-934 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: https://www.medscape.com/viewarticle/772588_6
- BRAZAS, M. D., HANCOCK, R. E. W. Using microarray gene signatures to elucidate
- BURSOVÁ, Šárka, Marta DUŠKOVÁ, Lenka NECIDOVÁ, Renáta KARPÍŠKOVÁ a Petra MYŠKOVÁ. *Mikrobiologické laboratorní metody*. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2014. ISBN 978-80-7305-676-6.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* [online]. 2004, **94**(3), 223-253 [cit. 2022-04-25]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>

COLLIGNON, Peter. Antibiotic resistance. *The Medical Journal of Australia* [online]. 2002, **177**(6), 325-329 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.5694/j.1326-5377.2002.tb04794.x>

COSGROVE, Sara E., Keith S. KAYE a George M. ELIOPOULOUS. Health and Economic Outcomes of the Emergence of Third-Generation Cephalosporin Resistance in Enterobacter Species. *Internal Medicine* [online]. 2002, **162**(2), 185-190 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:[10.1001/archinte.162.2.185](https://doi.org/10.1001/archinte.162.2.185)

Current Macrolide Antibiotics and Their Mechanism of Action. CAPELO-MARTÍNEZ, José-Luis a Gilberto IGREJAS. *Antibiotic Drug Resistance*. 1. John Wiley, 2020, s. 97-104. ISBN 1119282527.

DALE, Adam P. a Neil WOODFORD. Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): Disease, carriage and clones. *Journal* [online]. 2015, **71**(6), 615-626 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2015.09.009>

D'ANDREA, Marco Maria, Fabio ARENA, Lucia PALLECCHI, Gian Maria ROSSOLINI. CTX-M-type β -lactamases: A successful story of antibiotic resistance. *International Journal of Medical Microbiology: Special Issue Antibiotic Resistance* [online]. 2013, **303**(6-7), 305-317 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2013.02.008>

DAVIN-REGLI A, Lavigne JP, Pagès JM. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. *Clin Microbiol Rev*. 2019 Jul 17;**32**(4):e00002-19. doi: 10.1128/CMR.00002-19. PMID: 31315895; PMCID: PMC6750132.

DORAN, Terence. The Role of *Citrobacter* in Clinical Disease of Children: Review. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 1999, **28**(2), 384-394 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1086/515106>

DOSTÁL, Vojtěch. Topoizomeráza. *Wikipedie: Otevřená encyklopedie* [online]. 2009 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Topoizomer%C3%A1za>

DVOŘÁK, Marek. Salmonelóza (salmonela) – příznaky, přenos a léčba. *Euc.cz* [online]. 2021 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: <https://euc.cz/clanky-a-novinky/clanky/salmonelozasalmonela-priznaky-prenos-a-lecba/>

EFSA, BIOHAZ Panel. Whole genome sequencing and metagenomics for outbreak investigation, source attribution and risk assessment of food-borne microorganisms. *EFSA JOURNAL* [online]. 2019, 17(2) [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2019.5898>

EUCAST In: [online]. [cit. 2022-05-10]. Dostupné z: http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/

ESEMU, Seraphine Nkie. Multidrug-Resistant Bacteria and Enterobacteriaceae Count in Abattoir Wastes and Its Receiving Waters in Limbe Municipality, Cameroon: Public Health Implications. *BioMed Research International* [online]. 2022, 11 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1155/2022/9977371>

FALAGAS, Matthew a Sofia KASIAKOU. Colistin: the revival of polymyxins for the management of multidrug-resistant gram-negative bacterial infections. *Clinical Infectious Diseases* [online]. 2005, 40(9), 1333-1341 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1086/429323

FELMAN, Adam, CARTER, Alan, ed. What to know about antibiotics. *Medical News Today* [online]. 2019 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/10278>

FERRARESSO, Jacopo, Ilias APOSTOLAKOS, Luca FASOLATO a Alessandra PICCIRILLO. Third-generation cephalosporin (3GC) resistance and its association with Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC). Focus on broiler carcasses. *Food Microbiology* [online]. 2022, 103(5) [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103936>

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 [cit. 2022-5-08]. ISSN 2297-1769. Dostupné z: doi:10.3389/fvets.2020.622495

GALHANO, Beatriz et al., Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. 2021, 9(5), 923 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3390/microorganisms9050923>GAST

Richard K. a Robert E. PORTER. *Diseases of Poultry* [online]. 14. John Wiley, 2019, s. 717-753 [cit. 2022-04-20]. ISBN 9781119371168. Dostupné z: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/9781119371199.ch16?saml_referrer

GAZAL, Luís Eduardo de Souza et al., Detection of ESBL/AmpC-Producing and Fosfomycin-Resistant *Escherichia coli* From Different Sources in Poultry Production in Southern Brazil. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2021, (11) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2020.604544

GHEYAS, Almas A. a David W. BURT. Microarray resources for genetic and genomic studies in chicken: A review. *Genesis: The Journal of Genetics and Development* [online]. 2013, **51**(5), 337-356 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/dvg.22387>

GOEDECKE, Wolfgang. Topoisomerases. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference* [online]. 1. Elsevier, 2008, s. 1-2 [cit. 2022-05-01]. ISBN 978-0-08-055232-3. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780080552323606099>

GRIMONT, Francine a Patrick GRIMONT. The Genus *Enterobacter*. *Prokaryotes* [online]. 2006, (6), 197-214 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:10.1007/0-387-30746-x_9

GUALERZI, Claudio, Letizia BRANDI, Attilio FABBRETTI a Cynthia PON. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. 1. Weinheim, Germany: Wiley-VCH, 2013. ISBN 9783527333059.

GUENTZEL, M. Neal. *Chapter 26: Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Citrobacter, and Proteus*. 1. 1996. ISBN 10: 0-9631172-1-1

HACKER, Jörg a Gabriele BLUM-OEHLER. In appreciation of Theodor Escherich. *Nature Reviews Microbiology* [online]. 2007, **5**(902) [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nrmicro1810>

HAJJAR, Roy, Georges AMBARAGHASSI, Herawaty SEBAJANG, Frank SCHWENTER a Shih-Hann SU. Raoultella ornithinolytica: Emergence and Resistance. *Infection and drug resistance* [online]. 2020, **13**, 1091-1104 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.2147/IDR.S191387

HEDAYATIANFARD, Keshvad, Mostafa AKHLAGHI a Hassan SHARIFIYAZDI. Detection of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from fish farms using polymerase chain reaction. *Veterinary Research Forum* [online]. 2014, **5**(4), 269-275 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4299992/>

HEIR, Even, et al. Prevalence and characterization of integrons in blood culture Enterobacteriaceae and gastrointestinal Escherichia coli in Norway and reporting of a novel class 1 integron-located lincosamide resistance gene. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* [online]. 2004, **3**(12) [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/1476-0711-3-12>

HERA, Alfred, KOUTECKÁ, L., DORN, D., PSOTA, P. Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně v ČR v letech 2002-2004. *Věstník Ústavu pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv* **3**, 2005, 48-49 [cit. 2022-04-26].

HUANG, Si-Yang. Correlation of fluoroquinolone resistance with expression of qnrA gene in *Kluyvera* spp. *Foodborne pathogens and disease* [online]. 2011, **8**(9), 1039-1044 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:10.1089/fpd.2011.0839

HUOVINEN, Pentti, Lars SUNDSTRÖM, Göte SWEDBERG a Ola SKÖLD. Trimethoprim and Sulfonamide Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1995, **39**(2), 279-289 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: https://www.researchgate.net/publication/15471671_Trimethoprim_and_Sulfonamide_Resistance

CHEE-SANFORD, J.C. et al., Occurrence and Diversity of Tetracycline Resistance Genes in Lagoons and Groundwater Underlying Two Swine Production Facilities. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2001, **67**(4), 1494-1502 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1128/AEM.67.4.1494-1502.2001>

CHOUDHARY, M. et al., Isolation and characterization of multidrug-resistant *Leclercia* species from animal clinical case. *Letters in Applied Microbiology* [online]. 2018, **66**(1), 44-48 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/lam.12811>

IGBINOSA, Isoken. Antibigram profiling and pathogenic status of *Aeromonas* species recovered from Chicken. *Saudi journal of biological sciences* [online]. 2014, **21**(5), 481-485 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.sjbs.2014.06.003

JANG, J. Environmental Escherichia coli: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology* [online]. 2017, **123**(3), 570-581 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/jam.13468>

KAMBOH, Asghar, Muhammad SHOAIB, Shahid ABRO, Muhammad KHAN, Kanwar MALHI a Shenqing YU. Antimicrobial Resistance in Enterobacteriaceae Isolated from Liver

of Commercial Broilers and Backyard Chickens. *Journal of Applied Poultry Research* [online]. 2018, **27**(4), 627-634 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3382/japr/pfy045>

KARKMAN, Antti, Thi Thuy DO, Fiona WALSH a Marko VIRTÁ. Antibiotic-Resistance Genes in Waste Water. *Trends in Microbiology* [online]. 2018, **26**(3), 220-228 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:10.1016/j.tim.2017.09.005

KMEŤ, Vladimír a Marta KMEŤOVÁ. High level of quinolone resistance in *Escherichia coli* from healthy chicken broilers. *Folia Microbiologica*. Praha, 2010, **55**(1), 79-82. Dostupné z: doi:10.1007/s12223-010-0013-x

KNOTHE, H., SEELIGER H., DÖLL W., WIEDERMANN B. *Enterobacteriaceae* [*Enterobacteriaceae*]. Zentralbl Bakteriolog Orig. 1969, **211**(1):110-25. German. PMID: 5386241.

KOLÁŘ, Milan, Dominik REJMAN a Jan BARDOŇ. *Zásady antibiotické léčby*. 1. Olomouc: UP Olomouc, 2020, s. 67. ISBN 978-80-244-5740-6.

KOLÁŘ, Milan, Karel URBÁNEK, Vojtěch HANULÍK a Vladimíra VOJTOVÁ. Vliv antibiotické léčby na vývoj bakteriální rezistence. *Interní medicína pro praxi*. 2011, **8**(11), 463-465.

KOLÁŘ, Milan. Nebezpečné multirezistentní bakterie „superbugs“ v současné medicíně. *Interní medicína pro praxi*. 2019, **21**(3), 142-148.

KOMPANÍKOVÁ, Jana, Elena NOVÁKOVÁ a Martina NEUSCHLOVÁ. Mikrob Learning - Mikrobiológia nielen pre medikov. *MEFANET: Multimediálna podpora výučby klinických a zdravotníckych disciplín: Portál Jesseniovej lekárskej fakulty Univerzity Komenského* [online]. Martin, 2014 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://portal.jfmed.uniba.sk/clanky.php?aid=248>

KUMAR, S., V.R. TRIPATHI a S.K. GARG. Antibiotic resistance and genetic diversity in water-borne *Enterobacteriaceae* isolates from recreational and drinking water sources. *International journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2013, **10**, 789-798 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:10.1007/s13762-012-0126-7

KUMAR, Shailendra. Antibiotic resistance and genetic diversity in water-borne *Enterobacteriaceae* isolates from recreational and drinking water sources. *International*

- Journal of Environmental Science and Technology* [online]. 2012, **10**(4) [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:10.1007/s13762-012-0126-7
- KUNHIKANNAN, Shalini. Environmental hotspots for antibiotic resistance genes. *Microbiology Open* [online]. 2021, **10**(3) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1002/mbo3.1197
- LEI, Chen a Suresh KUMAR. Yersinia pestis antibiotic resistance: a systematic review. *Osong Public Health and Research Perspectives* [online]. 2022, **13**(1), 24-36 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.24171/j.phrp.2021.0288
- LI, Weiyang a Guosheng ZHANG. Detection and various environmental factors of antibiotic resistance gene horizontal transfer. *Environmental Research* [online]. 2022, **212** [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113267
- LIOU, Bo-Huang et al. A multicenter surveillance of antimicrobial resistance in *Serratia marcescens* in Taiwan. *Journal of microbiology, immunology, and infection* [online]. 2014, **47**(5), 387-393 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmii.2013.04.003
- LIU, Li-Hsiang. Citrobacter freundii bacteremia: Risk factors of mortality and prevalence of resistance genes. *Journal of microbiology, immunology, and infection* [online]. 2018, **51**(4), 565-572 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: doi:10.1016/j.jmii.2016.08.016
- LIU, Yi. Microplastics are a hotspot for antibiotic resistance genes: Progress and perspective. *Science of The Total Environment* [online]. 2021, **773** [cit. 2022-05-08]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145643
- LUBY, Elizabeth, A. Mark IBEKWE, Julie ZILLES a Amy PRUDEN. Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges. *Journal of Environmental Quality: Special Section: Antibiotics in Agroecosystem: State of the Science*. 2016, **45**(2), 441-453. Dostupné z: doi:doi:10.2134/jeq2015.07.0367
- MANGES, A.R. Escherichia coli and urinary tract infections: the role of poultry-meat. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. Elsevier, 2016 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2015.11.010.
- MARZANO, A.V., M. MERCOGLIANO, A. BORGHI, M. FACCHETTI a R. CAPUTO. Cutaneous infection caused by Salmonella typhi. *Journal of The European Academy of*

Dermatology and Veneraeology [online]. 2003, **17**(5), 575-577 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1046/j.1468-3083.2003.00797.x>

MASULLI M. Escherichia coli in Europe: an overview. *Int J Environ Res Public Health*. 2013 Nov 25; **10**(12):6235-54. doi: 10.3390/ijerph10126235. PMID: 24287850; PMCID: PMC3881111.

METRI, Basavaraj, P. JYOTHI a Basavaraj PEERAPUR. Antibiotic resistance in *Citrobacter* spp. isolated from urinary tract infection. *Urology Annals* [online]. 2013, **5**(4), 312-313 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:10.4103/0974-7796.120295

MEYER, E., C. LUNKE, M. KIST, F. SCHWAB a U. FRANK. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from food, animals and humans in Germany. *Infection* [online]. 2008, **36**(1), 59-61 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:10.1007/s15010-007-7113-9

MEYER, F. et al. The metagenomics RAST server – a public resource for the automatic phylogenetic and functional analysis of metagenomes. *BMC Bioinformatics* [online]. 2008, **9**(386) [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-386>

MOHAMED, S., KHAIRY, R.M.M. & ABDELRAHIM, S.S. Prevalence and molecular characteristics of ESBL and AmpC β -lactamase producing *Enterobacteriaceae* strains isolated from UTIs in Egypt. *Antimicrob Resist Infect Control* **9**, 198 (2020). <https://doi.org/10.1186/s13756-020-00856-w>

MUTOH, Yoshikazu et al. The first case of third-generation cephalosporins resistant *Kluyvera ascorbata* biliary tract infection in Japan: A case report and review of the literature. *IDCases* [online]. 2019, **15** [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.idcr.2019.e00498>

NAZZARO, Filomena, Florinda FRATIANNI, Laura DE MARTINO, Raffaele COPPOLA a Vincenzo DE FEO. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. *Pharmaceuticals* [online]. 2013, **6**(12), 1451-1474 [cit. 2022-04-25]. ISSN 1424-8247. Dostupné z: doi:10.3390/ph6121451. ISSN 1424-8247

NOLI, Chiara a D. BOOTHE. Macrolides and lincosamides. *Veterinary Dermatology* [online]. 1999, **10**(3), 217-223 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1046/j.1365-3164.1999.00176.x>

NÜESCH-INDERBINEN, Magdalena, Andrea TREIER, Katrin ZURFLUH a Roger STEPHAN. Raw meat-based diets for companion animals: a potential source of transmission

- of pathogenic and antimicrobial-resistant Enterobacteriaceae. *Royal Society Open Science* [online]. 2019, **6**(10) [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1098/rsos.191170>
- PARTRIDGE, Sally. Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2018, **31**(4) [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:[10.1128/CMR.00088-17](https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17)
- PAS, Mathilde et al. Case Report: Multidrug Resistant Raoultella ornithinolytica in a Septicemic Calf. *Frontiers in Veterinary Science* [online]. 2021 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: doi:[10.3389/fvets.2021.631716](https://doi.org/10.3389/fvets.2021.631716)
- PATERSON, David. Resistance in gram-negative bacteria: enterobacteriaceae. *The American journal of medicine* [online]. 2006, **119**(1), 62-70 [cit. 2022-04-27]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.amjmed.2006.03.013](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2006.03.013)
- PECHÈRE, J.C. [Lincosamides]. *Pathologie-biologie* [online]. 1986, **34**(2), 119-128 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3517777/>
- PEPPERELL, C., J.V. KUS, M.A. GARDAM, A. HUMAR a L.L. BURROWS. Low-Virulence Citrobacter Species Encode Resistance to Multiple Antimicrobials. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 2002, **46**(11) [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1128/AAC.46.11.3555-3560.2002>
- PETERSON, Elizabeth a Parjit KAUR. *Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Relationships Between Resistance Determinants of Antibiotic Producers, Environmental Bacteria, and Clinical Pathogens* [online]. 2018 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02928>
- PISHTIWAN, Ahmad Hamad a Khalil Mustafa KHADIJA. Prevalence of blaTEM, blaSHV, and blaCTX-M Genes among ESBL-Producing Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli Isolated from Thalassemia Patients in Erbil, Iraq. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* [online]. 2019, **11**(1) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:[10.4084/MJHID.2019.041](https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.041)
- POKLUDOVÁ, Lucie et al., Spotřeba antimikrobik ve veterinární medicíně v ČR: Detailní komentované srovnání spotřeb antimikrobik 2010-2017, *Věstník ÚSKVBL* 2019, 1 – 39 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: www.uskvbl.cz
- POTZ, Nicola, Russell HOPE, Marina WARNER a Alan JOHNSON. Prevalence and mechanisms of cephalosporin resistance in Enterobacteriaceae in London and South-East

England. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2006, **58**(2), 320-326 [cit. 2022-04-26]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1093/jac/dkl217>

POWELL, Dwight a Mario MACRON. Etiologic Agents of Infectious Diseases: Serratia Species. *Principles and Practice of Pediatric Infectious Disease (Third Edition)* [online]. 2008, 811-812 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/B978-0-7020-3468-8.50151-6>

PRAVEEN, Praveen Kumar et al., Incidence of Aeromonas spp. infection in fish and chicken meat and its related public health hazards: A review. *Veterinary world* [online]. 2016, **9**(1), 6-11 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: doi:[10.14202/vetworld.2016.6-11](https://doi.org/10.14202/vetworld.2016.6-11)

PROJAHN, Michaela et al., Contamination of chicken meat with extended-spectrum beta-lactamase producing-Klebsiella pneumoniae and Escherichia coli during scalding and defeathering of broiler carcasses. *Food Microbiology* [online]. 2019, (77), 185-191 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:[10.1016/j.fm.2018.09.010](https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.09.010)

QADI, Mohammad a Safaa ALHATO. Colistin Resistance among Enterobacteriaceae Isolated from Clinical Samples in Gaza Strip. *The Canadian Journal of Infectious diseases & medical microbiology* [online]. 2021 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:[10.1155/2021/6634684](https://doi.org/10.1155/2021/6634684)

QIN, Jie. Comparative genomic characterization of multidrug-resistant Citrobacter spp. strains in Fennec fox imported to China. *Gut Pathogens* [online]. 2021, (59) [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1186/s13099-021-00458-w>

RÅDSTRÖM, P., G. SWEDBERG a O. SKÖLD. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. 1991, **35**(9), 1840-1848 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:[10.1128/AAC.35.9.1840](https://doi.org/10.1128/AAC.35.9.1840)

RASMUSSEN, Henrik Berg. Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of PCR-Amplified Fragments (PCR-RFLP) and Gel Electrophoresis - Valuable Tool for Genotyping and Genetic Fingerprinting. *Gel Electrophoresis - Principles and Basics* [online]. 1. IntTech, 2012, s. 315-334 [cit. 2022-04-20]. ISBN 978-953-51-0458-2. Dostupné z: <https://www.intechopen.com/chapters/35104>

RHOUMA, Mohamed, Francis BEAUDRY a Ann LETELLIER. Resistance to colistin: what is the fate for this antibiotic in pig production?. *International Journal of antimicrobial agents*

[online]. 2016, **48(2)**, 119-126 [cit. 2022-04-29]. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2016.04.008

ROBERTS, Marily C. Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* [online]. 1996, **19(1)**, 1-24 [cit. 2022-05-02]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1996.tb00251.x

ROGERS, Kara. Enterobacter. *Encyclopedia Britannica* [online]. 2022 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/Enterobacter> s. 1245-1252. ISSN 1359-6446.

SANDERS, W. Eugene a Christine C. SANDERS. Enterobacter spp.: pathogens poised to flourish at the turn of the century. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 1997, **10(2)**, 220-241 [cit. 2022-04-14]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.220

SAUER, P. Molekulárně biologické metody v diagnostice ESBL, *Sborník abstrakt* (10. pracovního setkání „Antibiotické politiky“), 1. vyd., Soláň: Agentura B/P/P, 2006, ISBN 80-239-7288-X, 13-14 s.

SÊKOWSKA, Alicja, Tomasz BOGIEL, Marcin WOŹNIAK a Eugenia GOSPODAREK-KOMKOWSKA. Raoultella spp. - reliable identification, susceptibility to antimicrobials and antibiotic resistance mechanisms. *Journal of medical microbiology* [online]. 2020, **69(2)**, 233-238 [cit. 2022-04-28]. Dostupné z: doi:10.1099/jmm.0.001150

SHA, Qiong, Dhiraj A. VATTEM, Michael FORSTNER a Dittmar HAHN. Quantifying Salmonella population dynamics in water and biofilms. *Microb Ecol.* [online]. 2013, **65(1)** [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:10.1007/s00248-012-0106-y

SHEN, Youming, Lixue KUANG, Jianyi ZHANG a Haifei LI. DNA sequencing, genomes and genetic markers of microbes on fruits and vegetables. *Microbial biotechnology: Special Issue on Advances in Microbial Biotechnology in China* [online]. 2021, **14(2)**, 323-362 [cit. 2022-04-21]. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1111/1751-7915.13560

SCHOCHETMAN, Gerald, Chin-Yih OU a Wanda K. JONES. Polymerase Chain Reaction. *The Journal of Infectious Diseases* [online]. Oxford University Press, 1988, **158(6)**, 1154-1157 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:https://www.jstor.org/stable/30137034

SCHUMACHER, H. Cefuroxime resistance in *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Pathology, Microbiology and Immunology* [online]. 2009, **105**(7-12), 708-716 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1997.tb05075.x>

SIMON, Claus a Wolfgang STILLE. Beta-laktamová antibiotika. *Antibiotika v současné lékařské praxi*. 1. Praha: Grada, 1998, s. 52-57. ISBN 80-7169-268-9.

SINGH, Pallavi et al. Characterization of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in cattle and deer in a shared agroecosystem. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* [online]. 2015, **5**(29) [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:10.3389/fcimb.2015.00029

SOUCY, S. M., HUANG, J., a GOGARTEN, J. P. (2015). Horizontal gene transfer: Building the web of life. *Nature Reviews Genetics*, **16**, 472–482. Dostupné z: doi: [10.1038/nrg3962](https://doi.org/10.1038/nrg3962)

SPÍŽEK, J. Rezistence na antibiotika, *Vesmír*, sv. 78, č. 1, 1999, 27-31 s

STÖPPLER, Melissa. Medical Definition of Antibiotic. *MedicineNet* [online]. 2021 [cit. 2022-04-23]. Dostupné z: <https://www.medicinenet.com/antibiotic/definition.htm>

ŠTEFAN, Marek. *Antibiotika v klinické praxi*. 1. Galén, 2019. ISBN 978-80-7492-397-5.

TANG, K.L. et al. Restricting the Use of Antibiotics in Food-Producing Animals and Its Associations with Antibiotic Resistance in Food-Producing Animals and Human Beings: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Lancet Planet Health* **2017**, *1*, 316–327

TIWARI, Ram Parkash, Naresh SACHDEVA, Gurinder Singh HOONDAL a Jasvir Singh GREWAL. Adaptive acid tolerance response in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2004, **44**(2), 137-146 [cit. 2022-04-20]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/jobm.200310333>

TODAR, Kenneth. Pathogenic *E. coli*. *Online Textbook of Bacteriology* [online]. [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: <http://www.textbookofbacteriology.net/e.coli.html>

TSENG, M., P.M. FRATAMICO, L. BAGI, D. MANZINGER a J.A. FUNK. Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) in swine: prevalence over the finishing period and characteristics of the STEC isolates. *Epidemiology & Infection* [online]. Cambridge University Press, 2014, **143**(3), 505-514 [cit. 2022-04-30]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1017/S0950268814001095>

VANNUFFEL, Pascal a Carlo COCITO. Mechanism of Action of Streptogramins and Macrolides. *Drugs* [online]. 1996, (51), 20-30 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.2165/00003495-199600511-00006>

VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. Brno: Neptun, 2005. ISBN 80-86850-00-5.

WAGES, J.M. POLYMERASE CHAIN REACTION. WAGES, J.M. *Encyclopedia of Analytical Science* [online]. 2. USA: Elsevier, 2005, s. 243-250 [cit. 2022-04-19]. ISBN 978-0-12-369397-6. Dostupné z:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B0123693977004751>

WANG, Huhu, Linlin CAI, Yunhan LI, Xinglian XU a Guanghong ZHOU. Biofilm formation by meat-borne *Pseudomonas fluorescens* on stainless steel and its resistance to disinfectants. *Food Control* [online]. 2018, **91**, 397-403 [cit. 2022-04-22]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.04.035>

WANG, Wu, Jing CHEN, Xuefei SHAO, Pan HUANG, Jing ZHA a Yingwang YE. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from retail meats in Anhui, China. *Food Science and Nutrition* [online]. 2021, **9(9)**, 4701-4710 [cit. 2022-05-07]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1002/fsn3.2266>

WEIN, Harrison. Stop the Spread of Superbugs: Help Fight Drug-Resistant Bacteria. *News in Health* [online]. 2014 [cit. 2022-05-01]. Dostupné z: <https://newsinhealth.nih.gov/2014/02/stop-spread-superbugs>

WIEGAND, Irith et al., Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature Protocols* [online]. 2008, (3), 163-175 [cit. 2022-05-04]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

A/EEC – attaching and effacing *E. coli*

AMR – antimikrobiální rezistence

ARB – bakterie odolné k antibiotikům

ARG – geny pro rezistenci k ATB

ATB – antibiotikum

ČOV – čistička odpadních vod

DARE – detekce evolučních ohnisek antibiotické rezistence

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EAEC – enteroagregativní *E. coli*

ECDC – Evropské centrum pro prevenci a kontrolu chorob (European Center for Disease Prevention and Control)

EIEC – enteroinvazivní *E. coli*

EPEC – enteropatogenní *Escherichia coli*

ESBL – bakterie produkující širokospektrou beta-laktamázu

ETEC – enterotoxická *E. coli*

ExPEC – extraintestinální patogenní *E. coli*

HGT – horizontální přenos genů

LPS – lipopolysacharid

MIC – minimální inhibiční koncentrace

MRSA – meticilin-rezistentní *Staphylococcus aureus*

PCR – polymerázová řetězová reakce

RFLP – polymorfismus délky restrikčních fragmentů

RMBD – Raw Meat Based Diet

RNA – ribonukleová kyseliny

RT-PCR – reverzní transkriptázová PCR

RT-qPCR – Real-Time PCR (PCR v reálném čase)

tRNA – transferová RNA

TTC – tetracykliny

VGT – vertikální přenos genů

VRBA – Violet Red Bile Agar

VRE – enterokok rezistentní k vankomycinu

SEZNAM OBRÁZKŮ;

Obrázek 1. Šíření ARG prostřednictvím mikroplastů (Liu et al., 2021, upraveno).....	31
Obrázek 2. Zisk antibiotické rezistence – mechanismus horizontálního přenosu genů mezi bakteriálními populacemi (Kunhikannan, 2021, upraveno)	32
Obrázek 3. Měření inhibičních zón při diskové difúzní metodě (Přáda, 2011, upraveno)..	45

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1. Vzorokly použíté k izolaci kmenů a jejich původ.....	42
Tabulka 2. identifikace izolovaných bakterií dle Enterotestů 24 N (Erba Lachema) .	46
Tabulka 3. Procentuální vyjádření výskytu rezistentních kmenů čeledi <i>Enterobacteriaceae</i>	49
Tabulka 4. Procentuální vyjádření rezistence jednotlivých rodů k použitým ATB (%)	49