

Skríning antibiotické rezistence u vybraných gramnegativních tyčinek izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu

Mgr. Martina Coufalová

Diplomová práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Mgr. Martina Coufalová
Osobní číslo: T21478
Studijní program: N0721A210004 Technologie potravin
Forma studia: Kombinovaná
Téma práce: Skríning antibiotické rezistence u vybraných gramnegativních tyčinek izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu

Zásady pro vypracování

Teoretická část

Vodní drůbež – charakteristika, chov a produkce.

Mechanismy a příčiny vzniku antibiotické rezistence.

Antibiotická rezistence gramnegativních tyčinek izolovaných z potravin a nápojů.

Praktická část

Mikrobiologický rozbor vodní drůbeže – izolace enterobakterií.

Skríning antibiotické rezistence izolovaných gramnegativních tyčinek.

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

Forma zpracování diplomové práce: tištěná/elektronická

Seznam doporučené literatury:

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

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

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2022**
Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 20. února 2023

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, považuji se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Prohlašuji,

- že jsem 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

Využívání antibiotik nevyhnutelně vede k rozvoji bakteriálních kmenů k nim rezistentním, které se mohou šířit prostředím a ohrožovat citlivost patogenních kmenů, což vede ke komplikacím léčby i běžných infekcí. Studií byl prokázán výskyt rezistentních izolátů rodu *Pseudomonas*, *Acinetobacter* a *Brevundimonas* v prostředí chovu kachen. Fenotypovými testy byla u těchto izolátů zjištěna vysoká míra rezistence k testovaným antibiotikům, přičemž vysoký podíl izolátů vykazoval multirezistenci. Metodou PCR byla potvrzena přítomnost některých genů rezistence. Práce přispěla k dalšímu poznání rozšíření rezistentních gramnegativních bakterií v prostředí primární produkce drůbeže v České republice.

Klíčová slova: *Acinetobacter*, antibiotická rezistence, *Brevundimonas*, Česká republika, kachny, multirezistence, *Pseudomonas*

ABSTRACT

The use of antibiotics inevitably leads to the development of antibiotic-resistant bacterial strains that can spread through the environment and affect the susceptibility of pathogenic strains, leading to complications in the treatment of common infections. This study revealed the occurrence of resistant isolates of the genera *Pseudomonas*, *Acinetobacter* and *Brevundimonas* in duck rearing environment. Phenotypic tests revealed a high level of resistance to the tested antibiotics, with a high proportion of isolates showing multidrug resistance. The presence of some resistance genes was confirmed by PCR. The work contributed to further understanding of the distribution of resistant Gram-negative bacteria in the environment of primary poultry production in the Czech Republic.

Keywords: *Acinetobacter*, antibiotic resistance, *Brevundimonas*, Czech Republic, ducks, multi-resistance, *Pseudomonas*

Na tomto místě bych ráda v první řadě poděkovala vedoucí mé diplomové práce prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za možnost věnovat se tomuto tématu a za odborné rady, které mi poskytla v průběhu vypracování práce. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám laboratoře mikrobiologie Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí za pomoc při vypracování experimentální části práce. Mé poděkování patří také prof. Kačániové za pomoc při identifikaci izolátů bakterií. A v neposlední řadě bych chtěla poděkovat přátelům a kolegům mého domovského pracoviště za podporu v posledním roce studia.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 VODNÍ DRŮBEŽ	12
1.1 CHARAKTERISTIKA VRUBOZOBÝCH.....	12
1.2 PRODUKCE DRŮBEŽE.....	13
1.2.1 Produkce vodní drůbeže.....	14
1.3 SYSTÉMY CHOVU VODNÍ DRŮBEŽE	15
1.3.1 Rodinný chov drůbeže.....	16
1.3.2 Intenzivní velkochovy drůbeže	16
1.4 KONTEXT POUŽÍVÁNÍ ANTIBIOTIK V PRODUKCI DRŮBEŽE.....	18
2 MECHANISMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	19
2.1 MECHANISMY ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	19
2.1.1 Ovlivnění intracelulární koncentrace antibiotik.....	20
2.1.2 Modifikace molekuly antibiotika	21
2.1.3 Modifikace cílové molekuly.....	22
2.2 PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	23
2.3 MECHANISMY ŠÍŘENÍ ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE	24
3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH	26
3.1 ZDROJ ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V POTRAVINÁCH	27
3.1.1 Kontaminace potravin rezistentními bakteriemi a geny rezistence.....	28
3.1.2 Záměrné přidávání mikroorganismů do potravin.....	29
3.2 PŘENOS ANTIMIKROBIÁLNÍ REZISTENCE V PROSTŘEDÍ ZPRACOVÁNÍ POTRAVIN.....	30
3.2.1 Vliv technik zpracování a konzervace potravin	30
3.2.2 Vliv biofilmů.....	30
3.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE IZOLÁTŮ Z POTRAVIN A NÁPOJŮ.....	31
II PRAKTICKÁ ČÁST	33
4 CÍLE PRÁCE	34
5 MATERIÁL	35
5.1 TESTOVANÉ BAKTERIÁLNÍ IZOLÁTY	35
5.2 KULTIVAČNÍ A KRYOPROTEKTIVNÍ MÉDIA	35
5.3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY	36
5.4 CHEMIKÁLIE A ROZTOKY.....	36
5.5 PŘÍSTROJE A SOFTWARE	37
5.6 LABORATORNÍ POMŮCKY	38

6	METODIKA.....	39
6.1	MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR VODNÍ DRŮBEŽE.....	39
6.1.1	Odběr a zpracování vzorků z vodní drůbeže.....	39
6.1.2	Selektivní kultivace.....	39
6.1.3	Gramovo barvení.....	40
6.1.4	Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF.....	40
6.2	SKRÍNING AMR IZOLOVANÝCH GRAMNEGATIVNÍCH TYČINEK.....	41
6.2.1	Fenotypové testy rezistence.....	41
6.2.2	Izolace bakteriální DNA.....	43
6.2.3	Detekce genů rezistence pomocí PCR.....	43
7	VÝSLEDKY	45
7.1	SELEKTIVNÍ KULTIVACE MIKROORGANISMŮ.....	45
7.2	STANOVENÍ FENOTYPOVÉHO PROFILU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	47
7.2.1	Fenotypová rezistence u <i>Pseudomonas</i> spp.....	47
7.2.2	Fenotypová rezistence u <i>Acinetobacter</i> spp.....	50
7.2.3	Fenotypová rezistence u <i>Brevundimonas</i> spp.....	52
7.2.4	Souhrn fenotypového profilu antibiotické rezistence.....	53
7.3	KONFIRMACE PŘÍTOMNOSTI GENŮ REZISTENCE.....	54
8	DISKUZE	55
8.1	REZISTENCE K BETALAKTAMŮM – PENICILINY A CEFALOSPORINY	56
8.2	REZISTENCE K BETALAKTAMŮM – KARBAPENEMY.....	58
8.3	REZISTENCE K BETALAKTAMŮM – MONOBAKTAMY	59
8.4	REZISTENCE K FLUOROCHINOLONŮM.....	59
8.5	REZISTENCE K AMINOGLYKOSIDŮM	61
	ZÁVĚR.....	62
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	63
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	78
	SEZNAM OBRÁZKŮ	79
	SEZNAM TABULEK	80

ÚVOD

Antibiotická rezistence se stala naléhavou a znepokojivou globální hrozbou pro zdraví lidí a zvířat. Nadměrné používání a zneužívání antimikrobiálních látek, je spolu s nedostatečným vývojem nových léčiv, zaměřením zdravotnického průmyslu na zisk a absencí diagnostických testů před předepsáním antibiotik, jedním z hlavních faktorů jejího rozvoje.

Produkce drůbežního masa je jedním z nejdůležitějších potravinářských odvětví na světě, protože poskytuje nutriční zabezpečení značnému podílu světové populace. Produkty drůbežářského průmyslu nabízejí přijatelné prodejní ceny, vysokou kvalitu bílkovin a relativně nízký obsah tuku. Kontaminace jatečně upravených těl drůbeže patogenními bakteriemi přenášenými masem tudíž představuje jak ekonomický, tak zdravotnický problém.

Používání antimikrobiálních látek při chovu a zpracování drůbeže přispělo ke zlepšení mikrobiologické kvality jatečně upravených těl drůbeže. Antimikrobiální látky se používají k prevenci onemocnění, profylaxi, metafylaxi a samotnou léčbu, v některých zemích světa se antibiotika stále používají na podporu růstu. Tyto látky se tedy v drůbežářství používají ve velké míře a obvykle se podávají v krmivu nebo pitné vodě. Rozsáhlé používání těchto prostředků však vyvolává obavy vzhledem k jejich úloze při selekci bakterií rezistentních vůči antibiotikům. Patogeny drůbeže rezistentní vůči antimikrobiálním látkám mohou vést k selhání léčby, což vede k ekonomickým ztrátám, ale také mohou být zdrojem rezistentních bakterií/genů (včetně zoonotických bakterií), které představují riziko pro lidské zdraví.

Z tohoto důvodu je k identifikaci a monitoringu trendu šíření antimikrobiální rezistence v životním prostředí zapotřebí komplexní přístup ke sledování různých odvětví života. Jelikož je životní prostředí vzájemně úzce provázané a jeho jednotlivé složky se významně ovlivňují, je vhodné sledovat výskyt rezistence k antimikrobiálním látkám také v prostředí chovu méně významných druhů drůbeže, čímž se zabývá tato práce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

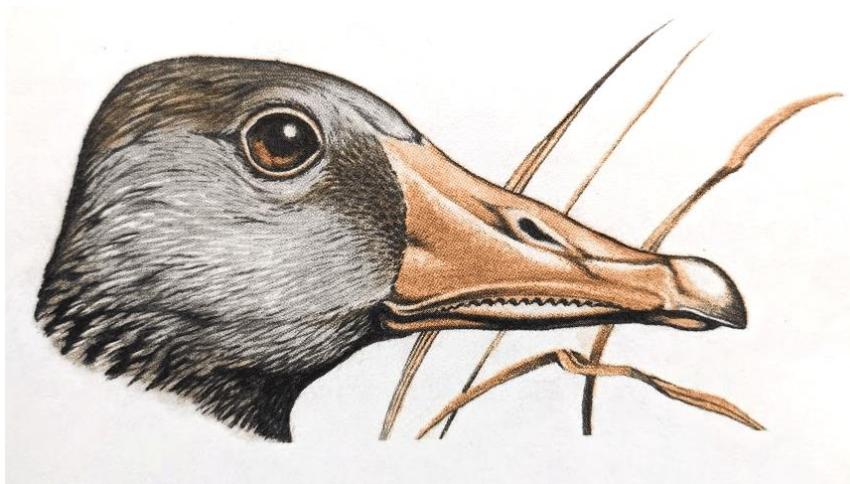
1 VODNÍ DRŮBEŽ

Drůbež je obecně definována jako skupina domestikovaných ptáků chovaných pro živočišné produkty (např. maso, vejce, peří, hnojivo), zábavu (např. závody, výstavy, lov) nebo práci (např. poštovní holubi). Většina druhů drůbeže je zahrnuta do několika ptačích řádů, mezi které patří *Galliformes* (kur, krůty, křepelky, bažanti, tetřevi, perličky), *Anseriformes* (kachny, husy, labutě) a *Columbiformes* (holubi a holubice) a *Ratites* (pštrosi, emu) (Mottet & Tempio, 2017; Vaarst et al., 2015). Domácí drůbež je tradičně dělena na drůbež hrabavou (kur domácí, krůty) a vodní (kachny, husy). Fylogeneticky tvoří drůbež (tedy řády hrabaví a vrubozobí) monofyletickou skupinu *Galloanseres*, jako jednu ze dvou vývojových větví moderních ptáků. Vodní drůbež patří zoologicky do řádu *Anseriformes* (vrubozobí), kam kromě běžně chovaných kachen a hus patří také labutě a pižmovky (Gill et al., 2022).

1.1 Charakteristika vrubozobých

Většina moderních druhů řádu *Anseriformes* je vysoce přizpůsobena životu na vodní hladině. V dalších odstavcích budou popsány typické znaky řádu vrubozobých, které jsou společné pro druhy vodní drůbeže.

Společným znakem všech vrubozobých jsou vroubkované okraje zobáku, lamely, jejichž vývoj původně umožňoval filtraci drobné potravy z vody nebo bahna (Obrázek 1). V současnosti se druhy vrubozobých živí i jiným způsobem než filtrací – husy a bernešky se pasou na vegetaci a okraje jejich zobáku jsou velmi ostré a fungují jako nůžky ke stříhání stébel trav, rybožraví morčáci mají zobák hákovitý a vroubky jim slouží k uchopení kluzké kořisti (Olsen, 2017; Veselovský, 2001).



Obrázek 1 Tvar zobáku typický pro vrubozobé
Převzato z Veselovský, 2001

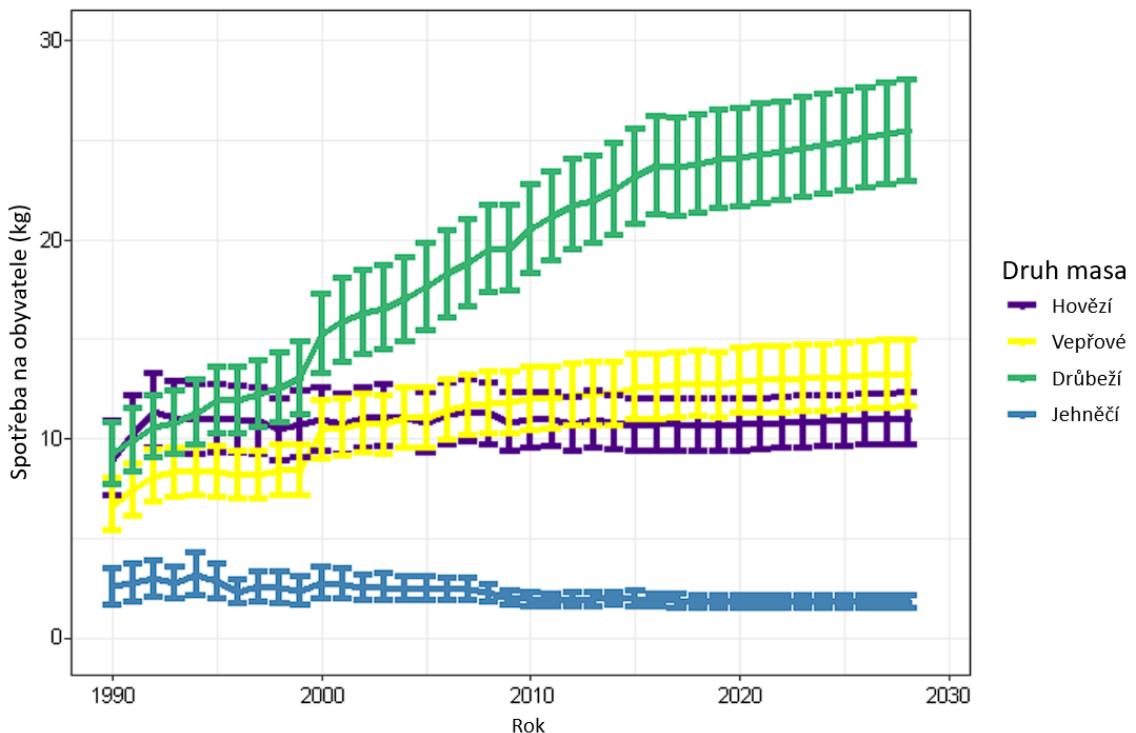
Dalším znakem vrubozobých jsou krátké zadní končetiny, jejichž tři přední prsty jsou spojené plovací blánou. Takto uzpůsobené běháky slouží jako výkonná vesla při plavání či potápění a tím dělají z vrubozobých výkonné plavce. Avšak kvůli stavbě nohou a jejich postavení poměrně vzadu jsou vrubozobí na souši spíše neobratní. K životu ve vodě je přizpůsobeno také i jejich opeření. Mají husté prachové peří a velkou kostrční žlázu produkující mastný sekret, kterým si potírají peří, čímž se pak stává nepropustné pro vodu. Zbarvením peří se také projevuje výrazný pohlavní dimorfismus, kdy samci ve svatebním šatu bývají pestře a nápadně zbarveni, kdežto samice jsou zpravidla hnědé. Samci poté na začátku hnízdění přepěrují do nenápadnějšího prostého šatu, při čemž ztrácejí také letky a nějakou dobu nemohou létat. U mnoha domestikovaných druhů tento projev pohlavního dimorfismu vymizel a obě pohlaví mají peří stejné barvy (K. L. A. Marshall & Gluckman, 2015; Pyle, 2005; Veselovský, 2001).

Oproti ostatním ptákům, mají samci vrubozobých pohlavní orgán, který je spirálovitě stočený a v klidové fázi je umístěn v kloace. K erekci dochází plněním topořivého tělesa lymfou. Po ztopoření se penis vysunuje z kloaky, po zasunutí do kloaky samice vtékají spermie do samičího pohlavního ústrojí pomocí žlábků na těle penisu. Po páření je tento orgán zvláštním vazem zasunut zpět do kloaky. Vrubozobí jsou většinou monogamní a vytvářejí páry na celý život. Hnízdí většinou na zemi, existují však druhy hnízdící na stromech, na plovoucích hnízdech či dokonce v norách v zemi. Mláďata jsou nidifugní (nekrmivá) a od narození následují své rodiče. Vrubozobí jsou dobří letci, létají rychle a na dlouhé vzdálenosti, severské druhy jsou tažné. Některé druhy jsou domestikované člověkem a chovány pro maso či vejce – tyto užitkové druhy jsou označovány jako vodní drůbež. Divoce žijící druhy jsou lovnou zvěří (Johnson & Grier, 1988; Veselovský, 2001).

1.2 Produkce drůbeže

Drůbež, v přepočtu na počet obyvatel, patří k nejrychleji produkovaným hospodářským zvířatům na světě (Dibner & Richards, 2005; Elwinger et al., 2016). Vysoká poptávka je částečně způsobena rostoucí populací, urbanizací a zvyšováním příjmů v rozvojových zemích (Ismoyowati & Sumarmono, 2019). Produkce drůbežího masa se navíc bude ještě dále zvyšovat z důvodu přechodu zemědělství států od samozásobitelského k intenzivnímu, které však vyžaduje rutinní používání antimikrobiálních látek (Obrázek 2) (OECD, 2023). V posledním půlstoletí činil celosvětový roční nárůst drůbežího masa 5 %. Naproti tomu

u hovězího masa to bylo pouze 1,5 %, u vepřového 3,1 % a u malých přežvýkavců 1,7 % (Mottet & Tempio, 2017).



Obrázek 2 Předpokládaný vývoj celosvětové spotřeby živočišného masa na obyvatele (kg) v letech 1990-2028.

Převzato z Hedman et al., 2020.

1.2.1 Produkce vodní drůbeže

Chov kachen má dlouhou historii, ale moderní kachní průmysl je ve většině částí světa relativně malý. Nicméně kachní průmysl je velmi dynamický a v posledních několika desetiletích prochází obdobím rychlého rozvoje. V některých částech světa začala produkce kachen konkurovat spotřebě jiných druhů drůbeže. Například Čína produkuje více než 2/3 všech kachen na světě. Většina kachen je chována v Asii (89,7 %), následuje Evropa (6,5 %), Amerika (2,3 %), Afrika (1,4 %) a Oceánie (0,1 %) (Jalaludeen et al., 2022).

Kachní maso je konzumováno nejen pro svou jedinečnou chuť, ale také díky svému vysokému obsahu živin s optimálním obsahem esenciálních aminokyselin, vhodnému složení mastných kyselin s vysokým obsahem polynenasycených mastných kyselin a vyváženému poměru omega-6 a omega-3 kyselin (Ismoyowati & Sumarmono, 2019).

V porovnání s kuřecím masem, hraje produkce kachního a husího masa (a vajec) menší roli. V některých zemích východní a jihovýchodní Asie však kachny a husy produkují významné

množství masa a vajec, přičemž v posledních desetiletích došlo k prudkému nárůstu produkce (Pingel, 2011).

Kachny mají oproti ostatním druhům drůbeže řadu výhod, zejména odolnost vůči nemocem. Jsou odolné, snadno se páří a pasou, zejména v mokřadech, kde mají tendenci se shlukovat do hejn. V oblastech s horkým a vlhkým podnebím je chov vodního ptactva snazší než chov kuřat. V takových podmínkách může být vodní drůbež upřednostňována jako zdroj potravinové bezpečnosti (Ismoyowati & Sumarmono, 2019; Pingel, 2011). Nevýhodou kachen chovaných v uzavřených prostorách a krmených vyváženou krmnou dávkou je jejich vysoké plýtvání krmivem, které je způsobeno lopatovitým tvarem jejich zobáků. To snižuje efektivitu využití krmiva, což vysvětluje, proč je jejich maso a vejce dražší než maso a vejce kuřat (Ismoyowati & Sumarmono, 2019).

1.3 Systémy chovu vodní drůbeže

Chov domestikovaného ptactva (drůbeže) pro maso, vejce a peří je základem výroby potravin již od vzniku zemědělství. Domácí kachny patří do rodů *Anas* a *Cairina*. Většina plemen pochází z kachny divoké (*Anas platyrhynchos*), která byla domestikována v jižní Číně, a jsou obzvláště důležitým zdrojem potravy ve venkovských oblastech Asie. Kachna pižmová (*Cairina moschata*) byla domestikována v Latinské Americe, vyskytuje se také ve všech rovníkových zemích Afriky a Asie. Toto plemeno kachny je mimořádně dobře žravé a dobře se mu daří ve volném výběhu, protože nepotřebuje mnoho vody. Husy byly v Egyptě domestikovány pravděpodobně před 3 000 lety a patřily mezi první domestikovaná zvířata. Dnes se chovají po celém světě, a to především pro maso a peří. Velká rozmanitost velikostí plemen hus umožňuje jejich chov v různých podmínkách chovu (FAO, 2023).

Díky možnosti využívat širokou škálu krmných surovin, od zemědělských a domácích zbytků až po vedlejší produkty potravinářského průmyslu, představuje chov drůbeže jednu z nejefektivnějších metod chovu zvířat. Zajišťuje stabilní přísun bílkovin i potravinové a nutriční zabezpečení pro širokou škálu obyvatelstva ve venkovských oblastech po celém světě, zejména v rozvojových zemích (Vaarst et al., 2015). Kromě těchto málo náročných systémů chovu na dvorku je však drůbež také jedním z hlavních druhů zvířat používaných v průmyslové živočišné výrobě. Průmyslová produkce drůbeže, převážně kuřat a v menší míře krůt, kachen, hus a dalších, totiž představuje naprostou většinu (až 98 % v případě masa a 92 % v případě vajec) celosvětové produkce drůbeže (Mottet & Tempio, 2017).

V celosvětovém měřítku se drůbež chová v nejrůznějších produkčních systémech, od těch s velmi jednoduchými nočními přístřešky až po systémy plně automatizované, s řízeným prostředím (FAO, 2023).

1.3.1 Rodinný chov drůbeže

Malé, takzvané rodinné, chovy se nacházejí po celém světě. Organizace OSN pro výživu a zemědělství (Food and Agriculture Organisation, FAO) rozdělila rodinné drůbežářské provozy do čtyř hlavních podskupin: malé extenzivní, extenzivní, polointenzivní a intenzivní (FAO et al., 2014). Tyto čtyři typy provozů se liší podle velikosti hejna, plemen drůbeže, vstupů a výstupů, účelu výroby, komercializace, lokality, biologické bezpečnosti a biologické ochrany, a také dopadů na životní prostředí (Alders et al., 2018; FAO et al., 2004).

1.3.2 Intenzivní velkochovy drůbeže

Většina průmyslové drůbeže, zahrnující brojlerů (chované pro produkci masa) a nosnice (používané pro produkci vajec), je chována v intenzivních produkčních chovech. Taková intenzivní produkce drůbeže, s hejny čítajícími od několika tisíc do několika set tisíc kusů, probíhá především ve vnitřních otevřených podlahových halách (Mottet et al., 2017) a s velmi vysokou hustotou zvířat ($33 \text{ kg} \cdot \text{m}^{-2}$ nebo vyšší) (EPRS, 2019). To vede ke značné ekologické stopě vzhledem k intenzivnímu charakteru produkce.

Kachny chované na maso se na trh dodávají na základě požadované hmotnosti a dispozice zpracovaného jatečného těla (celá kachna, části nebo dále zpracované produkty). Kachny jsou tedy zpracovávány mezi 38. a 45. dnem věku. Kachny pekingské, celosvětově nejprodukovanější plemeno kachen, se chovají v hejnech smíšeného pohlaví ve třech různých typech chovných systémů: na podestýlce, na vyvýšené plastové podlaze nebo na kombinaci obou. Kachňata jsou odchovávána v menším prostoru produkční haly, kde je možné dosáhnout vyšší teploty pro odchov. Když jsou kachňatům přibližně 3 týdny, prostor pro odchov se otevře a kachňatům se poskytne větší plocha haly. S jejich dalším růstem se jim zpřístupní celá hala (Obrázek 3). Když nastane čas odeslat kachny do zpracovatelského závodu, zařízení haly se zvedne, aby se usnadnilo nakládání (Karcher & Mench, 2018).



Obrázek 3 Chov kachňat na vyvýšené plastové podlaze se střídavě umístěnými krmítky a napáječkami.

Převzato z Karcher & Mench, 2018

Bez ohledu na velikost provozu využívá velká většina podnikatelských produkčních jednotek spíše komerční než místní genotypy. Obvykle nízká produktivita původních genotypů totiž znamená, že jejich chov v intenzivních systémech hospodaření není obecně rentabilní (FAO et al., 2014).

Problém, který je v chovu kachen jedinečný, se týká zajištění otevřených zdrojů vody, což je pravděpodobně nejkontroverznější téma v oblasti welfare kachen (Karcher & Mench, 2018). Kachny pekingské se obvykle chovají se savicovými napáječkami, aby se eliminovaly problémy související s rozlitím vody, jako je mokrá podestýlka. Nedostávají však vodu k čištění nebo koupání, tedy k velmi přirozenému chování. Otevřený zdroj vody, který je dostatečně velký a hluboký, aby umožnil koupání, způsobuje v komerčním chovu hygienické problémy a hrozí riziko kontaminace výkaly. Byly vyhodnoceny experimentální alternativy, které kachnám poskytují vodu, která jim umožňuje čištění (a tedy udržení dobrého stavu očí, nozder a peří), i když ne koupání; patří mezi ně sprchy a koryta (Jones et al., 2009; Liste et al., 2012). I poměrně mělká koryta však mohou být kontaminována bakteriemi a vytvářet tak zdravotní riziko (Schenk et al., 2016).

1.4 Kontext používání antibiotik v produkci drůbeže

Objev příznivého účinku antimikrobiálních látek podávaných v subterapeutických koncentracích hospodářským zvířatům na urychlení jejich růstu byl náhodný. V roce 1946 bylo zdokumentováno první zaznamenané použití antimikrobiálních stimulatorů růstu u kuřat (Moore et al., 1946). Tento objev přišel v poválečném období na počátku 50. let 20. století, kdy se zemědělci ve Spojených státech a Evropě snažili udržet krok s rostoucí poptávkou po potravinách a živočišných bílkovinách. Používání antimikrobiálních látek k prevenci nemocí a podpoře růstu se brzy stalo nedílnou součástí nového modelu zemědělské výroby a krmných programů (Laxminarayan et al., 2015). Navzdory včasnému varování před rizikem vzniku rezistence (viz např. Starr & Reynolds, 1951) zastínil příznivý účinek antimikrobiálních látek na produktivitu hospodářských zvířat potenciální rizika, která byla zaznamenána. Antimikrobiální látky se staly součástí systému produkce potravin, který procházel drastickými změnami, jako bylo zlepšení genetických vlastností zvířat, jejich výživy, ustájení, porážky a zpracování. V roce 2006 bylo nařízením Evropské unie č. 1831/2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat omezeno používání antimikrobiálních látek ve výživě zvířat jiných než kokcidostatika a histomonostatika (EUR-Lex, 2004; Laxminarayan et al., 2015).

2 MECHANISMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

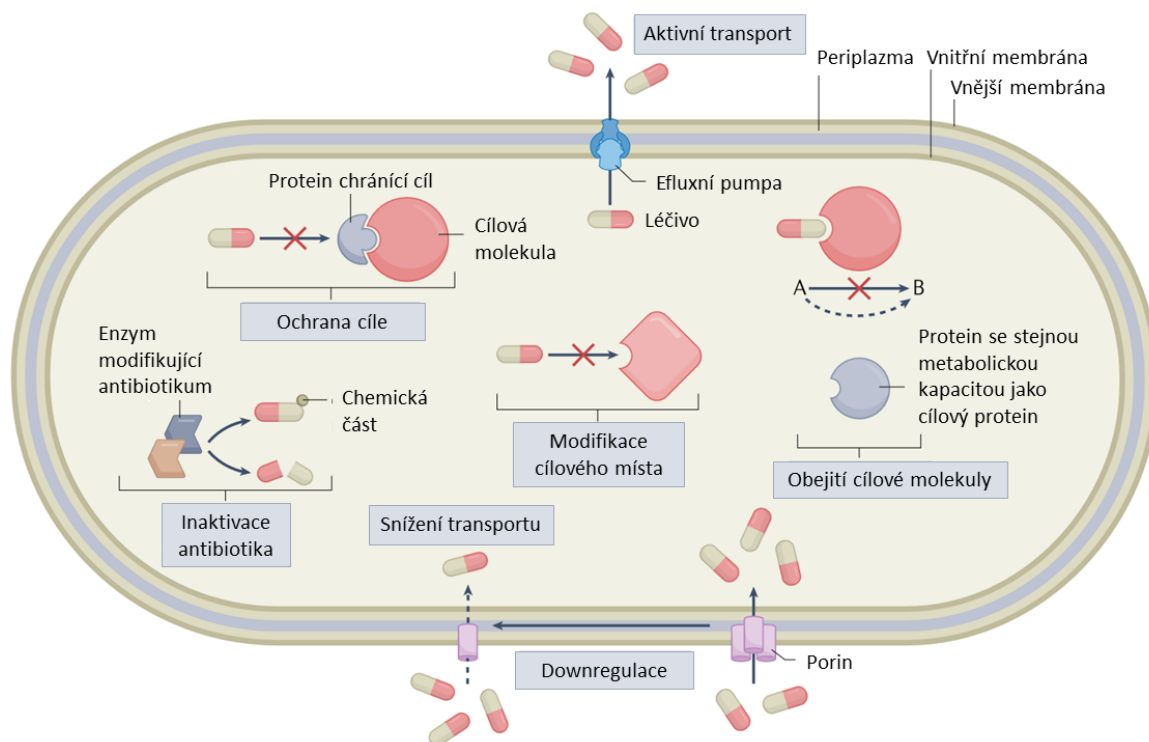
V první řadě je důležité rozlišit několik způsobů, kterými může organismus vykazovat rezistenci. Vnitřní (přirozená, primární) rezistence k antibiotikům charakterizuje rezistenci, která je inherentní vlastností konkrétního druhu. Všechny jednotlivé organismy daného druhu tedy postrádají vhodný cíl citlivý na léčivo nebo mají přirozené bariéry, které brání látce dosáhnout cíle. Cíle většiny antimikrobních látek se nacházejí v buněčné stěně, cytoplazmatické membráně nebo uvnitř cytoplazmy. U gramnegativních bakterií tedy může vnější membrána představovat další bariéru, která brání léčivu v dosažení těchto cílů (Kaye et al., 2004).

Získaná (sekundární) rezistence odráží skutečnou změnu v genetické výbavě bakterie, a proto léčivo, které bylo dříve účinné, již není schopno účinkovat, což vede ke klinické rezistenci. Někdy má genetická změna za následek snížení aktivity léčiva, avšak ne úplnou ztrátu jeho účinnosti (Kaye et al., 2004).

2.1 Mechanismy antibiotické rezistence

V obecné rovině je popisováno několik hlavních mechanismů, kterými může bakteriální rezistence k antibiotikům vznikat. Tyto mechanismy lze rozdělit podle biochemické cesty, která se na rezistenci podílí (Obrázek 4): zabránění léčivu dosáhnout cílové molekuly (snížením intracelulární koncentrace léčiva, a to omezením penetrace nebo aktivním vyloučením látky); enzymatickou modifikací molekuly antibiotika a jeho následnou inaktivací; změnou cílové molekuly tak, aby s ní léčivo již neinteragovalo; nebo úplné odstranění cílové molekuly vytvořením nových metabolických drah (Munita & Arias, 2016; Neu, 1992; Nollette, 2000).

Je třeba poznamenat, že rezistence vůči jedné třídě antibiotik může být obvykle dosažena více cestami a jedna bakteriální buňka může být schopna využít celou řadu mechanismů rezistence, aby přežila účinek antibiotika (Munita & Arias, 2016). Jediná změna může také vést k rezistenci vůči několika různým látkám nebo dokonce více nesouvisejícím typům léčiv současně (Kaye et al., 2004).



Obrázek 4 Přehled molekulárních mechanismů antibiotické rezistence.
Převzato z Darby et al., 2022

2.1.1 Ovlivnění intracelulární koncentrace antibiotik

Mnoho klinicky využívaných antibiotik působí na cílové molekuly umístěné intracelulárně, nebo, v případě gramnegativních bakterií, vázané v cytoplazmatické (vnitřní) membráně. Molekula léčiva proto musí proniknout vnější a/nebo cytoplazmatickou membránou, aby se projevil její antimikrobiální účinek. Bakterie proto vyvinuly mechanismy, které brání antibiotiku dosáhnout intracelulárního nebo periplazmatického cíle snížením příjmu antimikrobiální molekuly. Tento mechanismus je důležitý zejména u gramnegativních bakterií (z výše uvedeného důvodu), protože omezuje přísun látek z vnějšího prostředí. Vnější membrána totiž funguje jako první obranná linie proti průniku mnoha toxických sloučenin, včetně antimikrobiálních látek (Munita & Arias, 2016).

Hydrofilní molekuly, jako jsou například betalaktamy, tetracykliny a některé fluorochinolony, jsou obzvláště ovlivněny změnami v propustnosti vnější membrány, protože k překonání této bariéry často využívají vodou naplněné difuzní kanály známé jako poriny (Pagès et al., 2008). Změn porinů lze dosáhnout třemi obecnými procesy: změnou typu exprimovaných porinů; změnou úrovně exprese porinů; a narušením funkce porinu. Změny permeability prostřednictvím kteréhokoli z těchto mechanismů často vedou k nízké

rezistenci a jsou obvykle spojeny s dalšími mechanismy rezistence, jako je například zvýšená exprese efluxních pump (Nikaido, 2003).

Efluxní pumpy, složité proteinové systémy uložené v membráně bakterií, jsou schopny aktivním transportem vytlačit toxickou sloučeninu z buňky. Tyto systémy mohou být substrátově specifické (pro konkrétní antibiotikum, jako jsou *tet* determinanty pro tetracyklin a *mef* geny pro makrolidy) nebo mají širokou substrátovou specifitu, která se obvykle nachází u bakterií s mnohočetnou lékovou rezistencí (multi-drug resistance, MDR) (Munita & Arias, 2016; Poole, 2005). Tento mechanismus rezistence se týká široké škály tříd antimikrobiálních látek, včetně inhibitorů syntézy proteinů, fluorochinolonů, betalaktamů, karbapenemů a polymyxinů. Geny kódující efluxní pumpy mohou být lokalizovány na bakteriálním chromozomu (zpravidla pumpy s širokou substrátovou specifikou) nebo na plazmidech a dalších mobilních genetických elementech (MGE) (substrátově specifické pumpy) (Poole, 2005).

2.1.2 Modifikace molekuly antibiotika

Jednou z nejúspěšnějších bakteriálních strategií, jak se vypořádat s přítomností antibiotik, je produkce enzymů, které inaktivují léčivo přidáním specifických chemických skupin do sloučeniny, nebo které zničí samotnou molekulu, čímž znemožní interakci antibiotika s jeho cílem.

Produkce enzymů schopných provádět chemické změny antimikrobiální molekuly je dobře známým mechanismem získané rezistence vůči antibiotikům u gramnegativních i grampozitivních bakterií. Bylo popsáno mnoho typů modifikujících enzymů a mezi nejčastější biochemické reakce, které katalyzují patří: acetylace (aminoglykosidy, chloramfenikol, streptograminy); fosforylace (aminoglykosidy, chloramfenikol); a adenylace (aminoglykosidy, linkosamidy). Bez ohledu na biochemickou reakci je výsledný účinek často spojen se sterickou překážkou, která snižuje aviditu léčiva pro jeho cíl, což se následně projevuje ve vyšších hodnotách minimální inhibiční koncentrace (Munita & Arias, 2016).

Syntéza enzymů, které selektivně cílí na antibiotika, a tím způsobená neutralizace molekuly reverzibilní či ireverzibilní inaktivací, je dalším, a poměrně známým, mechanismem rezistence. Hlavními chemickými procesy, kterými je tohoto dosaženo jsou hydrolýza; přenos skupin; a redoxní mechanismy (Wright, 2005).

Mnoho antibiotik má hydrolyticky citlivé chemické vazby, jejichž integrita je pro biologickou aktivitu klíčová. Není proto překvapivé, že existuje několik enzymů, které bakterie vyvinuly tak, aby cílily právě na tyto vazby, štěpily je, a v důsledku toho zabránily působení antibiotika. Mezi ně patří především amidázy (betalaktamázy) štěpící betalaktamový kruh penicilinů a cefalosporinů (Moellering, Jr., 1998). Dalšími příklady jsou esterázy, které jsou spojovány s rezistencí vůči makrolidům a epoxidázy spojované s fosfomycinovou rezistencí. Protože tyto enzymy vyžadují jako ko-substrát pouze vodu, často jsou bakteriemi vylučovány do extracelulárního prostoru, čímž zachytí antibiotika dříve, než se dostanou do kontaktu s bakteriemi (Wright, 2005).

Nejrozmanitější, a tedy i nejpočetnější skupinou enzymů rezistence, jsou skupinové transferázy. Tyto enzymy kovalentně modifikují antibiotika, což vede ke strukturálním změnám, které zhoršují vazbu na cílovou molekulu. Všechny tyto kovalentní modifikační strategie vyžadují pro svou aktivitu ko-substrát (např. ATP, acetyl-CoA, NAD, a další), proto jsou tyto enzymy aktivní pouze v cytosolu (Wright, 2005).

2.1.3 Modifikace cílové molekuly

Běžnou strategií bakterií pro zajištění rezistence k antibiotikům je samotné předejití účinku jejich působení. To je zajišťováno zásahem do místa, na která antibiotika cílí. Existuje několik různých taktik, jak toho dosáhnout, mimo jiné ochrana cílové molekuly (zabránění přístupu antibiotika k vazebnému místu) a modifikace cílového místa (vedoucí ke snížení afinity k antibiotiku) (Munita & Arias, 2016; Spratt, 1994). V důsledku těchto změn tedy nemůže léčivo s cílovou molekulou interagovat a je proto neúčinné (Danziger & Pendland, 1995).

Ačkoli některé z genetických determinant kódujících proteiny, které zprostředkovávají ochranu cíle, byly nalezeny v sekvenci bakteriálního chromozomu, většinu klinicky relevantních genů zapojených do tohoto mechanismu rezistence je nesena MGE. Mezi léky ovlivněné tímto mechanismem patří například tetracyklin (Tet[M] a Tet[O]) a fluorochinolony (Qnr). Mechanismus účinku těchto proteinů spočívá v kompetici s antibiotikem o vazebné místo; změně konformace molekuly po vazbě v blízkosti cílového místa a následné zábraně vazby antibiotika; nebo cíleném vytlačení antibiotika z vazebného místa cílové molekuly (Dönhöfer et al., 2012; W. Li et al., 2013; Rodríguez-Martínez et al., 2011).

Zavádění modifikací do cílového místa je jedním z nejčastějších a nejběžnějších mechanismů antibiotické rezistence u bakteriálních patogenů, které ovlivňuje téměř všechny skupiny antimikrobiálních sloučenin. Tyto změny mohou spočívat v bodových mutacích v sekvenci genů kódujících cílové místo; enzymatických změnách vazebného místa (např. přidání metylových skupin); nebo nahrazení či obejití původního cíle (Kaye et al., 2004; Munita & Arias, 2016). Bez ohledu na typ změny je však konečný efekt vždy stejný: snížení afinity antibiotika k cílovému místu.

Pomocí úplného nahrazení nebo obejití cílového místa, případně eliminace cílové molekuly, která není pro přežití organismu nutná, jsou bakterie schopné vyvinout molekuly, které plní podobné biochemické funkce jako původní molekula, avšak nejsou antimikrobiální molekulou inhibovány (Munita & Arias, 2016). Toho je dosaženo vytvořením nových metabolických drah, které obcházejí primární cíl (Kaye et al., 2004). Další možností, jak se vyhnout antimikrobiálnímu účinku, je nadprodukce cílové molekuly a tím zabránění celkové inaktivace metabolické dráhy.

2.2 Příčiny vzniku antibiotické rezistence

U mnoha bakteriálních druhů se vyvinula schopnost tolerovat antibiotika dlouho předtím, než je lidé začali masově vyrábět a používat k prevenci a léčbě infekčních chorob (Bhullar et al., 2012; D'Costa et al., 2011). Důležitým faktorem dávné, a stále probíhající evoluce mechanismů rezistence, je pravděpodobně nikdy nekončící soupeření o zdroje mezi mikroorganismy, včetně přirozené produkce sekundárních metabolitů podobných mnoha antibiotikům, která se dnes používají jako léčiva (Allen et al., 2010; Davies & Davies, 2010; Martinez, 2009).

Relativně nedávné zavedení antibiotik do klinické praxe radikálně změnilo předpoklady pro rozvoj a šíření rezistence tím, že poskytlo nebývalý selekční tlak na vznik bakterií rezistentních vůči antibiotikům, v důsledku čehož se stal vývoj rezistence vůči antibiotikům nevyhnutelný (Spratt, 1994). Tento selekční tlak podpořil mobilizaci a horizontální přenos velké škály genů rezistence vůči antibiotikům (Alcock et al., 2019) u mnoha bakteriálních druhů, zejména u těch, které způsobují onemocnění.

Všechny dosud schválené kategorie antibiotik, ať už se jedná o přírodní, polosyntetické nebo syntetické sloučeniny, se setkaly s rezistencí alespoň u některých patogenů, na které jsou zaměřeny (Larsson & Flach, 2022). Obvykle trvá vývoj antibiotik nejméně 10 let, než jsou certifikována pro použití širokou veřejností (Renwick et al., 2016), naproti tomu bakterie

mohou vyvinout rezistenci během několika hodin (Burckhardt & Zimmermann, 2011). Mechanismy inaktivace antibiotik totiž mají mnoho společného s dobře charakterizovanými enzymatickými reakcemi. Hydrolýza, přenos skupin a redoxní enzymy se podílejí na primárním a intermediárním mikrobiálním metabolismu, a proto pravděpodobně slouží jako zdroj rezistence (Wright, 2005).

Organismy produkující antibiotika jsou možnými původci mnoha enzymů rezistence, protože u těchto druhů se biosyntéza a rezistence musí vyvíjet společně, a proto je působení evolučního tlaku chronické. V půdním prostředí, kde se mnoho těchto organismů vyskytuje, navíc žijí sousední druhy, které produkují vlastní antibiotika, což zvyšuje evoluční tlak na vývoj nových enzymů rezistence. Přítomnost prvků rezistence u bakterií produkujících antibiotika, které mají ortology v klinických izolátech, tuto hypotézu podporuje (C. G. Marshall et al., 1998).

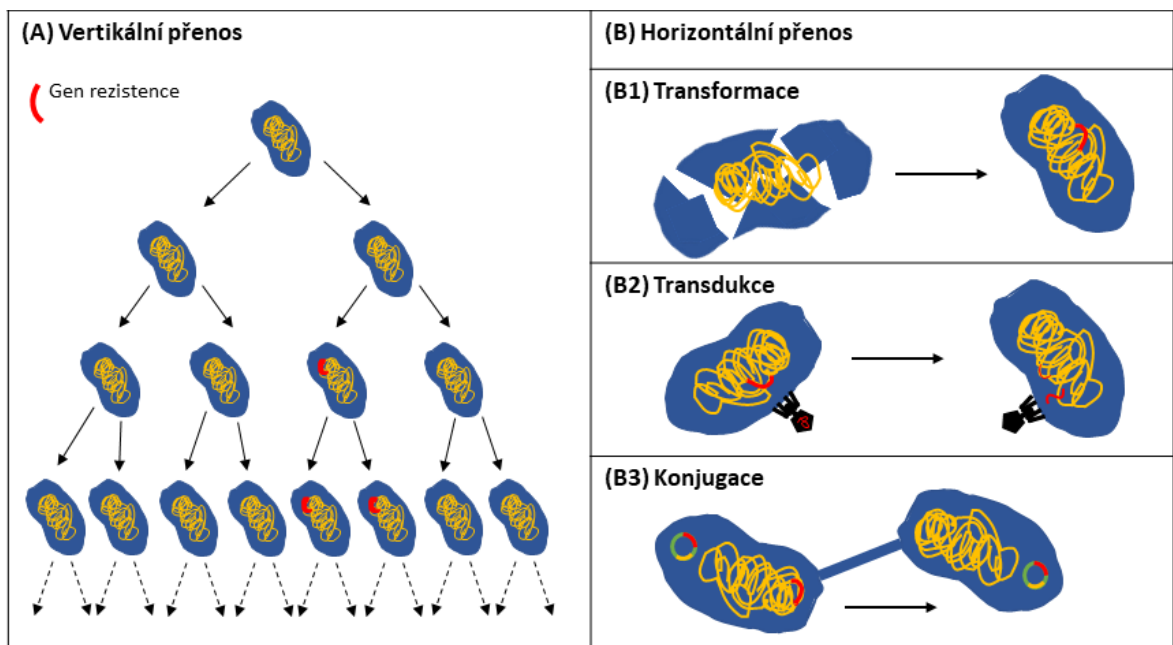
2.3 Mechanismy šíření antimikrobiální rezistence

Mezi dvě základní biologické cesty, které usnadňují vývoj a šíření antimikrobiální rezistence (AMR), patří vertikální přenos genů (VGT, z anglického vertical gene transfer) a horizontální přenos genů (HGT, z anglického horizontal gene transfer) (Obrázek 5).

Rezistence se může objevit u dříve citlivé bakteriální populace. Genetická mutace v bakteriálním genomu vedoucí k rezistentnímu fenotypu se poté může přenášet z rodičovských buněk na dceřině prostřednictvím VGT (Obrázek 5A). Takto se šíří například rezistence k fluorochinolonům a oxazolidinonům (Caniça et al., 2015; Munita & Arias, 2016; Silva et al., 2013).

Ve druhém případě může docházet k výměně genetické informace umožňující rezistenci mezi bakteriálními druhy, což je označováno jako horizontální genový transfer (Husnik & McCutcheon, 2018). HGT se obvykle uskutečňuje následujícími třemi mechanismy: transformací, transdukcí a konjugací (Obrázek 5B). Transformace je definována jako příjem exogenní DNA z prostředí do buňky přes buněčnou membránu. Transdukce probíhá prostřednictvím virového vektoru, fága, který přenáší genetickou informaci mezi bakteriálními buňkami. Konjugací je vyměňována genetická informace vázaná na plazmid a uskutečňuje se prostřednictvím přímého kontaktu mezi donorovou (dárcovskou) a recipientní buňkou (Catry et al., 2003; Husnik & McCutcheon, 2018).

K transformaci a transdukcii obvykle dochází mezi mikroorganismy, které jsou si fylogeneticky blíže příbuzné. Kdežto konjugace může probíhat mezi různými bakteriálními kmeny, což umožňuje promiskuitní přenos AMR mezi bakteriemi. Plazmidy jsou nejdůležitějším prostředkem šíření genů rezistence k antibiotikům. Tyto kruhové molekuly DNA jsou často nositelem genů rezistence a MGE (například transpozonů, integronů a inzertních sekvencí), což usnadňuje vznik multirezistentních (MDR) bakterií (Michaelis & Grohmann, 2023).



Obrázek 5 Primární cesty podílející se na výměně genetické informace způsobující rezistenci k antibiotikům. (A) vertikální přenos, (B) horizontální přenos

Upraveno z Hedman et al., 2020

3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE V POTRAVINÁCH A NÁPOJÍCH

Důležitým krokem k posouzení případného ohrožení veřejného zdraví v důsledku antimikrobiální rezistence (AMR) u hospodářských zvířat je stanovení úrovně rezistence v těchto populacích. AMR totiž nelze účinně řešit bez dobře fungujících systémů pokrývajících sektor zvířat i lidí (European Commission, 2017; WHO, 2015). Navíc je třeba, co se vzniku a rozvoje antibiotické rezistence týče, vzít do úvahy také socioekonomické faktory v jednotlivých zemích světa, znalosti místních farmářů k používání antimikrobiálních látek a hospodaření s nimi a samotnou dostupnost vhodných léčiv (Toghroli et al., 2023).

V současné době Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC) koordinuje Evropskou síť pro sledování antimikrobiální rezistence (EARS-Net), která monitoruje AMR u invazivních bakteriálních izolátů z lidských infekcí krevního řečiště nebo meningitidy (ECDC, 2019), a Evropskou síť pro nemoci přenášené potravinami a vodou a zoonózy (FWD-Net), která monitoruje AMR u lidských infekcí salmonelami a kampylobaktery (ECDC, 2016). V potravinářském sektoru koordinuje Evropský úřad pro bezpečnost potravin (EFSA) aktivní monitorování AMR u indikátorových komenzálních bakterií (především *Escherichia coli*, ale země mohou hlásit také *Enterococcus faecalis* a *Enterococcus faecium*) a zoonotických bakterií (*Salmonella* spp., *Campylobacter coli* a *Campylobacter jejuni*) podle směrnice 2003/99/ES a prováděcího rozhodnutí Komise (EU) 2020/1729 (EFSA & ECDC, 2020; EUR-Lex, 2003).

Na jatkách jsou odebírány vzorky slepých střev zdravých zvířat určených k produkci potravin (skot do jednoho roku, kuřata, krůty a prasata) a vzorky masa z nich v obchodních řetězcích. Vzhledem k tomu, že v současné době žádný evropský systém nesleduje AMR u klinických izolátů z nemocných zvířat, údaje o AMR ohniscích u konkrétních zvířecích infekcí na evropské úrovni stále chybí, ačkoli jsou nezbytné pro přizpůsobení strategií racionalizace používání antimikrobiálních látek v živočišném sektoru (Mader et al., 2021). Národní systémy sledování AMR u klinických izolátů z nemocných zvířat však existují nejméně ve 12 evropských zemích, včetně České republiky (Mader, Muñoz Madero, et al., 2022). Kromě toho existují veterinární programy sledování AMR i mimo Evropu (FDA, 2017).

V návaznosti na tyto programy sledování vznikla iniciativa EARS-Vet definující kombinace druhů zvířat, typů produkce, věkových kategorií, bakteriálních druhů, vzorků a antimikrobiálních látek, které mají být sledovány (Mader et al., 2021). EARS-Vet plánuje

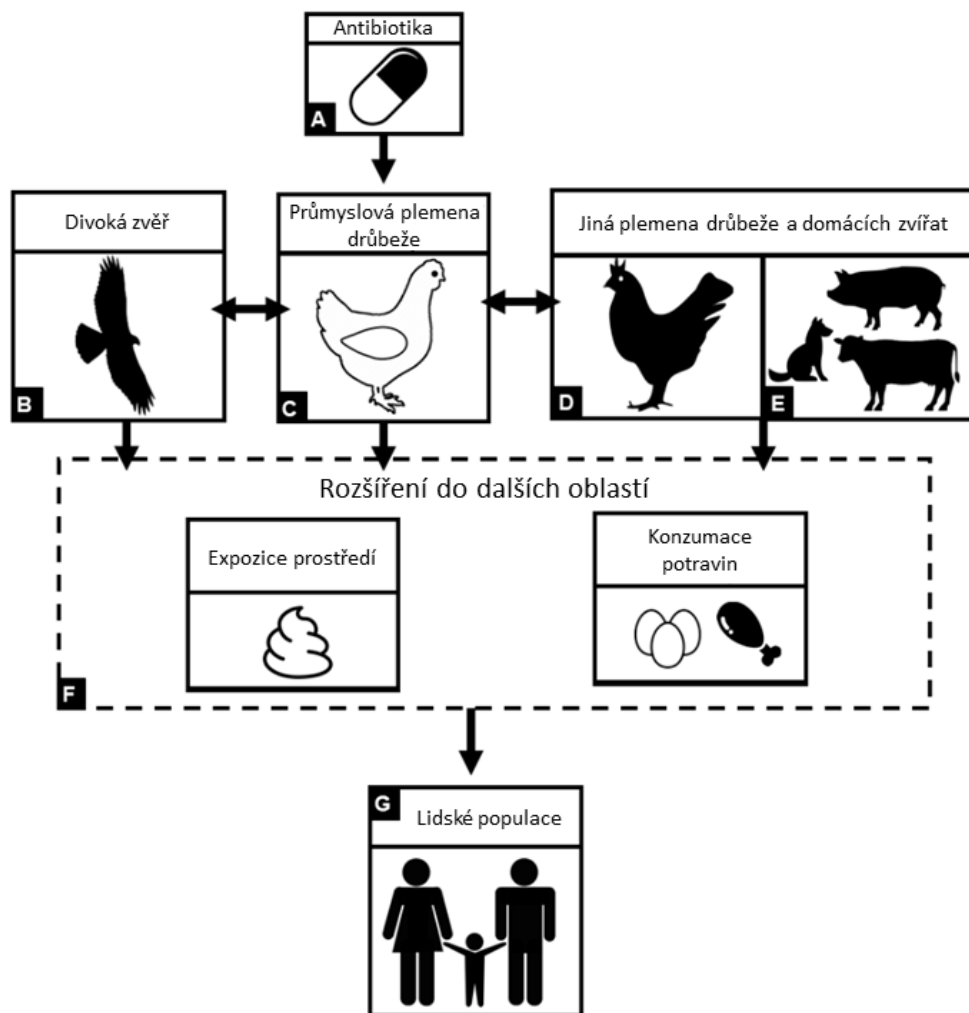
sledovat AMR u šesti druhů zvířat [skot, prasata, kuřata (brojleři a nosnice), krůty, kočky a psi], a to u 11 druhů bakterií (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mannheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus hyicus*, *Streptococcus uberis*, *Streptococcus dysgalactiae* a *Streptococcus suis*). Byly vybrány relevantní antimikrobiální látky pro jejich léčbu (např. tetracykliny) a doplněny o antimikrobiální látky specifitějšího zájmu veřejného zdraví (např. karbapenemy). Shromažďují se také molekulární údaje zjišťující přítomnost ESBL, AmpC cefalosporináz a rezistence k meticilinu (Mader, EU-JAMRAI, et al., 2022).

3.1 Zdroj antimikrobiální rezistence v potravinách

Antimikrobiální rezistence je hrozbou pro prevenci a léčbu bakteriálních infekcí (WHO, 2012). Jedno z prvních varování přišlo již kolem roku 1969, kdy Swann upozornil na problémy spojené s nevhodným používáním antibiotik a naznačil, že obrovské množství antibiotik bez dodržování norem může být nebezpečné pro lidské zdraví (Swann, 1969).

K rozvoji AMR dochází, když mikroorganismy (tj. bakterie, houby a viry) po častém kontaktu s antimikrobiálními látkami mění svou fyziologickou nebo genetickou výbavu. Antimikrobiální léčiva se celosvětově využívají k léčbě infekcí u lidí a zvířat, a také preventivně v produkčním zemědělství, a proto je pro zmírnění rizika rozvoje AMR zásadní kontrolovat používání antibiotik v průběhu výroby potravin, a to jak v živočišné, tak v rostlinné výrobě (Hudson et al., 2017; Jian et al., 2021).

Rezistentní bakterie nebo geny antimikrobiální rezistence (vyskytující se u patogenních bakterií) mohou kontaminovat potraviny v jakékoli fázi výroby, od pole (primární produkce) až po obchodní síť. K šíření patogenních bakterií z potravin na spotřebitele může docházet přímou nebo nepřímou cestou. Proto je nezbytné uplatňovat na národní i mezinárodní úrovni řadu přístupů ke kontrole šíření patogenů z potravin a k podpoře bezpečnosti a zabezpečení potravin. Organizace pro výživu a zemědělství (FAO), Světová organizace pro zdraví zvířat (OIE) a Světová zdravotnická organizace (WHO) doporučily přístup "Jedno zdraví" (One Health), který podporuje zdravá zvířata, zdravé lidi a zdravé životní prostředí, jak je uvedeno na Obrázku 6 (FAO, 2016; WHO, 2015).



Obrázek 6 Konceptní grafické znázornění antimikrobiální rezistence spojené s intenzivní produkcí drůbeže.

Převzato z Hedman et al., 2020.

3.1.1 Kontaminace potravin rezistentními bakteriemi a geny rezistence

Potraviny mohou být kontaminovány bakteriemi rezistentními vůči antimikrobiálním látkám a/nebo geny AMR mnoha způsoby. Jak již bylo výše napsáno, rezistentní bakterie se přirozeně vyskytují v životním prostředí, a to v půdě, ve vodě a také v lidských nebo zvířecích výkalech. Živočišné produkty tedy mohou být kontaminovány rezistentními bakteriemi v důsledku styku s výkaly v průběhu porážky; rostlinné produkty může během výroby kontaminovat použitá zavlažovací voda znečištěná výkaly nebo vypouštěním odpadních vod. Ke kontaminaci potravin může také dojít až po jejich primárním zpracování, například vlivem vnějšího prostředí, což je označováno jako post-kontaminace. Případně ke kontaminaci dochází při styku s jinými potravinami, což se nazývá křížová (nebo také cross-) kontaminace (Verraes et al., 2013).

3.1.2 Záměrné přidávání mikroorganismů do potravin

Během výrobního procesu některých potravinářských výrobků jsou z technologických důvodů záměrně přidávány mikroorganismy, u kterých mohou být přítomny geny AMR. Podle zamýšleného účinku lze tyto mikroorganismy rozdělit do tří skupin: startovací (starterové) kultury, probiotika a biokonzervační mikroorganismy. Starterové kultury jsou mikrobiální kultury přidávané do potravin za účelem indukce kvašení. Nejvíce jsou k tomuto účelu využívány bakterie mléčného kvašení (BMK), např. *Lactobacillus*, *Lactococcus* a *Leuconostoc*. Některé starterové kultury mají probiotické vlastnosti nebo jsou využívány pro biokonzervaci (García-Díez & Saraiva, 2021).

Probiotika jsou živé mikroorganismy přidávané do potravin pro svůj pozitivní vliv na organismus hostitele. Běžně jsou jako probiotika využívány BMK a bifidobakterie, případně také některé druhy kvasinek (Ljungh & Wadström, 2006; Z. Zhang et al., 2018).

Biokonzervace je proces využití přirozené a kontrolované mikrobioty k prodloužení trvanlivosti potravin. Tyto mikroorganismy mohou inhibovat (kompeticí o živiny) nebo přímo inaktivovat (produkcí antimikrobních látek) organismy způsobující kažení potravin nebo patogeny. Kromě toho mohou mít také fermentační či probiotické vlastnosti. Díky produkci kyselin a bakteriocinů, působí antibakteriálně proti škodlivým organismům a patogenním bakteriím, jako je například *Listeria monocytogenes* (Favaro & Todorov, 2017; Lahiri et al., 2022; Todorov et al., 2022).

Vzhledem k tomu, že startovací kultury, probiotika a mikroorganismy pro biokonzervaci často obsahují stejné bakteriální rody, dochází k přenosu AMR stejnými mechanismy. Po požití potravin se přidané mikroorganismy dostanou do trávicího systému člověka, kde může dojít k přenosu bakteriálních genů. Ve většině případů dochází k přenosu konjugací, i když teoreticky nelze vyloučit transformaci a transdukcii (Verraes et al., 2013). Mikroorganismy, kterých je v potravinách nebo v lidských střevech přítomno velké množství, přenášejí geny rezistence s větší pravděpodobností než mikroorganismy, kterých je přítomno pouze malé množství. To je případ probiotik a mikroorganismů pro biokonzervaci, pokud se jich do potravin přidává velké množství, a také startovacích kultur, které rostou během fermentačního procesu (Verraes et al., 2013).

3.2 Přenos antimikrobiální rezistence v prostředí zpracování potravin

3.2.1 Vliv technik zpracování a konzervace potravin

Pro prodloužení trvanlivosti potravin se používají různé techniky zpracování a konzervace potravin, které mohou mít rozdílné účinky na původní bakteriální flóru. Bakterie přítomné v potravinách mohou po použití techniky zpracování nebo konzervace potravin přežít, aniž by byl jejich růst potlačen. Je také možné, že jejich růst je inhibován, což má za následek stresované nebo subletálně poškozené bakteriální buňky. Jiné techniky mohou bakterie také usmrtit nebo inaktivovat. Tyto mrtvé bakteriální buňky mohou zůstat neporušené nebo mohou být lyzovány v důsledku poškození buněčné stěny. V důsledku toho se bakteriální DNA, včetně případných přítomných genů AMR, uvolní do prostředí. Většina metod zpracování potravin však vede ke snížení počtu bakterií (Deak et al., 2012).

Geny AMR, které jsou přítomny v částečně inaktivovaných, stresovaných buňkách, mohou být přeneseny na komenzální a patogenní bakterie jak v potravinách, tak po jejich požití v trávicím systému člověka. Toho lze dosáhnout buď konjugací, pokud se rezistence nachází na mobilizovatelných elementech, nebo transformací a transdukcí, avšak v nižší míře (Verraes et al., 2013).

K usmrcení bakteriálních buněk se používá velké množství metod zpracování potravin. Cílem bariérové technologie, používané při minimálním zpracování potravin, je vystavit bakterie různým překážkám, které by neměly překonat. Různé použité překážky mohou mít nejen aditivní účinek, ale mohou působit i synergicky (Leistner, 2000).

3.2.2 Vliv biofilmů

Na většině potravinářských zařízení mohou mikroorganismy růst a přežívat ve formě biofilmů. Biofilm lze definovat jako mikrobiální společenstvo charakterizované buňkami, které jsou nevratně připojeny k substrátu nebo k sobě navzájem; které jsou zakotveny do matrix extracelulárních polymerních látek, jež si vytvořily; a které vykazují změněný fenotyp s ohledem na rychlost růstu a transkripci genů (Donlan & Costerton, 2002). Jedno- i vícedruhové biofilmy se vyskytují v potravinářském průmyslu, kde mohou být příčinou kažení potravin a výroby produktů s nevyhovujícími vlastnostmi. Kromě toho mohou biofilmy také ohrožovat veřejné zdraví, pokud obsahují patogenní bakterie. Obavy o bezpečnost potravin vyvolávají biofilmy v masném (Manafi et al., 2020), mlékárenském (Gajewska et al., 2023) i obecně potravinářském průmyslu (Mazaheri et al., 2021; Sharan et

al., 2022). Důležitým zdravotním rizikem souvisejícím s výskytem biofilmů v potravinářském průmyslu je vrozená vyšší AMR bakterií ve srovnání s planktonními buňkami (Ciofu et al., 2022). Uvádí se, že k této vlastnosti přispívá několik faktorů, jako jsou role matrice, hustota buněk, rychlost růstu, heterogenita uvnitř biofilmu, obecná stresová odpověď a quorum sensing (Y. Li et al., 2020). Kromě této vrozené rezistence poskytuje stav biofilmu ideální situaci pro přenos rezistence a bylo prokázáno, že k němu dochází jak konjugací, tak transformací i transdukcí (Michaelis & Grohmann, 2023).

3.3 Antibiotická rezistence izolátů z potravin a nápojů

Z četných pozorovacích studií a zpráv o sledování je známo, že je AMR u hospodářských zvířat značně rozšířená. Mimo sledování rezistence u různých bakteriálních druhů lze dynamiku AMR hodnotit sledováním rezistence u komenzálních *Escherichia coli*, což je široce uznávaný indikátor AMR (EFSA & ECDC, 2017, 2020; N. Nhung et al., 2016).

Jedna z recentních studií provedená ve Švýcarsku zjistila, že přibližně 50 % testovaných vzorků potravin z masa a mořských plodů bylo kontaminováno bakteriemi jako jsou *Campylobacter*, *Enterococcus*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Listeria* a *Vibrio* spp. Gramnegativní bakterie se vyznačovaly rezistencí vůči aminoglykosidům, cefalosporinům, fluorochinolonom, penicilinům, sulfonamidům a tetracyklinům. Grampozitivní izoláty vykazovaly rezistenci vůči glykoproteinům, linkosamidům, makrolidům a nitrofuránům u stafylokoků a enterokoků izolovaných z masa a masných výrobků, stafylokoků izolovaných z mořských plodů, jakož i u enterokoků a technologicky významných bakterií (včetně zákysových) ve fermentovaných nebo zpracovaných mléčných výrobcích (Jans et al., 2018).

Jiná studie zkoumala, zda se vyskytují rozdíly v AMR u klinických a neklinických izolátů *E. coli* z hospodářských zvířat. V souladu s hypotézou bylo zjištěno vyšší riziko rezistence na všechny čtyři zahrnuté antimikrobiální látky (ampicilin, gentamicin, kyselinu nalidixovou a tetracyklin) u klinických izolátů z telat v Německu a Francii. U izolátů z brojlerů bylo toto zjištěno pouze u gentamicinu u brojlerů ve Francii. Naopak v rozporu s hypotézou byla zjištěna vyšší pravděpodobnost rezistence u neklinických izolátů u ampicilinu a tetracyklinu u brojlerů ve Francii, Německu a Spojeném království; krůt ve Francii a Německu; a u gentamicinu u krůt v Německu. To naznačuje, že vyšší výskyt rezistence u jednoho typu izolátů než u druhého (tj. klinických nebo neklinických izolátů) souvisí se vztahem mezi

kategoriemi zvířat a antimikrobiální látkou, který může souviset se způsobem léčby zvířat (Mesa-Varona et al., 2021).

Jak bylo výše popsáno, vysokým rizikem pro konečného spotřebitele je rezistence kontaminujících bakterií, které mohou rezistenci získat například od patogenních bakterií hostitelského organismu. Dále popsaná studie se zabývala AMR u patogenů drůbeže, jako jsou například *Escherichia coli*, *Salmonella Pullorum/Gallinarum*, *Pasteurella multocida*, *Ornitobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Clostridium perfringens*, *Mycoplasma spp.*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* a další. Mezi gramnegativními patogeny, které nejsou z čeledi *Enterobacteriaceae*, měly izoláty *Ornitobacterium rhinotracheale* nejvyšší úroveň fenotypové rezistence vůči ko-trimoxazolu, enrofloxacinu, gentamicinu, amoxicilinu a ceftiofuru, která přesahovala 50 % (Nhung et al., 2017).

Již dříve byl popsán stav AMR u zoonotických bakterií *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* a *E. coli* z kuřat a krůt. U salmonel se četnost a vzorce AMR liší v závislosti na období, regionu, sérovaru, konkrétní farmě, využití zvířete (nosnice/brojler) a antimikrobiálním přípravku. U salmonel izolovaných z krůt je obvykle vyšší frekvence AMR než u salmonel izolovaných z kuřat. Dochází také ke klonálnímu a horizontálnímu přenosu AMR a existují obavy z šíření přenosných plazmidů, které kódují cefalosporinázy s rozšířeným spektrem. Rezistence k fluorochinolonům je obecně nízká. U kampylobakterů je rezistence k tetracyklinu obvykle středně častá až častá, rezistence k chinolonům/fluorochinolonům kolísá od nízké po vysokou a rezistence k makrolidům je obvykle nízká. V některých zemích se vyskytuje vysoká míra rezistence vůči fluorochinolonům. Ptačí patogenní *E. coli* jsou často vysoce rezistentní, zejména k tetracyklinu, streptomycinu a sulfonamidům. Běžná je plazmidem zprostředkovaná rezistence. Komenzální *E. coli* z drůbeže mají podobný vzorec rezistence, ale s nižší frekvencí. Současně bylo zjištěno, že prevalence AMR je obvykle nižší u nosnic než u brojlerů, což je pravděpodobně částečně způsobeno omezením používání antimikrobiálních látek v hejnech nosnic, aby se zabránilo výskytu reziduí antimikrobiálních látek ve vejcích (Gyles, 2008).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo shrnout poznatky o mechanismu vzniku a přenosu bakteriální antibiotické rezistence. Dále bylo cílem prozkoumat výskyt této rezistence v potravinářských provozech a jejich produktech.

Cílem laboratorní části práce bylo selektivní kultivací izolovat gramnegativní bakterie tyčinkovité morfologie mimo enterobakterie ze vzorků z prostředí malochovu pižmovky domácí. Tyto izoláty charakterizovat z hlediska fenotypu rezistence vůči antimikrobiálním látkám a u vybraných izolátů potvrdit přítomnost genů tuto rezistenci kódující.

5 MATERIÁL

5.1 Testované bakteriální izoláty

Celkem bylo testováno 30 primárních vzorků z prostředí chovu vodní drůbeže, konkrétně pižmovky domácí z malochovu na Pardubicku. Jednalo se o vzorky čerstvého masa ($n = 10$), stěry z břicha a okolí kloaky ($n = 10$), vzorky chladicí vody z různých částí vany s chladicí vodou při porážce ($n = 5$) a vzorky napájecí vody z napájecích bazének včetně sedimentu ($n = 5$). Více o metodice odběru a zpracování primárních vzorků je napsáno v kapitole 6.1.

5.2 Kultivační a kryoprotektivní média

Média použitá pro selektivní kultivaci vzorků byla komerčně dostupná a byla připravena dle instrukcí výrobce. Soubor všech použitých kultivačních médií je uveden v Tabulce 1, včetně výrobce a původu.

Tabulka 1 Seznam použitých kultivačních médií

Název	Zkratka	Výrobce	Země původu	Využití
Plate Count Agar	PCA	HIMEDIA	Indie	kultivace
Brain Heart Infusion Broth	BHI	HIMEDIA	Indie	kultivace
Pseudomonas Agar Base * ¹	PA	HIMEDIA	Indie	selektivní kultivace
Leeds Acinetobacter Agar Base * ²	AA	HIMEDIA	Indie	selektivní kultivace
Vibrio agar	VA	HIMEDIA	Indie	selektivní kultivace
Mueller-Hinton agar	MHA	Oxoid	Velká Británie	disková difuzní metoda
Fosfátový pufr	PBS	Sigma-Aldrich	USA	

* do těchto médií byly přidány antibiotické suplementy, které jsou uvedeny v Tabulce 2

¹ Cetrinix Supplement (FD029), ² AC Selective Supplement (FD271)

Příprava kryoprotektivního média pro dlouhodobé uchování bakteriálních izolátů při teplotách $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ probíhala následovně: dle návodu výrobce byl připraven BHI bujón, 85 ml bujónu bylo odlito do samostatné baňky do které bylo následovně přidáno 12 ml (15 g) glycerolu, přičemž odměrný válec byl směsí několikrát propláchnut. Připravené médium bylo vysterilizováno v autoklávu ($121\text{ }^{\circ}\text{C}/15\text{ min}$) a rozplněno po 0,5 ml do sterilních Eppendorf zkumavek. Pro zajištění úplné sterility byly kryozkumavky opětovně sterilovány.

5.3 Antimikrobiální látky

Pro selektivní kultivaci a testování citlivosti k antibiotikům byly použity antimikrobiální látky ve formě komerčně vyráběných suplementů k agarovým základům (do objemu 500 ml agaru byla použita jedna lahvička, dle návodu výrobce) a v podobě komerčně vyráběných antibiotických disků. Seznam použitých suplementů je uveden v Tabulce 2, seznam antimikrobních disků je uveden v Tabulce 3.

Tabulka 2 Seznam použitých suplementů do selektivních médií

Supplement	Obsažené ATB v 1 lahvičce [mg]		Výrobce	Původ
AC Selective Supplement (FD271)	ampicilin sodná sůl	50,0	HIMEDIA	Indie
	ceftazidim	50,0		
Cetrinix Supplement (FD029)	cetrimid	100,0	HIMEDIA	Indie
	kyselina nalidixová	15,0		

Tabulka 3 Seznam použitých antimikrobiálních disků

Skupina	Antibiotikum (ATB)	Zkratka	Obsah ATB v disku [μg]	Výrobce	Původ
Peniciliny	piperacillin-tazobactam	PIT	100/10	HIMEDIA	Indie
	tikarcilin	TI	75	HIMEDIA	Indie
Cefalosporiny	cefepim	CAZ	30	HIMEDIA	Indie
	ceftazidim	CPM	10	HIMEDIA	Indie
Karbapenemy	imipenem	IPM	10	HIMEDIA	Indie
	doripenem	DOR	10	HIMEDIA	Indie
Fluorochinolony	ciprofloxacin	CIP	5	HIMEDIA	Indie
	levofloxacin	LE	5	HIMEDIA	Indie
Aminoglykosidy	amikacin	AK	30	HIMEDIA	Indie
	tobramycin	TOB	10	HIMEDIA	Indie

5.4 Chemikálie a roztoky

Chemikálie pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) a gelovou elektroforézu

- Agaróza (Sigma-Aldrich, USA)
- Destilovaná voda

- DNA Gel Loading Dye (6X) (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Ethidiumbromid (EtBr) (Sigma-Aldrich, USA)
- Hmotnostní standard (100 bp, New England Biolabs, USA)
- Oligonukleotidové primery (viz Tabulka 7) (Metabion GmbH, Německo)
- PCR Ultra H₂O (Top-Bio ČR)
- Q5 Hot Start High-Fidelity 2x Master mix (New England Biolabs, USA)
- TBE pufr: pufr byl připraven smícháním Tris–Base (Sigma-Aldrich, USA), kyseliny borité (Penta, ČR) a EDTA (Penta, ČR) a rozpuštěním v 1 l destilované vody. pH bylo upraveno pomocí ředěné HCl na hodnotu 8. Následně byl tento roztok autoklávován při 121 °C po dobu 20 minut. 1M pufr byl připraven ředěním z 20M zásobního roztoku.

Chemikálie použité na Gramovo barvení

- Krystalová violet' (Carl Roth GmbH, Německo)
- Lugolův roztok – 1% vodný roztok elementárního jodu a jodidu draselného (Carl Roth GmbH, Německo)
- Safranin roztok (Carl Roth GmbH, Německo)

5.5 Přístroje a software

- Centrifuga MiniSpin[®] (Eppendorf, Německo), univerzální chlazená centrifuga Universal 32 R (Hettich, Německo), kombinovaná centrifuga/vortex Combi-Spin FVL-2400N (Biosan, Lotyšsko)
- Denzitometr Den-1 McFarland Densitometer (Biosan, Lotyšsko)
- DNA/RNA UV-box UVT-S-AR (Biosan, Lotyšsko)
- Elektroforetická vana (VWR, USA)
- Elektronická multikanálová pipeta E1 ClipTip (Thermo Fisher Scientific, USA)
- Fotodokumentační a analyzační systém Azure c600 Gel Imaging System (Azure Biosystems, USA)
- Inkubátor MIR-162 (Sanyo, Japonsko)
- Laboratorní mrazák (–20 °C) (Gorenje, Slovinsko), laboratorní mrazák (–80 °C) New Brunswick Innova U-101 (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní váha EW-N (Kern, Německo)

- Laminární box Airstream® Gen 3 Class II BSC-S Series (ESCO Lifesciences Group, Singapur)
- Lednice (Liebherr, Německo)
- Mikrovlnná trouba (Beko, Turecko)
- Parní sterilizátor (autokláv) 2840EL (Tuttnauer, USA)
- PCR termocycler – Mastercycler nexus (Eppendorf, Německo)
- Sada automatických pipet Research plus (Eppendorf, Německo)
- Spektrofotometr Ultrospec 10 (Biochrom, USA)
- Stolní třepaný inkubátor ThermoMixer Comfort (Eppendorf, Německo)

5.6 Laboratorní pomůcky

- Chladicí stojan na mikrozkušavky (Eppendorf, Německo)
- Laboratorní sklo (Simax, ČR)
- Latexové a nitrilové rukavice (Hartmann; OneMed)
- Mikrozkušavky 1,5 ml a 2,0 ml (Eppendorf, Německo)
- Nůžky
- Parafilm(Sigma-Aldrich, USA)
- PCR destičky (Eppendorf, Německo), PCR stripy (Eppendorf, Německo)
- Pinzety, skalpely (Medin, ČR)
- Plastové Petriho misky o průměru 90 mm (Boettger, Německo)
- Plastové stojany na zkumavky a mikrozkušavky (Eppendorf, Německo)
- Polystyrenová krabice pro chlazení vzorků ledem
- Pravítko
- Příslušenství (formy, hřebeny) na přípravu gelů (VWR, USA)
- Semi-mikro jednorázové spektroskopické kyvety (VWR, USA)
- Sterilní Densi-La zkumavky 15 ml (Gama Group, ČR)
- Sterilní jednorázové plastové kličky 1 μ l (VWR, USA)
- Sterilní plastové špičky k automatickým pipetám (Eppendorf, Německo)

6 METODIKA

6.1 Mikrobiologický rozbor vodní drůbeže

6.1.1 Odběr a zpracování vzorků z vodní drůbeže

Odběr vzorků probíhal v období 06/2022-07/2022. Celkem bylo vyšetřeno 30 vzorků z prostředí malochovu pižmovky domácí z oblasti Pardubického kraje České republiky. Jednalo se o vzorky masa z poražených zvířat (n = 10), stěry z břicha a okolí kloaky (n = 10), vzorky chladicí vody z různých částí vany s chladicí vodou při porážce (n = 5) a vzorky napájecí vody z napájecích bazénků včetně sedimentu (n = 5).

Kachní maso z 1 kusu (100 g), prsní sval a stehno v celém průřezu, bylo po odběru uloženo do plastového zamrazovacího sáčku a zamraženo na teplotu -18 °C. Po transportu do laboratoře byly vzorky rozmrazeny (24 hod, lednice) a následně bylo 5 g vzorku homogenizováno ve 45 g fyziologického roztoku po dobu 5 minut.

Stěr z břicha a okolí kloaky jedné živé kachny byl proveden sterilní gázou namočenou v destilované vodě, která byla poté uložena do plastového zamrazovacího sáčku a zchlazena na teplotu 8 °C. Po transportu do laboratoře byl vzorek ponechán 2 hodiny v termostatu při 55 °C, poté bylo ke gáze přidáno 5 ml fyziologického roztoku a homogenizováno po dobu 5 min.

Chladicí voda z různých částí vany s chladicí vodou při porážce (250 g) byla uložena do plastového zamrazovacího sáčku a zamražena na teplotu -18 °C. Napájecí voda z napájecích bazénků, včetně sedimentu (250 g), byla uložena do plastového zamrazovacího sáčku a zchlazena na 8 °C. Po převozu do laboratoře byly vzorky rozmrazeny v lednici (48 hod) a poté bylo 0,5 ml promíchaného vzorku přepipetováno do zkumavky obsahující 4,5 ml fyziologického roztoku.

Takto připravené vzorky byly poté ve vhodném ředění vyočkovány na PCA agar a dále na selektivní půdy.

6.1.2 Selektivní kultivace

Selektivní kultivace byla provedena na třech selektivních agarových půdách (Pseudomonas agar, PA; Leeds Acinetobacter agar, AA a Vibrio agar, VA). Pro selektivní kultivaci bylo 100 µl suspenze hokejkou vyočkováno na selektivní půdy (PA, AA, VA) a kultivováno v termostatu při 37 °C po dobu 48 hodin. Poté byly vybrané kolonie metodou křížového

roztěru přeneseny a rozředěny na čerstvou půdu tak, aby bylo možné získat a popsat samostatné kolonie. V případě nárůstu více variant morfologií kolonií v rámci jednotlivého vzorku, byly jednotlivé kolonie inokulovány a kultivovány na oddělené misce. Postup byl opakován nejméně třikrát za účelem získání čisté bakteriální kultury.

Narostlé kultury byly barveny dle Grama (kapitola 6.1.3) a podrobeny mikroskopické analýze, aby bylo možné pro další postupy vybrat pouze gramnegativní bakterie s tyčinkovitou morfologií. Gramnegativní bakterie se jeví v zorném poli mikroskopu jako světle růžové a lze je snadno odlišit od temně fialových grampozitivních bakterií. Vzhledem k malé velikosti bakterií je třeba je pozorovat imerzním objektivem s použitím imerzního oleje. Vybrané gramnegativní izoláty byly podrobeny druhové identifikaci (MALDI-TOF, kapitola 6.1.4), zamraženy do kryoprotektivního média a uchovány při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Současně byla izolována bakteriální DNA pomocí teplotní lýze (kapitola 6.2.2), která byla využita při konfirmační PCR reakci pro detekci genů kódujících rezistenci na antibiotika (kapitola 6.2.3).

6.1.3 Gramovo barvení

Teplem fixovaný roztěr na podložním sklíčku byl převrstven roztokem krystalové violeti a ponechán působit 60 s, poté byla barva bez oplachování slita a preparát byl převrstven Lugolovým roztokem (60 s). Roztok byl slit, opatrně opláchnut destilovanou vodou a v šikmé poloze odbarvován směsí etanol:aceton (80:20) dokud neodtékalo barvivo (20-25 s). Preparát byl dokonale opláchnut destilovanou vodou a dobarven safraninem (60 s). Následně byl preparát důkladně opláchnut destilovanou vodou, ponechán oschnout a mikroskopován pomocí imerzního objektivu.

6.1.4 Hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF

Druhové stanovení bakteriálních izolátů bylo provedena v partnerské laboratoři Slovenské poľnohospodárske univerzity v Nitre ve Výskumném centru AgroBioTech ve spolupráci s prof. Ing. Kačániovou, PhD. Princip metody spočívá v ozáření směsi vzorku a matrice pulsním laserem, kdy matrice absorbuje dodanou energii a svým rozkladem ionizuje molekuly vzorku, které jsou následně separovány na základě poměru molekulové hmotnosti a náboje. Získaná hmotnostní spektra bílkovin jsou analyzována a porovnávána s databází spekter jednotlivých bakteriálních druhů. Pro další analýzy byly vybrány izoláty identifikované jako *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. a *Brevundimonas* spp.

6.2 Skríníng AMR izolovaných gramnegativních tyčinek

6.2.1 Fenotypové testy rezistence

V rámci fenotypových testů rezistence bylo provedeno stanovení citlivosti bakteriálních izolátů k 10 významným antibiotikům diskovou difuzní metodou s hodnocením dle CLSI (CLSI, 2023) a EUCAST (EUCAST, 2023).

Testované izoláty byly vyočkovány na Petriho misky (průměr 90 mm) s PCA a kultivovány přes noc při 37 °C. Současně bylo připraveno dostatečné množství Petriho misek s MH agarem o velikosti 90 mm (2 pro každý vzorek). Misky obsahovaly 25 ml média, což odpovídá výšce agaru 4 mm.

Z každého vzorku byla v 15 ml zkumavce připravena bakteriální suspenze ve fosfátovém pufru (PBS; přičemž pro každou z využitých Petriho misek bylo připraveno minimálně 2 ml suspenze). Obsah zkumavky byl důkladně zhomogenizován a následně byl změřen zákal bakteriální suspenze pomocí spektrofotometru. Hodnota zákalu by měla odpovídat hodnotě 0,5 McFarlandovy stupnice (tj. $\approx 1-2 \cdot 10^8$ CFU/ml), tedy $OD_{660} = 0,08-0,12$. Připravená suspenze byla do 15 minut od přípravy po krátkém promíchání na vortexu sterilně nanesena na celý povrch plotny s MH agarem a přebytečné inokulum bylo odpipetováno. Po dobu zhruba 10-20 minut byly plotny s inokulem ponechány ve sterilním boxu, aby dostatečně zaschly. Po zaschnutí byly na misky pomocí sterilní pinzety umístěny jednotlivé antibiotické disky dle seznamu v Tabulce 3. Po dalších 10-20 minutách, po přilnutí disků na povrch agaru, byly misky umístěny do termostatu dnem vzhůru a inkubovány při 35 °C po dobu 18-20 hodin.

Pro vyhodnocení citlivosti k antibiotikům byly po inkubaci změřeny průměry inhibičních zón vytvořených okolo antibiotických disků. Výsledky byly srovnány s referenčními hodnotami podle metodiky CLSI 2023 (CLSI, 2023), EUCAST 2022 (EUCAST, 2022) a EUCAST 2023 (EUCAST, 2023), které jsou uvedeny v Tabulkách 4 a 5.

Tabulka 4 Hraniční hodnoty zón inhibice antibiotik pro bakterie *Pseudomonas* spp. dle (CLSI, 2023)

Antibiotikum (ATB)	Zkratka	Obsah ATB v disku [μg]	Hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm] ^a		
			S	I	R
piperacillin-tazobactam	PIT	100/10	≥21	15-20	≤14
tikarcilin ^b	TI	75	≥ 50		≤ 18
ceftazidim ^c	CAZ	10	≥ 50		≤ 17
cefepim	CPM	30	≥18	15-17	≤14
imipenem	IPM	10	≥19	16-18	≤15
doripenem	DOR	10	≥19	16-18	≤15
ciprofloxacin	CIP	5	≥25	19-24	≤18
levofloxacin	LE	5	≥22	15-21	≤14
amikacin	AK	30	≥17	15-16	≤14
tobramycin	TOB	10	≥15	13-14	≤12

^a S – citlivý; I – intermediární; R – rezistentní; ^b zóny vyhodnoceny dle metodiky (EUCAST, 2022); ^c zóny vyhodnoceny dle metodiky (EUCAST, 2023)

Tabulka 5 Hraniční hodnoty zón inhibice antibiotik pro bakterie *Acinetobacter* spp. dle (CLSI, 2023)

Antibiotikum (ATB)	Zkratka	Obsah ATB v disku [μg]	Hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm] ^a		
			S	I	R
piperacillin-tazobactam	PIT	100/10	≥21	18-20	≤17
tikarcilin ^b	TI	75	≥ 50		≤ 18
ceftazidim ^c	CAZ	10	≥ 50		≤ 17
cefepim	CPM	30	≥18	15-17	≤14
imipenem	IPM	10	≥22	19-21	≤18
doripenem	DOR	10	≥18	15-17	≤14
ciprofloxacin	CIP	5	≥21	16-20	≤15
levofloxacin	LE	5	≥17	14-16	≤13
amikacin	AK	30	≥17	15-16	≤14
tobramycin	TOB	10	≥15	13-14	≤12

^a S – citlivý; I – intermediární; R – rezistentní; ^b zóny byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky (EUCAST, 2022); ^c zóny byly vyhodnoceny dle hraničních hodnot pro *Pseudomonas* spp. dle metodiky (EUCAST, 2023)

6.2.2 Izolace bakteriální DNA

Přečištěné přes noc narostené bakteriální kultury byly resuspendovány v 500 μl sterilní destilované vody v 1,5 ml mikrozkuvkách (Eppendorf) a důkladně zhomogenizovány vortexem. Izolace DNA byla provedena teplotní lýzou buněk vložením mikrozkuvek do termobloku vyhřátého na teplotu 100 °C a inkubací po dobu 10 minut. Po šokovém ochlazení vložením na led (5 min) byly mikrozkuvky centrifugovány (35 060 g/2 min). Vzniklý supernatant obsahující genomovou DNA byl odebrán do nových sterilních mikrozkuvek a uchován při -20 °C.

6.2.3 Detekce genů rezistence pomocí PCR

Detekce vybraných genů kódujících rezistenci k antimikrobiálním látkám byla provedena pomocí PCR z izolované DNA (viz kapitola 6.2.2). Sekvence použitých primerů je uvedena v Tabulce 7 (Baghal Asghari et al., 2021). Primery byly připraveny z lyofilizátů přidáním daného objemu PCR H₂O do finální koncentrace 100 μM . Tento zásobní roztok byl zředěn na pracovní koncentraci 10 μM .

Reakční směs byla ve sterilním PCR boxu připravena dle postupu uvedeném v Tabulce 6. V 1,5 ml zkuvkách byly smíchány všechny komponenty mimo testovanou DNA (voda + Master-Mix + primery) pro všechny testované vzorky dohromady, přičemž množství chemikálií bylo upraveno dle jejich počtu. Reakční směs byla důkladně homogenizována pomocí vortexu, odstředěna, a po 24 μl rozplněna do PCR destičky. Do příslušných jamek bylo přidáno 2 μl bakteriální DNA. Jako negativní kontrola byla použita reakční směs bez přidané DNA. Připravená destička byla zakryta krycí fólií a umístěna do termocycleru. Parametry pro jednotlivé PCR programy jsou uvedeny v Tabulce 7 (Baghal Asghari et al., 2021).

Tabulka 6 Složení PCR reakční směsi pro jednu reakci

Komponent	Objem komponent [μl]
Master Mix	12,5
PCR H ₂ O	9,5
Primer Fw (10 μM)	1
Primer Rv (10 μM)	1
DNA	2
Celkový objem	26

Tabulka 7 Sekvence primerů a teplotní podmínky použité při PCR amplifikaci
(*Baghal Asghari et al., 2021*)

Gen	Sekvence (5'-3')	V [bp]	PCR program
bla _{SHV}	GGTGACGAACAGCTGGAGCG	108	94 °C 5 min → 40_[94 °C 60 sec, 62 °C 30 sec, 72 °C 10 sec] → 72 °C 5 min
	GAGTTCGCCGACCGTCATGC		
bla _{TEM}	GCKGCCAACTTACTTCTGACAACG	247	94 °C 5 min → 40_[94 °C 60 sec, 62 °C 30 sec, 72 °C 10 sec] → 72 °C 5 min
	CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTA		
bla _{CTX}	TGGTGAYVTGGMTBAARGGCA	175	94 °C 5 min → 35_[94 °C 45 sec, 53 °C 45 sec, 72 °C 1 min] → 72 °C 5 min
	TGGGTRAARTARGTVACCAGAA		
bla _{VIM}	GTTTGGTCGCATATCGCAAC	382	94 °C 5 min → 35_[94 °C 60 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 10 sec] → 72 °C 5 min
	AATGCGCAGCACCAGGATAG		
<i>QnrS</i>	GACGTGCTAACTTGCGTGAT	118	94 °C 5 min → 35_[94 °C 60 sec, 60 °C 30 sec, 72 °C 10 sec] → 72 °C 5 min
	TGGCATTGTTGGAAACTTGC		

V – velikost amplikonu

Vizuální detekce byla následně provedena pomocí gelové elektroforézy. Elektroforéza byla provedena v 1,5% (w/v) agarózovém gelu 50 minut při 90 V/400 mA. Příprava elektroforetického gelu je popsána v následující kapitole 6.2.3.1.

6.2.3.1 Gelová elektroforéza

Vizualizace jednotlivých produktů PCR byla provedena gelovou elektroforézou. Byl připraven 1,5% agarózový gel rozpuštěním 1,5 g agarózy ve 100 ml 1M TBE pufru. Agaróza byla důkladně povařena v mikrovlnné troubě při maximálním výkonu do vzniku homogenní směsi. Získaná směs byla ochlazená na teplotu přibližně 60 °C a bylo do ní přidáno 5 µl interkalačního barviva ethidiumbromidu (10 mg/ml). Promíchaná směs byla vlita do připravené formy s příslušným počtem hřebíků a případné bubliny byly odstraněny sterilní špičkou. Po zatuhnutí gelu (20-30 minut) byl gen umístěn do elektroforetické vany s 1M TBE pufrém a byly opatrně vyjmuty hřebíčky. Do jednotlivých jamek bylo pipetováno 3 µl PCR produktu smíchaného se 2 µl loadovací barvičky, přičemž do první jamky na začátek každé řady bylo přidáno 3 µl hmotnostního standardu (100 bp) a na konec vždy pozitivní a negativní kontrola pro správnou detekci daného genu. Jako pozitivní kontrola byl použit produkt reakce s potvrzenou přítomností daného genu, jako negativní kontrola byla použita reakční směs bez přidané DNA. Samotná elektroforéza probíhala při napětí 90 V/400 mA po dobu 50 minut. Po dokončení byl gel vložen do fotodokumentačního zařízení Azure c600 Gel Imaging System, zdokumentován a vyhodnocen.

7 VÝSLEDKY

7.1 Selektivní kultivace mikroorganismů

Kultivací na třech selektivně diagnostických půdách (*Pseudomonas* agar, PA; Leeds *Acinetobacter* agar, AA a *Vibrio* agar, VA) bylo ze 30 primárních vzorků získáno celkem 126 izolátů rostoucích na použitých půdách (PA n=62, AA n=34, VA n=30). Po provedení Gramova barvení byly gramnegativní vzorky odeslány k druhové identifikaci pomocí MALDI-TOF. Po získání výsledků byly pro další zpracování vybrány pouze gramnegativní bakterie tyčinkovité morfologie mimo enterobakterie. K takto získaným izolátům byly přidány izoláty studentky Pavlína Píšové izolované v rámci její diplomové práce zabývající se enterobakteriemi. Celkem bylo tedy zpracováno 75 izolátů gramnegativních tyčinek (mimo enterobakterie), konkrétně *Pseudomonas* spp. (n=48), *Acinetobacter* spp. (n=11), *Brevundimonas* sp. (n=16). Počet izolátů rozdělených dle bakteriálního rodu a původu izolátu je uveden v Tabulce 8. Počet izolátů dle původu vzorku pro jednotlivé bakteriální rody je uveden v Tabulce 9.

Tabulka 8 Počet izolátů rozdělený podle bakteriálního rodu a původu izolátu

Bakteriální rod	Původ	Počet vzorků ^a	Počet izolátů	Celkem izolátů
<i>Pseudomonas</i>	Čerstvé maso	7 (70 %)	16	48
	Stěr z břicha a okolí kloaky	4 (40 %)	6	
	Chladicí voda při porážce	5 (100 %)	16	
	Napájecí voda vč. sedimentu	4 (80 %)	10	
<i>Acinetobacter</i>	Čerstvé maso	2 (20 %)	2	11
	Stěr z břicha a okolí kloaky	5 (50 %)	7	
	Chladicí voda při porážce	1 (20 %)	2	
	Napájecí voda vč. sedimentu	0	0	
<i>Brevundimonas</i>	Čerstvé maso	1 (10 %)	1	16
	Stěr z břicha a okolí kloaky	3 (30 %)	3	
	Chladicí voda při porážce	5 (100 %)	9	
	Napájecí voda vč. sedimentu	2 (40 %)	3	
Celkem				75

a – počet vzorků, ze kterých byl izolován alespoň jeden izolát

Počet izolátů získaných z jednotlivých vzorků byl rozdílný vzhledem k jejich původu. Bakterií rodu *Pseudomonas* se podařilo vyizolovat ze sedmi různých vzorků čerstvého masa (7/10, 70 %) celkem 16 izolátů, přičemž ze vzorků byl získán jeden až čtyři izoláty. Z deseti vzorků stěrů z břicha a okolí kloaky kachen bylo získáno 6 izolátů ze 4 vzorků (4/10, 40 %). Ze vzorků chladicí vody byl získán alespoň jeden izolát *Pseudomonas* spp. z každého vzorku (100 %), celkem 16. Z pěti vzorků napájecí vody včetně sedimentu byl získán alespoň jeden izolát ze čtyř vzorků (4/5, 80 %), celkem jich bylo získáno 10.

Izoláty rodu *Acinetobacter* byly získány ze dvou vzorků čerstvého masa (2/10, 20 %) po jednom izolátu. Pět vzorků stěrů peří poskytlo celkem sedm izolátů (5/10, 50 %), odebraná chladicí voda při porážce obsahovala dva izoláty pouze v jednom vzorku (1/5, 20 %) a izolát rodu *Acinetobacter* se nepodařilo získat ani z jednoho vzorku napájecí vody.

Po jednom izolátu *Brevundimonas* spp. bylo získáno z jednoho vzorku čerstvého masa (1/10, 10 %) a tří různých vzorků stěrů z peří (3/10, 30 %). Izoláty byly získány z každého vzorku chladicí vody při porážce (5/5, 100 %), celkem jich bylo získáno 9. Ve vzorcích napájecí vody byly nalezeny tři izoláty ze dvou vzorků (2/5, 40 %).

Tabulka 9 Počet izolátů dle druhu vzorku pro jednotlivé bakteriální rody

Původ vzorků (jejich počet)	Bakteriální rod	Počet vzorků ^a	Počet izolátů	Celkem izolátů
Čerstvé maso (n=10)	<i>Pseudomonas</i>	7 (70 %)	16	19
	<i>Acinetobacter</i>	2 (20 %)	2	
	<i>Brevundimonas</i>	1 (10 %)	1	
Stěr z břicha a okolí kloaky (n=10)	<i>Pseudomonas</i>	4 (40 %)	6	16
	<i>Acinetobacter</i>	5 (50 %)	7	
	<i>Brevundimonas</i>	3 (30 %)	3	
Chladicí voda při porážce (n=5)	<i>Pseudomonas</i>	5 (100 %)	16	27
	<i>Acinetobacter</i>	1 (20 %)	2	
	<i>Brevundimonas</i>	5 (100 %)	9	
Napájecí voda včetně sedimentu (n=5)	<i>Pseudomonas</i>	4 (80 %)	10	13
	<i>Acinetobacter</i>	0	0	
	<i>Brevundimonas</i>	2 (40 %)	3	
Celkem				75

a – počet vzorků, ze kterých byl izolován alespoň jeden izolát

Izolované druhy rodu *Pseudomonas* byly identifikovány pomocí metody MALDI-TOF. Ze 48 izolátů bylo do druhu zařazeno 25, ostatní byly určeny pouze do rodu.

Z identifikovaných druhů pseudomonád patřila většina do skupiny *P. fluorescens* – *P. synxantha* (n=5), *P. koreensis* (n=3), *P. fluorescens* (n=2), *P. libanensis* (n=2), *P. rhodesiae* (n=2) a *P. orientalis* (n=1). Další početnou skupinou byla skupina *P. chlororaphis* – *P. lundensis* (n=6) a *P. taetrolens* (n=1). Poslední více zastoupenou skupinou byla skupina *P. putida* – *P. putida* a *P. fulva* (po jednom izolátu). Poslední izolát byl identifikován jako *P. extremorientalis*.

Izoláty rodu *Acinetobacter* byly identifikovány pomocí metody MALDI-TOF, přičemž dva izoláty nebyly zařazeny na úroveň druhu. Ostatní izoláty byly identifikovány jako *A. calcoaceticus* (n=1), *A. guillouiae* (n=2), *A. junii* (n=3), *A. lwoffii* (n=2) a *A. pittii* (n=1).

Z 16 izolátů *Brevundimonas* spp. byly do druhu identifikovány pouze dva, a to jako *B. diminuta*, zbylé izoláty byly zařazeny pouze do rodu.

7.2 Stanovení fenotypového profilu antibiotické rezistence

Ke stanovení fenotypového profilu rezistence na antibiotika byla použita disková difuzní metoda pro zjištění rezistence k 10 antibiotikům. Jednotlivá antibiotika byla vybrána podle významu vzniku rezistence, důležitosti jejich využití v humánní a veterinární medicíně a podle dostupných hraničních hodnot ke stanovení rezistence, zejména pro bakterie rodu *Pseudomonas*. Seznam antibiotik použitých ke stanovení profilu antibiotické rezistence je uveden v Tabulce 3. Výsledky byly vyhodnoceny dle standardů CLSI a EUCAST; pro izoláty rodu *Pseudomonas* spp. jsou hraniční zóny inhibice uvedeny v Tabulce 4, pro izoláty *Acinetobacter* v Tabulce 5, izoláty *Brevundimonas* byly vyhodnoceny, na základě jejich fylogenetické příbuznosti, dle hraničních zón pro *Acinetobacter* (Tabulka 5).

7.2.1 Fenotypová rezistence u *Pseudomonas* spp.

Všechny bakteriální izoláty, které byly identifikovány jako rod *Pseudomonas*, byly citlivé na kombinovanou antibiotickou látku piperacillin-tazobactam (100 %, n=48), která patří do skupiny penicilinů. Naopak většina izolátů byla rezistentní (94 %, n=45) k antibiotiku tikarcilin, přičemž zbylé izoláty (6 %, n=3) měly zónu v intermediární oblasti, kterou EUCAST definuje jako „citlivý, zvýšená expozice“ (EUCAST, 2023).

U velkého procenta bakteriálních izolátů rodu *Pseudomonas* byla zjištěna rezistence na cefalosporiny, a to ceftazidim (rezistentní 79 %, n=38; intermediární 21 %, n=10) a cefepim (rezistentní 98 %, n=47; intermediární 2 %, n=1). Pro karbapenemová antibiotika se výsledky mezi kmeny lišily. K imipenemu bylo rezistentních 8 % izolátů (n=4) a citlivých 79 % (n=38). Naopak k doripenemu byla většina (98 %, n=47) izolátů citlivých, jeden izolát byl rezistentní (2 %). Fluorochinolonová antibiotika poskytla u většiny izolátů citlivou fenotypovou odpověď, všechny izoláty byly citlivé k ciprofloxacinu (n=48) a 94 % z nich bylo citlivé k levofloxacinu (n=45). Všechny izoláty byly citlivé k antibiotikům patřícím do skupiny aminoglykosidů – k amikacinu a tobramycinu (100 %, n=48).

Souhrn výsledků diskové difuzní metody pro izoláty rodu *Pseudomonas* je zobrazen v Tabulce 10. Procentuální zastoupení fenotypů testovaných izolátů je uvedeno na Obrázku 7.

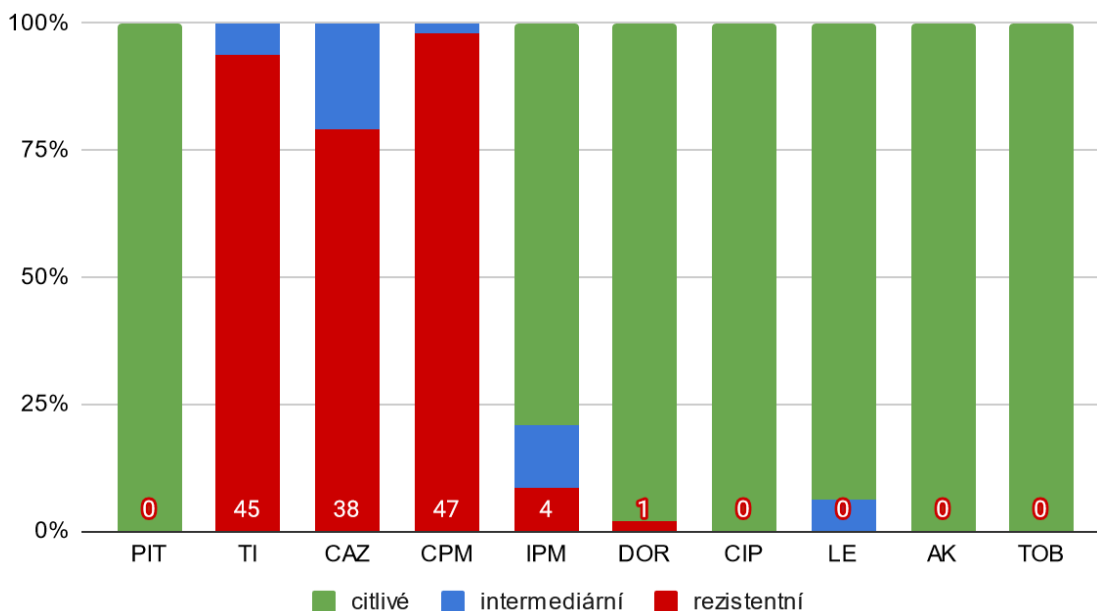
Tabulka 10 Profil antibiotické rezistence u izolátů *Pseudomonas* spp.

Hodnota v buňce udává průměr zóny inhibice [mm]. Červená barva značí rezistentní izoláty, modrá barva intermediární, pole bez barvy citlivé. Zkratky jednotlivých antibiotik a hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm] jsou uvedeny v Tabulce 4.

Zdroj	Označení izolátu	Identifikace MALDI	Profil antibiotické rezistence									
			PIT	TI	CAZ	CPM	IPM	DOR	CIP	LE	AK	TOB
Čerstvé maso	PA_M1	<i>P. libanensis</i>	40	0	0	0	12	44	42	20	20	48
	PA_M3A	<i>Pseudomonas</i> sp.	32	0	12	0	20	30	33	26	34	33
	PA_M3B	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	0	0	0	15	33	37	29	33	32
	PA_M3C	<i>Pseudomonas</i> sp.	32	0	16	0	20	31	31	26	35	33
	PA_M5A	<i>P. rhodesiae</i>	28	0	8	0	20	31	38	28	32	31
	PA_M5B	<i>P. lundensis</i>	30	10	12	0	34	34	26	22	32	30
	PA_M6A	<i>P. synxantha</i>	32	0	8	0	16	31	33	26	33	33
	PA_M6B	<i>Pseudomonas</i> sp.	24	12	13	0	30	26	36	26	26	26
	PA_M6C	<i>P. extremorientalis</i>	27	0	9	0	17	32	38	31	17	31
	PA_M7B	<i>P. lundensis</i>	31	0	0	0	18	14	29	21	32	32
	PA_M7C	<i>P. taetrolens</i>	25	9	8	0	32	42	31	21	30	29
	PA_M8A	<i>Pseudomonas</i> sp.	32	0	16	0	17	31	31	26	34	32
	PA_M8B	<i>Pseudomonas</i> sp.	33	0	18	0	30	38	40	31	40	38
	PA_M10A	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	0	0	0	30	32	34	27	34	32
	PA_3.A	<i>P. lundensis</i>	30	12	13	0	24	29	33	28	31	29
PA_10.E	<i>P. lundensis</i>	27	13	14	0	20	28	33	28	29	29	

Pokračování Tabulky 10

Stěr z peří	PA_S3A	<i>P. fluorescens</i>	33	0	10	0	19	33	35	29	35	32
	PA_S3C	<i>P. synxantha</i>	28	0	9	0	21	32	38	31	34	31
	PA_S4A	<i>P. synxantha</i>	28	0	9	0	19	32	34	24	35	31
	PA_S4D	<i>P. ludensis</i>	38	0	10	0	38	45	33	24	43	40
	PA_S6A	<i>Pseudomonas</i> sp.	36	0	10	0	20	36	45	38	36	38
	PA_S8B	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	20	16	13	26	34	28	24	30	39
Chladicí voda při porážce	PA_Vch1A	<i>Pseudomonas</i> sp.	35	0	18	0	37	40	35	31	40	40
	PA_Vch1B	<i>P. fluorescens</i>	35	0	15	0	37	44	37	35	40	38
	PA_Vch2A	<i>P. libanensis</i>	30	0	0	0	14	37	27	42	34	37
	PA_Vch2B	<i>P. synxantha</i>	32	0	0	0	26	37	40	34	43	37
	PA_Vch2C	<i>Pseudomonas</i> sp.	32	0	0	0	20	35	37	31	38	35
	PA_Vch4B	<i>Pseudomonas</i> sp.	33	0	14	0	20	32	36	25	24	33
	PA_Vch5A	<i>Pseudomonas</i> sp.	37	0	20	0	18	36	38	34	43	39
	PA_Vch5B	<i>Pseudomonas</i> sp.	33	0	18	0	21	35	35	30	39	35
	PA_21.B	<i>P. fulva</i>	37	24	25	10	40	42	40	30	35	33
	PA_22.A	<i>P. koreensis</i>	28	0	10	0	28	36	40	31	32	30
	PA_22.B	<i>Pseudomonas</i> sp.	34	0	15	0	20	38	38	30	38	37
	PA_22.C	<i>P. synxantha</i>	34	0	11	0	17	37	46	38	38	38
	PA_22.D	<i>Pseudomonas</i> sp.	37	0	20	0	22	36	42	34	37	38
	PA_22.E	<i>Pseudomonas</i> sp.	36	0	17	0	14	36	37	33	39	37
	PA_23.B	<i>P. orientalis</i>	33	0	16	0	20	36	33	32	39	35
PA_24.A	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	15	16	0	38	33	33	28	30	28	
Napájecí voda	PA_Vn1A	<i>Pseudomonas</i> sp.	28	0	0	0	20	34	44	34	35	34
	PA_Vn1B	<i>Pseudomonas</i> sp.	40	0	0	0	46	26	47	46	46	40
	PA_Vn1C	<i>P. ludensis</i>	30	16	20	16	38	37	33	27	30	30
	PA_Vn1D	<i>Pseudomonas</i> sp.	44	31	11	0	40	46	30	39	38	42
	PA_Vn2A	<i>Pseudomonas</i> sp.	26	12	10	0	40	42	39	28	48	45
	PA_Vn2B	<i>P. koreensis</i>	32	0	0	0	32	47	45	40	40	38
	PA_Vn3A	<i>P. putida</i>	25	9	15	0	35	31	36	25	27	26
	PA_Vn3B	<i>P. rhodesiae</i>	38	0	13	0	20	40	45	40	42	37
	PA_Vn5A	<i>P. koreensis</i>	30	0	17	0	28	37	33	28	33	29
	PA_26.B	<i>Pseudomonas</i> sp.	31	13	20	13	36	43	39	32	34	30



Obrázek 7 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, *Pseudomonas* spp.

Číslo udává počet izolátů rezistentních k danému antibiotiku.

PIT – piperacillin-tazobactam, TI – tikarcilin, CAZ – ceftazidim, CPM – cefepim, IPM – imipenem, DOR – doripenem, CIP – ciprofloxacin, LE – levofloxacin, AK – amikacin, TOB – tobramycin

Nejčastěji byla tedy detekována rezistence k cefepimu (98 %, n=47), tikarcilinu (94 %, n=45) a ceftazidimu (79 %, n=38). Všechna tato antibiotika patří k betalaktamům. Rezistence ke třem a více antibiotikům byla prokázána u 77 % izolátů *Pseudomonas* spp, (n=36). Velmi nízká nebo žádná rezistence byla prokázána u všech ostatních antibiotik.

7.2.2 Fenotypová rezistence u *Acinetobacter* spp.

Pro penicilinová antibiotika vykazovaly bakteriální izoláty rodu *Acinetobacter* mírnou rezistenci na kombinaci piperacillin-tazobactam (18 %, n=2), kde byl zbytek izolátů fenotypově citlivý (82 %, n=9). Avšak vyšší podíl rezistence byl pro tikarcilin (27 %, n=3), kde ostatní izoláty vykazovaly fenotypovou odezvu v intermediární oblasti (73 %, n=8).

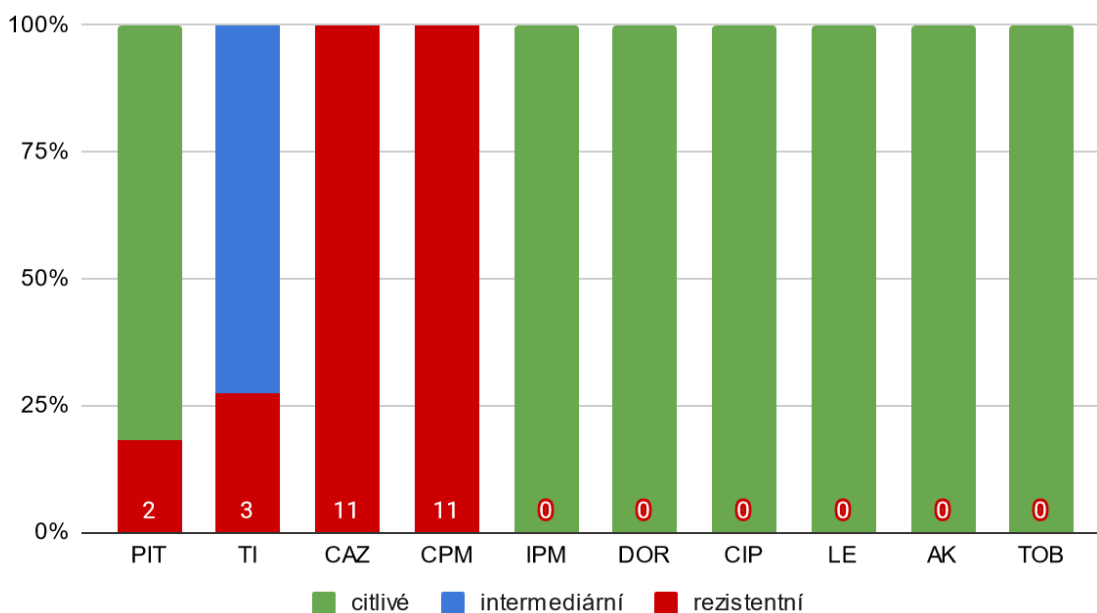
K testovaným cefalosporinovým antibiotikům (ceftazidim a cefepim) vykazovaly všechny izoláty rezistenci (100 %, n=11). Pro všechny ostatní testované antimikrobiální látky kmeny vykazovaly 100% citlivost. Rezistence ke třem a více antibiotikům byla prokázána u 27 % izolátů *Acinetobacter* spp, (n=3).

Souhrn výsledků diskové difuzní metody pro izoláty rodu *Acinetobacter* je zobrazen v Tabulce 11. Procentuální zastoupení fenotypů testovaných izolátů je uvedeno na Obrázku 8.

Tabulka 11 Profil antibiotické rezistence u izolátů *Acinetobacter* spp.

Hodnota v buňce udává průměr zóny inhibice [mm]. Červená barva značí rezistentní izoláty, modrá barva intermediární, pole bez barvy citlivé. Zkratky jednotlivých antibiotik a hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm] jsou uvedeny v Tabulce 5.

Zdroj izolátu	Označení izolátu	Identifikace MALDI	Profil antibiotické rezistence									
			PIT	TI	CAZ	CPM	IPM	DOR	CIP	LE	AK	TOB
Maso	AA_6.C	<i>A. calcoaceticus</i>	23	21	10	0	32	29	27	26	25	24
	AA_10.D	<i>A. guillouiae</i>	30	20	10	0	36	36	37	31	32	32
Stěr z peří	AA_S5A	<i>A. lwoffii</i>	0	0	0	0	33	34	33	31	27	26
	AA_S6A	<i>A. lwoffii</i>	8	9	0	0	37	24	30	27	23	23
	AA_11.D	<i>A. pittii</i>	25	25	11	0	38	33	28	27	22	24
	AA_16.D	<i>A. junii</i>	26	26	14	9	36	28	29	26	23	22
	AA_17.E	<i>Acinetobacter</i> sp.	25	25	14	9	35	23	29	26	23	22
	AA_19.C	<i>Acinetobacter</i> sp.	26	25	13	11	31	30	28	26	22	21
	AA_19.E	<i>A. junii</i>	27	25	13	10	35	30	28	26	24	22
Chladicí voda	AA_21.D	<i>A. guillouiae</i>	26	17	8	0	32	35	33	30	29	32
	AA_21.E	<i>A. junii</i>	22	26	14	11	34	33	28	26	24	22


Obrázek 8 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, *Acinetobacter* spp.

Číslo udává počet izolátů rezistentních k danému antibiotiku.

PIT – piperacillin-tazobactam, TI – tikarcilin, CAZ – ceftazidim, CPM – cefepim, IPM – imipenem, DOR – doripenem, CIP – ciprofloxacin, LE – levofloxacin, AK – amikacin, TOB – tobramycin

7.2.3 Fenotypová rezistence u *Brevundimonas* spp.

Všechny izoláty rodu *Brevundimonas* vykazovaly citlivost ke kombinaci piperacillin-tazobactam (100 %, n=16), a rezistenci k tikarcilinu (100 %, n=16). Stejně tak byly všechny rezistentní k cefalosporinovým antibiotikům ceftazidim a cefepim (100 %, n=16).

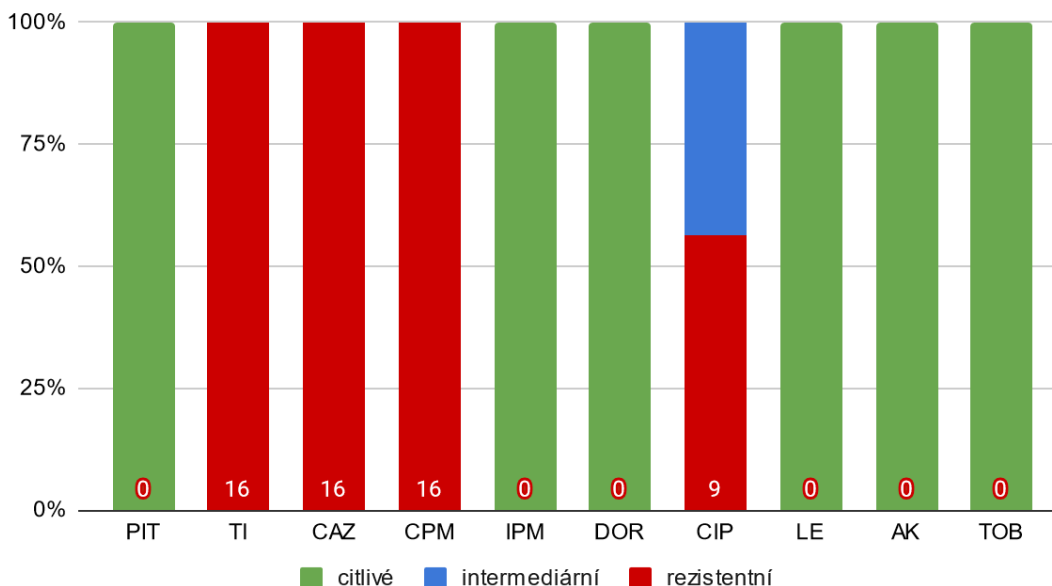
Dále byla detekována rezistence k ciprofloxacinu (56 %, n=9), ke druhému testovanému fluorochinolonovému antibiotiku byly všechny izoláty citlivé (100 %). Stejnou citlivost vykazovaly všechny izoláty také k testovaným karbapenemům (imipenem, doripenem) a aminoglykosidům (amikacin, tobramycin). Rezistence ke třem a více antibiotikům byla prokázána u všech izolátů *Brevundimonas* spp. (100 %, n=16).

Souhrn výsledků diskové difuzní metody pro izoláty rodu *Brevundimonas* je zobrazen v Tabulce 12. Procentuální zastoupení fenotypů testovaných izolátů je uvedeno na Obrázku 9.

Tabulka 12 Profil antibiotické rezistence u izolátů *Brevundimonas* spp.

Hodnota v buňce udává průměr zóny inhibice [mm]. Červená barva značí rezistentní izoláty, modrá barva intermediární, pole bez barvy citlivé. Zkratky jednotlivých antibiotik a hraniční hodnoty pro průměr zóny inhibice [mm] jsou uvedeny v Tabulce 5.

Zdroj	Označení izolátu	Identifikace MALDI	Profil antibiotické rezistence									
			PIT	TI	CAZ	CPM	IPM	DOR	CIP	LE	AK	TOB
Maso	AA_4.D	<i>Brevundimonas</i> sp.	31	13	0	0	34	26	16	22	28	26
Stěr	AA_S1A	<i>Brevundimonas</i> sp.	33	14	0	0	32	24	14	23	32	26
	AA_S6B	<i>Brevundimonas</i> sp.	29	13	0	0	36	23	16	21	33	27
	AA_S10A	<i>B. diminuta</i>	29	12	0	0	32	20	16	21	29	29
Chladičí voda	AA_Vch1A	<i>Brevundimonas</i> sp.	34	12	0	0	34	24	16	22	29	26
	AA_Vch2B	<i>Brevundimonas</i> sp.	32	12	0	0	33	31	16	24	31	30
	AA_Vch2C	<i>Brevundimonas</i> sp.	32	13	0	0	37	30	14	21	32	30
	AA_Vch3A	<i>Brevundimonas</i> sp.	32	13	0	0	35	25	18	21	35	27
	AA_Vch3B	<i>Brevundimonas</i> sp.	33	14	0	0	34	29	15	21	34	26
	AA_Vch3C	<i>B. diminuta</i>	36	13	0	0	34	28	14	24	34	31
	AA_Vch4A	<i>Brevundimonas</i> sp.	32	14	0	0	31	29	0	22	27	29
	AA_Vch5A	<i>Brevundimonas</i> sp.	33	15	0	0	34	31	12	19	29	32
	AA_Vch5B	<i>Brevundimonas</i> sp.	33	14	0	0	35	32	16	21	31	31
Napájecí voda	AA_Vn4B	<i>Brevundimonas</i> sp.	29	13	0	0	33	20	10	20	29	24
	AA_Vn5A	<i>Brevundimonas</i> sp.	29	11	0	0	33	27	0	24	33	26
	AA_Vn5B	<i>Brevundimonas</i> sp.	31	13	0	0	34	28	0	21	32	28



Obrázek 9 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, *Brevundimonas* spp.

Číslo udává počet izolátů rezistentních k danému antibiotiku.

PIT – piperacillin-tazobactam, TI – tikarcilin, CAZ – ceftazidim, CPM – cefepim, IPM – imipenem, DOR – doripenem, CIP – ciprofloxacin, LE – levofloxacin, AK – amikacin, TOB – tobramycin

7.2.4 Souhrn fenotypového profilu antibiotické rezistence

V Tabulce 13 je procentuální shrnutí rezistentních izolátů ke zkoumaným antibiotikům. Nejčastěji se u všech tří bakteriálních rodů vyskytla rezistence na tikarcilin, ceftazidim a cefepim. U izolátů *Acinetobacter* spp. a *Brevundimonas* spp. byl rezistentní fenotyp k ceftazidimu nalezen u 100 % izolátů z důvodu přítomnosti tohoto antibiotika v selektivním kultivačním médiu při izolaci ze vzorků. U *Acinetobacter* spp. se lišil podíl rezistentních izolátů k tikarcilinu (27 % oproti 94 % a 100 % u *Pseudomonas* spp. a *Brevundimonas* spp. v tomto pořadí). U těchto izolátů se také vyskytla rezistence ke kombinované látce piperacillin-tazobactam (18 %), která u ostatních rodů přítomna nebyla. Izoláty *Brevundimonas* sp. vykazovaly rezistenci k ciprofloxacinu v 56 % případů.

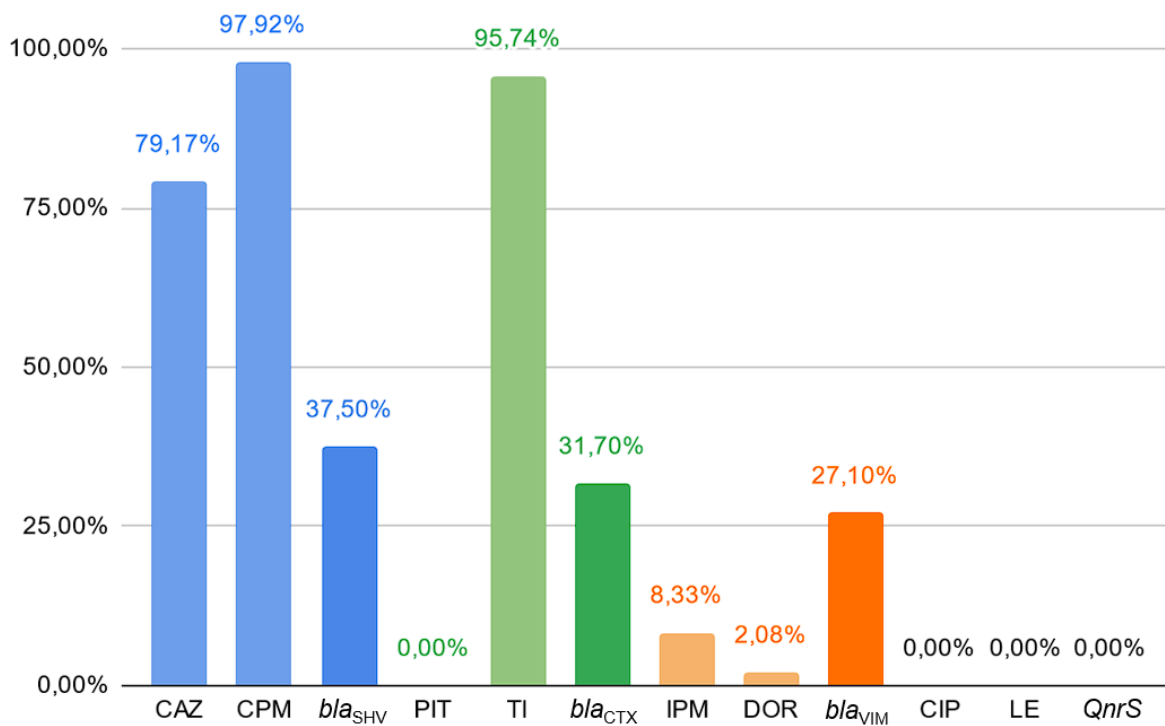
Tabulka 13 Procento rezistence u všech testovaných izolátů

Bakteriální rod	Počet izolátů	Procento rezistentních [%]									
		PIT	TI	CAZ	CPM	IPM	DOR	CIP	LE	AK	TOB
<i>Pseudomonas</i> spp.	48	0	94	79	98	6	2	0	0	0	0
<i>Acinetobacter</i> spp.	11	18	27	100	100	0	0	0	0	0	0
<i>Brevundimonas</i> sp.	16	0	100	100	100	0	0	56	0	0	0

PIT – piperacillin-tazobactam, TI – tikarcilin, CAZ – ceftazidim, CPM – cefepim, IPM – imipenem, DOR – doripenem, CIP – ciprofloxacin, LE – levofloxacin, AK – amikacin, TOB – tobramycin

7.3 Konfirmace přítomnosti genů rezistence

U všech 48 izolátů *Pseudomonas* spp. byla pomocí PCR zjišťována přítomnost vybraných genů kódujících antibiotickou rezistenci. V případě *bla* genů je rezistence podmíněna produkcí extracelulárních enzymů (betalaktamáz, cefalosporináz), které hydrolyzují molekulu betalaktamových antibiotik. Jednalo se o gen *bla_{SHV}* kódující rezistenci k cefalosporinům, *bla_{TEM}* kódující rezistenci k antibiotiku aztreonam, *bla_{CTX}* kódující rezistenci k penicilinům, *bla_{VIM}* kódující produkci karbapenemáz. Dále se jednalo o gen *QnrS* kódující rezistenci k chinolonům (Baghal Asghari et al., 2021; Munita & Arias, 2016). V souboru zkoumaných izolátů byla zjištěna přítomnost genu *bla_{SHV}* u 37,5 % (n=18), *bla_{TEM}* u 33,3 % (n=16), *bla_{CTX}* 31,3 % (n=15), *bla_{VIM}* 27,1 % (n=13). Gen *QnrS* nebyl nalezen u žádného izolátu.



Obrázek 10 Grafické porovnání fenotypových a genotypových metod záchytu AMR

Světlou barvou jsou označeny výsledky fenotypové metody, procenta udávají podíl rezistentních izolátů. Tmavou barvou jsou označeny záchyty pomocí genotypové metody v procentech.

PIT – piperacillin-tazobactam, TI – tikarcilin, CAZ – ceftazidim, CPM – cefepim, IPM – imipenem, DOR – doripenem, CIP – ciprofloxacin, LE – levofloxacin

8 DISKUZE

Žijeme v prostředí hustě osídleném mikroorganismy. Vyskytují se téměř ve všech nikách na planetě, včetně extrémních podmínek kyselých pramenů (Baker-Austin & Dopson, 2007), a radioaktivního odpadu (Jeong & Choi, 2020). Mikroorganismy jsou nezbytné pro mnoho základních kroků/pochodů v ekosystému, jako například pro recyklaci odpadních látek produkovaných živými organismy a pro rozklad organických zbytků na anorganické látky. Na druhou stranu jsou některé z nich patogenní a způsobují infekční onemocnění organismů (Sagar et al., 2023).

Obecně lze říci, že mezi dominantní kmeny komenzálních bakterií u drůbeže se řadí *Pseudomonadota* (*Proteobacteria*), *Bacillota* (*Firmicutes*), *Actinomycetota* (*Actinobacteria*) a *Bacteroidota* (*Bacteroidetes*). Mnoho z komenzálních bakteriálních rodů drůbeže je společných pro člověka, kde některé konkrétní druhy mohou figurovat jako oportunně patogenní. Mezi ně patří například druhy z čeledi *Enterobacteriaceae* (*Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, *Klebsiella* sp.) a dále také *Campylobacter* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. (Aruwa et al., 2021).

V této práci zaměřené na nefermentující gramnegativní bakterie (gramnegativní bakterie s tyčinkovitou morfologií mimo enterobakterie) byly ze vzorků drůbeže izolovány bakterie rodů *Pseudomonas*, *Acinetobacter* a *Brevundimonas*. Naopak izolován nebyl očekávaný rod *Vibrio*, vyskytující se v souvislosti s vodním prostředím.

Mezi izoláty rodu *Pseudomonas* byly v největším zastoupení nalezeny druhy patřící do skupiny *P. fluorescens* a *P. chlororaphis*, avšak patogenní druh sledovaný a zkoumaný v mnoha studiích, *P. aeruginosa*, mezi izoláty nebyl identifikován. Druhy rodu *Brevundimonas* jsou v životním prostředí všudypřítomné, ale z klinických vzorků izolovány jen zřídka (Lee et al., 2011), nicméně jejich význam se zvyšuje (Ryan & Pembroke, 2018). Druh izolovaný v rámci této práce, *B. diminuta*, byl dříve řazen mezi pseudomonády (Murray et al., 2003; Segers et al., 1994). Několik izolovaných zástupců rodu *Acinetobacter* patřilo mezi oportunně patogenní druhy (*A. junii*, *A. guillouiae*, *A. lwofii*) (Juni, 1978; Karcher & Mench, 2018), avšak známý patogen *A. baumannii* izolován nebyl.

P. aeruginosa a *A. baumannii* jsou významní zástupci nefermentujících gramnegativních patogenů, kteří jsou zodpovědní za infekce spojené se zdravotní péčí. Společně patří mezi tzv. „ESKAPE“ patogeny (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.)

(Rice, 2008), případně „ESCAPE“ patogeny (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridioides difficile*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* a *Enterobacter* spp.) (De Rosa et al., 2015). Tyto bakterie jsou častými původci život ohrožujících nozokomiálních infekcí u kriticky nemocných a imunokompromitovaných osob a vyznačují se přítomností potenciálních mechanismů rezistence vůči léčivům (De Oliveira et al., 2020; Rice, 2010).

Jak již bylo dříve v této práci uvedeno, tak šíření genů rezistence je velmi jednoduché mezi blízkými příbuznými druhy, proto pokud se vyskytne rezistence ke klinicky důležitým antibiotikům využívaným pro léčbu kritických infekčních nemocí u zástupců izolovaných z prostředí, je pouze otázkou času, kdy budou tyto geny přeneseny na patogenní druhy ohrožující zdraví lidí. V tomto jsou nejkritičtější geny rezistence nesené na mobilních genetických elementech, nejčastěji plazmidech (Michaelis & Grohmann, 2023).

8.1 Rezistence k betalaktamům – peniciliny a cefalosporiny

Většina gramnegativních bakterií je schopna produkce hydrolytických enzymů, betalaktamáz, které jsou schopny štěpit amidovou vazbu betalaktamového kruhu, což vede k inaktivaci betalaktamových antibiotik (Wright, 2005). Mezi takové patří peniciliny (piperacillin, tikarcilin) a cefalosporiny (ceftazidim, cefepim). Tato třída antibiotik blokuje biosyntézu bakteriální buněčné stěny tím, že se zaměřuje na tzv. penicilin vázající proteiny, což jsou enzymy podílející se na syntéze peptidoglykanu (Poole, 2004). Na základě substrátové specifity lze rozlišit čtyři hlavní skupiny betalaktamáz: penicilinázy, cefalosporinázy typu AmpC, betalaktamázy s rozšířeným spektrem (ESBL) a karbapenemázy. Skupina ESBL, která může hydrolyzovat všechna antibiotika betalaktamy kromě karbapenemů, tvoří největší a nejrozšířenější skupinu (Rood & Li, 2017). V této práci byla schopnost produkce betalaktamáz potvrzena fenotypovými testy rezistence.

Poměrně vysokou rezistenci vykazovaly izoláty k tikarcilinu, který je již v dnešní době častěji podáván jako kombinovaná látka s kyselinou klavulanovou (EUCAST, 2023). K tomuto antibiotiku byly rezistentní všechny izoláty *Brevundimonas* spp., 94 % izolátů *Pseudomonas* spp., avšak mezi izoláty *Acinetobacter* spp. byla rezistence k tikarcilinu prokázána pouze u 27 % z nich. Žádný z izolátů současně nebyl k tomuto antibiotiku citlivý, všechny nerezistentní izoláty byly totiž vyhodnoceny jako intermediární.

Kombinovaná látka piperacillin-tazobactam byla účinná na vyšší podíl izolátů, zřejmě právě z důvodu kombinace dvou principů účinku. Tato kombinace však nebyla účinná k téměř

pětině izolovaných bakterií rodu *Acinetobacter* (18 %), což je situace popsaná i ve studii z roku 2017, kdy navíc rozdíl citlivých izolátů k piperacillinu a jeho kombinaci s tazobactamem činil pouze přibližně 5 % (Carvalho et al., 2017).

K produkci širokospektrých betalaktamáz (ESBL) přispívá také přítomnost genu *bla_{CTX}* v genomu bakterie. Tento gen byl nalezen u 31,3 % izolátů *Pseudomonas* spp., což je výskyt srovnatelný s dalšími studiemi. V Íránu byla prokázána vyšší přítomnost tohoto genu, konkrétně varianty *bla_{CTX-M}*, u 53,19 % izolátů *Pseudomonas aeruginosa* ze syrového masa (Poursina et al., 2023), v Egyptě byla přítomnost tohoto genu potvrzena u 38 % izolátů *P. aeruginosa* z velbloudího masa (Elhariri et al., 2017) a v Jihoafrické republice u 20 % izolátů *P. aeruginosa* z neklinického prostředí (Hosu et al., 2021).

Všechny izolované rody vykazovaly vysokou rezistenci k cefalosporinovým antibiotikům. Ceftazidim patří k cefalosporinům druhé generace, které mají vyšší účinnost na gramnegativní bakterie než předchozí první generace a jsou předepisovány na středně těžké infekce, které nereagují na cefalosporiny první generace. Cefepim se řadí k cefalosporinům třetí generace, která má ze všech cefalosporinů nejvyšší účinnost na gramnegativní bakterie. Jsou využívány v léčbě středně těžkých a těžkých infekcí, nozokomiálních nákaz a infekčních komplikací závažných chorob (W. F. Marshall & Blair, 1999). U izolátů *Acinetobacter* a *Brevundimonas* byla rezistence k ceftazidimu očekávána (100 %), protože bylo tohle antibiotikum obsaženo v selektivním médiu využitém pro izolaci těchto kmenů z původních vzorků. K cefepimu byla rezistentní naprostá většina izolátů – *Acinetobacter* spp. a *Brevundimonas* spp. ve 100 % a *Pseudomonas* spp. v 98 % případů, což jsou výsledky korelující se závěry dosaženými v rámci jiných studií (Elhariri et al., 2017)

Gen *bla_{SHV}*, který kóduje enzym zprostředkující rezistenci k cefalosporinům, byl nalezen u izolátů *Pseudomonas* spp. v 37,5 % případů. Výskytem tohoto genu mimo prostředí humánní medicíny se zabývá velmi málo studií, v již výše zmíněné studii z Egypta byl gen *bla_{SHV}* nalezen u 33,3 % izolátů ze syrového velbloudího masa (Elhariri et al., 2017). Gen je však nalézán také u izolátů z humánních zdrojů, a to ve 23,08 % (Bahrami et al., 2018) nebo 38,30 % u humánních izolátů *P. aeruginosa* z nemocničního prostředí (El Aila et al., 2023). Prevalence výskytu tohoto genu u izolátů z rozdílných prostředí je tedy srovnatelná.

Rozdíl mezi četností výskytu fenotypové rezistence a potvrzené přítomnosti genu je zřejmý, což je pravděpodobně způsobeno tím, že v této práci byl sledován pouze jeden z genů kódující produkci betalaktamáz schopných štěpit cefalosporinová antibiotika. Těchto genů je více typů a pro komplexní analýzu by bylo třeba sledování přítomnosti více z nich.

8.2 Rezistence k betalaktamům – karbapenemy

Karbapenemová antibiotika (imipenem, doripenem) patří také mezi betalaktamy, avšak jsou vůči betalaktamázám stabilní a mají také nejširší terapeutické spektrum. Mají zásadní význam pro lidské zdraví a jsou často jedinými zbývajících účinnými antibiotiky pro léčbu závažných infekcí. Využívají se pro terapii život ohrožujících a nosokomiálních infekcí vyvolaných například MDR kmeny *Acinetobacter* spp., *Pseudomonas aeruginosa* a dalšími. Z tohoto důvodu jsou zařazena mezi tzv. záložní antibiotika, jejichž použití je omezeno na závažné případy (Breilh et al., 2013). U gramnegativních bakterií se stále častěji vyskytuje rezistence vůči těmto léčivům zprostředkovaná produkovanými enzymy karbapenemázami a je považována za mimořádnou hrozbu v oblasti veřejného zdraví (Morrison & Rubin, 2015). Tyto enzymy jsou schopné, podobně jako betalaktamázy, hydrolyzovat molekulu ATB (Morita et al., 2014). Kromě toho může k rezistenci pseudomonád a acinetobakterů pomoci to, že antibiotika prochází jejich vnější membránou přibližně stokrát pomaleji, než vnější membránou *Enterobacteriaceae*, což je částečně způsobeno speciálními poriny, které mohou zaujmout konformaci s velmi omezeným vstupním kanálem (Rice, 2006).

Potraviny živočišného původu jsou považovány za potenciální zdroj rezistentních organismů, ačkoli rezistence vůči karbapenemům byla zaznamenána teprve nedávno. V některých zemích (převážně v Evropě, Severní Americe, Austrálii či Japonsku) probíhají aktivní programy sledování rezistence zaměřené na potravinová zvířata a maloobchodní masné výrobky. Tyto programy se zaměřují především na hovězí, vepřové a drůbeží maso a zaměřují se výhradně na *E. coli*, salmonely, *Campylobacter* spp. a *Enterococcus* spp. Z toho důvodu tato globální strategie dozoru nezachycuje rozmanitost dostupných potravin ani neřeší přítomnost mobilních genetických prvků nesoucích geny rezistence u nepatogenních bakteriálních taxonů (Morrison & Rubin, 2015).

V souboru izolátů zkoumaných v této práci byla zachycena mírná rezistence u izolátů rodu *Pseudomonas* spp., kdy k imipenemu bylo rezistentních 6 % izolátů a k doripenemu 2 %. U acinetobakterů nebo brevundimonád nebyla fenotypová rezistence ke karbapenemům zaznamenána, což bylo zjištěno také ve studii zabývající se výskytem rezistence u acinetobakterů ze syrového krutího masa (Schmitz et al., 2023).

Některé bakterie nesoucí geny rezistence kódující produkci karbapenemázy, a v důsledku toho produkující karbapenemázy, však nedosáhnou klasifikace jako rezistentní, a to bez

ohledu na použité breakpointy. Tyhle necitlivé izoláty tedy nemusí být v některých studiích sledujících prevalenci vůbec zohledněny (Woodford et al., 2014).

V rámci zjišťování přítomnosti genových determinant rezistence v genomu izolovaných *Pseudomonas* spp. byl v této práci sledován gen *bla_{VIM}*, který byl potvrzen u 27,1 % izolátů. Tento gen není běžně sledován, avšak byl například nalezen u 19,5 % izolátů *Pseudomonas aeruginosa* z nemocničního prostředí (Khosravi & Mihani, 2008), nebo 60,0 % izolátů z nečištěné nemocniční odpadní vody (Baghal Asghari et al., 2021) a také u všech karbapenem-rezistentních pseudomonád a acinetobakterů (Aruhomukama et al., 2019). Byl také přítomen u izolátů *Pseudomonas* spp. z kuřat a jejich okolního prostředí (R. Zhang et al., 2017).

Z tohoto porovnání významného rozdílu v zachytu fenotypové a genotypové rezistence ke karbapenemům v souboru izolátů lze poznat nedostatečnost současného sledování šíření rezistence pomocí fenotypových metod. Míra získané rezistence ke karbapenemům u většiny bakteriálních druhů a ve většině zemí Evropského hospodářského prostoru (EHP) je pod prahovými hodnotami potřebnými k tomu, aby byla zaznamenána na mapách vyplývajících z monitorovacích programů, jako je EARS-Net (ECDC, 2019). V důsledku toho se téměř všechny země EHP jeví jako "zelené a bezpečné", což však zakrývá realitu, v níž skutečný počet bakteriálních izolátů produkujících karbapenemázy stoupá a epidemiologický stav těchto bakterií se postupně zhoršuje (Brolund et al., 2019).

8.3 Rezistence k betalaktamům – monobaktamy

Fenotypová rezistence k monobaktamům, mezi které patří antibiotikum aztreonam, v této studii u izolátů sledována nebyla. U izolátů rodu *Pseudomonas* však byla zjišťována přítomnost genu *bla_{TEM}*, který patří mezi geny kódující produkci ESBL betalaktamáz. Tento gen byl nalezen u 33,3 % izolátů, což je výskyt mírně vyšší, než 27,65 % (Poursina et al., 2023) a 28,5 % u izolátů ze syrového masa (Elhariri et al., 2017). Další studie zabývající se výskytem genů rezistence v humánních izolátech vykazují vyšší výskyt tohoto genu, například 40 % u neklinických izolátů (Hosu et al., 2021), 57, 29 % (Bahrami et al., 2018) a 57,6 % (El Aila et al., 2023) z klinických izolátů *P. aeruginosa*.

8.4 Rezistence k fluorochinolonům

Fluorochinolony, jako ciprofloxacin a levofloxacin, jsou syntetické antimikrobiální látky se širokým spektrem účinku. Jsou účinné proti gramnegativním i grampozitivním bakteriím,

protože mechanismem jejich účinku je zásah do replikace DNA inhibicí DNA gyrázy a topoizomerázy IV (Aldred et al., 2014). V posledních několika letech došlo v důsledku jejich širokého používání k celosvětovému rozvoji rezistence vůči fluorochinolonům (Venkataramana et al., 2022). Důležitý mechanismus rezistence k fluorochinolonům je zapříčiněn mutacemi v oblastech genů kódujících gyrázu a topoizomerázu (Bonomo & Szabo, 2006). Dalším známým mechanismem rezistence vůči fluorochinolonům je snížená intracelulární akumulace léčiva v důsledku upregulace efluxních pump nebo snížené exprese porinů vnější membrány (Hooper & Jacoby, 2015). Od roku 1998 se začaly objevovat zprávy o výskytu plazmidy zprostředkované rezistence k chinolonům, který umožňuje jejich šíření na jiné bakteriální druhy horizontálním přenosem genů (Martínez-Martínez et al., 1998). Tyto geny jsou horizontálně přenosné a označují se PMQR (z anglického plasmid mediated quinolone resistance). Patří mezi ně mimo jiné skupina genů *qnr* (*qnrA*, *qnrB* a *qnrS*), které kódují proteiny z rodiny pentapeptidových repetit, které chrání DNA gyrázu a topoizomerázu před inhibicí fluorochinolony (Rodríguez-Martínez et al., 2011).

V rámci diskové difuzní metody u izolátů rodu *Pseudomonas* a *Acinetobacter* nebyl zachycen žádný izolát rezistentní k ciprofloxacinu ani k levofloxacinu.

Tomuto fenotypu odpovídá také nulový záchyt zkoumaného genu *qnrS* u izolátů *Pseudomonas* spp. Tento gen však byl v minulosti nalezen v rámci jiných studií věnujících se izolátům z klinického prostředí, kdy byl zachycen u 14,1 % (Venkataramana et al., 2022) a 24 % (Rafiq et al., 2019) izolátů *Pseudomonas aeruginosa*, dále u 2,7 % (Saleh & Balboula, 2017) a 79,5% (El-Badawy et al., 2019) izolátů *Pseudomonas* spp.

Z izolátů rodu *Brevundimonas* nebyl žádný rezistentní k levofloxacinu, avšak 56 % izolátů bylo rezistentních k ciprofloxacinu. To může být vysvětleno na příkladu sbírkového kmene *B. diminuta* izolovaného z prostředí v 50. letech minulého století, tedy ještě před érou chinolonů, který byl rezistentní k ciprofloxacinu a intermediární k levofloxacinu, což naznačuje přirozenou rezistenci k chinolonům (Leifson & Hugh, 1954). Vnitřní rezistence k chinolonům je vzácná, ale byla zaznamenána u vodních *Aeromonas* spp. tj. u *A. caviae*, *A. hydrophila* a *A. sobria* (Goñi-Urriza et al., 2002). Kromě toho bylo zjištěno, že *B. diminuta* rozkládá chinolinové a 6-hydroxychinolinové sloučeniny, které jsou strukturálně podobné chinolonům, zejména kyselině oxolinové, který je ranou formou chinolonů (Bott & Lingens, 1991). Toto zjištění by mělo být předmětem dalšího zkoumání, zda bakterie, zejména ty přirozeně rezistentní, mohou skutečně kromě rezistence k chinolonům také tyto chinolony degradovat (Han, 2005).

8.5 Rezistence k aminoglykosidům

Aminoglykosidová antibiotika (amikacin, tobramycin) inhibují syntézu bakteriálních proteinů vazbou na ribozomální podjednotky 30S (Mingeot-Leclercq et al., 1999). Ve své struktuře obsahují aminocyklitolový kruh spojený glykosidickými vazbami s aminosacharidy a jsou běžně využívána při léčbě infekcí vyvolaných *P. aeruginosa* (Ratjen et al., 2009).

V rámci téhle práce nebyl zachycen žádný izolát rezistentní k testovaným aminoglykosidovým antibiotikům – amikacinu nebo tobramycinu. To je příznivá informace vzhledem k důležitosti tohoto antibiotika využívaného v humánní medicíně k léčbě závažných infekcí *P. aeruginosa* u pacientů se závažnými nemocemi, například cystickou fibrózou (Ratjen et al., 2009).

ZÁVĚR

Výskyt bakterií rezistentních k antibiotikům využívaným v humánní a veterinární medicíně je v životním prostředí stále častěji pozorovaným fenoménem. Je důležitý zejména z toho důvodu, že se rezistentní bakterie mohou šířit mezi jednotlivými druhy prostředí, případně rozšiřovat determinanty rezistence do dalších bakteriálních populací. To přináší riziko jak pro veterinární, tak humánní zdravotnictví, kdy je nutné mít k dispozici léčiva, která jsou schopna zastavit a léčit bakteriální infekce.

Diplomová práce se soustředila na detekci antimikrobiální rezistence u gramnegativních bakterií mimo enterobakterie izolovaných z prostředí chovu kachny pižmovky domácí z malochovu na Pardubicku. Cílem práce bylo zjistit výskyt rezistentních izolátů ve vzorcích kachního masa, stěrů z peří kachen, chladicí vody při porážce a vody z napájecích jezírek, včetně sedimentu, a otestovat jejich citlivost k řadě klinicky významných antibiotik včetně posouzení přítomnosti vybraných genů kódujících rezistenci. Ze třiceti původních vzorků bylo izolováno 75 izolátů, z čehož 48 bylo identifikováno jako *Pseudomonas* spp., 11 jako *Acinetobacter* spp. a 16 jako *Brevundimonas* spp. V rámci studie byla zjištěna různá míra zastoupení bakteriálních druhů v jednotlivých typech vzorků, kdy nejvyšší procentuální záchyt byl zjištěn u bakterií rodu *Pseudomonas*. Fenotypovým testováním citlivosti k významným antimikrobiálním látkám byla prokázána vysoká míra rezistence izolátů z prostředí drůbežního chovu, které vykazovaly sníženou citlivost ke třem a více antibiotikům. Multirezistence byla zjištěna u 76,6 % izolátů *Pseudomonas* spp., 27,3 % izolátů *Acinetobacter* spp. a 100 % izolátů *Brevundimonas* spp. Nejčastěji se vyskytovala rezistence k cefalosporinovým antibiotikům ceftazidimu a cefepimu a dále k penicilinovému antibiotiku tikarcilinu. U izolátů rodu *Brevundimonas* byla významná rezistence k fluorochinolonovému antibiotiku ciprofloxacinu. Genotypovým zjištěním přítomnosti genů rezistence u izolátů *Pseudomonas* spp. byla potvrzena přítomnost genů kódujících rezistenci k betalaktamovým antibiotikům (*bla_{SHV}*, *bla_{TEM}*, *bla_{CTX}*, *bla_{VIM}*) vždy přibližně u třetiny izolátů, gen chinolonové rezistence (*QnrS*) nebyl zjištěn u žádného izolátu.

Výsledky diplomové práce prokázaly, že se bakterie rezistentní k významným antibiotikům vyskytují také u bakterií izolovaných z malých chovů drůbeže. Přestože se práce zabývá pouze malým souborem vzorků a pro důkladnější porozumění problému by bylo vhodné využít dalších metod, získaná data ukazují důležitost vědomého používání antimikrobiálních látek v celém potravním řetězci, aby jejich dopad na životní prostředí a také lidské zdraví nebyl vysokým rizikem.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alcock, B. P., Raphenya, A. R., Lau, T. T. Y., Tsang, K. K., Bouchard, M., Edalatmand, A., Huynh, W., Nguyen, A.-L. V., Cheng, A. A., Liu, S., Min, S. Y., Miroshnichenko, A., Tran, H.-K., Werfalli, R. E., Nasir, J. A., Oloni, M., Speicher, D. J., Florescu, A., Singh, B., ... McArthur, A. G. (2019). CARD 2020: Antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database. *Nucleic Acids Research*, gkz935. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz935>
- Alders, R. G., Dumas, S. E., Rukambile, E., Magoke, G., Maulaga, W., Jong, J., & Costa, R. (2018). Family poultry: Multiple roles, systems, challenges, and options for sustainable contributions to household nutrition security through a planetary health lens. *Maternal & Child Nutrition*, 14, e12668. <https://doi.org/10.1111/mcn.12668>
- Aldred, K. J., Kerns, R. J., & Osheroff, N. (2014). Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry*, 53(10), 1565–1574. <https://doi.org/10.1021/bi5000564>
- Allen, H. K., Donato, J., Wang, H. H., Cloud-Hansen, K. A., Davies, J., & Handelsman, J. (2010). Call of the wild: Antibiotic resistance genes in natural environments. *Nature Reviews Microbiology*, 8(4), 251–259. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>
- Aruhomukama, D., Najjuka, C. F., Kajumbula, H., Okee, M., Mboowa, G., Sserwadda, I., Mayanja, R., Joloba, M. L., & Kateete, D. P. (2019). BlaVIM- and blaOXA-mediated carbapenem resistance among *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from the Mulago hospital intensive care unit in Kampala, Uganda. *BMC Infectious Diseases*, 19(1), 853. <https://doi.org/10.1186/s12879-019-4510-5>
- Aruwa, C. E., Pillay, C., Nyaga, M. M., & Sabiu, S. (2021). Poultry gut health – microbiome functions, environmental impacts, microbiome engineering and advancements in characterization technologies. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 12(1), 119. <https://doi.org/10.1186/s40104-021-00640-9>
- Baghal Asghari, F., Dehghani, M. H., Dehghanzadeh, R., Farajzadeh, D., Yaghmaeian, K., Mahvi, A. H., & Rajabi, A. (2021). Antibiotic resistance and antibiotic-resistance genes of *Pseudomonas* spp. And *Escherichia coli* isolated from untreated hospital wastewater. *Water Science and Technology*, 84(1), 172–181. <https://doi.org/10.2166/wst.2021.207>
- Bahrami, M., Mmohammadi-Sichani, M., & Karbasizadeh, V. (2018). Prevalence of *SHV*, *TEM*, *CTX-M* and *OXA-48* β -Lactamase Genes in Clinical Isolates of *Pseudomonas*

- aeruginosa in Bandar-Abbas, Iran. *Avicenna Journal of Clinical Microbiology and Infection*, 5(4), 86–90. <https://doi.org/10.34172/ajcmi.2018.18>
- Baker-Austin, C., & Dopson, M. (2007). Life in acid: PH homeostasis in acidophiles. *Trends in Microbiology*, 15(4), 165–171. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2007.02.005>
- Bhullar, K., Waglechner, N., Pawlowski, A., Koteva, K., Banks, E. D., Johnston, M. D., Barton, H. A., & Wright, G. D. (2012). Antibiotic Resistance Is Prevalent in an Isolated Cave Microbiome. *PLoS ONE*, 7(4), e34953. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034953>
- Bonomo, R. A., & Szabo, D. (2006). Mechanisms of Multidrug Resistance in *Acinetobacter* Species and *Pseudomonas aeruginosa*. *Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement_2), S49–S56. <https://doi.org/10.1086/504477>
- Bott, G., & Lingens, F. (1991). Microbial Metabolism of Quinoline and Related Compounds. IX. Degradation of 6-Hydroxyquinoline and Quinoline by *Pseudomonas diminuta* 31/1 Fa1 and *Bacillus circulans* 31/2 A1. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler*, 372(1), 381–384. <https://doi.org/10.1515/bchm3.1991.372.1.381>
- Breilh, D., Texier-Maugein, J., Allaouchiche, B., Saux, M.-C., & Boselli, E. (2013). Carbapenems. *Journal of Chemotherapy*, 25(1), 1–17. <https://doi.org/10.1179/1973947812Y.0000000032>
- Brolund, A., Lagerqvist, N., Byfors, S., Struelens, M. J., Monnet, D. L., Albiger, B., Kohlenberg, A., & European Antimicrobial Resistance Genes Surveillance Network (EURGen-Net) capacity survey group. (2019). Worsening epidemiological situation of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in Europe, assessment by national experts from 37 countries, July 2018. *Eurosurveillance*, 24(9). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.9.1900123>
- Burckhardt, I., & Zimmermann, S. (2011). Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry To Detect Carbapenem Resistance within 1 to 2.5 Hours. *Journal of Clinical Microbiology*, 49(9), 3321–3324. <https://doi.org/10.1128/JCM.00287-11>
- Canica, M., Manageiro, V., Jones-Dias, D., Clemente, L., Gomes-Neves, E., Poeta, P., Dias, E., & Ferreira, E. (2015). Current perspectives on the dynamics of antibiotic resistance in different reservoirs. *Research in Microbiology*, 166(7), 594–600. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2015.07.009>

- Carvalho, A., Casquete, R., Silva, J., & Teixeira, P. (2017). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* spp. Isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*, *243*, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.001>
- Catry, B., Laevens, H., Devriese, L. A., Opsomer, G., & de Kruif, A. (2003). Antimicrobial resistance in livestock: *Antimicrobial resistance. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, *26*(2), 81–93. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2885.2003.00463.x>
- Ciofu, O., Moser, C., Jensen, P. Ø., & Høiby, N. (2022). Tolerance and resistance of microbial biofilms. *Nature Reviews Microbiology*, *20*(10), 621–635. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00682-4>
- CLSI. (2023). *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 33rd ed. CLSI supplement M100*. Clinical and Laboratory Standards Institute, USA. ISBN 978-1-68440-171-0 [Electronic]
- Danziger, L. H., & Pendland, S. L. (1995). Bacterial resistance to β -lactam antibiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, *52*(suppl_2), S3–S8. https://doi.org/10.1093/ajhp/52.6_Suppl_2.S3
- Darby, E. M., Trampari, E., Siasat, P., Gaya, M. S., Alav, I., Webber, M. A., & Blair, J. M. A. (2022). Molecular mechanisms of antibiotic resistance revisited. *Nature Reviews Microbiology*. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00820-y>
- Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *74*(3), 417–433. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00016-10>
- D’Costa, V. M., King, C. E., Kalan, L., Morar, M., Sung, W. W. L., Schwarz, C., Froese, D., Zazula, G., Calmels, F., Debruyne, R., Golding, G. B., Poinar, H. N., & Wright, G. D. (2011). Antibiotic resistance is ancient. *Nature*, *477*(7365), 457–461. <https://doi.org/10.1038/nature10388>
- De Oliveira, D. M. P., Forde, B. M., Kidd, T. J., Harris, P. N. A., Schembri, M. A., Beatson, S. A., Paterson, D. L., & Walker, M. J. (2020). Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. *Clinical Microbiology Reviews*, *33*(3), e00181-19. <https://doi.org/10.1128/CMR.00181-19>
- De Rosa, F. G., Corcione, S., Pagani, N., & Di Perri, G. (2015). From ESKAPE to ESCAPE, From KPC to CCC. *Clinical Infectious Diseases*, *60*(8), 1289–1290. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu1170>

- Deak, T., Farkas, J., & Beczner, J. (2012). Microbiology of thermally preserved foods canning and novel physical methods. *Acta Alimentaria*, 41(4), 513–514. <https://doi.org/10.1556/AAlim.41.2012.4.13>
- Dibner, J. J., & Richards, J. D. (2005). Antibiotic growth promoters in agriculture: History and mode of action. *Poultry Science*, 84(4), 634–643. <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>
- Dönhöfer, A., Franckenberg, S., Wickles, S., Berninghausen, O., Beckmann, R., & Wilson, D. N. (2012). Structural basis for TetM-mediated tetracycline resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(42), 16900–16905. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208037109>
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193. <https://doi.org/10.1128/CMR.15.2.167-193.2002>
- ECDC. (2016). *EU Protocol for Harmonised Monitoring of Antimicrobial Resistance in Human Salmonella and Campylobacter Isolates*.
- ECDC. (2019). *Antimicrobial Resistance in the EU/EEA (EARS-Net)—Annual Epidemiological Report for 2019*. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/surveillance-antimicrobial-resistance-Europe-2019.pdf>
- EFSA & ECDC. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>
- EFSA & ECDC. (2020). The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018. *EFSA Journal*, 18(3). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6007>
- El Aila, N. A., Al Laham, N. A., & Ayesh, B. M. (2023). Prevalence of extended spectrum beta lactamase and molecular detection of blaTEM, blaSHV and blaCTX-M genotypes among Gram negative bacilli isolates from pediatric patient population in Gaza strip. *BMC Infectious Diseases*, 23(1), 99. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08017-1>
- El-Badawy, M. F., Alrobaian, M. M., Shohayeb, M. M., & Abdelwahab, S. F. (2019). Investigation of six plasmid-mediated quinolone resistance genes among clinical isolates of pseudomonas: A genotypic study in Saudi Arabia. *Infection and Drug Resistance*, Volume 12, 915–923. <https://doi.org/10.2147/IDR.S203288>

- Elhariri, M., Hamza, D., Elhelw, R., & Dorgham, S. M. (2017). Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* in camel in Egypt: Potential human hazard. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0197-x>
- Elwinger, K., Fisher, C., Jeroch, H., Sauveur, B., Tiller, H., & Whitehead, C. C. (2016). A brief history of poultry nutrition over the last hundred years. *World's Poultry Science Journal*, 72(4), 701–720. <https://doi.org/10.1017/S004393391600074X>
- EPRS. (2019). *The EU poultry meat and egg sector: Main features, challenges and prospects*. EPRS: European Parliamentary Research Service. <https://policycommons.net/artifacts/1337506/the-eu-poultry-meat-and-egg-sector/1945404/>
- EUCAST. (2022). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 12.0. 11*. <https://www.eucast.org>
- EUCAST. (2023). *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 13.0. 12*. <https://www.eucast.org>
- EUR-Lex. (2003). *SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY 2003/99/ES ze dne 17. Listopadu 2003 o sledování zoonóz a jejich původců, o změně rozhodnutí Rady 90/424/EHS a o zrušení směrnice Rady 92/117/EHS*.
- EUR-Lex. (2004). *Nářízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003 ze dne 22. Záře 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat*. Úřední věstník Evropské unie.
- European Commission. (2017). *A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*. https://health.ec.europa.eu/system/files/2020-01/amr_2017_action-plan_0.pdf
- FAO. (2016). *The FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020*.
- FAO. (2023). *Gateway to poultry production and products*. Food and Agriculture Organisation of the United Nations. <https://www.fao.org/poultry-production-products/production/production-systems/family-poultry-production/en/>
- FAO, International Fund for Agricultural Development, & KYEEMA Foundation (Ed.). (2014). *Decision tools for family poultry development*. Food and Agriculture Organization of the United Nations in collaboration with the International Fund for Agricultural Development and KYEEMA Foundation.

- FAO, Sonaiya, E. B., & Swan, S. E. J. (2004). *Small-scale poultry production: Technical guide*. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Favaro, L., & Todorov, S. D. (2017). Bacteriocinogenic LAB Strains for Fermented Meat Preservation: Perspectives, Challenges, and Limitations. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 9(4), 444–458. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9330-6>
- FDA. (2017). *NARMS 2017 Animal Pathogen AMR Data*. Food and Drug Administration (FDA). <https://www.fda.gov/animal-veterinary/national-antimicrobial-resistance-monitoring-system/animal-pathogen-amr-data>
- Gajewska, J., Chajęcka-Wierzchowska, W., Byczkowska-Rostkowska, Z., & Saki, M. (2023). Biofilm Formation Capacity and Presence of Virulence Determinants among Enterococcus Species from Milk and Raw Milk Cheeses. *Life*, 13(2), 495. <https://doi.org/10.3390/life13020495>
- García-Díez, J., & Saraiva, C. (2021). Use of Starter Cultures in Foods from Animal Origin to Improve Their Safety. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(5), 2544. <https://doi.org/10.3390/ijerph18052544>
- Gill, F., Donsker, D., & Rasmussen, P. (2022). *IOC World Bird List 12.1* [Data set]. World Bird Names. <https://doi.org/10.14344/IOC.ML.12.1>
- Goñi-Urriza, M., Arpin, C., Capdepu, M., Dubois, V., Caumette, P., & Quentin, C. (2002). Type II Topoisomerase Quinolone Resistance-Determining Regions of *Aeromonas caviae*, *A. hydrophila*, and *A. sobria* Complexes and Mutations Associated with Quinolone Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46(2), 350–359. <https://doi.org/10.1128/AAC.46.2.350-359.2002>
- Gyles, C. L. (2008). Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Animal Health Research Reviews*, 9(2), 149–158. <https://doi.org/10.1017/S1466252308001552>
- Han, X. Y. (2005). *Brevundimonas diminuta* infections and its resistance to fluoroquinolones. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 55(6), 853–859. <https://doi.org/10.1093/jac/dki139>
- Hedman, H. D., Vasco, K. A., & Zhang, L. (2020). A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *Animals*, 10(8), 1264. <https://doi.org/10.3390/ani10081264>
- Hooper, D. C., & Jacoby, G. A. (2015). Mechanisms of drug resistance: Quinolone resistance: Mechanisms of quinolone resistance. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1354(1), 12–31. <https://doi.org/10.1111/nyas.12830>

- Hosu, M. C., Vasaikar, S., Okuthe, G. E., & Apalata, T. (2021). Molecular Detection of Antibiotic-Resistant Genes in *Pseudomonas aeruginosa* from Nonclinical Environment: Public Health Implications in Mthatha, Eastern Cape Province, South Africa. *International Journal of Microbiology*, 2021, 1–9. <https://doi.org/10.1155/2021/8861074>
- Hudson, J. A., Frewer, L. J., Jones, G., Brereton, P. A., Whittingham, M. J., & Stewart, G. (2017). The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science & Technology*, 69, 131–147. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.09.007>
- Husnik, F., & McCutcheon, J. P. (2018). Functional horizontal gene transfer from bacteria to eukaryotes. *Nature Reviews Microbiology*, 16(2), 67–79. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.137>
- Ismoyowati, & Sumarmono, J. (2019). Duck Production for Food Security. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, 372(1), 012070. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/372/1/012070>
- Jalaludeen, A., Churchil, R. R., & Baéza, E. (Ed.). (2022). *Duck Production and Management Strategies*. Springer Nature Singapore. <https://doi.org/10.1007/978-981-16-6100-6>
- Jans, C., Sarno, E., Collineau, L., Meile, L., Stärk, K. D. C., & Stephan, R. (2018). Consumer Exposure to Antimicrobial Resistant Bacteria From Food at Swiss Retail Level. *Frontiers in Microbiology*, 9, 362. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00362>
- Jeong, S.-W., & Choi, Y. J. (2020). Extremophilic Microorganisms for the Treatment of Toxic Pollutants in the Environment. *Molecules*, 25(21), 4916. <https://doi.org/10.3390/molecules25214916>
- Jian, Z., Zeng, L., Xu, T., Sun, S., Yan, S., Yang, L., Huang, Y., Jia, J., & Dou, T. (2021). Antibiotic resistance genes in bacteria: Occurrence, spread, and control. *Journal of Basic Microbiology*, 61(12), 1049–1070. <https://doi.org/10.1002/jobm.202100201>
- Johnson, D. H., & Grier, J. W. (1988). Determinants of Breeding Distributions of Ducks. *Wildlife Monographs*, 100, 3–37.
- Jones, T. A., Waite, C. D., & Dawkins, M. S. (2009). Water off a duck's back: Showers and troughs match ponds for improving duck welfare. *Applied Animal Behaviour Science*, 116(1), 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2008.07.008>
- Juni, E. (1978). Genetics and Physiology of *Acinetobacter*. *Annual Review of Microbiology*, 32(1), 349–371. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.32.100178.002025>

- Karcher, D. M., & Mench, J. A. (2018). Overview of commercial poultry production systems and their main welfare challenges. In *Advances in Poultry Welfare* (s. 3–25). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100915-4.00001-4>
- Kaye, K. S., Engemann, J. J., Fraimow, H. S., & Abrutyn, E. (2004). Pathogens resistant to antimicrobial agents: Epidemiology, molecular mechanisms, and clinical management. *Infectious Disease Clinics of North America*, 18(3), 467–511. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2004.04.003>
- Khosravi, A. D., & Mihani, F. (2008). Detection of metallo- β -lactamase-producing *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from burn patients in Ahwaz, Iran. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(1), 125–128. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2007.08.003>
- Lahiri, D., Nag, M., Sarkar, T., Ray, R. R., Shariati, M. A., Rebezov, M., Bangar, S. P., Lorenzo, J. M., & Domínguez, R. (2022). Lactic Acid Bacteria (LAB): Autochthonous and Probiotic Microbes for Meat Preservation and Fortification. *Foods*, 11(18), 2792. <https://doi.org/10.3390/foods11182792>
- Larsson, D. G. J., & Flach, C.-F. (2022). Antibiotic resistance in the environment. *Nature Reviews Microbiology*, 20(5), 257–269. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>
- Laxminarayan, R., Van Boeckel, T., & Teillant, A. (2015). *The Economic Costs of Withdrawing Antimicrobial Growth Promoters from the Livestock Sector* (OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers Č. 78; OECD Food, Agriculture and Fisheries Papers, Roč. 78). <https://doi.org/10.1787/5js64kst5wv1-en>
- Lee, M. R., Huang, Y. T., Liao, C. H., Chuang, T. Y., Lin, C. K., Lee, S. W., Lai, C. C., Yu, C. J., & Hsueh, P. R. (2011). Bacteremia caused by *Brevundimonas* species at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000–2010. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 30(10), 1185–1191. <https://doi.org/10.1007/s10096-011-1210-5>
- Leifson, E., & Hugh, R. (1954). A New Type of Polar Monotrichous Flagellation. *Journal of General Microbiology*, 10(1), 68–70. <https://doi.org/10.1099/00221287-10-1-68>
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. *International Journal of Food Microbiology*, 55(1–3), 181–186. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00161-6)
- Li, W., Atkinson, G. C., Thakor, N. S., Allas, Ü., Lu, C., Chan, K.-Y., Tenson, T., Schulten, K., Wilson, K. S., Hauryliuk, V., & Frank, J. (2013). Mechanism of tetracycline

- resistance by ribosomal protection protein Tet(O). *Nature Communications*, 4(1), 1477. <https://doi.org/10.1038/ncomms2470>
- Li, Y., Xiao, P., Wang, Y., & Hao, Y. (2020). Mechanisms and Control Measures of Mature Biofilm Resistance to Antimicrobial Agents in the Clinical Context. *ACS Omega*, 5(36), 22684–22690. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c02294>
- Liste, G., Kirkden, R. D., & Broom, D. M. (2012). A commercial trial evaluating three open water sources for farmed ducks: Effects on health and production. *British Poultry Science*, 53(5), 576–584. <https://doi.org/10.1080/00071668.2012.736613>
- Ljungh, A., & Wadström, T. (2006). Lactic acid bacteria as probiotics. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, 7(2), 73–89.
- Mader, R., Damborg, P., Amat, J.-P., Bengtsson, B., Bourély, C., Broens, E. M., Busani, L., Crespo-Robledo, P., Filippitzi, M.-E., Fitzgerald, W., Kaspar, H., Madero, C. M., Norström, M., Nykäsenoja, S., Pedersen, K., Pokludova, L., Urdahl, A. M., Vatopoulos, A., Zafeiridis, C., ... on behalf of EU-JAMRAI. (2021). Building the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in veterinary medicine (EARS-Vet). *Eurosurveillance*, 26(4). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.4.2001359>
- Mader, R., EU-JAMRAI, Demay, C., Jouvin-Marche, E., Ploy, M.-C., Barraud, O., Bernard, S., Lacotte, Y., Pulcini, C., Weinbach, J., Berling, C., Bouqueau, M., Hlava, A., Habl, C., Kernstock, E., Strauss, R., Muchl, R., Buhmann, V., Versporten, A., ... Madec, J.-Y. (2022). Defining the scope of the European Antimicrobial Resistance Surveillance network in Veterinary medicine (EARS-Vet): A bottom-up and One Health approach. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 77(3), 816–826. <https://doi.org/10.1093/jac/dkab462>
- Mader, R., Muñoz Madero, C., Aasmäe, B., Bourély, C., Broens, E. M., Busani, L., Callens, B., Collineau, L., Crespo-Robledo, P., Damborg, P., Filippitzi, M.-E., Fitzgerald, W., Heuvelink, A., van Hout, J., Kaspar, H., Norström, M., Pedersen, K., Pohjanvirta, T., Pokludova, L., ... Amat, J.-P. (2022). Review and Analysis of National Monitoring Systems for Antimicrobial Resistance in Animal Bacterial Pathogens in Europe: A Basis for the Development of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network in Veterinary Medicine (EARS-Vet). *Frontiers in Microbiology*, 13, 838490. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.838490>
- Manafi, L., Aliakbarlu, J., & Dastmalchi Saei, H. (2020). Antibiotic resistance and biofilm formation ability of *Salmonella* serotypes isolated from beef, mutton, and meat

- contact surfaces at retail. *Journal of Food Science*, 85(8), 2516–2522.
<https://doi.org/10.1111/1750-3841.15335>
- Marshall, C. G., Lessard, I. A. D., Park, I.-S., & Wright, G. D. (1998). Glycopeptide Antibiotic Resistance Genes in Glycopeptide-Producing Organisms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(9), 2215–2220.
<https://doi.org/10.1128/AAC.42.9.2215>
- Marshall, K. L. A., & Gluckman, T.-L. (2015). The evolution of pattern camouflage strategies in waterfowl and game birds. *Ecology and Evolution*, 5(10), 1981–1991.
<https://doi.org/10.1002/ece3.1482>
- Marshall, W. F., & Blair, J. E. (1999). The Cephalosporins. *Mayo Clinic Proceedings*, 74(2), 187–195. <https://doi.org/10.4065/74.2.187>
- Martinez, J. L. (2009). The role of natural environments in the evolution of resistance traits in pathogenic bacteria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 276(1667), 2521–2530. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0320>
- Martínez-Martínez, L., Pascual, A., & Jacoby, G. A. (1998). Quinolone resistance from a transferable plasmid. *The Lancet*, 351(9105), 797–799.
[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)07322-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)07322-4)
- Mazaheri, T., Cervantes-Huamán, B. R. H., Bermúdez-Capdevila, M., Ripolles-Avila, C., & Rodríguez-Jerez, J. J. (2021). *Listeria monocytogenes* Biofilms in the Food Industry: Is the Current Hygiene Program Sufficient to Combat the Persistence of the Pathogen? *Microorganisms*, 9(1), 181.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9010181>
- Mesa-Varona, O., Mader, R., Velasova, M., Madec, J.-Y., Granier, S. A., Perrin-Guyomard, A., Norstrom, M., Kaspar, H., Grobbel, M., Jouy, E., Anjum, M. F., & Tenhagen, B.-A. (2021). Comparison of Phenotypical Antimicrobial Resistance between Clinical and Non-Clinical *E. coli* Isolates from Broilers, Turkeys and Calves in Four European Countries. *Microorganisms*, 9(4), 678.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9040678>
- Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal Gene Transfer of Antibiotic Resistance Genes in Biofilms. *Antibiotics*, 12(2), 328.
<https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>
- Mingeot-Leclercq, M.-P., Glupczynski, Y., & Tulkens, P. M. (1999). Aminoglycosides: Activity and Resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 43(4), 727–737.
<https://doi.org/10.1128/AAC.43.4.727>

- Moellering, Jr., R. C. (1998). Antibiotic Resistance: Lessons for the Future. *Clinical Infectious Diseases*, 27(s1), S135–S140. <https://doi.org/10.1086/514902>
- Moore, P. R., Evenson, A., Luckey, T. D., McCoy, E., Elvehjem, C. A., & Hart, E. B. (1946). USE OF SULFASUXIDINE, STREPTOTHRICIN, AND STREPTOMYCIN IN NUTRITIONAL STUDIES WITH THE CHICK. *Journal of Biological Chemistry*, 165(2), 437–441. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41154-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41154-9)
- Morita, Y., Tomida, J., & Kawamura, Y. (2014). Responses of *Pseudomonas aeruginosa* to antimicrobials. *Frontiers in Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00422>
- Morrison, B. J., & Rubin, J. E. (2015). Carbapenemase Producing Bacteria in the Food Supply Escaping Detection. *PLOS ONE*, 10(5), e0126717. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126717>
- Mottet, A., de Haan, C., Falcucci, A., Tempio, G., Opio, C., & Gerber, P. (2017). Livestock: On our plates or eating at our table? A new analysis of the feed/food debate. *Global Food Security*, 14, 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2017.01.001>
- Mottet, A., & Tempio, G. (2017). Global poultry production: Current state and future outlook and challenges. *World's Poultry Science Journal*, 73(2), 245–256. <https://doi.org/10.1017/S0043933917000071>
- Munita, J. M., & Arias, C. A. (2016). Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiology Spectrum*, 4(2), 4.2.15. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>
- Murray, P. R., Baron, E. J., & American Society for Microbiology (Ed.). (2003). *Manual of clinical microbiology* (8th ed). ASM Press.
- Neu, H. C. (1992). The Crisis in Antibiotic Resistance. *Science*, 257(5073), 1064–1073. <https://doi.org/10.1126/science.257.5073.1064>
- Nhung, N., Cuong, N., Thwaites, G., & Carrique-Mas, J. (2016). Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance in Animal Production in Southeast Asia: A Review. *Antibiotics*, 5(4), 37. <https://doi.org/10.3390/antibiotics5040037>
- Nhung, N. T., Chansiripornchai, N., & Carrique-Mas, J. J. (2017). Antimicrobial Resistance in Bacterial Poultry Pathogens: A Review. *Frontiers in Veterinary Science*, 4, 126. <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00126>
- Nikaido, H. (2003). Molecular Basis of Bacterial Outer Membrane Permeability Revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(4), 593–656. <https://doi.org/10.1128/MMBR.67.4.593-656.2003>

- Nollette, K. A. (2000). Antimicrobial Resistance. *Journal of the American Academy of Nurse Practitioners*, 12(7), 286–296. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7599.2000.tb00306.x>
- OECD. (2023). *Meat consumption (indicator)* [Data set]. OECD. <https://doi.org/10.1787/fa290fd0-en>
- Olsen, A. M. (2017). Feeding ecology is the primary driver of beak shape diversification in waterfowl. *Functional Ecology*, 31(10), 1985–1995. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12890>
- Pagès, J.-M., James, C. E., & Winterhalter, M. (2008). The porin and the permeating antibiotic: A selective diffusion barrier in Gram-negative bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 6(12), 893–903. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1994>
- Pingel, H. (2011). *Waterfowl Production for Food Security*. 46(2).
- Poole, K. (2004). Resistance to β -lactam antibiotics. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61(17). <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>
- Poole, K. (2005). Efflux-mediated antimicrobial resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56(1), 20–51. <https://doi.org/10.1093/jac/dki171>
- Poursina, S., Ahmadi, M., Fazeli, F., & Ariaai, P. (2023). Assessment of virulence factors and antimicrobial resistance among the *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from animal meat and carcass samples. *Veterinary Medicine and Science*, 9(1), 315–325. <https://doi.org/10.1002/vms3.1007>
- Pyle, P. (2005). Molts and Plumages of Ducks (Anatinae). *Waterbirds*, 28(2), 208–219. [https://doi.org/10.1675/1524-4695\(2005\)028\[0208:MAPODA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1675/1524-4695(2005)028[0208:MAPODA]2.0.CO;2)
- Rafiq, K., Ahmad, K., Ahmad, N., Gohar, M., Shehzad, M. A., & Saeed, M. Q. (2019). Determination of Qnr allele frequencies in Fluoroquinolone resistant *Pseudomonas aeruginosa* isolated from burn wounds. *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*, 69(2), 250–252.
- Ratjen, F., Brockhaus, F., & Angyalosi, G. (2009). Aminoglycoside therapy against *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis: A review. *Journal of Cystic Fibrosis*, 8(6), 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2009.08.004>
- Renwick, M. J., Brogan, D. M., & Mossialos, E. (2016). A systematic review and critical assessment of incentive strategies for discovery and development of novel antibiotics. *The Journal of Antibiotics*, 69(2), 73–88. <https://doi.org/10.1038/ja.2015.98>
- Rice, L. B. (2006). Challenges in Identifying New Antimicrobial Agents Effective for Treating Infections with *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa*.

- Clinical Infectious Diseases*, 43(Supplement_2), S100–S105.
<https://doi.org/10.1086/504487>
- Rice, L. B. (2008). Federal Funding for the Study of Antimicrobial Resistance in Nosocomial Pathogens: No ESKAPE. *The Journal of Infectious Diseases*, 197(8), 1079–1081.
<https://doi.org/10.1086/533452>
- Rice, L. B. (2010). Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(S1), S7–S10.
<https://doi.org/10.1086/655995>
- Rodríguez-Martínez, J. M., Velasco, C., Pascual, Á., Cano, M. E., Martínez-Martínez, L., Martínez-Martínez, L., & Pascual, Á. (2011). Plasmid-mediated quinolone resistance: An update. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 17(2), 149–182.
<https://doi.org/10.1007/s10156-010-0120-2>
- Rood, I. G. H., & Li, Q. (2017). Review: Molecular detection of extended spectrum- β -lactamase- and carbapenemase-producing Enterobacteriaceae in a clinical setting. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 89(3), 245–250.
<https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.07.013>
- Ryan, M. P., & Pembroke, J. T. (2018). *Brevundimonas* spp: Emerging global opportunistic pathogens. *Virulence*, 9(1), 480–493.
<https://doi.org/10.1080/21505594.2017.1419116>
- Sagar, P., Aseem, A., Banjara, S. K., & Veleri, S. (2023). The role of food chain in antimicrobial resistance spread and One Health approach to reduce risks. *International Journal of Food Microbiology*, 391–393, 110148.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110148>
- Saleh, M. A., & Balboula, M. M. (2017). Plasmid Mediated Quinolone Resistance Determinants among Nosocomial Clinical *Pseudomonas aeruginosa* Isolates. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 42–50.
<https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.601.006>
- Segers, P., Vancanneyt, M., Pot, B., Torck, U., Hoste, B., Dewettinck, D., Falsen, E., Kersters, K., & De Vos, P. (1994). Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hugh 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. Nov. As *Brevundimonas diminuta* comb. Nov. And *Brevundimonas vesicularis* comb. Nov., Respectively. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44(3), 499–510. <https://doi.org/10.1099/00207713-44-3-499>

- Sharan, M., Vijay, D., Dhaka, P., Bedi, J. S., & Gill, J. P. S. (2022). Biofilms as a microbial hazard in the food industry: A scoping review. *Journal of Applied Microbiology*, *133*(4), 2210–2234. <https://doi.org/10.1111/jam.15766>
- Schenk, A., Porter, A. L., Alenciks, E., Frazier, K., Best, A. A., Fraley, S. M., & Fraley, G. S. (2016). Increased water contamination and grow-out Pekin duck mortality when raised with water troughs compared to pin-metered water lines using a United States management system. *Poultry Science*, *95*(4), 736–748. <https://doi.org/10.3382/ps/pev381>
- Schmitz, A., Hanke, D., Lüscho, D., Schwarz, S., Higgins, P. G., & Feßler, A. T. (2023). *Acinetobacter baumannii* from Samples of Commercially Reared Turkeys: Genomic Relationships, Antimicrobial and Biocide Susceptibility. *Microorganisms*, *11*(3), 759. <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030759>
- Silva, N. C. C., Guimarães, F. F., Manzi, M. P., Budri, P. E., Gómez-Sanz, E., Benito, D., Langoni, H., Rall, V. L. M., & Torres, C. (2013). Molecular characterization and clonal diversity of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in milk of cows with mastitis in Brazil. *Journal of Dairy Science*, *96*(11), 6856–6862. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6719>
- Spratt, B. G. (1994). Resistance to Antibiotics Mediated by Target Alterations. *Science*, *264*(5157), 388–393. <https://doi.org/10.1126/science.8153626>
- Starr, M. P., & Reynolds, D. M. (1951). Streptomycin Resistance of Coliform Bacteria from Turkeys Fed Streptomycin. *American Journal of Public Health and the Nations Health*, *41*(11_Pt_1), 1375–1380. https://doi.org/10.2105/AJPH.41.11_Pt_1.1375
- Swann, M. M. (1969). *Joint Committee on the Use of Antibiotics in Animal Husbandry and Veterinary Medicine*. <https://api.parliament.uk/historic-hansard/commons/1969/nov/20/use-of-antibiotics-in-animal-husbandry>
- Todorov, S. D., Popov, I., Weeks, R., & Chikindas, M. L. (2022). Use of Bacteriocins and Bacteriocinogenic Beneficial Organisms in Food Products: Benefits, Challenges, Concerns. *Foods*, *11*(19), 3145. <https://doi.org/10.3390/foods11193145>
- Toghroli, R., Aghamolaei, T., Hassani, L., Sharifi, H., & Jajarmi, M. (2023). Determinants of antimicrobial resistance occurrence in animal-based food, perceived by livestock farmers: A qualitative phenomenological study. *Health Science Reports*, *6*(3), e1160. <https://doi.org/10.1002/hsr2.1160>

- Vaarst, M., Steinfeldt, S., & Horsted, K. (2015). Sustainable development perspectives of poultry production. *World's Poultry Science Journal*, 71(4), 609–620. <https://doi.org/10.1017/S0043933915002433>
- Venkataramana, G. P., Lalitha, A. K. V., Mariappan, S., & Sekar, U. (2022). Plasmid-Mediated Fluoroquinolone Resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter baumannii*. *Journal of Laboratory Physicians*, 14(03), 271–277. <https://doi.org/10.1055/s-0042-1742636>
- Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., de Schaetzen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Veselovský, Z. (2001). *Obecná ornitologie* (1. vyd). Academia.
- WHO. (2012). *The evolving threat of antimicrobial resistance: Options for action*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44812>
- WHO. (2015). *Global action plan on antimicrobial resistance*. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/193736>
- Woodford, N., Wareham, D. W., Guerra, B., & Teale, C. (2014). Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae and non-Enterobacteriaceae from animals and the environment: An emerging public health risk of our own making? *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(2), 287–291. <https://doi.org/10.1093/jac/dkt392>
- Wright, G. (2005). Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57(10), 1451–1470. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2005.04.002>
- Zhang, R., Liu, Z., Li, J., Lei, L., Yin, W., Li, M., Wu, C., Walsh, T. R., Wang, Y., Wang, S., & Wu, Y. (2017). Presence of VIM-Positive *Pseudomonas* Species in Chickens and Their Surrounding Environment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(7), e00167-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.00167-17>
- Zhang, Z., Lv, J., Pan, L., & Zhang, Y. (2018). Roles and applications of probiotic *Lactobacillus* strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102(19), 8135–8143. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9217-9>

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	amikacin
AMR	antimikrobiální rezistence
ATB	antibiotikum
BMK	bakterie mléčného kvašení
CAZ	ceftazidim
CIP	ciprofloxacin
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CPM	cefepim
DOR	doripenem
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control (Evropské středisko pro prevenci a kontrolu nemocí)
EFSA	European Food Safety Authority (Evropský úřad pro bezpečnost potravin)
ESBL	extended spectrum betalactamases (betalaktamázy s rozšířeným spektrem)
EUCAST	The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
FAO	Food and Agriculture Organisation of the United Nations (Organizace pro výživu a zemědělství)
FDA	Food and Drug Administration (Úřad pro kontrolu potravin a léčiv)
HGT	horizontal gene transfer (horizontální přenos genů)
IPM	imipenem
LE	levofloxacin
MDR	multi-drug resistance (multi-léková rezistence)
MGE	mobilní genetické elementy
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development (Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj)
OIE	The World Organisation for Animal Health (Světová organizace pro zdraví zvířat)
PCR	polymer chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
PIT	piperacillin-tazobactam
TI	tikarcilin
TOB	tobramycin
VGT	vertical gene transfer (vertikální přenos genů)
WHO	World Health Organisation (Světová zdravotnická organizace)

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Tvar zobáku typický pro vrubozobé	12
Obrázek 2 Předpokládaný vývoj celosvětové spotřeby živočišného masa na obyvatele (kg) v letech 1990-2028.....	14
Obrázek 3 Chov kachňat na vyvýšené plastové podlaze se střídavě umístěnými krmítky a napáječkami.	17
Obrázek 4 Přehled molekulárních mechanismů antibiotické rezistence.	20
Obrázek 5 Primární cesty podílející se na výměně genetické informace způsobující rezistenci k antibiotikům. (A) vertikální přenos, (B) horizontální přenos.....	25
Obrázek 6 Koncepční grafické znázornění antimikrobiální rezistence spojené s intenzivní produkcí drůbeže.....	28
Obrázek 7 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, <i>Pseudomonas</i> spp.	50
Obrázek 8 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, <i>Acinetobacter</i> spp.	51
Obrázek 9 Podíl citlivých, intermediárních a rezistentních kmenů k jednotlivým antibiotikům, <i>Brevundimonas</i> spp.....	53
Obrázek 10 Grafické porovnání fenotypových a genotypových metod záchytu AMR.....	54

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Seznam použitých kultivačních médií.....	35
Tabulka 2 Seznam použitých suplementů do selektivních médií.....	36
Tabulka 3 Seznam použitých antimikrobiálních disků.....	36
Tabulka 4 Hraniční hodnoty zón inhibice antibiotik pro bakterie <i>Pseudomonas</i> spp. dle (CLSI, 2023)	42
Tabulka 5 Hraniční hodnoty zón inhibice antibiotik pro bakterie <i>Acinetobacter</i> spp. dle (CLSI, 2023)	42
Tabulka 6 Složení PCR reakční směsi pro jednu reakci.....	43
Tabulka 7 Sekvence primerů a teplotní podmínky použité při PCR amplifikaci	44
Tabulka 8 Počet izolátů rozdělený podle bakteriálního rodu a původu izolátu.....	45
Tabulka 9 Počet izolátů dle druhu vzorku pro jednotlivé bakteriální rody	46
Tabulka 10 Profil antibiotické rezistence u izolátů <i>Pseudomonas</i> spp.....	48
Tabulka 11 Profil antibiotické rezistence u izolátů <i>Acinetobacter</i> spp.	51
Tabulka 12 Profil antibiotické rezistence u izolátů <i>Brevundimonas</i> spp.....	52
Tabulka 13 Procento rezistence u všech testovaných izolátů.....	53

