

# Identifikace a genotypizace enterobakterií z potravin

Lucie Hernady

---

Bakalářská práce  
2023

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

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

Akademický rok: 2022/2023

# ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lucie Hernady  
Osobní číslo: T190056  
Studijní program: B0721A210002 Technologie a hodnocení potravin  
Specializace: Potravinářské biotechnologie a aplikovaná mikrobiologie  
Forma studia: Prezenční  
Téma práce: Identifikace a genotypizace enterobakterií izolovaných z potravin

## Zásady pro vypracování

Vypracujte literární rešerši o identifikaci enterobakterií z potravin. Dále popište možnosti genotypizace včetně detekce genů antibiotické rezistence. U bakterie *Escherichia coli* se zaměřte dále na rozdělení do fylogenetických skupin, výskyt bakteriocinogenie a faktorů virulence.

Experimentálně izolujte enterobakterie z potravin, proveďte identifikaci různými metodami a sledujte výskyt antibiotické rezistence či multirezistence. U kmenů identifikovaných jako *Escherichia coli* proveďte genotypizaci. Výsledky vyhodnotte, diskutujte a formulujte závěry.

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

Seznam doporučené literatury:

AL-KHAROUSI, ZAHRA S., NEJIB GUIZANI, ABDULLAH M. AL-SADI a ISMAIL M. AL-BULUSHI. Antibiotic Resistance of Enterobacteriaceae Isolated from Fresh Fruits and Vegetables and Characterization of their AmpC  $\beta$ -Lactamases. *Journal of Food Protection* [online]. 2019, 82(11), 1857-1863 [cit. 2021-5-31]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-089

DIB, Amira Leila, Amir AGABOU, Amina CHAHED, Cemil KUREKCI, Elena MORENO, Miguel ESPIGARES a Elena ESPIGARES. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control* [online]. 2018, 88, 54-60 [cit. 2021-5-31]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.005

KUMAR, Shashi B., Shanvanth R. ARNIPALLI a Ouliana ZIOUZENKOVA. Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics* [online]. 2020, 9(10) [cit. 2021-5-31]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9100688

MORABITO, Stefano, ed. *Pathogenic Escherichia coli: molecular and cellular microbiology*. Norfolk: Caister Academic Press, c2014, x, 304 s., A12 obr. příl. ISBN 9781908230379.

Vedoucí bakalářské práce:

**Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

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

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

L.S.

---

**prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.**  
děkan

---

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

Ve Zlíně dne 17. února 2023

## **PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE**

Beru na vědomí, že:

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

### **Prohlašuji,**

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....  
podpis studenta

## ABSTRAKT

Zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* se hojně vyskytují v potravinách, zejména pak jako kontaminace masa. Většina enterobakterií je pro lidi neškodná, avšak mohou se mezi nimi vyskytovat oportunně patogenní či patogenní druhy, u nichž nastává problém s léčbou v případě zvýšené antibiotické rezistence takového kmene. V této práci byly identifikovány a genotypizovány enterobakterie z kuřecího masa. Bylo izolováno a identifikováno 52 enterobakterií, které byly rozřazeny do rodů *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Moellerella*, *Raoultella* a *Serratia*. U 13 kmenů *Escherichia coli* a dvou kmenů *Serratia fonticola* byla detekována produkce bakteriocinů. Nejčastějšími typy bakteriocinů byly koliciny E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib, K, M a mikrocín V. Dále byla sledována citlivost vůči vybraným antibiotikům a byla provedena PCR detekce genů rezistence. Všechny kmeny byly rezistentní nejméně vůči jednomu antibiotiku a 32 kmenů bylo označeno za multirezistentní. Nejčastěji se vyskytovala rezistence vůči cefalosporinům a penicilinům s prokázanou přítomností genů *blaOXA-7*, *tetA*, *floR* a *blaTEM*. Kmeny *Escherichia coli* byly rozřazeny do fylogenetických skupin, všechny patřily do skupiny A nebo B1. Nejčastěji detekovanými faktory virulence byly geny *hlyF*, *ompT*, *iroN* a *iss*. Výsledky této práce ukazují, že enterobakterie jsou častými producenty bakteriocinů. Dále je patrné, že kuřecí maso může být potenciálním vektorem antibiotické rezistence u enterobakterií. Výsledky rozřazení *E. coli* do fylogenetických skupin a detekce faktorů virulence u těchto kmenů poukazují na fakt, že může docházet k horizontálnímu přenosu genů virulence mezi patogeny a komenzály.

Klíčová slova: enterobakterie, bakteriocinogenie, antibiotická rezistence, *Escherichia coli*, faktory virulence

## ABSTRACT

Members of the *Enterobacteriaceae* family are abundant in food, especially in meat contamination. Most enterobacteria are harmless to humans, but there may be opportunistically pathogenic or pathogenic species among them, which pose a problem with treatment in case of increased antibiotic resistance of such a strain. In this work, enterobacteria from chicken meat were identified and genotyped. Fifty-two enterobacteria were isolated and identified, classified into the genera *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Moellerella*, *Raoultella*, and *Serratia*. Bacteriocin production was detected in 13 strains of *Escherichia coli* and two strains of *Serratia fonticola*. The most common types of bacteriocins were colicins E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib, K, M, and microcin V. Furthermore, sensitivity to selected antibiotics was monitored, and PCR detection of resistance genes was performed. All strains resisted at least one antibiotic, and 32 were identified as multi-resistant. The most common occurrence was resistance to cephalosporins and penicillins with the proven presence of *blaOXA-7*, *tetA*, *floR*, and *blaTEM* genes. *Escherichia coli* strains were classified into phylogenetic groups belonging to groups A and B1. The most frequently detected virulence factors were *hlyF*, *ompT*, *iroN*, and *iss* genes. The results of this work show that enterobacteria are frequent producers of bacteriocins. Furthermore, chicken meat can be a potential vector of antibiotic resistance in enterobacteria. The results of classifying *E. coli* into phylogenetic groups and detecting virulence factors in these strains point to the fact that there may be a horizontal transfer of virulence genes between pathogens and commensals.

Keywords: enterobacteria, bacteriocinogeny, antibiotic resistance, *Escherichia coli*, virulence factors

Mé největší díky patří vedoucí této bakalářské práce, Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D., za její pomoc, odborné vedení a trpělivost. Dále bych chtěla poděkovat laborantkám Ing. Veronice Kubačové a Ing. Olze Vlčkové za pomoc v laboratořích. Nakonec bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za podporu.

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

# OBSAH

ÚVOD.....	10
<b>I TEORETICKÁ ČÁST .....</b>	<b>11</b>
<b>1 MIKROBIOM POTRAVIN .....</b>	<b>12</b>
1.1 MIKROBIOLOGIE OVOCE A ZELENINY .....	12
1.2 MIKROBIOLOGIE RYB A MOŘSKÝCH PLODŮ .....	13
1.3 MIKROBIOLOGIE MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ .....	13
1.4 MIKROBIOLOGIE MASA.....	14
<b>2 ČELEĎ ENTEROBACTERIACEAE .....</b>	<b>18</b>
2.1 ROD <i>ESCHERICHIA</i> .....	18
2.2 ROD <i>SALMONELLA</i> .....	19
2.3 ROD <i>CITROBACTER</i> .....	20
2.4 ROD <i>KLEBSIELLA</i> .....	20
2.5 ROD <i>ENTEROBACTER</i> .....	21
2.6 ROD <i>YERSINIA</i> .....	21
2.7 ROD <i>SHIGELLA</i> .....	21
2.8 ROD <i>SERRATIA</i> .....	22
2.9 PATOGENITA A VIRULENCE.....	22
<b>3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY .....</b>	<b>25</b>
3.1 BAKTERIOCINY.....	26
3.1.1 Koliciny .....	27
3.1.2 Mikrociny .....	28
3.1.3 Marcesciny .....	28
3.2 ANTIBIOTIKA.....	29
3.2.1 Mechanismus účinku .....	29
3.2.2 Antibiotická rezistence.....	30
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST.....</b>	<b>32</b>
<b>4 CÍL PRÁCE .....</b>	<b>33</b>
<b>5 MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>34</b>
5.1 MATERIÁL.....	34
5.1.1 Vzorky .....	34
5.1.2 Použité kmeny .....	34
5.1.3 Laboratorní přístroje.....	35
5.1.4 Kultivační média .....	36
5.1.5 Chemikálie a antibiotika .....	38
5.2 METODIKA .....	39
5.2.1 Izolace kmenů .....	39



5.2.2	Identifikační metody .....	39
5.2.3	Detekce bakteriocinogenie – vpichový pokus.....	41
5.2.4	Disková difuzní metoda .....	41
5.2.5	Genotypizační metody .....	42
<b>6</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>54</b>
6.1	IDENTIFIKACE NEZNÁMÝCH KMENŮ .....	54
6.2	DETEKCE BAKTERIOCINOGENIE .....	57
6.3	DETEKCE ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE .....	60
6.4	FYLOGENETICKÉ SKUPINY .....	66
6.5	DETEKCE FAKTORŮ VIRULENCE .....	68
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>71</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>73</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>81</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>85</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>86</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>87</b>

## ÚVOD

Potraviny jsou nedílnou součástí našich životů a nedílnou součástí potravin jsou mikroorganismy. Ti žijí na povrchu a pod povrchem pokrmů, které jíme. Mikroorganismy v potravinách jsou přínosné, nebo nepřínosné a způsobují kažení potravin. Právě kuřecí maso je skvělým živným médiem pro bakterie včetně enterobakterií. Mezi nimi můžeme najít druhy, které jsou označovány jako koliformní bakterie a které slouží jako ukazatel hygienické kvality potravin. Mezi koliformní bakterie můžeme zařadit například *Escherichia coli*.

Antimikrobiální látkou se rozumí látka, která má neblahé účinky na mikroorganismy. Společně s antibiotiky sem můžeme zařadit i bakteriociny, jež jsou antimikrobiální proteiny s baktericidními účinky vůči druhu produkčnímu a druhům fylogeneticky příbuzným. Bakteriociny jsou bakteriemi produkovány ve stresových situacích, kdy mezi druhy dochází k boji o nutrienty.

Antibiotická rezistence je světovým problémem nejen pro lidi, ale i pro zvířata a životní prostředí. Právě potravinářská zvířata jsou vektory rezistentních bakterií a jejich genetického materiálu, které se mohou na člověka přenášet například masem. Nadměrným používáním antibiotik může vznikat i multirezistence, kdy je bakterie rezistentní vůči celé škále antibiotik. V dnešní době je největší hrozbou rezistence bakterií vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, zejména u čeledi *Enterobacteriaceae*.

*Escherichia coli* byla po mnoha letech zkoumání rozřazena do fylogenetických skupin, které se liší vlastnostmi a patogenitou. Mohou být rozdílně rezistentní vůči antibiotikům, mohou produkovat jiné bakteriociny a mohou vlastnit rozdílné faktory virulence. Rozřazením do fylogenetických skupin lze zjistit, zda se jedná o kmen patogenní či komenzální.

Tato práce se zabývá identifikací a genotypizací enterobakterií izolovaných z kuřecího masa v maloobchodním řetězci ve Zlíně. Je zde popsána detekce bakteriocinogenie a bakteriocinotypizace kolicinogenních kmenů, stanovení citlivost vůči antibiotikům diskovou difuzní metodou a detekce genů rezistence a v neposlední řadě rozřazení *Escherichia coli* do fylogenetických skupin a detekce faktorů virulence u těchto kmenů.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 MIKROBIOM POTRAVIN

Pojem mikrobiom lze jinak vysvětlit jako mikrobiální společenství neboli soubor mikroorganismů žijících společně. Mikrobiální společenství je přesně definováno jako vícedruhová sdružení mikroorganismů vzájemně interagující v prostředí. Společným znakem je velikost jejich buňky pohybující se mezi několika mikrometry až několika desetin milimetru. Mikrobiom lze dále definovat jako kolektivní genom všech mikroorganismů žijících ve všech obratlovcích a na nich [1].

Mikroorganismy se běžně vyskytují všude v prostředí – ve vodě, ve vzduchu, v půdě, na rostlinách. Jsou dokonce nedílnou součástí našich těl a těl našich mazlíčků. Tyto mikroorganismy jsou zejména neškodní komenzálové nebo saprofyté. Bohužel se mezi vysokými počty příznivých mikroorganismů najdou i parazitické druhy, které způsobují řadu onemocnění [2; 3].

Neboť jsou mikroorganismy součástí potravin, stávají se proto vehikulem bakteriálních původců alimentárních onemocnění. Alimentární onemocnění vznikají velmi brzy po požití infikované potravin a jsou provázeny zejména zvracením, průjmami a horečkou. V závislosti na typu původce a na zdraví konzumenta může být onemocnění velmi závažné, a dokonce může skončit smrtí. K přenosu mikroorganismů dochází nejčastěji křížovou kontaminací na potraviny určené k přímé spotřebě. To se děje zejména v domácnostech nebo v podnicích veřejného stravování. Alimentární onemocnění se dělí na alimentární infekci, kdy jsou původci onemocnění v potravinech v době konzumace, a alimentární intoxikaci, kdy je v potravinech přítomen toxin vyprodukovaný bakteriemi [2; 4].

### 1.1 Mikrobiologie ovoce a zeleniny

Čerstvé ovoce a zelenina obsahují přirozenou mikroflóru, která se dostává na povrch z půdy, vody, vzduchu a z dalších zdrojů. Počty bakterií v čerstvé zelenině a ovoci se mohou pohybovat od  $10^2$  až  $10^7$  kolonií tvořící jednotku na gram (KTJ/g). Příznivými vnějšími faktory jsou přítomnost vzduchu a vyšší teplota při skladování ovoce a zeleniny. Těmi se zvyšuje šance na mikrobiální růst a znehodnocení. Mezi vnitřní faktory ovlivňující růst mikroorganismů řadíme pH a aktivitu vody  $a_w$ . V čerstvém ovoci a zelenině je aktivita vody dostatečně vysoká, aby podporovala růst mnoha bakterií a plísní [4].

Mezi mikrobiální kontaminanty zeleniny patří zejména *Pseudomonas fluorescens*, kvasinky a plísně. Ty jsou na zeleninu přenášeny z půdy. Populace všech mikroorganismů se během

zpracování rychle zvyšuje prostřednictvím rekontaminace od špinavých stolů, dopravníků a dalších pomůcek. Parazitě mohou kontaminovat syrovou zeleninu od infikovaných osob, hnojiv, závlahové a mycí vody [4; 5].

Počáteční mikroflóra ovocných plodů pochází z pole a ze sklizňových zařízení. Polní zdroje zahrnují půdu, hmyz, závlahovou vodu, vzduch, ptáky a jiná zvířata. Půda je primárním zdrojem tepelně odolných askospor plísní, zejména *Byssochlamys* spp. Mikroorganismy způsobující kažení ovoce a střevní patogeny jsou na ovoce přenášeny přes hmyz. Závlahová voda je významným zdrojem mikroorganismů, včetně střevních patogenů, zejména bakterií rodu *Salmonella*. Vzduch, ptáci a zvířata nesou různé druhy mikroorganismů. Mezi běžné rody plísní osidlující ovocné plody patří *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Alternaria*, *Cladosporium* a *Botrytis* spp. Nejběžnější rody kvasinek kontaminující ovoce jsou *Saccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Kloeckera*, *Candida* a *Rhodotorula* [4; 5].

## 1.2 Mikrobiologie ryb a mořských plodů

Rybí maso a mořské plody mají vysokou tendenci se rychle kazit [6]. Mikroorganismy jsou v rybách schopny růst díky dostupnosti velkého množství neproteinových dusíkatých sloučenin a vysoké aktivitě vody. Hlavní skupinou mikroorganismů v rybách jsou bakterie, viry a měkkýši [4]. Bakteriálními patogeny mořských plodů a příbuzných produktů závisí na vodě, ze které byly živočichové vyloveni. Patogeny přirozeně se vyskytující v prostředí jsou *Vibrio* spp., neproteolytické i proteolytické *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Plesimonas shigelloides* a *Aeromonas* spp., *Listeria monocytogenes* a *Bacillus* spp. V rybách a mořských plodech vylovených z vod znečištěných lidským a zvířecím odpadem se mohou vyskytovat bakterie *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Escherichia coli*, *Campylobacter jejuni* a *Staphylococcus aureus* [4; 6]. Mohou se vyskytovat i viry hepatitidy A a Norwalk viry [4].

## 1.3 Mikrobiologie mléka a mléčných výrobků

V mléce se mohou vyskytovat bakterie, viry, houby i prvoci. Podle významu je zle dělit na patogeny, mikroorganismy kazící potraviny, ty, které nejsou ani škodlivé ani prospěšné a samozřejmě i mikroorganismy, kterou mohou být prospěšné. Těmito bakteriemi jsou zejména bakterie mléčného kvašení [7].

Syrové mléko může být často kontaminováno z vemene a jeho povrchu, z dojících přístrojů, trubek přepravujících mléko a skladovacích nádrží. Dále může být kontaminováno

mikroorganismy z prostředí, například z vody nebo vzduchu, a samozřejmě i z pracovníků samotných. Nežádoucími bakteriemi jsou *Streptococcus*, *Brevibacterium*, koliformní bakterie, psychrotrofní gramnegativní termodurické bakterie, kterými jsou *Micrococcus*, *Enterococcus* a *Bacillus* [4].

Počet mikroorganismů v čerstvém syrovém mléce je pevně spojený s čistotou pracovních ploch a nástrojů a opatrnosti zaměstnanců. Při skladování syrového mléka za chladírenských teplot stoupají počty psychrofilních bakterií, kterými jsou *Aerococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Streptococcus*, koliformní bakterie a další. Proto musí být mléko pasterováno, aby se eliminovala většina těchto bakterií [4].

#### 1.4 Mikrobiologie masa

Maso díky svým jedinečným vlastnostem podléhá velice rychle kažení. Již bylo zmíněno, že chemické složení, výhodná vodní aktivita a pH, jsou skvělými podmínkami pro růst mikrobů. Za příznivých podmínek se začne počet mikroorganismů zvyšovat, což může vést ke změnám v senzoryckých vlastnostech, a nakonec ke zkažení masa. Počáteční počet mikroorganismů je závislý na tělesném stavu zvířete při porážce a samozřejmě na hygieně prostředí a pomůcek, jež byly použity na jatkách [8].

Čerstvé maso obsahuje různé rody bakterií, zejména pak *Actinetobacter*, *Flavobacterium*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Pseudomonas*, *Psychrobacter*, *Streptococcus*, bakterie mléčného kvašení, různé rody čeledi *Enerobacteriaceae*, a dále také kvasinky a plísně. Patogenní mikroorganismy kontaminující maso z gastrointestinálního traktu jsou druhy *Salmonella enterica*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*, *Aeromonas hydrophila*, *Listeria monocytogenes* a *Escherichia coli*. Maso může být kontaminováno i mikroorganismy přirozeně se vyskytujícími v lymfatických uzlinách zvířat. K těmto mikroorganismům řadíme rody *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Clostridium* a *Salmonella*. Mikroorganismy kontaminující kůži zvířete jsou bakterie, zejména *Staphylococcus*, *Micrococcus* a *Pseudomonas*, plísně a kvasinky. Některé kontaminující bakterie mohou pocházet z fekálního materiálu nebo půdy [4].

Nejčastějšími původci alimentárních nákaz z kategorie zoonóz jsou bakterie rodu *Campylobacter*, *Salmonella*, druhy *Yersinia enterocolitica*, *Listeria monocytogenes* a verotoxigenní kmeny *Escherichia coli*. Tyto mikroorganismy se hojně vyskytují již na farmách – na kůži a srsti zvířat nebo v trusu. To zvyšuje pravděpodobnost kontaminace masa na jatkách [2].

Jedlá svalová tkáň zdravého zvířete je sterilní, což značí, že ke kontaminaci bakteriemi dochází během zpracování. Existuje několik faktorů, které ovlivňují bakteriální kontaminaci.

Těmito faktory jsou:

- Bakteriální flóra zvířete.
- Fyziologický stav zvířete před porážkou. Pokud je zvíře ve stresu, bakterie se dostanou do tkáně, kde se dále šíří.
- Metoda porážky a vykrvení.
- Poranění během odchlupení, kdy mohou bakterie vstoupit do tkáně přes zranění.
- Rychlost ochlazení kostry. Rychlejší zmražení kostry zabrání mikrobiálnímu růstu.
- Zvětšení povrchu masa mletím podporuje růst mikroorganismů.
- Chemické složení masa je velmi důležitým parametrem. Nízká vlhkost masa podporuje růst kvasinek a plísní, kdežto vyšší vlhkost podporuje růst bakterií. Množství nebo nepřítomnost fermentovatelných sacharidů a vysoký obsah proteinů podporují růst nefermentujících mikroorganismů. Vyšší pH také podporuje mikrobiální růst.
- Dalším důležitým parametrem je dostupnost kyslíku. Aerobní podmínky na povrchu masa jsou příznivé pro růst plísní, kvasinek a aerobních bakterií.
- Dále je zde důležitá i teplota skladování. Pokud je maso skladováno ve vyšších teplotách, než jsou chladírenské teploty, je zvýšen růst plísní, kvasinek a psychrotrofních bakterií.
- Posledními faktory jsou zdraví zvířete, pracovní návyky a osobní hygiena pracovníků, úroveň sanitace během práce s jatečným tělem, kontakt masa s fekáliemi, kůží, kopyty a chlupy, a sanitace nožů mohou ovlivnit kontaminaci masa [4; 9].

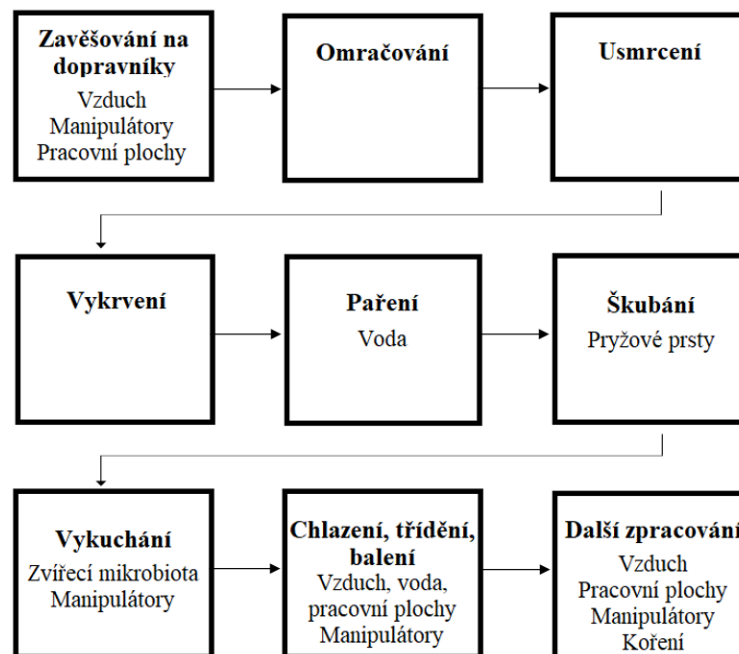
Vakuově balené maso je výhodným prostředím pro fakultativně anaerobní bakterie včetně bakterií mléčného kvašení. Z bakterií mléčného kvašení vyskytujících se na mase jsou nejpočetnějšími zástupci *Lactobacillus sakei* a *Leuconostoc mesenteroides*. Dalšími hojně se vyskytujícími druhy na baleném mase jsou *Lactobacillus curvatus*, *Leuconostoc carnosum* a *Carnobacterium divergens*. Právě rody *Lactobacillus*, *Leuconostoc* a *Carnobacterium* jsou spojovány s kažením masa. Při teplotě 4 °C se na mase nejvíce vyskytují zejména druhy *Lactobacillus sakei* a *Lactobacillus algidus*. Když klesne teplota

pod 1 °C, dominantními druhy se stávají *Lactobacillus* spp., *Weissella* spp. a *Leuconostoc mesenteroides* [8; 10].

Pokud se začne snižovat teplota za aerobních podmínek, bude dominující bakterií *Pseudomonas* spp. Pokud se teplota dostane pod –2 °C, dojde k zastavení růstu bakterií. Růst xerotolerantních plísní a kvasinek však ani touto teplotou není zastaven. Většina běžných plísní má minimální teplotu růstu pohybující se okolo –8 °C. Při této teplotě trvá růst běžných kolonií i několik měsíců. Většina bakterií je schopna přežít v nerostoucím stavu při chlazených a zmrazených skladovacích teplotách, ale teploty pro vegetativní růst jsou obvykle vyšší než 0 °C. Dle provedených pokusů bylo zjištěno, že lidské patogenní mikroorganismy jsou citlivé ke zmrazení [11].

#### 1.4.1 Kontaminace drůbežního masa

Drůbeží maso je vhodným kultivačním médiem pro bakterie, neboť je bohaté na dusíkaté látky, sacharidy a další růstové faktory. Má vysokou vlhkost a optimální pH, jež se pohybuje mezi hodnotami 6,5–6,7. Díky jeho vlastnostem vyhovujícím mikroorganismům často způsobuje drůbeží maso alimentární onemocnění [4; 10].



Obrázek 1 Schéma postupných kroků porážky drůbeže a možné cesty kontaminace [9].



Obrázek 1 popisuje postup zpracování od porážky po produkci masa a možné cesty kontaminace. Po přepravě je drůbež zavěšena na dopravník a poté omráčena a usmrcena. Po vykrvení se ptáci opaří v teplé vodě, která pomáhá uvolnit peří. Následně se peří mechanicky obrousí. Na velkých jatkách se peří odstraňuje pomocí pryžových prstů. Těla zbavena peří se dále omyjí a vykuchají. Poté se jatečně opracovaná těla ochladí studenou vodou, nebo vzduchem. Posledním krokem jsou konečné transformace, které zahrnují krájení, vykost'ování, mletí a použití dalších úprav pro skladování mastných výrobků, jako je například marinování nebo přidávání přísad do zpracovaných produktů [9].

## 2 ČELEĎ *ENTEROBACTERIACEAE*

Bakterie z čeledi *Enterobacteriaceae* jsou gramnegativní rovné tyčinky. Mohou být nepohyblivé i pohyblivé pomocí peritrichálních bičičků. Tyto bakterie netvoří endospory ani cysty. Jsou fakultativně anaerobní, chemoorganotrofní a mají respiratorní i fermentativní metabolismus. Většina rodů z této čeledi roste při 37 °C, některé rody však preferují nižší teploty, při kterých jsou i metabolicky aktivní. Generační doba těchto bakterií je velmi krátká. Využívají glukózu, v některých případech za vzniku plynu, a mnoho dalších sacharidů a cukerných alkoholů. Jsou většinou kataláza pozitivní a oxidáza negativní, s výjimkou rodu *Plesiomonas*. Převážně redukují nitráty [12; 13].

Bakterie této čeledi jsou celosvětově rozšířené a je možné je najít v půdě, ve vodě, v ovoci a zelenině, v kvetoucích rostlinách a stromech. Hojně se vyskytují i v živočišných od cizopasných červů přes hmyz až k člověku. Jejich ekologie, hostitelé a patogenita je značně rozmanitá. Mnoho druhů napadá zejména intestinální trakt, a proto způsobují zejména průjemová onemocnění, některé z nich jsou pouze podmíněně patogenní. Mezi extraintestinální infekce patří infekce ran, močových cest a respiračního traktu [12].

V průběhu let se mnoho druhů z čeledi *Enterobacteriaceae* stalo odolnými vůči běžně používaným antimikrobiálním látkám a antimikrobiální rezistence mezi těmito organizmy je problémem. Používání antimikrobiálních látek v nemocnicích vedlo ke zvýšení rezistence vůči mnoha  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, zvláště širokospektrých  $\beta$ -laktamů [14].

### 2.1 Rod *Escherichia*

Bakterie rodu *Escherichia* jsou běžnou mikroflórou teplokrevných živočichů. Některé kmeny produkují toxiny, a právě tyto kmeny způsobují průjemová onemocnění. Patogenní kmeny jsou rozděleny do sérovarů podle somatických (O), kapsulárních (K) a bičičkových (H) antigenů. Jiné kmeny mohou být pouze podmíněně patogenní, ve většině případů se dostávají do oběhu ranami [12; 15].

Zpočátku byly všechny druhy *E. coli* označovány jako enteropatogenní (EPEC), ale později došlo k dalšímu rozdělení do více skupiny. *E. coli* byla nakonec rozdělena na enteropatogenní (EPEC), enterotoxinogenní (ETEC), enterohemoragická (EHEC), enteroinvazivní (EIEC), enteroagregativní (EAEC) a difuzně agregativní (DAEC) podle jejich působení, jak je uvedeno v Tabulce 1 [15].

Tabulka 1 Epidemiologie patogenních skupin *Escherichia coli* [15; 16]

Patogenní skupina	Epidemiologie
EPEC	Působí občasné případy i epidemie u kojenců a malých dětí.
ETEC	Nejvýznamnější příčina dětských průjmů v rozvojových zemích. Původce cestovatelských průjmů. Šíření zejména kontaminovanou vodou lidskou nebo zvířecí stolicí.
EHEC (STEC)	Nejvýznamnějším sérovarem je O157:H7. Producenti Shiga toxinu. Šíření potravinami a nepasterovaným mlékem. Může způsobovat hemolyticko-uremický syndrom (HUS).
EIEC	Enteroinvazivní <i>Escherichia coli</i> .
EAEC	Charakteristická adheze ke tkáňovým buňkám.
DAEC	Původce dětských průjmů v rozvojových zemích.

Clermont rozdělil *Escherichia coli* v roce 2000 do čtyř základních fylogenetických skupin, a to A, B1, B2 a D [17]. Do fylogenetické skupiny A se řadí komenzální kmeny. Naopak do skupiny B2 jsou zařazeny extra-intestinální kmeny a v menší míře do skupiny D. V roce 2013 byla provedena revize metody a došlo k rozšíření fylogenetických skupin o další tři skupiny C, E a F. Skupina E sestává z dříve nepřirazených kmenů, z nichž je nejznámější O157:H7. Skupina F je tvořena kmeny, které jsou sesterskou skupinou fyloskupiny B2. Nakonec byla navržena skupina C, kam byly zařazeny kmeny blízké příbuzné, avšak odlišné od kmenů ze skupiny B1 [18].

## 2.2 Rod *Salmonella*

Salmonely přežívají ve vnějším prostředí. Vyskytují se na rostlinách, v hnoji a v čistírenských kalech. V potravinách přežívají dlouhou dobu, někdy měsíce až roky. Jsou ale citlivé k chladírenským a mrazírenským teplotám. Primárními hostiteli jsou teplokrevná i chladnokrevná zvířata, a nejen ta nemocná, ale v některých případech i ta zdravá. Nejčastěji jsou na člověka přenášena potravinami živočišného původu, tedy vejci, mlékem, masem [10; 12].

Rod *Salmonella* je původcem tyfu, střevních horeček, gastroenteritid a septikemií. Vyskytují se v sérovarech definovaných somatických (O), kapsulárních (Vi) a bičíkových (H)

antigenů. V současnosti existují pouze dvě druhová jména *S. bongori* a *S. enterica*, které mají šest poddruhů a mnoho sérovarů [12; 15].

Ve většině států Evropy způsobuje nejvíce salmonelózu *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Enteritidis. Způsobuje gastroenteritidy jak u člověka, tak i u zvířat. Dalším nejčastějším druhem způsobující gastroenteritidu je *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhimurium. Druhy patogenními pouze pro člověka jsou *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhi a Paratyphi, které se na člověka přenáší vodou a potravinami kontaminovanými lidskou stolicí [12; 15].

### 2.3 Rod *Citrobacter*

Bakterie rodu *Citrobacter* jsou biochemicky i sérologicky velice podobné rodu *Salmonella*. Neboť jsou s velkou pravděpodobností běžným obyvatelům intestinálního traktu, mohou být nalezeni zástupci tohoto rodu ve stolici člověka a zvířat. Rod *Citrobacter* se dále vyskytuje v půdě, v odpadní vodě, a v potravinách. Běžně jsou izolovány z klinického materiálu jako podmíněné patogeny. Bakterie rodu *Citrobacter* nejsou považovány za střevní patogeny, ale *Citrobacter freundii* je spojován s meningitidou a mozkovým abscesem [12; 19].

### 2.4 Rod *Klebsiella*

Bakterie rodu *Klebsiella* tvoří polysacharidová pouzdra, a právě pouzdra dodávají koloniím lesklý tvar a mukoidní charakter a tvoří základ sérotypizačního systému. Vyskytují se jednotlivě, po dvou nebo v krátkých řetězcích [12; 19].

Bakterie tohoto rodu se běžně vyskytují ve střevním traktu člověka. Dále se tyto bakterie vyskytují ve vodě a v půdě a dále také na rostlinách. Mohou způsobovat bakteriémie, pneumonie, infekce močových cest a další. Nejběžnějším druhem je *Klebsiella pneumoniae*, který je schopen způsobit právě pneumonii. Ze všech rodů čeledi *Enterobacteriaceae*, patří *Klebsiella* mezi nejodolnější vůči antibiotikům [12; 19].

V posledních letech se druhy rodu *Klebsiella* staly odolnými vůči široké škále antibiotik. Vznikla zde rezistence vůči penicilinům, zejména ampicilinu a karbencilinu prostřednictvím enzymu penicilinázy. Dříve byly bakterie tohoto rodu citlivé na cefalosporiny a gentamicin, nyní se vyvinul nový mechanismus rezistence vůči karbapenemům pomocí karbapenemázy. V poslední době bylo zaznamenáno šíření tohoto mechanismu mezi dalšími rody bakterií [14].

## 2.5 Rod *Enterobacter*

Tento rod je druhým nejpočetnějším rodem enterobakterií. Druhy tohoto rodu jsou v přírodě široce rozšířené. Můžeme je nalézt ve sladké vodě, v odpadních vodách, v půdě, na rostlinách a zelenině. Některé druhy rodu *Enterobacter* sídlí v lidském střevě jako součást komenzální mikroflóry, a proto byly nalezeny i v lidské stolici. Některé z těchto druhů, jako je například *Enterobacter cloacae*, jsou podmíněně patogenními druhy. Tyto druhy poté mohou způsobit různé typy infekcí, jako jsou infekce krevního řečiště a intraabdominální infekce [12; 20].

Kromě ampicilinu je většina izolátů rezistentních vůči cefalosporinům první generace, ale nemusí být citlivé k cefalosporinům druhé a třetí generace. Rezistence na nové cefalosporiny, aminopeniciliny, a cefamyciny je způsobeno mutanty, které mohou exprimovat velká množství AmpC  $\beta$ -laktamázy. To omezuje výběr vhodného antimikrobiálního činidla k léčbě invazivní infekce. Rezistence na antibiotika může být také zprostředkována pěti enzymy modifikujícími aminoglykosidy, které jsou detekovány na R-plasmidu [19].

## 2.6 Rod *Yersinia*

Druhy bakterií rodu *Yersinia* lze najít ve vodě, v půdě a v potravinách. Dále osidlují intestinální trakt zvířat, zejména hlodavců a ptáků, a samozřejmě i člověka. Rod zahrnuje 11 druhů, ze kterých jsou *Yersinia pestis*, *Yersinia pseudotuberculosis* a *Yersinia enterocolitica* důležitými patogeny pro člověka. *Yersinia pestis* je původcem moru a způsobuje onemocnění divokých hlodavců, přenašečem jsou blechy. *Yersinia pseudotuberculosis* je patogenní pro mnoho živočichů a může napadat i člověka, kdy se infekce projevuje chronickými průjmy a septikemií. *Yersinia enterocolitica* vyvolává onemocnění jak u zvířat, tak u člověka projevující se průjmy a bolestí břicha [12; 19].

## 2.7 Rod *Shigella*

Rod je rozdělen do čtyř druhů, které jsou definovány biochemickými reakcemi a specifickými O antigeny organizovanými do séro skupin. Tyto skupiny jsou *Shigella dysenteriae* (séro skupina A), *Shigella flexneri* (séro skupina B), *Shigella boydii* (séro skupina C) a *Shigella sonnei* (séro skupina D) [19].

*Shigella* je klasickou příčinou úplavice, která se typicky šíří z člověka na člověka za špatných hygienických podmínek. Nemoc začíná jako vodnatý průjem, ale postupně se vyvine

v intenzivní kolitidu s častou maloobjemovou stolicí, která obsahuje krev a hnis. Infekce se obvykle nešíří mimo střevní trakt [19].

## 2.8 Rod *Serratia*

Bakterie rodu *Serratia* se vyskytují ve vodě, v půdě, v potravinách bohatých na škrob, i v tělech savců, včetně člověka. Některé druhy tvoří červený pigment [12; 14].

Bakterie rodu *Serratia* produkují dva typy bakteriocinů. Kmeny produkující bakteriocin skupiny A jsou odolné vůči chloroformu, teplu, proteolytickým enzymům. Zároveň jsou aktivní proti jiným kmenům *Serratia*. Kmeny produkující bakteriocin skupiny B jsou naopak vůči chloroformu, teplu a proteolytickým enzymům citlivé. Dále jsou aktivní proti jiným enterobakteriím, ale ne proti jiným kmenům *Serratia* [14].

Kmeny rodu *Serratia* jsou rezistentní vůči třídám penicilinů, a to cefalosporinům první a druhé generace,  $\beta$ -laktamázu zprostředkovanému karbapenemu. Dále jsou rezistentní vůči aminoglykosidům a polymyxinům. Nepigmentované kmeny jsou obecně více rezistentní, neboť obvykle obsahují plazmidy rezistence [14; 19].

## 2.9 Patogenita a virulence

Člověk se rodí s nízkou diverzní a nestabilní mikroflórou, jež se liší způsobem porodu dítěte. Děti narozené vaginálně jsou zpočátku kolonizovány vaginální mikroflórou jako je *Lactobacillus* a *Prevotella*, zatímco děti narozené císařským řezem jsou kolonizovány zejména kožními mikroby. V prvním roce života se kojeným novorozencům ve střevech zvyšuje počet bifidobakterií a snižuje se podíl anaerobních organismů ve srovnání s novorozenci krmenými umělou výživou [21]. Poté se během let života vlivem potravy a jiných faktorů, dostávají do našeho těla další mikroorganismy, které můžeme rozdělit na komenzály a parazity. Komenzálové jsou neškodní příživníci například v našich střevech. Využívají hostitele s vhodným prostředím jako zdroj výživy a tím svého hostitele nijak neomezují. Tento vztah hostitele a mikrobu je vzácný, neboť se ve většině případech stává mikroorganismus součástí obranných systémů hostitele. Tímto se přechází z komensalismu do symbiózy, kdy si jinými slovy organismy navzájem pomáhají. Příkladem symbiózy mohou být streptokoky v ústech, rod *Bacteroides* a *Escherichia coli* v tlustém střevě, nebo také flóra trávicího traktu přežvýkavců. Opakem jsou poté parazité, kteří hostiteli svým metabolismem ubližují. Produkty a reakce metabolismu parazitů poté u hostitele vyvolávají příznaky onemocnění [22; 23].

Patogenita je schopnost mikroorganismu vyvolat onemocnění. Virulence je pojem, který kvantitativně vyjadřuje patogenitu kmenu patřícího do patogenního druhu. Patogenní druh se poté dělí na vysoce virulentní, virulentní a avirulentní kmeny [22; 24; 25].

Patogenní druhy mohou být patogenními jen k omezenému druhu hostitele, například *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhi je patogenní pouze pro člověka. Některé druhy patogenů mohou být patogenní pro široký okruh hostitelů, jako je to například *Bacillus anthracis*, který je patogenní pro všechna teplokrevná zvířata [22]. Jinými slovy se jedná o fenomén „všechno nebo nic“ a mikroorganismus je pro hostitele buď patogenní nebo ne. Naproti tomu virulence je měřitelná charakteristika schopnosti způsobit onemocnění. Obecně platí, že patogenitu aplikujeme na skupiny či druhy, kdežto virulenci využíváme pro srovnání v rámci skupiny nebo druhu. Oba termíny se však mohou vztahovat na jakoukoliv taxonomickou úroveň nebo napříč těmito úrovněmi (kmen, druh, čeleď atd.), za předpokladu, že patogenita je kvalitativní a virulence je pouze jako srovnávací měřítko [24].

Patogenní druhy mikroorganismů mohou být rozděleny podle virulence na primární patogeny a podmíněné patogeny. Primárně patogenní bakterie mají schopnost vyvolat onemocnění u zdravého hostitele. Právě proti těmto patogenům je mířeno preventivní očkování a v dnešní době je výskyt jimi vyvolaných onemocnění kontrolován. Mezi primárně patogenní mikroorganismy řadíme například *Salmonella enterica* subsp. *enterica* sv. Typhi, *Vibrio cholerae*, *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis* a *Yersinia pestis*. Hostitel je poškozen buď přímým působením mikroorganismu nebo neadekvátní odezvou imunitního systému [22; 23; 26].

Naopak podmíněně patogenní mikroorganismy vyvolávají onemocnění jen za určitých podmínek, například při oslabení imunitního systému, poranění kůže a cizími tělesy ve tkáni. Zdrojem infekce mohou být patogeny vnějšího prostředí, kdy se může jednat i o druhy běžně nepatogenní, ale i vnitřní autochtónní flóra se za daných podmínek může změnit v patogen [22; 23].

Patogenita bakterie závisí na produkci faktorů vyvolávajících onemocnění. Ty se nazývají faktory virulence a jsou v buňce kódovány geneticky. Mohou se vyskytovat v bakteriálním chromozomu nebo v plazmidech. Pokud jsou tyto geny uloženy v bakteriálním chromozomu, většina kmenů daného druhu bude patogenních. Pokud se však gen nachází na plazmidu, dodává bakteriím vysokou variabilitu, kdy mohou vznikat kmeny s variabilní virulencí [22]. Příklady faktorů virulence jsou toxiny, povrchové povlaky, které inhibují

fagocytózu, a povrchové receptory, které se váží na hostitelské buňky. Většina primárních bakteriálních patogenů si vyvinula specifické faktory virulence, které jim umožňují se dále množit v hostiteli, aniž by byly vypuzeny nebo usmrceny obranou hostitele. Mnoho faktorů virulence je produkováno pouze specifickými virulentními kmeny mikroorganismu. Například pouze některé kmeny *Escherichia coli* vylučují enterotoxiny způsobující průjemy [26].



### 3 ANTIMIKROBIÁLNÍ LÁTKY

Antimikrobiální látky jsou chemické sloučeniny či fyzikální činidla, které se používají k ničení mikroorganismů nebo k zabránění jejich rozvoji [27]. Řadí se sem antibiotika proti bakteriím, virostatika bojující proti virům, antimykotika proti mikromycetám, a antiparazitika [23]. Mezi antimikrobiální látky se dále řadí antimikrobiální peptidy, a to například katelicidiny, bakteriociny, defenziny a neribozomální peptidy [28].

Antibiotika jsou antimikrobní látky, jež produkují mikroorganismy a které mohou usmrtit či pozastavit růst mikroorganismů. Virostatika se používají při léčbě těžkých virových onemocnění, avšak virus nehubí, pouze brání jejich množení. Antimykotika se využívají k léčbě systémových i lokálních nákaz kvasinkami či plísněmi. Antiparazitika se dále dělí na antiprotozoika, antihelminatika a antiectoparazitika. Antiprotozoika se využívají při léčbě onemocnění vyvolaných prvoky, kam můžeme zařadit například toxoplazmózu či malárii. Onemocnění heminty se léčí pomocí antihelmintiky, mezi které dále řadíme anticestodika proti tasemnicím, antitrepatodika proti motolicím, a antinematodika proti hlísticím. Posledními antiparazitiky jsou antiectoparazitika bojující proti parazitům napadající kůži. K antiectoparazitikům jsou často přiřazovány insekticidy a repelenty [23].

Katelicidiny jsou známé jako hostitelské obranné peptidy, které jsou zodpovědné za vrozené imunitní reakce. Jsou široce rozšířené u savců i nesavcích obratlovců, jako jsou sliznatky, pstruhové či kuřata. Vykazují řadu funkcí, od přímé antimikrobiální aktivity proti bakteriím, houbám, eukaryotickým parazitům a virům až po protizánětlivé aktivity. Další kategorií jsou bakteriociny, ribozomálně syntetizované antimikrobiální peptidy či proteiny, jež usmrcují nebo inhibují růst blízce příbuzných bakterií. Ty se dělí na bakteriociny typu I (lantibiotika) a typu II (nemodifikované bakteriociny). Asi nejznámějšími zástupci bakteriocinů jsou koliciny a mikrocin produkované *Escherichia coli*. Defenziny jsou obranné peptidy hostitele obratlovců, bezobratlých, rostlin a plísní. Defenziny také hrají důležitou regulační roli v imunitním systému a působí jako most mezi vrozenou a adaptivní imunitou u obratlovců. Neribozomální peptidy jsou vysoce rozmanité přírodní produkty bakteriálního a plísňového původu a na rozdíl od ribozomálně produkovaných peptidů u nich nedochází k posttranslačním modifikacím. Řadí se sem například peptaiboly, jež jsou homologní lineární peptidy izolované z půdních hub. Většina peptaibolů vykazuje antibakteriální nebo antifungální aktivitu, některé mají i antivirové a protinádorové účinky a podporují hojení ran [28].

### 3.1 Bakteriociny

Mikrobi vytvářejí mimořádnou škálu mikrobiálních obranných systémů, mezi které patří širokospektrá antibiotika, metabolické vedlejší produkty, jako je kyselina mléčná, lysozym, četné typy proteinových exotoxinů a bakteriociny. Bakteriociny se nacházejí téměř u všech zkoumaných bakteriálních druhů. V rámci jednoho druhu mohou být přítomny desítky až stovky různých bakteriocinů [29]. Pojem bakteriocin je užíván zejména pro antibakteriální peptidy tvořené grampozitivními bakteriemi, obzvláště bakteriemi mléčného kvašení. Nicméně i enterobakterie produkují peptidy a proteiny také nazývané bakteriociny [30]. Bakteriociny produkované gramnegativními bakteriemi jsou různorodé. Jen z *Escherichia coli* bylo identifikováno více než 30 různých bakteriocinů a dá se očekávat, že další budou objeveny [29].

Bakteriociny produkované enterobakteriemi jsou proteiny ribozomálně syntetizovány, známé jako koliciny a mikrociny. Tyto látky jsou produkovány enterobakteriemi ve stresových situacích, což vede k odpovědi „SOS systému“. Pokud dochází k souboji o nutrienty, tyto peptidy mohou inhibovat růst *E. coli* a dalším fylogeneticky příbuzných bakterií [30]. Geny pro produkci aktivních bakteriocinů jsou obvykle ve shlucích operonů, které jsou uloženy v genomu nebo plazmidu. Exprese těchto operonů je indukovatelná a vyžaduje přítomnost autoinduktorových peptidů pro indukci. Exprese je často regulována dvousložkovým regulačním a v některých případech tříložkovým regulačním systémem [31].

Bakteriociny byly zpočátku klasifikovány do čtyř tříd. Čtvrtá třída bakteriocinů, obsahovala velké komplexy se sacharidovými nebo lipidovými skupinami, a proto byla zrušena a pojmenována jako bakteriolyliny. Tím pádem se bakteriociny dělí převážně do tří tříd. Bakteriociny I třídy jsou běžně složeny z 19–50 aminokyselin a jsou značně posttranslačně upravovány, což vede ke vzniku nestandardních aminokyselin. Tato třída se dále dělí na Ia (lantibiotika) a Ib (labyrinthopeptidy) a Ic (sanctibiotika). Nejznámějším bakteriocinem z této třídy je nisin. Třída II obsahuje malé tepelně stabilní, nemodifikované peptidy a lze ji dále rozdělit na třídu IIa (bakteriociny podobné pediocinu), IIb (dvoupeptidové nemodifikované bakteriociny), IIc (kruhové bakteriociny) a IId (nemodifikované, lineární bakteriociny nepodobné pediocinu). Bakteriociny III třídy jsou velké a tepelně labilní látky, o kterých je k dispozici jen málo informací. Kolicin je jedním z příkladů bakteriocinů třídy III produkovaných *Escherichia coli* [31].

### 3.1.1 Koliciny

Koliciny jsou typicky velké proteiny s vysokou molekulovou hmotností. Třetina kmenů *Escherichia coli* produkuje bakteriociny. Kmeny *E. coli*, které jsou schopny produkovat tento bakteriocin, nesou kolicinogenní plazmid s genetickou informací pro syntézu, imunitu a uvolňování kolicinu [29; 32].

Existují dva typy kolicinogenních plazmidů, které se liší velikostí, počtem kopií v buňce, schopností amplifikace a schopností přenosu konjugací. Kolicinogenní plazmidy typu I jsou malé, vyskytují se v buňce ve velkém počtu kopií a kódují koliciny skupiny A. Kolicinogenní plazmidy typu II jsou naopak velké, v buňce se nachází pouze jedna kopie a často jsou schopné přenosu konjugací. Velké plazmidy typu II mohou obsahovat jeden či dva operony a to buňce dává schopnost produkovat až dva odlišné koliciny. Exprimované koliciny se hromadí v cytoplasmě produkující buňky a potřebují významné množství lyzačního proteinu, aby se uvolnily do extracelulárního média. Kolicinové lyzační proteiny jsou malé proteiny a jsou koexprimovány s koliciny. Kolicinová lyze způsobuje strukturní změny a lyzi buněčného obalu, aktivaci vnější membrány fosfolipázy A a následnou smrt produkující buňky. Syntéza kolicinů skupiny B však není pro buňku smrtelná díky nepřítomnosti lyzačního genu v plazmidu typu II [30].

Jak již bylo zmíněno, koliciny se dělí do dvou skupin A a B, které jsou založené na zkřížené rezistenci. Skupina A zahrnuje koliciny, které jsou translokovány systémem Tol, jako jsou koliciny A, E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y. Naopak skupina B zahrnuje koliciny využívající systém TonB, jako jsou koliciny B, D, H, Ia, Ib, M, 5 a 10 [30; 32].

Koliciny s enzymatickou aktivitou mohou působit jako hydrolázy či transferázy cílící na fosfodiesterové vazby DNA nebo RNA hostitelské buňky. Koliciny se nejdříve vážou prostřednictvím Ton nebo Tol systému na specifické receptory, což jsou proteiny na vnější membráně určené pro vstup specifických živin. Poté jsou translokovány přes membránu a procházejí periplazmatickým prostorem, kde vyvíjí letální aktivitu [30; 32]. DNázové koliciny degradují DNA produkováním důlků v dsDNA opakovaným štěpením. Tyto koliciny jsou závislé na kovu, avšak povaha požadovaných kovových iontů je neznámá. Výzkum Ku et al. (2002) [33] naznačuje, že  $Zn^{2+}$  a  $Ni^{2+}$  jsou nezbytné jako kofaktory enzymové aktivity. Koliciny RNázy mohou způsobit buněčnou smrt inhibicí syntézy proteinů a pro tuto činnost nejsou potřebné žádné kofaktory. Cílovými molekulami RNázových kolicinů jsou 16S rRNA a antikodonové smyčky tRNA. Nukleázové koliciny

jsou produkovány z buňky v komplexu s jejími specifickými imunitními proteiny, které chrání produkující buňky od letální aktivity [30].

### 3.1.2 Mikrociny

Mikrociny jsou nízkomolekulární, ribozomálně produkované, některé z nich procházející posttranslačními modifikacemi, vysoce stabilní látky. Jsou vylučovány zejména bakteriemi z čeledi *Enterobacteriaceae* a jsou schopny inhibovat jiné bakterie [34].

Klasifikace mikrocinů bere v úvahu tři kritéria a to za (a) přítomnost, povahu a lokalizaci posttranslačních modifikací; za (b) organizaci genového klastru a za (c) sekvenace vedoucích peptidů. Dle těchto kritérií se mikrociny rozdělují do dvou skupin [30].

Mikrociny třídy I, jako jsou MccB17, MccC7–C51, MccD93 a MccJ25, jsou malé peptidy kódované plazmidem, které vyžadují rozsáhlé posttranslační modifikace hlavního řetězce. Mikrociny třídy II jsou o něco větší než mikrociny I třídy. Dále se mikrociny třídy II dělí na IIa, včetně mikrocinů MccL zprostředkovaných plazmidem, MccV a MccS, které nevyžadují posttranslační úpravy a mají dvě, jednu nebo žádnou disulfidovou vazbu, a IIb, jako jsou chromozomálně kódované mikrociny MccE492, MccM a MccH47 [30; 34].

Mikrociny blokují vitální funkce v cílové buňce. Některé tvoří póry v bakteriální membráně, inhibují aspartyl-tRNA syntetázu, která je nezbytná při syntéze proteinů, a inhibují DNA gyrázu, což má za následek dvojité zlomy DNA. Jiné mikrociny blokují sekundární RNA polymerázový kanál narušující transkripci a inhibují buněčné dýchání, narušují buněčný protonový kanál, nebo ATP syntázu [30; 34]. Mikrociny I třídy inhibují aktivitu esenciálních enzymů, jako je například DNA gyráza. Naopak mikrociny II třídy se zaměřují na vnitřní membránu buňky, neboť pro svou aktivitu potřebují právě proteiny vnitřní membrány [30].

### 3.1.3 Marcesciny

Bylo zjištěno, že kmen *Serratia marcescens* produkuje marcesciny A a B, kdy marcescin A byl znám před marcescinem B. Syntéza obou marcescinů byla indukovatelná mitomycinem C. Marcescin A je odolný vůči trypsinu, napadá některé kmeny *Serratia marcescens* i *Escherichia coli* a jeho mechanismus účinku se v mnoha ohledech podobá kolicinu E2. Inhibuje tedy syntézu DNA, RNA a proteinů a také způsobuje degradaci DNA. Ve vysokých koncentracích degraduje i RNA. Marcescin B je naopak citlivý na trypsin a nepůsobí na kmeny *Serratia marcescens*. Jeho mechanismus účinku je podobný kolicinu E1, kdy inhibuje syntézu DNA, RNA a proteinů bez degradace DNA [35].

## 3.2 Antibiotika

Pojem antibiotikum je definován jako přírodní nebo syntetická chemikálie inhibující jak růst, tak přežití mikroorganismů [36]. Pokud se jedná o přírodní antibiotika, jsou to sekundární metabolity některých mikroorganismů. Mělo by být selektivně toxické neboli inhibující růst mikroorganismů v dávkách, které ještě nepoškozují makroorganismus [23; 37].

Jednou z prvních známých antimikrobiálních látek byla pyocyanáza, nazývaná i pyocyanin, poprvé popsána doktorem Fordosem v roce 1859 [38]. Byla vytvořena z lihového výluhu z kolonií *Pseudomonas aeruginosa*, avšak tato látka byla velice toxická, a proto byl výluh používán pouze lokálně [23].

Asi nejznámějším objevem v této oblasti byl objev penicilinu v roce 1928. Penicilin byl objeven náhodou sirem Alexandrem Flemingem. V roce 1941 došlo Howardem Floreyem a Ernestem Chainem k extrakci penicilinu z houby *Penicillium chrysogenum* [36]. Později došlo k jeho purifikaci a jeho syntetické výrobě, kdy se začal klinicky využívat [23].

Antibiotika se rozdělují do dvou kategorií podle účinku, a to na baktericidní a bakteriostatická. Baktericidní antibiotika mají ireverzibilní účinek, který vede k usmrcení mikroorganismu. Naopak bakteriostatické antibiotikum je reverzibilní proces, při kterém dochází pouze k zastavení růstu mikroorganismů [23; 37].

### 3.2.1 Mechanismus účinku

Antibiotika se dále rozdělují podle mechanismu účinku. Cílí na zásadní procesy a struktury v buňce mikroorganismu a tím mohou inhibovat její růst. Existuje hlavních pět mechanismů účinku:

- Inhibitory syntézy buněčné stěny jsou velmi účinné, vysoce selektivní, baktericidní antibiotika. Můžeme sem zařadit peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a glykopeptidy.
- Inhibitory funkcí buněčné stěny jsou baktericidní látky působící jak na bakterie tak i mikromycety. Příklady těchto inhibitorů jsou polymyxin B, kolistin a lipopeptidy.
- Baktericidní inhibitory syntézy nukleových kyselin zasahují do různých segmentů syntézy nukleových kyselin. V porovnání s inhibitory syntézy buněčné stěny jsou inhibitory syntézy nukleových kyselin více toxické. Spadají sem například fluorochinolony.

- Inhibitory proteosyntézy se váží na bakteriální ribozomy a tím inhibují bakteriální růst. Mohou mít jak baktericidní, tak bakteriostatický účinek, kdy se baktericidní antibiotikum ireverzibilně váže na malou podjednotku, a antibiotika s bakteriostatickým účinkem se reverzibilně váží velkou podjednotku. Typickým baktericidním antibiotikem z této kategorie jsou aminoglykosidy. Bakteriostatickými antibiotiky, které se váží na velkou podjednotku, jsou makrolidy, linkosamidy a chloramfenikol. Tetracykliny mohou být bakteriostatická antibiotika vážící se na malou podjednotku.
- Poslední kategorií jsou antimetaboly, což jsou bakteriostatická antibiotika inhibující syntézu kyseliny listové. Řadíme sem sulfonamidy, trimethoprim. Kombinace obou antibiotik se nazývá kotrimoxazol a působí baktericidně [23; 36].

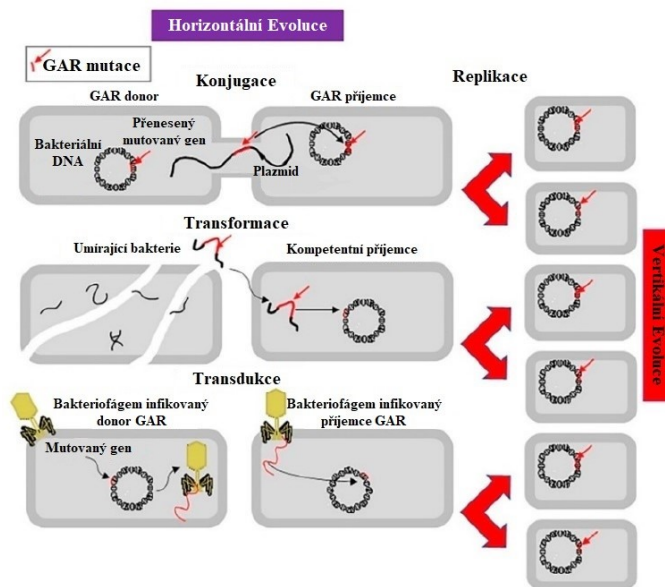
### 3.2.2 Antibiotická rezistence

Rezistence k antibiotikům je schopnost mikroorganismu těmto látkám odolávat. U rezistentního mikroorganismu se vyskytuje molekulárně-biologický, geneticky kódovaný mechanismus, který snižuje účinek antimikrobiální látky. Rezistence na antimikrobiální látky může být buď přirozená nebo získaná [23].

Mikroorganismy jsou schopny vyvinout geny rezistence z důvodu lepšího přežití, čímž se minimalizují možnosti léčby mikrobiálních infekcí a zvyšuje se tak úmrtnost nakažených [36]. Získání rezistence vůči antibiotiku může být otázka jak měsíců, tak i let. Například rezistence na penicilin byla pozorována již na počátku roku 1945. Naopak rezistence vůči vankomycinu byla zaznamenána až v roce 1987, tedy až po 30 letech od začátku užívání tohoto antibiotika v klinické praxi [37].

Antibiotická rezistence se vyvíjí jako výsledek vertikálního nebo horizontálního vývoje. Výhodné mutace způsobují toleranci vůči antibiotikům, která se dále přenáší na potomstvo – vertikální evoluce –, nebo na jinou bakterii prostřednictvím konjugace, transdukce nebo transformace – horizontální evoluce. Právě horizontální genový přenos mezi lidskými patogeny je velice významným mechanismem získávání genů antibiotické rezistence (GAR) [36].

Mechanismy jak vertikální, tak horizontální evoluce jsou uvedeny v Obrázku 2. Levá část obrázku popisuje horizontální přenos genu antibiotické rezistence (GAR; červená čára označena červenou šipkou) třemi hlavními mechanismy – konjugace, transformace a transdukce. Konjugace zahrnuje přenos GAR z donorové bakterie na příjemce prostřednictvím přímého kontaktu a hraje klíčovou roli v šíření antibiotické rezistence. Transformace zahrnuje příjem volně DNA obsahující GAR z prostředí. Transdukce je bakteriofágy zprostředkovaný přenos genů. Pravá strana obrázku popisuje vertikální vývoj prováděný replikací bakterie obsahující GAR [36].



Obrázek 2 Mechanismy horizontálního a vertikálního přenosu u bakterií pro vývoj [36]

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**



## 4 CÍL PRÁCE

Cílem této bakalářské práce byla charakterizace enterobakterií izolovaných z kuřecího masa pomocí mikrobiologických a molekulárně-biologických metod.

Jednotlivé části práce zahrnovaly:

- identifikaci enterobakterií pomocí mikroskopických, biochemických a kultivačních metod;
- stanovení citlivosti vůči vybraným antibiotikům diskovou difuzní metodou;
- detekci genů rezistence metodou PCR;
- detekci bakteriocinogenie;
- bakteriocinotypizaci kolicinogenních kmenů metodou PCR;
- zařazení kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin a detekce genů virulence.

## 5 MATERIÁL A METODIKA

### 5.1 Materiál

#### 5.1.1 Vzorky

V této bakalářské práci byly zpracovávány vzorky kuřecího masa zakoupeného v lednu roku 2022, kdy tři z nich byly špalíčky, a další tři byla křídla. Tyto vzorky masa byly zakoupeny ve třech různých řeznictvích ve městě Zlín.

Tabulka 2 Vzorky kuřecího masa a jejich původ

Vzorek	Část	Řeznictví
K31	Špalíček	U Červinků
K32	Špalíček	Řeznictví Singer
K33	Špalíček	Sanytrák
K34	Křídlo	U Červinků
K35	Křídlo	Řeznictví Singer
K36	Křídlo	Sanytrák

#### 5.1.2 Použité kmeny

V této práci byly kromě bakterií izolovaných v této práci využity také kmeny izolované z kuřecího masa z diplomové práce Kateřiny Zaymlové (2022), které jsou uvedeny v Příloze I [39] a jsou součástí sbírky mikroorganismů na Ústavu inženýrství a ochrany životního prostředí, Fakulty technologické UTB ve Zlíně.

Pro stanovení produkce bakteriocinů byly využity indikátorové mikroorganismy uvedené v Tabulce 3.

Tabulka 3 Indikátorové mikroorganismy a jejich původ

Kmen	Označení	Zdroj
<i>Escherichia coli</i>	ϕ	Biologický ústav Masarykovy univerzity v Brně
<i>Escherichia coli</i>	P400	
<i>Escherichia coli</i>	B1	
<i>Escherichia coli</i>	ROW	
<i>Escherichia coli</i>	SABINA 40	
<i>Shigella sonnei</i>	SS17	

### 5.1.3 Laboratorní přístroje

- Aeris™ PCR Thermal Cycler ESCO, Singapur
- Běžné laboratorní pomůcky a laboratorní sklo
- Binokulární mikroskop se čtyřmi objektivy Intraco Micro, Česká republika
- Dekontaminační digestoř Aura PCR BioAir, Itálie
- Elektroforetická vana Cleaver Scientific Ltd, UK
- Infinite®M200 Tecan, Švýcarsko
- InGenius transluminátor Syngene, UK
- Magnetický separátor NucleoMag SEP MACHREY-NAGEL, Německo
- Mikropipety Eppendorf, Německo
- Mikrotitrační destička GAMA, Česká republika
- Pipety Eppendorf, Německo
- Počítačový program SnapGene InGenius pro vyhodnocení elektroforetického gelu
- Počítačový program TNW pro vyhodnocení ENTEROtest
- Souprava mikrotestů ENTEROtest 24 Erba Lachema, Česká republika
- Spiral plater EDDY JET 2 ILU Instruments, Španělsko
- Stolní centrifuga miniSpin Eppendorf, Německo
- Stomacher Classic IUL BioTech, Česká republika
- Suchý blokový termostat CH-100 BioSan, Česká republika
- Třepačka VX-200 Vortex Mixer Labnet International, USA
- Váhy KB d = 0,1 g KERN, Německo
- Zákaloměr Densi-La-Meter Erba Lachema, Česká republika
- Zdroj energie EV243 Consort, Belgie

**5.1.4 Kultivační média****VRBL (Violet Red Bile Lactose Agar)**

HIMEDIA, Indie

Složení (g/l):

Agar	15
Laktóza	10
Pepton	7
NaCl	5
Kvasniční extrakt	3
Směs žlučových solí	1,5
Neutrální červeň	0,03
Krystalová violet'	0,002
Destilovaná voda	1000 ml

**Masopeptonový agar**

HIMEDIA, Indie

Složení (g/l):

Agar	15
Pepton	10
Masový výtažek	10
NaCl	5
Destilovaná voda	1000 ml

**Plate count agar (PCA)**

HIMEDIA, Indie

Složení (g/l):

Agar	15
Trypton	5
Kvasinkový extrakt	2,5
Glukóza	1
Destilovaná voda	1000 ml

**Mueller Hinton Agar (MH agar)**

HIMEDIA, Indie

Složení (g/l):

Ekvivalent hovězího výtažku	300
Agar	17
Ekvivalent hydrolyzátu kyseliny kaseinové	1,5
Škrob	1,5
Destilovaná voda	1000 ml

**Soft Agar**

Složení (g/l):

Agar	10,5
Pepton	5
NaCl	5
Masový výtažek	3
Destilovaná voda	1000 ml

**Masopeptonový bujón**

HIMEDIA, Indie

Složení (g/l):

Pepton	5
Masový výtažek	3
NaCl	3
Destilovaná voda	1000 ml

## 5.1.5 Chemikálie a antibiotika

### 5.1.5.1 Chemikálie

- Aceton PENTA, Česká republika
- Agaróza Sigma-Aldrich, USA
- Destilovaná voda
- Eluční pufr QIAGEN, Německo
- Ethanol PENTA, Česká republika
- Gelred Nucleic Acid Stain 10,000x Water Biotium, USA
- GoTaq® G2 Hot Start Green Master mix Promega, USA
- Chlorid sodný PENTA, Česká republika
- Chloroform Sigma, St. Louis, USA
- Imerzní olej Sigma-Aldrich, USA
- Krystalová violet PENTA, Česká republika
- Lugolův roztok LACHEMA, Česká republika
- Parafín Sigma-Aldrich, USA
- PCR destilovaná voda
- Peqlab peqGOLD, DNA Ladder, 100 bp Plus Avantor, Litva
- Peroxid vodíku PENTA, Česká republika
- Proteinasa K QIAGEN, Německo
- Safranin HIMEDIA, Indie
- SPRIselect magnetické kuličky Beckman Coulter, USA
- Tris-acetátový pufr (TAE pufr)
- Vymývací pufr QIAGEN, Německo

### 5.1.5.2 Antibiotika

Byly použity antibiotické disky s antibiotiky Kolistin CL10, Ciprofloxacin CIP5, Chloramfenikol C30, Ceftazidim CAZ30, Amikacin AK30, Tetracyklin TE10, Cefuroxim CXM30, Mupirocin MU5, Doxycyklin hydrochlorid DO30, Impenem IMP10, Ampicilin AMP10, Ampicilin sulbactam A/S10/10, Cafazolin CZ30, Cefoxotin CX30, Ceftriaxon CTR30, Cefalotin CEP30, Azitromycin AZM15, Amoxicilin AMX10.

Veškeré antibiotické disky využity v této práci byly vyrobeny výrobcem HIMEDIA, Indie.

## 5.2 Metodika

### 5.2.1 Izolace kmenů

Kmeny byly izolovány z již uvedených vzorků kuřecího masa v Tabulce 2. Z těchto vzorků bylo odebráno 5 g kůže a vloženo do sterilního homogenizačního sáčku. Vzorek kuřecí kůže byl dále homogenizován v devítinásobném množství sterilního fyziologického roztoku pomocí Stomacheru. Vzniklá suspenze byla v desítkovém ředění inokulována na VRBL agar pomocí Spiral plateru a následně kultivována při 37 °C po dobu 24 hodin.

Z každé série misek jednotlivých vzorků bylo odebráno 4–5 kolonií s odlišnými makroskopickými znaky. Tyto kolonie byly dále naočkovány na půdu VRBL metodou křížového roztěru sloužící k oddělení jednotlivých kolonií. Půdy VRBL byly kultivovány v termostatu ve 37 °C po dobu 24 hodin.

Z půd VRBL s křížovými roztěry byly odebrány samostatné kolonie a naočkovány na univerzální půdu PCA a byl opět proveden křížový roztěr. Tyto půdy byly kultivovány v termostatu ve 37 °C po dobu 24 hodin.

### 5.2.2 Identifikační metody

K identifikaci kmenů byly použity mikroskopické metody počítaje barvení podle Grama a biochemické metody obsahující katalázový a oxidázový test. Dále byla využita metoda ENTEROtest 24N.

První využitou metodou bylo barvení podle Grama, jež je metoda založena na odlišení bakterií grampozitivních a gramnegativních na základě fyzikálních a chemických vlastností jejich buněčných stěn [40].

Od každého kmene byla odebrána jedna kolonie a rozetřena v kapce destilované vody na podložním sklíčku. Dále byla podložní sklíčka ponechána určitou dobu blízko kahanu, aby došlo k úplnému zaschnutí suspenze. Poté bylo sklíčko se zaschlou suspenzí třikrát protaženo plamenem, aby došlo k zafixování mikroorganismů na povrch sklíčka. Dále následovalo samotné barvení. Nedříve bylo sklíčko ponořené na 60 s do krystalové violeti, poté do Lugolova roztoku na 30–60 s, dále bylo sklíčko opláchnuté acetonem, a nakonec bylo ponořeno do safraninu na 60 s. Mezi každým krokem bylo sklíčko opláchnuto destilovanou vodou. Poté byly jednotlivé buňky pozorovány pod mikroskopem. Zde byl použit imerzní objektiv společně s imerzním olejem.

Dalším krokem byl oxidázový test, jehož principem je detekce chromoxidázy pomocí barevné reakce ethyloxethyl-parafenylendiaminu s alfa-naftolem za vzniku indofenolové modři. V případě pozitivní reakce se inokulované místo na proužku zbarví tmavomodře až černě. Při negativní reakci zůstane inokulované místo na disku nezbarveno [41].

Od každého kmene byla odebrána část kolonie na špičku sterilní kličky a dále rozetřena na určenou část na proužku. Dále byla pozorována barevná změna.

Posledním krokem bylo provedení katalázového testu. Účelem této metody je stanovení schopnosti bakterií produkovat enzym katalázu. Tento enzym může rozkládat peroxid vodíku  $H_2O_2$  za vzniku kyslíku a vody. Bakterie rozkládající peroxid vodíku obsahují ve své buňce enzym katalázu, a proto jsou kataláza-pozitivní [40].

Od každého kmene byla odebrána část kolonie na špičku sterilní kličky a dále rozetřena v kapce peroxidu vodíku na podložním sklíčku. Dále byla pozorována produkce plynu za vzniku bublin.

Pro přesnější identifikaci kmenů byla použita souprava ENTEROtest 24N, která slouží pro identifikaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Souprava obsahuje mikrotitrační destičku s 24 biochemickými testy pro průkaz biochemické aktivity specifické pro daný druh bakterií. V jamkách mikrotitrační destičky jsou obsaženy ureáza URE, arginin ARG, ornitin ORN, lysin LYS, sirovodík  $H_2S$ , Simmons citrát SCI, malonát MAL,  $\beta$ -galaktosidáza ONP, salicin SAL, sorbitol SOR, melibióza MLB, celobióza CEL, laktóza LAC, trehalóza TRE, mannitol MAN,  $\beta$ -glukuronidáza GLR, dulcitol DUL, adonitol ADO, arabitól ART, sacharóza SUC, inositol INO, rafinóza RAF, esculin ESL,  $\beta$ -xylosidáza bXY. Diagnostika pozitivní biochemické reakce je založena na změně barvy testovacího média, ke které dochází změnou příslušného indikátoru [42].



Postup byl založen na doporučeném postupu v příbalovém letáku dle ENTEROtest 24N. Z čerstvé kultury bylo odebráno příslušné množství a vloženo do zkumavky s fyziologickým roztokem. Vzniklá suspenze byla pečlivě promíchána a pomocí zákaloměru změřena do ideální hustoty 1 McF. Dále byla vzniklá suspenze inokulována do jamek po 100  $\mu$ l. Nakonec byly do prvních pěti jamek prvního řádku s testy URE, ARG, ORN, LYS, H<sub>2</sub>S přidány dvě kapky parafinového oleje. Mikrotitrační destička byla vložena do určeného sáčku a inkubována 24 hodin ve 37 °C.

### 5.2.3 Detekce bakteriocinogenie – vpichový pokus

Pro detekci tvorby bakteriocinů byla použita metoda vpichového pokusu [43], kdy byly do základní agarové plotny inokulovány vpichem čerstvé kultury potencionálních producentů. Tyto plotny byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Narostlé kolonie bakterií byly usmrceny parami chloroformu a plotna pokryta suspenzí 3 ml soft agaru a 100  $\mu$ l čerstvého indikátorového kmene. Indikátorovými kmeny byly *Escherichia coli*  $\phi$ , P400, B1, ROW, SABINA 40 a *Shigella sonnei* 17, které jsou uvedeny v Tabulce 3. Po ztuhnutí byly plotny inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po ukončení inkubace byl sledován vznik inhibičních zón.

### 5.2.4 Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda je jedním z nejstarších přístupů k testování antimikrobiální citlivosti. Tato metoda má výhodu v tom, že je univerzální a je vhodná pro testování většiny bakteriálních patogenů, včetně náročnějších kmenů, a lze testovat téměř všechny antimikrobiální činidla. Také nevyžaduje žádné speciální vybavení [44].

Bylo postupováno podle metodiky EUCAST, kdy byl použit Mueller Hinton agar s inokulem odpovídajícím McFarlandovu standardu zákalu 0,5 [44].

Byla vytvořena suspenze fyziologického roztoku a daného kmenu o hustotě 0,5 McF. Na povrch Petriho misky byla tato suspenze rovnoměrně naočkována. Případný zbytek suspenze byl z plotny odebrán. Na povrch agaru se suspenzí byly opatrně položeny disky s antibiotiky o známé koncentraci. Poté byly misky kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin.

Po uběhnutí době kultivace byl pozorován vznik inhibičních zón bez nárůstu buněk a měřen průměr těchto zón v mm.

### 5.2.5 Genotypizační metody

Byly využity molekulárně-biologické metody ke genotypizaci kmenů izolovaných z kuřecího masa. Bylo izolováno DNA, které bylo dále využíváno pro PCR reakce. PCR produkty byly zobrazeny pomocí elektroforézy na agarózovém gelu a UV-transluminátoru.

#### 5.2.5.1 Izolace DNA

DNA vybraných kmenů byla izolována pomocí kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN (Německo). Bylo postupováno podle postupu pro izolaci DNA gramnegativních bakterií.

Byly využity jednotky [rpm] – revolutions per minute, v češtině pak otáčky za minutu. Tato jednotka však není tak přesná, neboť se zrychlení zvyšuje se zvětšením poloměru centrifugy. Jednotka [g] pro relativní odstředivou sílu (RCF) je v tomto ohledu přesnější, neboť je univerzální a je nezávislá na velikosti centrifugy. Vztah mezi těmito silami je:

$$\text{RCF nebo G – force} = 1,12 \cdot r \cdot \left(\frac{\text{rpm}}{1000}\right)^2 \quad [45]$$

Z každého vzorku byla odebrána jedna kolonie a převedena do univerzálního živného bujónu. Bujóny byly inkubovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Z těchto živných bujónu bylo odebráno 1,5 ml suspenze a převedeno do eppendorfek. Eppendorfky byly centrifugovány při 8 000 rpm po dobu 5 minut. Po uplynuté době byl odebrán supernatant a pelet byl resuspendován ve 200 µl ATL pufru. Dále bylo přidáno 20 µl proteinázy K a suspenze byla důkladně promíchána. Eppendorfky s rozmíchanou suspenzí byly inkubovány při 56 °C po dobu 10 minut. Po uběhnutí 10 minut bylo do eppendorfky přidáno 200 µl AL pufru a po promíchání bylo přidáno 200 µl 96% ethanolu. Suspenze v eppendorfce byla opět promíchána. Rozmíchaná suspenze byla odpipetována a přenesena do 2 ml kolonky se sběrnou zkumavkou. Kolonka byla centrifugována při 8 000 rpm po dobu 1 minuty. Po uběhlé době byla odebrána sběrná zkumavka a nahrazena novou. Do kolonky bylo přidáno 500 µl AW1 pufru a kolonka byla centrifugována při 8 000 rpm po dobu 1 minuty. Sběrná zkumavka byla odstraněna a nahrazena novou. Do kolonky bylo přidáno 500 µl AW2 pufru a kolonka byla centrifugována při 14 000 rpm po dobu 3 minut. Sběrná zkumavka byla odebrána a nahrazena 2 ml eppendorfkou. Doprostřed kolonky bylo pipetováno 100 µl elučního AE pufru a inkubováno 10 minutu při pokojové teplotě. Poté byla kolonka centrifugována při 14 500 rpm po dobu 1 minuty.

Dále byla spektrofotometricky změřena koncentrace izolované DNA (ng/ $\mu$ l) při vlnových délkách 260 nm pomocí přístroje Tecan Infinite M200. Technika pro stanovení koncentrace nukleových kyselin je založena na měření absorbance při 260 nm (A260) [46].

Na destičku Nano Quant bylo naneseno 5  $\mu$ l elučního AE pufru využitého při izolaci DNA a byla provedena kalibrace. Poté bylo naneseno stejné množství vzorku izolované DNA a byla změřena absorbance. Poté byla vyhodnocena koncentrace DNA v ng/ $\mu$ l.

#### 5.2.5.2 Identifikace kmenů pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA

Pro identifikaci kmenů pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA byla potřeba provést PCR DNA vybraných kmenů. Byla vybrána metoda Touchdown PCR, která je používána pro zvýšení specifity PCR.

V touchdown PCR je teplota annealingu zpočátku zvolena o 5–10 °C vyšší než vypočítaná  $T_m$  (primer melting temperature) primerů. V následujících cyklech se teplota postupně snižuje, např. po půl stupních, a na konci PCR je annealingová teplota o 2–5 °C nižší než vypočítaná  $T_m$ . Do té doby cílová sekvence projde několika cykly geometrické amplifikace, a proto se stane dominantním produktem PCR. Aby se minimalizovalo chybné nasednutí primerů během prvních cyklů PCR, měla by být v touchdown PCR vždy nastavována vyšší teplota startu [47].

Tabulka 4 Seznam použitých primerů pro sekvenaci genu pro 16S rRNA

Primer	sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	$T_A$	Reference
FD1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG		57	[48]
RD2	AAG GAG GTG ATC CAG CC			

Složení amplifikační směsi PCR pro jednu reakci ( $\mu$ l):

H <sub>2</sub> O	7
2x MasterMix	10
DNA Primer R	1
DNA Primer F	1
DNA matrice	1

Podmínky touchdown PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/3 minut
Počet cyklů	9x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	62 °C/30 sekund; s každým cyklem snižující o 0,5 °C
Extenze	72 °C/1 minuta a 30 sekund
Počet cyklů	24x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	57 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/1 minuta a 30 sekund
Závěrečná extenze	72 °C/5 minut

Dále byla provedena detekce výsledných PCR produktů v prostředí 1 x TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu při 90 V po dobu 75 minut, vyhodnoceny v UV-transluminátoru pomocí počítačového programu SnapGene. Podle těchto výsledků bylo určeno, zda PCR proběhla správně.

Po kontrole správnosti PCR pomocí elektroforézy byla provedena purifikace PCR produktu pomocí magnetických kuliček a magnetu. Byl vybrán doporučený postup SPRIselect, Beckman Coulter pro výběr velikosti na levé straně. PCR produkt ve zkumavce smíchán s vypočítaným množstvím magnetickými kuličkami dle objemu PCR produktu a tyto dvě složky byly pečlivě promíchány. Tato směs byla převedena do mikrotitrační destičky, která byla následně umístěna na magnet. Během minuty byla pozorovatelná migrace magnetických kuliček k magnetu. K absorpci DNA na kuličky může docházet v závislosti na pH a obsahu solí v pufru. Absorpční proces je založen na vodíkové vazebné interakci s hydrofilní maticí za chaotropních podmínek, iontové výměně za vodných podmínek pomocí aniontoměniče a afinitních a velikostních vylučovacích mechanismech [49]. Supernatant byl opatrně odpipetován a k magnetickým kuličkám s navázanou DNA byl přidán 85% ethanol. Po dobu 30 sekund a více byly kuličky promývány ethanolem a poté se kuličky opět odseparovaly magnetem. Ethanol byl odpipetován, magnet odebrán a destička postavena na blokový termostat s nastavenou teplotou 60 °C. Po dobu přibližně jedné minuty byly kuličky vysušeny a zbaveny zbylého ethanolu. K suchým kuličkám bylo nakonec přidáno  $\geq 20$   $\mu$ l PCR vody a proběhla eluce DNA z kuliček do vody. Mikrotitrační destička byla opět postavena na magnet, dokud se kuličky opět nepřesunuly k magnetu, kdy mohla být směs vody a DNA odpipetována a přenesena do samostatné eppendorfky.

Dále byla spektrofotometricky změřena koncentrace purifikované DNA (ng/μl) při vlnových délkách 260 nm pomocí přístroje Tecan Infinite M200. Technika pro stanovení koncentrace nukleových kyselin je založena na měření absorbance při 260 nm (A260) [46].

Na destičku Nano Quant bylo nanášeno 5 μl PCR vody využitá při purifikaci DNA a byla provedena kalibrace. Poté bylo nanášeno stejné množství vzorku purifikované DNA a byla změřena absorbance. Poté byla vyhodnocena koncentrace DNA v ng/μl.

Nakonec byla provedena identifikace sekvenováním genu pro 16S rRNA vybraných kmenů firmou SEQme (Dobříš, ČR).

### **5.2.5.3 Typizace bakteriocinogenních kmenů**

Typizace bakteriocinogenních kmenů byla provedena pomocí PCR reakcí a dále byla provedena vizualizace produktů na elektroforetickém gelu.

U kmenů, u kterých byla vpichovým pokusem ověřena tvorba inhibičních látek byla dále provedena genotypizace bakteriocinů. Byla zjišťována produkce kolicinů A, B, E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib, K, L a M, a mikrocinů H47 a V.

Teplotní podmínky reakce probíhaly podle dizertační práce Silvie Pavlíčkové [50]. Při výskytu nespecifických produktů byla reakce opakována a teploty annealingu byly navýšeny o 2 °C. Byla provedena klasická single PCR, kdy byly jednotlivé geny amplifikovány zvlášť.

Tabulka 5 Seznam použitých PCR primerů pro detekci kolicinů [50]

Kolicin	Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>
A	ColA-F	CGTGGGGAAAAGTCATCATC	475	55
	ColA-R	GCTTTGCTCTTTCTGATGC		
B	ColB-F	AAGAAAATGACGAGAAGACG	492	55
	ColB-R	GAAAGACCAAAGGCTATAAGG		
E1	ColE1-F	TGTGGCATCGGGCGAGAATA	649	55
	ColE1-R	CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT		
E2	ColE2-F	TGATGCTGCTGCAAAGAG	409	55
	ColE2-R	TTCAAAGCGTTCCTACCAC		
E5	ColE5-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	430	55
	ColE5-R	TTGAATTCTCGAATCGTCCA		
E8	ColE3-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	449	55
	ColE8-R	GACTGATTGGCTTGTCGTGA		
E9	ColE9-F	TAAGCAGGCTGCATTTGATG	418	55
	ColE9-R	GACTTTTCTCCCTCCGACCT		
Ia	ColIa-F	GCATGCAAATGACGCTCTTA	473	55
	ColIa-R	GAGGACGCCAGTTCTCTGTC		
Ib	ColIb-F	AACGAGTGGGTCGATGATTC	464	55
	ColIb-R	CCTTTTCTGCGCTCGTATTC		
K	ColK-F	CAGAGGTCGCTGAACATGAA	469	55
	ColK-R	TCCGCTAAATCCTGAGCAAT		
L	Col28b-F	TGCATATTGAAAGCGTCAGC	449	55
	Col28b-R	CAGGTTATCCCCTCTCACCA		
M	ColM-F	GCTACCACTTCGCAAAACC	429	55
	ColM-R	GAGCGACTCTCCGATAATGC		

Tabulka 6 Seznam použitých PCR primerů pro detekci mikrocinů [50]

Mikrocin	Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>
V	MccV-F	CACACACAAAACGGGAGCTGTT	680	55
	MccV-R	CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT		
H47	MccH47-F	CACTTTCATCCCTTCGGATTG	227	55
	MccH47-R	AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC		

Složení amplifikační směsi PCR pro jednu reakci ( $\mu$ l):

H <sub>2</sub> O	7
GoTaq MasterMix	10
DNA Primer R	1
DNA Primer F	1
Templátová DNA matrice	1
DNA matrice	1

Podmínky PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/3 minut
Počet cyklů	35x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	55 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/1 minut
Závěrečná extenze	72 °C/10 minut

Výsledné PCR produkty byly detekovány v prostředí 1 x TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu při 90 V po dobu 75 minut. Výsledný gel byl vyhodnocen v UV-transluminátoru pomocí počítačového programu SnapGene. Podle těchto výsledků byly identifikovány bakteriociny produkované bakteriemi.

#### 5.2.5.4 Detekce genů rezistence

Byla provedena detekce genů rezistence na  $\beta$ -laktamová antibiotika *blaTEM*, *blaOXA-7*, *CTX-M-1g*, *blaOXA-1*, *blaOXA-3*, *blaPSE-4*, *blaSHV*; tetracykliny *tetA* a *tetB*; amfenikoly *floR*; a fluorochinolony *aaC6-Ib-Cr*, *qnrS*, *qepA*. Přítomnost těchto genů byla stanovena pomocí klasické PCR reakce a teplotní podmínky probíhaly podle dizertační práce Silvie Pavlíčkové [50]. Při výskytu nespecifických produktů byla reakce opakována a teploty annealingu byly navýšeny o 2 °C. Byla provedena klasická single PCR, kdy byly jednotlivé geny amplifikovány zvlášť.

Tabulka 7 Seznam použitých PCR primerů pro detekci genů rezistence na  $\beta$ -laktamová antibiotika [50]

Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>
blaTEM-F	GAGTATTCAACATTTTCGT	857	50
blaTEM-R	ACCAATGCTTAATCAGTGA		
blaOXA-1-F	GCAGCGCCAGTGCATCAAC	198	50
blaOXA-1-R	CCGCATCAAATGCCATAAGTG		
blaSHV-F	TCGCCTGTGTATTATCTCCC	768	50
blaSHV-R	CGCAGATAAATCACCACAATG		
blaOXA-7-F	AGTTCTCTGCCGAAGCC	591	50
blaOXA-7-R	TCTCAACCCAACCAACCC		
blaPSE-4-F	CTGCTCGTATAGGTGTTTCC	705	50
blaPSE-4-R	TCGCATCATTTTCGCTCTTC		
blaCTX-M-3-F	AATCACTGCGTCAGTTCAC	701	50
blaCTX-M-3-R	TTTATCCCCCACAACCCAG		
CTX-M-1g-F	CCCATGGTTAAAAAATCACTGC		58
CTX-M-1g-R	CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG		

Tabulka 8 Seznam použitých PCR primerů pro detekci genů rezistence [50]

Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>
tetA-F	GGCCTCAATTTTCCTGACG	372	55
tetA-R	AAGCAGGATGTAGCCTGTGC		
tetB-F	GAGACGCAATCGAATTCGG	228	55
tetB-R	TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC		
floR-F	CACGTTGAGCCTCTATATGG	868	55
floR-R	ATGCAGAAGTAGAACGCGAC		
aac6-Ib-C-F	GATCTCATATCGTCGAGTGGTGG	435	58
aac6-Ib-C-R	GAACCATGTACACGGCTGGAC		
qnrS-F	ACGACATTCGTCAACTGCAA	600	58
qnrS-R	TAAATTGGCACCCCTGTAGGC		
qepA-F	GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG	199	60
qepA-R	CTTCCTGCCCCGAGTATCGTG		



Složení amplifikační směsi PCR pro jednu reakci ( $\mu$ l):

H <sub>2</sub> O	7
GoTaq MasterMix	10
DNA Primer R	1
DNA Primer F	1
DNA matrice	1

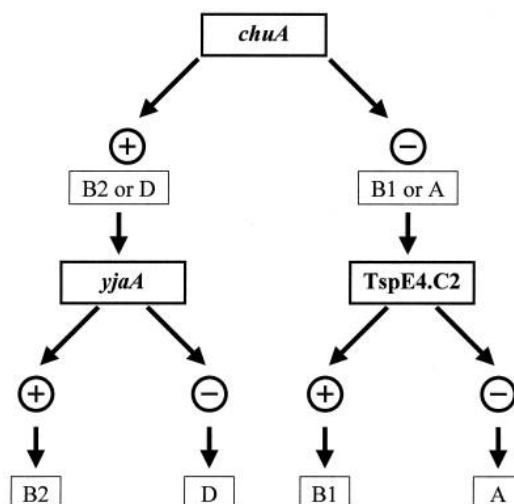
Podmínky PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/3 minut
Počet cyklů	35x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	50–60 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/1 minut
Závěrečná extenze	72 °C/10 minut

Výsledné PCR produkty byly detekovány v prostředí 1 x TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu při 90 V po dobu 75 minut. Výsledný gel byl vyhodnocen v UV-transluminátoru pomocí počítačového programu SnapGene. Podle těchto výsledků byly identifikovány dané geny rezistence.

#### 5.2.5.5 Zařazení do fylogenetických skupin

Kmeny identifikované jako *Escherichia coli* byly zařazeny do fylogenetických skupin PCR metodou podle přítomnosti genů *chuA* a *yjaA* a fragmentu TspE4.C2. Přítomnost těchto genů byla stanovena pomocí klasické PCR reakce a teplotní podmínky probíhaly podle dizertační práce Silvie Pavlíčkové [50]. Při výskytu nespecifických produktů byla reakce opakována a teploty annealingu byly navýšeny o 2 °C. Byla provedena klasická triplex PCR, kdy byly všechny tři geny amplifikovány společně. Kmeny *Escherichia coli* lze rozdělit do čtyř fylogenetických skupin dle dichotomického klíče, který je zobrazen na Obrázku 3.



Obrázek 3 Rozdělení kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin podle dichotomického klíče [94]

Tabulka 9 Seznam použitých PCR primerů pro zařazení kmenů *Escherichia coli* do fylogenetických skupin [50]

Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>
ChuA1	GACGAACCAACGGTCAGGAT	279	55
ChuA2	TGCCGCCAGTACCAAAGACA		
YjaA1	TGAAGTGTCAGGAGACGCTG	211	55
YjaA2	ATGGAGATTGCGTTCCTCACC		
TspE4C2.1	GAGTAATGTCGGGGCATTCA	152	55
TspE4C2.2	CGCGCCAACAAAGTATTACG		

Složení amplifikační směsi PCR pro jednu reakci (μl):

H <sub>2</sub> O	3
GoTaq MasterMix	10
ChuA1/ChuA2	1/1
YjaA1/YjaA2	1/1
TspE4C2.1/TspE4C2.2	1/1
DNA matrice	1

Podmínky PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/3 minut
Počet cyklů	35x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	55 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/1 minut
Závěrečná extenze	72 °C/10 minut

Výsledné PCR produkty byly detekovány v prostředí 1 x TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu při 90 V po dobu 75 minut. Výsledný gel byl vyhodnocen v UV-transluminátoru pomocí počítačového programu SnapGene. Podle těchto výsledků byly kmeny *Escherichia coli* zařazeny do fylogenetických skupin.

#### 5.2.5.6 Detekce genů virulence

Kmeny identifikované jako *Escherichia coli* rozdělené do fylogenetických skupin byly podrobeny detekci genů virulence metodou PCR. Byla testována přítomnost genů virulence *tsh*, *iss*, *iucD*, *papC*, *neuC*, *eaeA*, *ST I*, *ST II*, *LT I*, *stx 1*, *stx 2*, *entA*, *entB*, *entC*, *fepA* a genů virulence spojených s tvorbou biofilmů *aggR*, *fimA*. Přítomnost těchto genů byla stanovena pomocí klasické PCR reakce a teplotní podmínky jsou popsány v Tabulce 10. Při výskytu nespécifických produktů byla reakce opakována a teploty annealingu byly navýšeny o 2 °C. Byla provedena klasická single PCR, kdy byly jednotlivé geny amplifikovány zvlášť.

Tabulka 10 Seznam PCR primerů pro detekci genů virulence

Primer	Sekvence 5' - 3'	Velikost (pb)	T <sub>A</sub>	Reference
iroN-F	AATCCGGCAAAGAGACGAACCGCCT	553	63	[51]
iroN-R	GTTCTGGGCAACCCCTGCTTTGACTTT			
ompT-F	TCATCCCGGAAGCCTCCCTCACTACTAT	496	63	
ompT-R	TAGCGTTTGCTGCACTGGCTTCTGATAC			
hlyF-F	GGCCACAGTCGTTTAGGGTGCTTACC	450	63	
hlyF-R	GGCGTTTAGGCATTCCGATACTCAG			
aggR-F	GTATACACAAAAGAAGGAAGC	254	52	[52]
aggR-R	ACAGAATCGTCAGCATCAGC			
fimA-F	TTAGTAGCCTGATGTTGCTGGGCA	342	57	
fimA-R	ATGTGCCTGCCGCAGTTTCAATAC			

stx1-F	ACACTGGATGATCTCAGTGG	614	58	[53]
stx1-R	CTGAATCCCCCTCCATTATG			
stx2-F	CCATGACAACGGACAGCAGTT	779	58	
stx2-R	CCTGTCAACTGAGCAGCACTTTG			
entA-F	GGTACCACTCATAGTGGAAA	138	58	[54]
entA-R	CCCTGGAATTGCTCCACCTAA			
entB-F	CAAAATGTAAAAGAATTAAGTACG	201	56	
entB-R	AGAGTATACATTTGCTAACCC			
entC-F	GAGAGTCAACCAGACCCTA	125	55	[55]
entC-R	TCTACAGACATAACTTTA			
fepA-F	TACGCCAAAATACCTTACGAT	438	56	[56]
fepA-R	TGTAAATACACCCCCACCTGA			
tsh-F	ACTATTCTCTGCAGGAAGTC	824	58	[50]
tsh-R	CTTCCGATGTTCTGAACGT			
papC-F	TGATATCACGCAGTCAGTAGC	501	58	
papC-R	CCGGCCATATTCACATAAC			
neuC-F	GGTGGTACATTCCGGGATGTC	670	58	
neuC-R	AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGT			
iucD-F	ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC	714	58	
iucD-R	CCTGATCCAGATGATCCTC			
eaeA-F	TGAGCGGCTGGCATGAGTCAT	241	63	
eaeA-R	TCGATCCCCATCGTCAACAGA			
ST I-F	TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG	160	63	
ST I-R	GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG			
ST II-F	CCCCCTCTCTTTTGCACCTTCTTTCC	423	63	
ST II-R	TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC			
LT I-F	TGGTTCATCATGCACCACAAGG	360	63	
LT I-R	CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC			

Složení amplifikační směsi PCR pro jednu reakci ( $\mu\text{l}$ ):

H <sub>2</sub> O	7
GoTaq MasterMix	10
DNA Primer R	1
DNA Primer F	1
DNA matrice	1

Podmínky PCR reakce:

Úvodní denaturace	95 °C/3 minut
Počet cyklů	35x
Denaturace	95 °C/30 sekund
Annealing	52–63 °C/30 sekund
Extenze	72 °C/1 minut
Závěrečná extenze	72 °C/10 minut

Výsledné PCR produkty byly detekovány v prostředí 1 x TAE pufru na 1,5% agarózovém gelu při 90 V po dobu 75 minut. Výsledný gel byl vyhodnocen v UV-transluminátoru pomocí počítačového programu SnapGene. Podle těchto výsledků byly identifikovány faktory virulence kmenů *Escherichia coli*.

## 6 VÝSLEDKY A DISKUZE

Cílem této práce byla identifikace a genotypizace bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* izolovaných ze vzorků nebaleného chlazeného kuřecího masa zakoupených v maloobchodním řetězci ve Zlíně. Byla provedena identifikace a stanovena rezistence k vybraným antimikrobiálním látkám, produkce bakteriocinů a následně jejich genotypizace, a nakonec byly detekovány geny rezistence a virulence pomocí molekulárně genetických metod.

Z půdy VRBL bylo izolováno 56 enterobakterií. Vybrané kmeny odpovídající charakteristice enterobakterií byly podrobeny identifikaci pomocí ENTEROtestu 24N a u 20 kmenů byla provedena i identifikace pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA. Po této identifikaci byly vyřazeny čtyři kmeny, které byly identifikovány jako *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas salmonicida* a *Aeromonas* sp., které spadají do čeledi *Aeromonadaceae* [57]. Zbylých 52 kmenů enterobakterií bylo podrobeno vpichovému pokusu. U 15 kmenů byla dále provedena detekce genů zodpovědných za tvorbu bakteriocinů. U všech 52 kmenů byla také testována rezistence vůči antibiotikům diskovou difuzní metodou. Nakonec bylo 20 kmenů identifikovaných jako *Escherichia coli* rozřazeno do fylogenetických skupin. U těchto kmenů byly nakonec detekovány faktory virulence.

### 6.1 Identifikace neznámých kmenů

Po kultivaci na VRBL agaru bylo vybráno 118 kmenů na základě různých morfologických znaků. Tyto kmeny byly podrobeny barvení dle Grama a u všech 118 kmenů se jednalo o gramnegativní tyčinky. Dále byl proveden katalázový a oxidázový test, kdy zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* jsou vždy kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Podle těchto vlastností bylo do čeledi *Enterobacteriaceae* zařazeno 56 kmenů izolovaných z kuřecího masa. Tyto kmeny odpovídající mikroskopickými i biochemickými vlastnostmi čeledi *Enterobacteriaceae*, bylo podrobena metodě ENTEROtest 24N. Ten byl dále vyhodnocen pomocí počítačového programu TNW, který vypočítal identifikační skóre a T-index pro vybraný kmen. Vzhledem k nevyhovujícímu identifikačnímu skóre nebo T-indexu u 22 kmenů byla provedena i identifikace sekvenací genu pro 16S rRNA. Po této identifikaci byly čtyři kmeny identifikovány jako *Aeromonas aquatica*, *Aeromonas salmonicida* a *Aeromonas* sp. Dva kmeny identifikovány jako *Aeromonas* sp. však měly nerelevantní procento identity, ale s velkou pravděpodobností se nejedná o členy čeledi *Enterobacteriaceae*, a proto byly vyřazeny z dalších experimentů. Kombinací obou metod

byly identifikovány rody *Escherichia*, *Serratia*, *Enterobacter*, *Buttiauxella*, *Citrobacter*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Leclercia*, *Raoultella* a *Moellerella*, jejichž procentuální zastoupení je uvedeno v Tabulce 11. Výsledky identifikace všech kmenů enterobakterií jsou uvedeny v Příloze II.

Tabulka 11 Procentuální zastoupení rodů enterobakterií identifikovaných pomocí ENTEROtestu 24N a sekvenováním genu pro 16S rRNA

Identifikované rody	Kmeny ( $n=52$ )	
	$n$	%
Rod <i>Escherichia</i>	21	40
Rod <i>Serratia</i>	14	27
Rod <i>Enterobacter</i>	4	8
Rod <i>Buttiauxella</i>	4	8
Rod <i>Hafnia</i>	3	6
Rod <i>Citrobacter</i>	2	4
Rod <i>Klebsiella</i>	1	2
Rod <i>Leclercia</i>	1	2
Rod <i>Raoultella</i>	1	2
Rod <i>Moellerella</i>	1	2

Prvním krokem k izolaci enterobakterií je vždy kultivace na vhodném kultivačním médiu. V této práci byl použit VRBL agar, neboli Violet Red Bile Lactose agar. Tento agar vznikl odvozením od MacConkey agaru. Krystalová violet' a žlučové soli v agaru působí jako inhibiční složky a inhibují růst grampozitivních bakterií. Laktóza a neutrální červeně jsou zde jako indikátory a je díky nim možné na tomto agaru rozeznat enterobakterie fermentující laktózu od laktózu nefermentujících. Fermentací laktózy vzniká kyselina, která mění barvu neutrální červené a je zodpovědná za vysrážení žlučových solí kolem pozitivní kolonie. Laktóza pozitivní bakterie se jeví jako fialové kolonie o průměru 0,5–2 mm po 24 hodinách a mohou být obklopeny zónou precipitace. Laktóza negativní bakterie mají naopak světlou barvu a mohou být doprovázeny nazelenalou zónou. Bakterie nespádající do čeledi *Enterobacteriaceae* na VRBL agaru rostou jako bezbarvé kolonie [58]. VRBL agar však nemusí zcela inhibovat bakterie nespádající pod koliformní bakterie či enterobakterie a existují zde rizika, že na tomto agaru budou růst bakterie jiné než čeleď *Enterobacteriaceae* nebo dokonce i grampozitivní bakterie [59].

VRBL agar se používá zejména pro izolaci fekálních koliformních bakterií, které jsou častým ukazatelem hygienické kvality potravin [60]. Mezi fekální koliformní bakterie obecně patří čtyři druhy čeledi *Enterobacteriaceae*, a to *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella aerogenes* [61], jež byla dříve známa jako *Enterobacter aerogenes* [62].

Neúplná selektivita média může být důvodem, proč bylo v této práci izolováno mnoho kmenů rodu *Aeromonas*. Avšak nebyly izolovány žádné grampozitivní bakterie, tudíž je selektivita VRBL média dostačující. Byly izolovány i kmeny spadající mezi koliformní bakterie, které morfologií a změnou okolního média odpovídaly jejich typickému růstu na tomto médiu.

Dle Zakrzewski et al. (2022) [63] je velká podobnost mezi jednotlivými druhy enterobakterií a jejich identifikace je často náročná. Je známo mnoho způsobů identifikací a mezi nejčastější se řadí konvenční mikrobiologické metody založené na morfologické a biochemické charakterizaci. Pro identifikaci enterobakterií se může využít např. ENTEROtestu 24N, MALDI-TOF MS či sekvenování genu pro 16S rRNA. Avšak při použití biochemických metod, jako je právě ENTEROtest 24N, může dojít k chybám v identifikaci a je doporučeno provést potvrzení jinou metodou, nejlépe sekvenováním [63].

Výpočet identifikačního skóre a T-indexu v ENTEROtestu 24N je nezbytný pro určení relevance výsledku. Identifikační skóre je odhad udávaný v procentech říkající, jak moc odpovídá profilu taxonu vzhledem k ostatním taxonům v databázi. T-index vyjadřuje odhad, jak blízko profil odpovídá nejtypičtějšímu souboru reakcí pro každý taxon. Jeho hodnota se pohybuje mezi 0 a 1 a čím vyšší tato hodnota je tím podobnější je daný kmen obecné charakteristice daného taxonu [64]. Neboť byly u 20 kmenů vypočítány T-index a/nebo identifikační skóre nízké a takovýto výsledek by se nedal považovat za relevantní, byla u těchto kmenů provedena křížová identifikace pomocí sekvenování genu pro 16S rRNA, jak bylo doporučeno v publikaci Zakrzewski et al. (2022) [63].



## 6.2 Detekce bakteriocinogenie

Všech 52 kmenů izolovaných enterobakterií bylo podrobena vpichovému pokusu, díky němuž bylo možné detekovat produkci antimikrobiálních látek – bakteriocinů proti indikátorovým (citlivým) kmenům uvedeným v Tabulce 3. Vpichovým pokusem byla potvrzena produkce bakteriocinů pouze u 15 kmenů, z nichž bylo 13 kmenů *Escherichia coli* a dva kmeny *Serratia fonticola*. U těchto 15 kmenů, představující téměř 29% incidence, byly dále zkoumány geny pro tvorbu kolicinů a mikrocinů. Byly provedeny PCR reakce pro detekci kolicinů A, B, E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib, K, L a M, a mikrocinů H47 a V. Výsledky jednotlivých reakcí jsou uvedené v Tabulce 12.

Tabulka 12 Výsledky detekce genů pro tvorbu bakteriocinů

Kmen	A	B	E1	E2	E5	E8	E9	Ia	Ib	K	L	M	H47	V
<i>Serratia fonticola</i> K7B	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>S. fonticola</i> K31E	-	-	+	+	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+
<i>Escherichia coli</i> K12A	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i> K16B	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K31A	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>E. coli</i> K31B	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K32B	-	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K32C	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K33A	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+
<i>E. coli</i> K33B	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+
<i>E. coli</i> K33C	-	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K34A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
<i>E. coli</i> K35B	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	+
<i>E. coli</i> K35D	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>E. coli</i> K36A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+

U každého z 15 kmenů byl detekován alespoň jeden gen kódující tvorbu bakteriocinů. U 73 % kmenů byly nalezeny více než tři geny pro produkci bakteriocinů a u 47 % kmenů bylo nalezeno šest a více genů pro produkci bakteriocinů. U 53 % byly nalezeny geny spojené pouze s produkcí kolicinů, u zbylých 47 % byly nalezeny geny pro koliciny i mikrocinu. V této práci byla potvrzena produkce kolicinů E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib a M, a mikrocinu V u *Escherichia coli*. U kmenů *Serratia fonticola* byla potvrzena produkce kolicinů E1, E2, E9, Ia, Ib, K a M, a mikrocinu V. Zastoupení a prevalence pro dané koliciny jsou uvedeny v Tabulce 13 a pro dané mikrocinu v Tabulce 14.

Tabulka 13 Zastoupení jednotlivých kolicinů

Kolicin	Kmeny ( $n=15$ )	
	$n$	%
Ib	13	87
M	12	80
E1	10	67
E2	10	67
Ia	6	40
E9	5	33
E5	3	20
E8	2	13
K	1	7
A	0	0
B	0	0
L (28b)	0	0

Tabulka 14 Zastoupení jednotlivých mikrocinů

Mikrocin	Kmeny ( $n=15$ )	
	$n$	%
V	7	47
H47	0	0

Bakteriociny jsou definovány jako antimikrobiální proteiny s baktericidními účinky. Na rozdíl od antibiotik, které mohou mít neblahé účinky vůči celé škále bakterií, jsou bakteriociny toxické pouze pro druh produkční a další druhy fylogeneticky příbuzné [65]. *Escherichia coli* má schopnost sekrece bakteriocinů, a to kolicinů a mikrocinů. Některé koliciny tvoří póry (koliciny A, E1, K, N, U, S4, B, Ia, Ib), některé mají nukleázovou aktivitu, např. DNáza (E2, E7, E8 a E9), 16S RNáza (E3, E4, E6) a tRNáza (E5, D), a kolicin M inhibuje biosyntézu peptidoglykanu. Mikrocinů jsou schopny tvořit póry v bakteriální membráně (mikrociny V a L), inhibovat DNA gyrázu (B17), RNA polymerázu (J25) či narušovat ATP syntázu (H47) [66].

Práce Marković et al. (2022) [30] se zabývá koliciny a mikrocinů produkovanými enterobakteriemi. Popisuje, že až třetina *Escherichia coli* produkuje bakteriociny

a ve srovnání s ostatními zástupci čeledi *Enterobacteriaceae* mají její bakteriociny vysokou distribuci a diverzitu. Jedná se zejména o mikrocin, které jsou produkovány z důvodu konkurence v prostředí. Například *Salmonella* spp. a *Shigella* spp. žijící v méně nebo více specifických podmínkách jsou méně mikrocinogenní. Naopak rody *Citrobacter*, *Klebsiella* a *Enterobacter* mají širší environmentální životní styl a produkují tak více charakteristické mikrocin, než *E. coli* [30]. I rod *Serratia* je významným producentem antimikrobiálních látek a může produkovat například koliciny L (28b) anebo 24 [67].

V této práci byly však jedinými produkčními kmeny *Escherichia coli* a *Serratia fonticola*, představující 29% incidenci ze všech testovaných kmenů. Lze očekávat, že podmínky pro produkci bakteriocinů byly ideální právě pro *E. coli* a *S. fonticola*.

U kmenů *Escherichia coli* byly v této práci detekovány nejčastěji koliciny Ib (85 %), M (77 %), E1 (69 %) a E2 (62 %). U mikrocinů byl detekován pouze mikrocin V (45 %). Ve studii Kuznetsova et al. (2022) [66], kde byly izolované kmeny *Escherichia coli* ze zdravých hospodářských zvířat, včetně kuřat, krav a prasat, byly nejčastěji vyskytujícími se mikrocin M a kolicin E1. Dále se hojně vyskytovali koliciny M, Ia, E9, Ib a B. Avšak pouze jeden kmen *E. coli* izolovaný z kuřete produkoval bakteriociny. Tento kmen *E. coli* produkoval koliciny Ia, E1, B a M [66].

Není neobvyklé, že by jeden druh produkoval více než jeden bakteriocin zároveň. Například u *Escherichia coli* se často vyskytují společně kolicin Ia a mikrocin V [65]. Gordon a O'Brien (2006) [68] se také zmínili o tomto jevu. Zmínili se i o společném výskytu kolicinů Ia a E1 za předpokladu, že se kolicin Ia nevyskytuje s mikrocinem V. Dále si všimli společného výskytu kolicinů B a M, nebo kolicinů M a E1, bez výskytu s kolicinem B [68].

V této práci byl jev, kdy *Escherichia coli* zároveň produkovala kolicin Ia a mikrocin V, pozorován pouze u jednoho kmene a kombinace kolicinů Ia a E1 byla detekována u třech kmenů *E. coli*. Koliciny B a M nebyly společně pozorovány ani u jednoho kmene, naopak kombinace kolicinů E1 a M byla pozorována u osmi kmenů (62 %).

Rod *Serratia* produkuje několik typů bakteriocinů. *Serratia* spp. mohou inhibovat růst gramnegativních bakterií např. produkcí červeného pigmentu prodigiosinu. *Serratia marcescens* může tvořit bakteriociny, které se nazývají marcesciny. *Serratia plymthicum* produkuje bakteriocin serracin P, který je podobný pyocinu – bakteriocinu produkovanému rodem *Pseudomonas* [67]. Pyociny jsou klasifikovány do různých typů, jako jsou R, F a S pyociny, které mají odlišné vlastnosti a chování [32]. Bakteriociny obecně tvoří póry, ale

pyocin typu S vykazuje endonukleázovou aktivitu, která způsobuje buněčnou smrt degradací DNA bez lýzy buněk. Pyocin typu S je tvořen ze tří funkčních částí – N-terminální receptorové vazebné domény, translokační domény vnější membrány a C-terminální domény nesoucí DNázovou aktivitu. Na C-terminálním konci pyocinů typu S se nachází malý protein, který je identifikován jako imunitní protein, který chrání hostitelské buňky před rozpadem DNA. Tento malý protein je homologní s kolicinem E2 [67].

Li et al. (2015) [69] objevili po sekvenaci genomů deseti kmenů *Serratia* jedenáct klastřů účastníků se biosyntézy bakteriocinů, kolicinů, entericidinů, mikrocinů a pyocinů. Dále zjistili, že jeden z jedenácti klastřů je zachován napříč rodem. Také potvrdili výskyt genu pro tvorbu mikrocinu H47 v genomu *Serratia marcescens* [69].

Právě gen pro tvorbu kolicinu E2 byl detekován u obou kmenů *Serratia fonticola*, což může naznačovat skutečnost, že tyto kmeny produkují bakteriociny podobné pyocinu typu S. Naopak mikrocin H47 nebyl detekován ani u jednoho kmene *Serratia fonticola* a může to vypovídat, že onen sdílený klastř, o kterém se zmínili Li et al. (2015) [69], neobsahuje gen pro tvorbu tohoto mikrocinu.

### 6.3 Detekce antibiotické rezistence

U všech 52 kmenů byla zkoumána rezistence vůči vybraným antibiotikům – cefalosporinům (cefazolin, cefoxitin, ceftriaxon, cefalotin, cefuroxim, ceftazidim), amfenikolům (chloramfenikol), penicilinům (ampicilin, ampicilin sulbaktam, amoxicilin), tetracyklinům (tetracyklin, doxycyklin hydrochlorid), karbapenemům (impenem), polymyxinům (kolistin), fluorchinolonům (ciprofloxacin), makrolidům (azitromycin) a aminoglykosidům (amikacin). Na Obrázku 4 jsou viditelné inhibiční zóny u kmene *Escherichia coli* K34C vůči doxycyklinu (DO30), kolistinu (CL10), ciprofloxacinu (CIP5), chloramfenikolu (C30), ampicilin sulbaktamu (A/S) a cefoxitinu (CX30). Dva kmeny byly rezistentní pouze vůči jednomu antibiotiku. Čtyřicet pět kmenů (87 %) bylo rezistentních vůči čtyřem a více antibiotikům, lze je tudíž označit za multirezistentní. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána u cefuroximu (98 %), ampicilinu (90 %) a ampicilin sulbaktamu (83 %). Prevalence rezistentních kmenů k testovaným antibiotikům je uvedena v Tabulce 15. Skupinami antibiotik, vůči kterým měly kmeny nejvyšší rezistenci, byly cefalosporiny (48 %) a peniciliny (38 %). Procentuální zastoupení rezistentních kmenů vůči dalším skupinám antibiotik je uvedeno na Obrázku 5.



Obrázek 4 Inhibiční zóny kmene *Escherichia coli* K34C na MH agaru

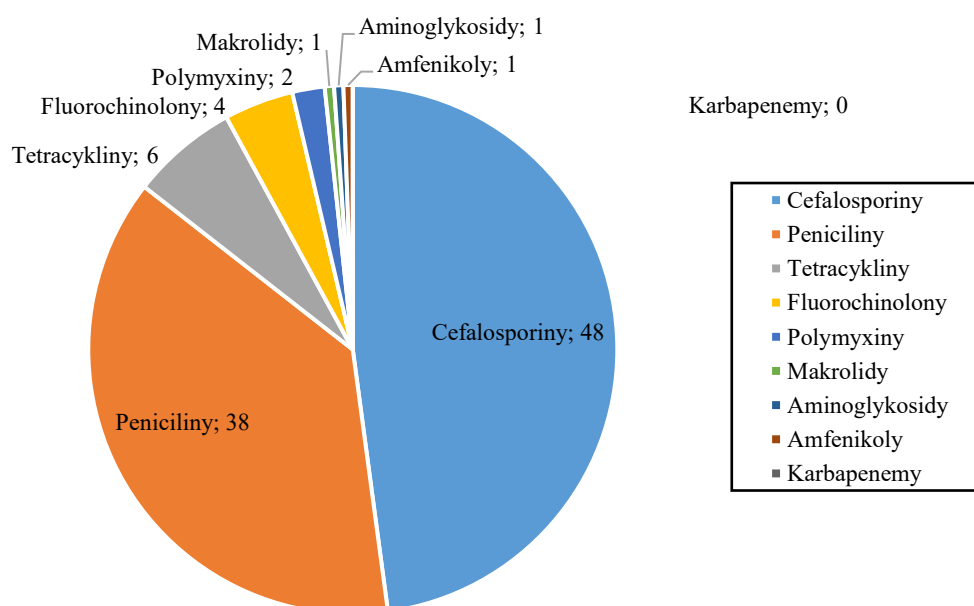
Tabulka 15 Prevalence rezistence u jednotlivých kmenů

Antibiotikum	Limit pro rezistenci [mm]	Kmeny (n=52)					
		R		I		C	
		n	%	n	%	n	%
Cefazolin	<20	38	73	13	25	1	2
Cefoxitin	<19	22	24	0	0	30	58
Ceftriaxon	<22	10	19	4	8	38	73
Cefalotin	<14	2	4	2	4	48	92
Cefuroxim	<19	51	98	1	2	0	0
Ceftazidim	<19	4	8	15	29	33	63
Ampicilin	<14	47	90	0	0	7	13
Ampicilin sulbaktam	<14	43	83	0	0	9	17
Amoxicilin	<14	39	75	0	0	13	25
Imipenem	<19	0	0	0	0	52	100
Kolistin	<9	7	13	0	0	45	87
Ciprofloxacín	<22	13	25	2	4	37	71
Chloramfenikol	<17	2	4	0	0	50	96
Azitromycin	<12	2	4	0	0	50	96
Doxycyklin Hydrochlorid	≤10	2	4	4	8	46	88
Tetracyklin	<14	9	17	7	13	36	69
Amikacin	<18	2	4	0	0	50	96

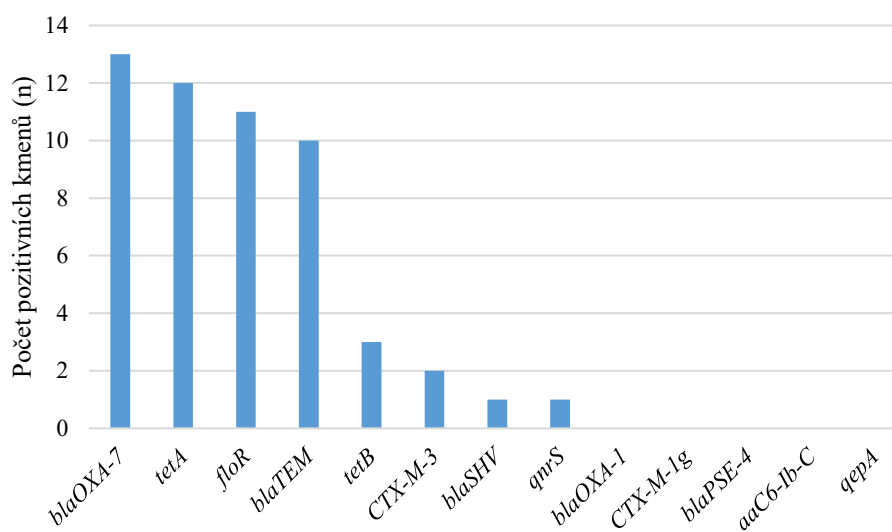
R – rezistentní; I – intermediární; C – citlivé

Breakpointy pro většinu antibiotik byly určeny podle EUCAST [70], avšak pro doxycyklin hydrochlorid nebyly uvedeny breakpointy, a proto bylo pro toto antibiotikum určen breakpoint dle CLSI [71].

Detekce genů rezistence byla provedena pouze u 32 kmenů (59 %), které byly rezistentní vůči čtyřem a více antibiotikům nepočítaje cefuroxim a ampicilin. Ty byly vyřazeny z důvodu vysokého výskytu rezistentních kmenů vůči těmto antibiotikům při výběru multirezistentních kmenů. Multirezistentními kmeny byly rody *Escherichia* (38 %), *Serratia* (38 %), *Enterobacter* (9 %), *Hafnia* (6 %), *Buttiauxella* (6 %) a *Citrobacter* (3 %). Byla testována přítomnost genů rezistence  $\beta$ -laktamů (*CTX-M-1g*, *CTX-M-3*, *blaOXA-1*, *blaOXA-7*, *blaPSE*, *blaSVH*, *blaTEM*), tetracyklinů (*tetA*, *tetB*), amfenikolů (*floR*) a fluorochinolonů (*aaC6-Ib-Cr*, *qnrS*, *qepA*). U sedmi kmenů (22 %) nebyl nalezen žádný gen rezistence, u devíti kmenů (28 %) byl nalezen jeden gen rezistence a u 16 (50 %) kmenů byly detekovány dva a více genů rezistence. V Obrázku 6 je uveden výskyt genů rezistence u multirezistentních kmenů.



Obrázek 5 Počet rezistentních kmenů pro skupiny antibiotik



Obrázek 6 Výskyt genů rezistence u multirezistentních kmenů

Antibiotická rezistence představuje hrozbu nejen pro lidi, ale i pro zvířata a životní prostředí. Právě zvířata určená k produkci potravin se přímo podílejí na šíření a udržování rezistentních bakterií a jejich genetického materiálu. Geny zodpovědné za rezistenci mohou být umístěny na chromozomu nebo v extrachromozomálních genech, které jsou přenosné na jiné bakterie. Používání antibiotik u hospodářských zvířat může vyvíjet selektivní tlak na bakteriální populaci, jejichž přežití je antibiotiky ohroženo, a dále jejich přežívání ve střevní mikrobiotě [72]. Nadměrné užívání antibiotik je hlavní příčinou antibiotické rezistence a mohou vznikat i multirezistence. Multirezistentní bakterie obvykle obsahují několik genů rezistence [73]. Rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, která jsou klinicky významné při léčbě těžkých infekcí, je velice závažným problémem u čeledi *Enterobacteriaceae* [74].

K roku 2010 byl dle ECDC (2011) [75] pozorován vzrůst antibiotické rezistence i multirezistence. Nejvyšší rezistence *E. coli* byly pozorovány u aminopenicilinů. Byl hlášen i výrazný nárůst rezistence vůči cefalosporinům třetí generace. V České republice byla pozorována rezistence vůči aminopenicilinům u téměř 60 % izolátů *E. coli*, vůči cefalosporinům třetí generace bylo rezistentních 10 % izolátů a multirezistentních kmenů bylo pouze 3 % [75]. Dle Rybak et al. (2021) [76] byly uvedeny u kmenů *Escherichia coli* rezistence vůči ampicilinu a cefuroximu, kdy 100 % testovaných izolátů vykazovalo rezistenci. Dále se zde vyskytovala rezistence vůči ciprofloxacinu. Naopak vůči ceftazidimu a impenemu byla detekována vysoká citlivost [76]. I dle EFSA (2022) [77] byla k tomuto roku u zvířat v Evropě zaznamenána častá rezistence *Escherichia coli* vůči ampicilinu, sulfomethoxazolu, trimethoprimu a tetracyklinu. U drůbeže byla zaznamenána i rezistence vůči ciprofloxacinu, u brojlerů byla dokonce označena za „velmi vysokou“. Naopak

rezistence vůči chloramfenikolu byla u drůbeže mírná a vůči kolistinu byla rezistence *E. coli* „velice nízká“ až „vzácná“. U cefalosporinů třetí generace (cefotaxim a ceftazidim) byla rezistence *E. coli* popsána jako „nízká“ či „velice nízká“ [77].

U ampicilinu byla v této práci pozorována vysoká rezistence kmenů *E. coli* vůči tomuto antibiotiku, kdy 75 % *E. coli* bylo rezistentních. Vůči tetracyklinu bylo rezistentních pouze 35 % a intermediárních 20 %. I u ciprofloxacinu byl pozorována u *E. coli* vyšší výskyt rezistence, kdy rezistentních bylo 60 % kmenů. Nebyla zde pozorována rezistence *E. coli* vůči kolistinu. Stejně jako popisovala EFSA nízkou rezistenci vůči tomuto antibiotiku, byla i v této práci pozorována rezistence vůči ceftazidimu pouze u 15 % *E. coli*.

V práci Stock et al. (2003) [78] byly uvedeny antibiotické rezistence vyskytující se u rodu *Serratia*. Dle této práce byly všechny testované kmeny přirozeně rezistentní vůči penicilinu G, cefazolinu, cefuroximu, všem testovaným makrolidům a glykopeptidům. Dále byla sledována přirozená citlivost kmenů k aminoglykosidům, některým cefalosporinům – přesněji cefiximu, cefoperazonu, cefotaximu, ceftibutenu, ceftriaxonu, ceftazidimu a cefepimu –, karbapenemům a veškerým fluorochinolonům. Testované kmeny se však lišili citlivostí vůči tetracyklinům, některým aminoglykosidům, aminopenicilinům, cefoxitinu a chloramfenikolu. Například *Serratia fonticola* byla jako jediná citlivá či intermediární vůči tetracyklinu, rezistentní vůči amoxicilinu, ale citlivá nebo intermediární vůči aminopenicilinům v přítomnosti inhibitorů  $\beta$ -laktamáz [78]. Dle Rybak et al. (2021) [76] se vyskytovala vysoká rezistence vůči ampicilinu, cefuroximu a fluorochinolonům. Nižší rezistence byla pak zaznamenána vůči ceftazidimu a ciprofloxacinu. Naopak citlivé byly izoláty vůči karbapenemům [76].

V této práci byla potvrzena rezistence na cefuroxim, vůči kterému bylo rezistentních 100 % izolátů *Serratia*. Dále byla potvrzena rezistence vůči cefazolinu, vůči němuž bylo rezistentních 93 % izolátů a 7 % izolátů bylo intermediárních. Naopak vůči makrolidům nebyla potvrzená rezistence, neboť bylo 100 % kmenů *Serratia* citlivých. Dále bylo 43 % izolátů rezistentních vůči ceftriaxonu, a naopak vůči aminoglykosidům, karbapenemům a ceftazidimu bylo 100 % kmenů citlivých. U kmenů *Serratia fonticola* byla detekována 100% rezistence vůči amoxicilinu a 100% citlivost vůči tetracyklinům. Ze všech izolátů *Serratia* bylo však vůči amoxicilinu rezistentních jen 86 %.

Dle Torres et al. (2021) [79] jsou některé enterobakterie, jako *Serratia marcescens*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis* a *Burkholderia* spp., přirozeně rezistentní vůči kolistinu [79]. Tuto skutečnost potvrdila i Světová zdravotnická organizace WHO (2018)



[80], kdy označili *Serratia* spp. jako „skutečně odolnou“ vůči kolistinu. V této práci byla zaznamenána rezistence vůči kolistinu u 43 % kmenů *Serratia*, z nichž jeden kmen byl právě *Serratia marcescens* [80].

Bakterie produkující širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL) jsou odolné vůči širokospektrým  $\beta$ -laktamovým antibiotikům. V současnosti jsou považovány za jednu z hlavních hrozeb pro léčbu infekcí u lidí a zvířat [81]. Nejvýznamnějšími geny  $\beta$ -laktamáz jsou varianty *CTX-M*, *SHV*, *TEM*, *VEB*, *GES*, *PER*, *TLA* a *OXA* [82]. V roce 1983 byly ESBL v Evropě poprvé popsány a od té doby je jejich výskyt hlášen čím dál častěji. Z ESBL byly v 90. letech 20. století popsány zejména *TEM*- a *SHV*- skupiny u *Klebsiella pneumoniae*. V současné době se nejvíce vyskytují v *Escherichia coli*, které způsobují komunitní infekce a stále častěji obsahují enzymy *CTX-M* [83]. Coque, Baquero a Cantón (2008) [83] uvedli ve své práci, že nejvíce se vyskytující ESBL izolované ze zvířat byly *CTX-M* (-1, -2, -3, -8, -9, -13, -14, -15, -24, -28, -32), *SHV* (-2, -5, -12) a *TEM* (-52, -106, -116). A právě *CTX-M-1*, *TEM-52* a *SHV-12* byly nejčastěji nalezené [83]. I Saliu, Vahjen a Zentek (2017) [81] ve své práci uvedli, že většina bakterií produkujících ESBL u drůbeže jsou *E. coli* a *Salmonella* spp., a nejvíce se vyskytujícími geny rezistence ESBL u drůbeže jsou *CTX-M*, *TEM* a *SHV* [81].

Dále byla uvedena v práci Coque, Baquero a Cantón (2008) [83] multirezistence, kdy byly producenti ESBL běžně rezistentní vůči dalším skupinám antibiotik, včetně fluorochinolonů, aminoglykosidů a trimetoprim-sulfametoxazolu. Dle této studie se nejdříve zvyšoval počet izolátů *K. pneumoniae* a později i izolátů *E. coli*, které produkovaly ESBL a zároveň byly rezistentní vůči fluorochinolonům. Zvýšily se i mechanismy rezistence zprostředkované plazmidem – proteiny *qnr* (*qnrA*, *qnrB*, *qnrS*), acetylázy ovlivňující účinky některých fluorochinolonů (*aac(6')-Ib-cr*), nebo systémy pumpující fluorochinolony z bakterií (*qepA*) [83].

Práce Szmolka a Nagy (2013) [84] byla věnována komenzálním multirezistentním *E. coli* izolovaným ze zdravých i nemocných hospodářských zvířat, avšak nehledě na jejich zdravotní stav se geny rezistence hojně vyskytovaly. Byl zde uveden jistý „multirezistentní vzor“, kdy se společně vyskytovaly geny rezistence vůči aminoglykosidům (*aadA1-like* a *strA/B*),  $\beta$ -laktamům (*blaTEM*), sulfonamidům (zejména integrony – *intI1*) a tetracykliny (*tetA* a *tetB*). I přes fakt, že po roce 1994 byl zákaz užívání chloramfenikolu u potravinářských zvířat, byl v Evropě zaznamenán nízký až střední výskyt rezistence vůči tomuto antibiotiku. Florfenikol, derivát chloramfenikolu, je však užíván pro léčbu respiračních onemocnění u skotu a prasat, a proto byly identifikovány geny rezistence vůči

chloramfenikolu. U potravinářských živočišných kmenů *E. coli* jsou to zejména geny *catA1*, *floR* a *cmlA1* [84].

V této práci byly nalezeny všechny geny širokospektrých  $\beta$ -laktamáz, které popisovaly studie Coque, Baquero a Cantón (2008) [83] a Saliu, Vahjen a Zentek (2017) [81], a to *TEM*, *SHV* a *CTX-M-3*. Nejvíce nalezeným genem rezistence byl však gen *blaOXA-7* (41 %). „Multirezistentnímu vzoru“, jež byl popsán v práci Szmolka a Nagy (2013) [84], odpovídalo 9 izolátů, z nichž 8 kmenů bylo *Escherichia coli* a jeden kmen *Serratia fonticola*. U jednoho kmene *E. coli* byly nalezeny geny *blaTEM* společně s geny *tetA* a *tetB*. U zbylých kmenů *E. coli* a *Serratia fonticola* byly nalezeny geny *blaTEM* a *tatA*. Ze skupiny genů rezistence vůči fluorochinolonům byl nalezen pouze gen *qnrS* u jednoho kmene *Escherichia coli*. Naopak geny rezistence vůči chloramfenikolu byly nalezeny u 11 kmenů – sedm kmenů *Escherichia coli*, tři kmeny *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* a jeden kmen *Serratia fonticola*. Fakt, že se geny rezistence vyskytovaly u mnoha izolátů, může naznačovat, že jsou tyto geny přirozenou součástí genomu zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, a tím se stávají hrozbou.

#### 6.4 Fylogenetické skupiny

Dvacet kmenů identifikovaných jako *Escherichia coli* bylo rozřazeno do fylogenetických skupin podle schématu dle Clermont et al. (2000) [17]. Kmeny *E. coli* byly zařazeny pouze do skupin A (55 %) a B1 (45 %). Skupiny B2 a D nebyly detekovány.

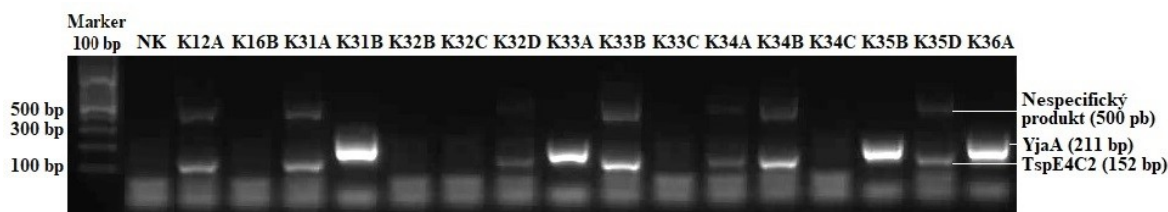
Většina komenzálních kmenů *Escherichia coli* patří do skupiny A, naopak virulentní extraintestinální kmeny spadají do skupin B2 a D [17]. *E. coli* vykazuje různé virulentní rysy, které jí umožňují se pohybovat ze střevních tkání do různých míst těla. Mimo střevní tkáň mohou způsobovat extraintestinální onemocnění jak u člověka, tak i u drůbeže, zejména pak novorozeneckou meningitidu (NMEC), sepsi (SEPEC) a infekci močových cest (UTI) [85].

Marazzato et al. (2020) [85] uvedli, že kmeny skupiny B2, geneticky velice podobné extraintestinální patogenní *E. coli* (ExPEC), byly nalezené ve střevech zdravé drůbeže a jako kontaminanty potravin živočišného původu. Dále uvedli, že kmeny skupin A a B1 vykazují některé geny virulence spojené ExPEC a mohou být proto potencionálně patogenní jak pro drůbež, tak pro lidi. Pro lidi mohou být patogenní zejména prostřednictvím manipulace s kontaminovaným zvířecím masem nebo jeho požitím [85].

Práce Murase a Ozaki (2022) [86] byla věnována rozdílům fylogenetických skupin mezi zdravými kuřaty a kuřaty nakaženými kolibacilózou. Došli k závěru, že fylogenetické skupiny A a B1 se vyskytovaly zejména u zdravých kuřat, naopak u nemocných kuřat našli hlavně *E. coli* spadající do fylogenetické skupiny F [86].

Neboť byly nalezeny pouze kmeny spadající do fylogenetických skupin A a B1, lze tvrdit, že se jednalo o komenzální kmeny *E. coli*. Také by se dalo říci, že byla kuřata zdravá, tak jak popsali Murase a Ozaki (2022) [86] ve své práci.

Ruiz del Castillo, Ocampo-Sosa a Martínez-Martínez (2011) [87] si ve své práci všimli nespécifického produktu o velikosti přibližně 550 bp pouze při použití primerů chuA a fragmentu TspE4C2. Tento band byl zřetelný zejména u izolátů patřících do skupiny B1. Po sekvenování tohoto bandu se ukázalo, že byl 100% homologní s lipázou acetylhydrolázou, jež lze nalézt u patogenních kmenů *Escherichia coli* spadajících do skupiny B1. Tímto bylo možné odlišit komenzální kmeny od patogenních kmenů skupiny B1 [87]. Tuto skutečnost potvrdili i Rahayuningtyas et al. (2020) [51].



Obrázek 7 Triplex PCR reakce pro stanovení fylogenetických skupin

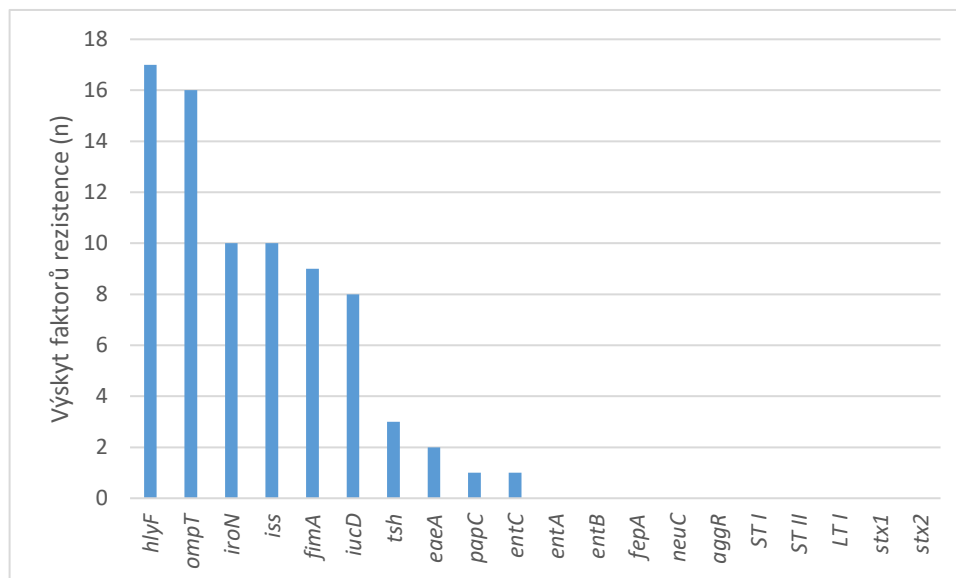
NK – negativní kontrola

U sedmi kmenů, které byly zařazeny do fylogenetické skupiny B1 byly pozorovány nespécifické produkty o velikosti přibližně 500 bp. U dvou kmenů skupiny B1 tyto nespécifické bandy pozorovány nebyly. Dle nálezu Ruiz del Castillo, Ocampo-Sosa a Martínez-Martínez (2011) [87] by se u sedmi kmenů z této práce vykazujících přítomnost nespécifického produktu mohlo jednat o patogenní *E. coli* a u zbylých dvou kmenů o komenzální *E. coli*. Výsledky triplex PCR reakce pro stanovení fylogenetických skupin 16 kmenů *E. coli* jsou uvedeny v Obrázku 7. Lze vidět band fragmentu TspE4C2 o velikosti 152 bp a gen YjaA o velikosti 211 bp. Gen ChuA o velikosti 279 bp nebyl detekován. Schéma Clermont et al. (2000) [17] říká, že pokud je detekce genu ChuA negativní, jedná se *E. coli* ze skupiny A nebo B1, a neboť tento gen nebyl v této práci detekován, byly kmeny zařazeny do těchto dvou skupin. V Obrázku 7 lze pozorovat i nespécifické produkty, které by mohly

rozdělit *E. coli* skupiny B1 na patogenní a komenzální dle Ruiz del Castillo, Ocampo-Sosa a Martínez-Martínez (2011) [87].

## 6.5 Detekce faktorů virulence

Detekce faktorů virulence byla provedena u kmenů *Escherichia coli*. Byla testována přítomnost genů virulence *tsh*, *iss*, *iucD*, *papC*, *neuC*, *eaeA*, *ST I*, *ST II*, *LT I*, *stx 1*, *stx 2*, *entA*, *entB*, *entC*, *fepA* a genů virulence spojených s tvorbou biofilmů *aggR* a *fimA*. U každého kmene byl nalezen alespoň jeden gen virulence. Jeden kmen *E. coli* byl pozitivní na pouze jeden gen virulence, a to *fimA*. U sedmnácti kmenů byly detekovány tři a více genů virulence, z toho u čtyř kmenů bylo detekováno až 6 genů virulence. Nejvíce se vyskytujícími faktory virulence byly geny *hlyF* (85 %), *ompT* (80 %), *iroN* (50 %) a *iss* (50 %). Výskyt genů virulence je uveden v Obrázku 8.



Obrázek 8 Výskyt genů virulence

APEC sdílí společné charakteristiky s jinými kmeny *Escherichia coli* spojenými s onemocněními mimo střevní trakt, jak je tomu u ExPEC. Nepatogenní kmeny *E. coli* vyskytující se u ptactva, známy také jako aviární fekální *E. coli* (AFEC), jsou přirozeně přítomny ve střevním traktu kuřat, včetně kuřat napadených APEC. Patogenní kmeny mají však navíc sadu genů virulence seskupujících se v chromozomech nebo ještě častěji na plasmidu. Tyto geny jsou obvyklé u kmenů *E. coli* spojených s kolibacilózou [88].

Mezi faktory virulence se mohou řadit i bakteriociny, jako jsou například koliciny E1 a Ia a mikrocin V, které jsou spojeny s uropatogenní *E. coli*. O toto téma se zajímali ve své práci

Šmajš et al. (2010) [89]. V této práci byly nalezeny všechny tři zmíněné bakteriociny, tak jak je uvedeno v Kapitole 6.2.

Rahayuningtyas et al. (2020) [51] zkoumali ve své práci přítomnost genů *hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss* a *iutA*. Neboť jsou tyto geny podobné genům virulence v ExPEC, které infikují lidi, kmeny se všemi geny v plazmidu mohou být potenciálně zoonotické. V jejich práci bylo pět kmenů pozitivních na všech pět genů. Z těchto pěti kmenů čtyři spadaly do skupin B2 a D a jeden kmen byl zařazen do skupiny A. Bylo navrženo, že kmen skupiny A mohl geny získat horizontálním přenosem genů z patogenních kmenů ExPEC [51]. De Carli et al. (2015) [88] ve své práci zkoumali zastoupení faktorů virulence *Escherichia coli* z drůbeže nakažené kolibacilózou. Nejčastěji nalezenými geny charakteristickými pro APEC byly geny *hlyF*, *ompT*, *iss*, *iroN*, *tsh* [88]. Dle Jansen et al. (2001) [90] je dalším charakteristickým genem pro APEC také *iucD*. Zde se také zmínili, že gen *papC* se hojně vyskytoval u kmenů *E. coli* spadajících do skupiny patogenních *E. coli* způsobující sepse [90]. Tyto kmeny *E. coli* způsobují onemocnění nejen u lidí, ale jsou také významným patogenem hospodářských zvířat, kdy mají koliseptikémie ptáků podstatný ekonomický význam [91].

V této práci byly geny *hlyF*, *ompT*, *iroN* a *iss* nejčastěji se vyskytujícími. U osmi kmenů byly nalezeny všechny čtyři geny, u jednoho kmene byly nalezeny tři z těchto genů (*hlyF*, *ompT*, *iroN*), u sedmi kmenů byly nalezeny dva z těchto genů (*hlyF*, *ompT*). U dvou kmenů byla nalezena kombinace všech pěti genů (*hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss* a *tsh*) zmíněných v práci De Carli et al. (2015) [88]. Skupina A je spojena s komenzálními kmeny *Escherichia coli* a dle Rahayuningtyas et al. (2020) [51] je možné, že byly geny virulence těmito kmeny získány horizontálním přenosem genů. Z prací De Carli et al. (2015) [88] a Jansen et al. (2001) [90] vyplývá, že kmeny *E. coli* z této práce, u nichž byly nalezeny geny *hlyF*, *ompT*, *iroN*, *iss*, *tsh* a *iucD* spadají do skupiny APEC a jeden kmen u něhož byl nalezen gen *papC* by mohl potenciálně spadat do skupiny septikemické *E. coli*.

Geny *aggR* a *fimA* jsou typické pro enteroagregativní *Escherichia coli* (EAEC), pro enteropatogenní *E. coli* (EPEC) jsou typické geny *eae* [52], geny toxinů *LT II*, *stx1* a *stx2* zase pro enterohemoragické *E. coli* (EHEC) a nakonec geny *ST I* a *ST II* jsou typické pro enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) [92].

Sharan et al. (2023) [52] zkoumali faktory virulence spojené s produkcí biofilmu u *E. coli* z kuřecích vajec a nejčastěji nalezenými byly geny *fimA* a *aggR*. Geny *eae*, *stx1* a *stx2* detekovány nebyly. EAEC je považována za jednu z hlavních průjmových patotypů *E. coli*

(DEC), které způsobují otravu jídlem. EAEC je také spojena s tvorbou biofilmů, jež mohou souviset s průjmy u dětí [52].

V této práci byly u izolátů z kuřecího masa nalezeny pouze geny *fimA* a *eaeA*. Gen *fimA* byl nalezen u devíti kmenů, z nichž šest bylo ze skupiny B1. Gen *eaeA* byl nalezen u dvou kmenů, oba ze skupiny B1. Geny *aggR*, *stx1*, *stx2*, *LT I*, *ST I* a *ST II* nalezeny nebyly. Dle Sharan et al. (2023) [52] by se tedy mohlo jednat o devět kmenů EAEC a dva kmene EPEC.

Práce Aguirre-Sánchez et al. (2022) [93] byla věnována klasifikaci faktorů virulence ve spojitosti s fylogenetickými skupinami z různých zdrojů. Určili, že každá skupina má své jedinečné geny virulence, avšak vyskytovaly se i geny, které by se měli vyskytovat v genomu všech kmenů nehlédě na fylogenetickou skupinu. Mezi těmito sdílenými geny byly například geny *entABCDEFGHI*, *fepABCDG* a *fimABCDEFGHI* [93].

V této práci byly detekované pouze geny *entC* a jak již bylo zmíněno gen *fimA*. Ostatní geny, o kterých se ve své práci zmiňovali Aguirre-Sánchez et al. (2022) [93], nebyly detekovány. Neboť však nebyla provedena detekce všech genů virulence zmíněných v práci Aguirre-Sánchez et al. (2022) [93], je možné, že kmene *E. coli* využité v této práci produkují právě geny, jejich detekce nebyla provedena.

## ZÁVĚR

V této práci byla provedena identifikace a genotypizace enterobakterií izolovaných z kuřecího masa. Kmeny byly identifikovány pomocí mikroskopických a biochemických testů, u vybraných kmenů byla provedena i sekvenace genu pro 16S rRNA. Byly nalezeny rody *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter* a *Klebsiella*, jež jsou označovány za koliformní bakterie a slouží jako indikátory fekálního znečištění v potravinách. Dále byly mezi izoláty popsány rody *Serratia*, *Buttiauxella*, *Hafnia*, *Leclercia*, *Raoultella* a *Moellerella*.

Bakteriociny jsou antimikrobiální proteiny, jež bakterie využívají ve stresových podmínkách, kdy bojují o nutrienty. U bakterie *Escherichia coli* bylo identifikováno více než 30 různých bakteriocinů. U enterobakterií izolovaných z kuřecího masa v této práci byla provedena detekce bakteriocinogenie a u nalezených produkčních kmenů PCR bakteriocinotypizace. Vpichovým pokusem byla potvrzena produkce bakteriocinů u 13 kmenů *Escherichia coli* a dvou kmenů *Serratia fonticola*. U všech 15 kmenů byl detekován alespoň jeden gen kódující tvorbu bakteriocinů a u 46 % bylo nalezeno šest a více genů. U kmenů *E. coli* byly nalezeny geny pro bakteriociny E1, E2, E5, E8, E9, Ia, Ib, M a mikrocin V. Naopak druh *Serratia fonticola* je méně prozkoumaný druh. V této práci však bylo u tohoto izolátu detekováno hned několik bakteriocinů, typově odpovídající bakteriocinům rodu *Serratia*.

Antibiotická rezistence je velkou hrozbou a zvířata se rozhodně podílí na udržování a šíření rezistentních bakterií a genů rezistence. Nadměrné používání antibiotik je hlavní příčinou antibiotické rezistence a multirezistence. Velký význam má rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, zejména u čeledi *Enterobacteriaceae*. Všechny kmeny enterobakterií z této práce byly testovány na rezistenci k antibiotikům. Cefalosporiny (48 %) a peniciliny (38 %), které spadají pod  $\beta$ -laktamová antibiotika, jsou skupiny, vůči nimž byla nalezena nejvyšší rezistence. Byla detekována rezistence vůči cefuroximu (98 %), ampicilinu (90 %) a ampicilin sulbaktamu (83 %). Výskyt antibiotické rezistence je sledován nejen u klinických izolátů a jednoznačně se neustále zvyšuje. U některých antibiotik, jako je například ampicilin, byl zjištěn rapidní nárůst rezistence u *Escherichia coli*. Vůči kolistinu bylo v této práci rezistentních jen málo kmenů a rezistentními kmeny byly i druhy rodu *Serratia*. Na antibiotickou rezistenci *Serratia* spp. upozornila i Světová zdravotnická organizace v roce 2018. Dále byla provedena genotypizace genů rezistence a nejčastěji se vyskytujícími geny v této práci byly *blaOXA-7*, *tetA*, *floR* a *blaTEM*. Geny *blaOXA-7*

a *blaTEM* spadají mezi širokospektré  $\beta$ -laktamázy, *tetA* kóduje gen rezistence vůči tetracyklinům a gen *floR* vůči amfenikolům.

Nakonec byly kmeny *Escherichia coli* rozřazeny do fylogenetických skupin a byly u nich detekovány faktory virulence. Byly objeveny pouze skupiny A a B1, které jsou považovány za komenzální a které lze najít ve střevech zdravé drůbeže. U kmenů *E. coli* se nejčastěji vyskytovaly geny virulence *hlyF*, *ompT*, *iroN* a *iss*, které jsou typické pro APEC. Je možné, že došlo k horizontálnímu přenosu genů od patogenních, neboť byly kmeny *E. coli* z této práce rozřazeny pouze do dvou zmíněných skupin.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] BERG, Gabriele, Daria RYBAKOVA, Doreen FISCHER et al. Microbiome definition re-visited: old concepts and new challenges. *Microbiome* [online]. 2020, **8**(1), 1-22 [cit. 2022-03-03]. ISSN 2049-2618. Dostupné z: doi:10.1186/s40168-020-00875-0
- [2] STEINHAUSER, Ladislav. *Hygiena a technologie masa*. 1. vyd. Brno: Last, 1995, 643 s. ISBN 8090026044.
- [3] SHAW, Ian C. *Food safety: the science of keeping food safe*. 1st ed. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell, 2013, xii, 428 s. ISBN 9781444337228.
- [4] ERKMEN, Osman a T. BOZOĞLU. *Food Microbiology: Principles into Practice* [online]. 1st ed. Hoboken, NJ: Wiley, 2016 [cit. 2022-02-18]. ISBN 9781119237761. Dostupné z: doi:10.1002/9781119237860
- [5] MARTÍN-BELLOSO, Olga a Robert SOLIVA-FORTUNY, ed. *Advances in fresh-cut fruits and vegetables processing*. 1st ed. United States of America: Taylor and Francis Group, LLC, 2011. ISBN 978-1-4200-7121-4.
- [6] DIB, Amira, Amir AGABOU, Amina CHAHED, Cemil KUREKCI, Elena MORENO, Miguel ESPIGARES a Elena ESPIGARES. Isolation, molecular characterization and antimicrobial resistance of enterobacteriaceae isolated from fish and seafood. *Food Control* [online]. 2018, **88**, 54-60 [cit. 2022-02-17]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2018.01.005
- [7] BOOR, Kathryn, Martin WIEDMANN, Sarah MURPHY a Sam ALCAINE. A 100-Year Review: Microbiology and safety of milk handling. *Journal of Dairy Science* [online]. 2017, **100**(12), 9933-9951 [cit. 2022-03-17]. ISSN 00220302. Dostupné z: doi:10.3168/jds.2017-12969
- [8] KAMENÍK, Josef. *Maso jako potravina: produkce, složení a vlastnosti masa*. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita, 2014, 327 s. ISBN 9788073056735.
- [9] ROUGER, Amélie, Odile TRESSE a Monique ZAGOREC. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: Sources, Species, and Dynamics. *Microorganisms* [online]. 2017, **5**(3) [cit. 2022-04-02]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms5030050
- [10] GÖRNER, Fridrich a Lubomír VALÍK. *Aplikovaná mikrobiologie požívatin: principy mikrobiologie požívatin*. Bratislava: MALÉ CENTRUM, 2004. ISBN 80-967064-9-7.
- [11] SUN, Da-Wen, ed. *Handbook of Frozen Food Processing and Packaging*. 1st Edition. Boca Raton: CRC Press, 2005. ISBN 9780429113727.
- [12] SEDLÁČEK, Ivo. *Taxonomie prokaryot*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2007. ISBN 8021042079.
- [13] CARROL, Karen, JA HOB DEN, S MILLER et al. *Jawetz, Melnick, & Adelberg's Medical Microbiology, 27e* [online]. 27th. New York: McGraw Hill, 2019 [cit. 2023-04-14]. ISBN 9780-0-71-82498-9. Dostupné z: <https://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1551&sectionid=94104942>
- [14] COONEY, S., S O'BRIEN, C IVERSEN a S FANNING. Bacteria: Other Pathogenic Enterobacteriaceae – Enterobacter and Other Genera. In: *Encyclopedia of Food Safety*

- [online]. Elsevier, 2014, s. 433-441 [cit. 2022-05-05]. ISBN 9780123786135. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-378612-8.00104-9
- [15] GOERING, Richard, Hazel DOCKRELL, Mark ZUCKERMAN, Ivan ROITT a Peter CHIODINI, Jaroslav JULÁK, ed. *Mimsova lékařská mikrobiologie*. 5. vydání. Přeložil Jan BOBEK, přeložil Renáta ČERMÁKOVÁ, přeložil Karel HOLADA, přeložil Zora MĚLKOVÁ, přeložil Tibor MOŠKO, přeložil Jan NOVÁK, přeložil Ludmila PROKEŠOVÁ, přeložil Jiřina SUCHANOVÁ. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2016. ISBN 978-80-7387-928-0.
- [16] KOO, Hyon-Ji, Hyo-Sun KWAK, Sang-Hyeon YOON a Gun-Jo WOO. Phylogenetic group distribution and prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* isolates from food samples in South Korea. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2012, **28**(4), 1813-1816 [cit. 2023-02-22]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-011-0954-5
- [17] CLERMONT, Olivier, Stéphane BONACORSI a Edouard BINGEN. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2000, **66**(10), 4555-4558 [cit. 2023-02-22]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.66.10.4555-4558.2000
- [18] CLERMONT, Olivier, Julia CHRISTENSON, Erick DENAMUR a David GORDON. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports* [online]. 2013, **5**(1), 58-65 [cit. 2023-02-22]. ISSN 17582229. Dostupné z: doi:10.1111/1758-2229.12019
- [19] RYAN, Kenneth, C. RAY a John SHERRIS. *Sherris Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*. 4th. Michigan: McGraw Hill Professional, 2003. ISBN 9780071212458.
- [20] WU, Wenjing, Yu FENG a Zhiyong ZONG. Characterization of a strain representing a new *Enterobacter* species, *Enterobacter chengduensis* sp. nov. *Antonie van Leeuwenhoek* [online]. 2019, **112**(4), 491-500 [cit. 2022-04-22]. ISSN 0003-6072. Dostupné z: doi:10.1007/s10482-018-1180-z
- [21] TUDDENHAM, Susan a Cynthia L. SEARS. The intestinal microbiome and health. *Current Opinion in Infectious Diseases* [online]. 2015, **28**(5), 464-470 [cit. 2023-03-23]. ISSN 0951-7375. Dostupné z: doi:10.1097/QCO.000000000000196
- [22] BEDNÁŘ, Marek, Věra FRAŇKOVÁ, Jiří SCHINDLER, Andrej SOUČEK a Jiří VÁVRA. *Lékařská mikrobiologie: Bakteriologie, virologie, parazitologie*. 1. vydání. Praha: Glos Semily, 1996. ISBN 8023802976.
- [23] HURYCH, Jakub a Roman ŠTÍCHA. *Lékařská mikrobiologie: repetitorium*. Vydání 1. Praha: Stanislav Juhaňák - Triton, 2020. ISBN 978-80-7553-844-4.
- [24] SHAPIRO-ILAN, David, James FUXA, Lawrence LACEY, David ONSTAD a Harry KAYA. Definitions of pathogenicity and virulence in invertebrate pathology. *Journal of Invertebrate Pathology* [online]. 2005, **88**(1), 1-7 [cit. 2022-05-12]. ISSN 00222011. Dostupné z: doi:10.1016/j.jip.2004.10.003
- [25] ISENBERG, Henry D. Pathogenity and Virulence: Another View. *Clinical Microbiology Reviews*. 1988, **1**(1), 40-53. Dostupné z: doi:https://doi.org/10.1128/CMR.1.1.40
- [26] BARON, Samuel, ed. *Medical microbiology*. 4rd ed. New York: Churchill Livingstone, 1996. ISBN 0-9631172-1-1.

- [27] Antimicrobial agent. In: *Encyclopedia Britannica* [online]. Brittanica, The Editors of Encyclopaedia, 2022 [cit. 2023-04-20]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/science/antimicrobial-agent>
- [28] KASTIN, Abba J., ed. *Handbook of biologically active peptides*. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2013. ISBN 978-0-12\_385095-9.
- [29] RILEY, M. a M. CHAVAN. *Bacteriocins: Ecology and Evolution*. 1st. New York: Springer, 2007. ISBN 3-540-36603-2.
- [30] MARKOVIĆ, Katarina, Mirjana GRUJOVIĆ, Maja KORACĚVIĆ, Danijela NIKODIJEVIĆ, Milena MILUTINOVIĆ, Teresa SEMEDO-LEMSADDEK a Milan DJILAS. Colicins and Microcins Produced by Enterobacteriaceae: Characterization, Mode of Action, and Putative Applications. *International Journal of Environmental Research and Public Health* [online]. 2022, **19**(18) [cit. 2023-03-27]. ISSN 1660-4601. Dostupné z: doi:10.3390/ijerph191811825
- [31] KUMARIYA, Rashmi, Anita GARSA, Y.S. RAJPUT, S.K. SOOD, Nadeem AKHTAR a Seema PATEL. Bacteriocins: Classification, synthesis, mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. *Microbial Pathogenesis* [online]. 2019, **128**, 171-177 [cit. 2022-04-29]. ISSN 08824010. Dostupné z: doi:10.1016/j.micpath.2019.01.002
- [32] CASCALES, Eric, Susan BUCHANAN, Denis DUCHÉ et al. Colicin Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* [online]. 2007, **71**(1), 158-229 [cit. 2022-04-29]. ISSN 1092-2172. Dostupné z: doi:10.1128/MMBR.00036-06
- [33] KU, Wen Yen, Yu Wen LIU, Ya Chein HSU, Chen Chung LIAO, Po Huang LIANG, Hanna S. YUAN a Kin Fu CHAK. The zinc ion in the HNH motif of the endonuclease domain of colicin E7 is not required for DNA binding but is essential for DNA hydrolysis. *Nucleic Acids Research* [online]. 2002, **30**(7), 1670-1678 [cit. 2023-03-27]. ISSN 13624962. Dostupné z: doi:10.1093/nar/30.7.1670
- [34] BAQUERO, Fernando, Val LANZA, Maria-Rosario BAQUERO, Rosa DEL CAMPO a Daniel BRAVO-VÁZQUEZ. Microcins in Enterobacteriaceae: Peptide Antimicrobials in the Eco-Active Intestinal Chemosphere. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2019, **10** [cit. 2022-04-29]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.02261
- [35] EICHENLAUB, R. a U. WINKLER. Purification and Mode of Action of Two Bacteriocins Produced by *Serratia marcescens* HY. *Journal of General Microbiology* [online]. 1974, **83**(1), 83-94 [cit. 2022-05-07]. ISSN 0022-1287. Dostupné z: doi:10.1099/00221287-83-1-83
- [36] KUMAR, Shashi, Shanvanth ARNIPALLI a Ouliana ZIOUZENKOVA. Antibiotics in Food Chain: The Consequences for Antibiotic Resistance. *Antibiotics* [online]. 2020, **9**(10), 1-26 [cit. 2022-05-12]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9100688
- [37] WALSH, Christopher. *Antibiotics: Actions, origins, rezistance*. 1st edition. Washington DC: ASM Press, 2003. ISBN 1555812546.
- [38] MENDEL, Matthias, Ekta AHUJA, Dmitri MAVRODI, Rolf BREINBAUER, Linda THOMASHOW a Wulf BLANKENFELDT. Of Two Make One: The Biosynthesis of Phenazines. *ChemBioChem* [online]. 2009, **10**(14), 2295-2304 [cit. 2023-03-20]. ISSN 14394227. Dostupné z: doi:10.1002/cbic.200900323
- [39] ZAYMLOVÁ, Kateřina. *Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin*. Zlín, 2022. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati.

- [40] TALAIEKHOZANI, Amirreza, Sanaz ALAEE a Mohanadoss PONRAJ. Guidelines for quick application of biochemical tests to identify unknown bacteria. *Accounts of Biotechnology Research* [online]. 2015, **2**(2), 65-81 [cit. 2022-05-05]. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Amirreza-Talaiekhazani/publication/272087836\\_Guidelines\\_for\\_quick\\_application\\_of\\_biochemical\\_tests\\_to\\_identify\\_unknown\\_bacteria/links/5bc1a46fa6fdcc2c91fb3704/Guidelines-for-quick-application-of-biochemical-tests-to-identify-unknown-bacteria.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Amirreza-Talaiekhazani/publication/272087836_Guidelines_for_quick_application_of_biochemical_tests_to_identify_unknown_bacteria/links/5bc1a46fa6fdcc2c91fb3704/Guidelines-for-quick-application-of-biochemical-tests-to-identify-unknown-bacteria.pdf)
- [41] *ITEST OXIDÁZA: pro rychlé stanovení oxidázové aktivit*. Kat. č. DD 505. Hradec Králové, 2016.
- [42] MIKRO-LA-TEST. *ENTEROtest 24 N*. Brno, 2011. Kat. č.: 10020290.
- [43] ŠMARDA, Jan, David ŠMAJS a Hana LHOTOVÁ. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *Journal of Basic Microbiology* [online]. 2002, **42**(6), 429-433 [cit. 2022-05-05]. ISSN 0233111X. Dostupné z: doi:10.1002/1521-4028(200212)42:6429::AID-JOBM4293.0.CO;2-X
- [44] MATUSCHEK, E., D.F.J. BROWN a G. KAHLMETER. Development of the EUCAST disk diffusion antimicrobial susceptibility testing method and its implementation in routine microbiology laboratories. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. 2014, **20**(4), 255-266 [cit. 2022-05-05]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1111/1469-0691.12373
- [45] TEKIN, Levent. Effect of Platelet-Rich-Plasma (PRP) Implant Surface Topography on Implant Stability and Bone Revisited. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. 2015, **9**(2) [cit. 2022-05-07]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2014/11282.5547
- [46] TECAN TRADING AG. *High throughput DNA quantification and quality checks for low volume samples*. 2. Švýcarsko, 2017. 398571.
- [47] GREEN, Michael a Joseph SAMBROOK. Touchdown Polymerase Chain Reaction (PCR). *Cold Spring Harbor Protocols* [online]. 2018, **2018**(5) [cit. 2023-03-29]. ISSN 1940-3402. Dostupné z: doi:10.1101/pdb.prot095133
- [48] WEISBURG, W, S BARNES, D PELLETIER a D LANE. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of Bacteriology* [online]. 1991, **173**(2), 697-703 [cit. 2023-03-31]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: <https://journals.asm.org/doi/10.1128/jb.173.2.697-703.1991>
- [49] TAN, Siun a Beow YIAP. DNA, RNA, and Protein Extraction: The Past and The Present. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* [online]. 2009, **2009**, 1-10 [cit. 2023-03-29]. ISSN 1110-7243. Dostupné z: doi:10.1155/2009/574398
- [50] PAVLÍČKOVÁ, Silvie. *Charakterizace kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2016. Dizertační práce. Univerzita Tomáše Bati.
- [51] RAHAYUNINGTYAS, Irma, Agustin INDRAWATI, I WIBAWAN, Maria PALUPI a Istiyaningsih ISTIYANINGSIH. Phylogenetic group determination and plasmid virulence gene profiles of colistin-resistant *Escherichia coli* originated from the broiler meat supply chain in Bogor, Indonesia. *Veterinary World* [online]. 2020, **13**(9), 1807-1814 [cit. 2023-02-28]. ISSN 22310916. Dostupné z: doi:10.14202/vetworld.2020.1807-1814
- [52] SHARAN, Manjeet, Pankaj DHAKA, Jasbir BEDI, Randhir SINGH a Nitin MEHTA. Characterization of chicken eggs associated *Escherichia coli* and *Staphylococcus*

- aureus for biofilm production and antimicrobial resistance traits. *Animal Biotechnology*. 2023. Dostupné z: doi:10.1080/10495398.2023.2171423
- [53] FAGAN, Peter, Michael HORNITZKY, Karl BETTELHEIM a Steven DJORDJEVIC. Detection of Shiga-Like Toxin ( stx 1 and stx 2 ), Intimin ( eaeA ), and Enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC) Hemolysin (EHEC hlyA ) Genes in Animal Feces by Multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1999, **65**(2), 868-872 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.65.2.868-872.1999
- [54] ÖZDEMİR, Gamze, Erman ORYAŞIN, Hacı BıYIK, Melihcan ÖZTEBER a Bülent BOZDOĞAN. Phenotypic and Genotypic Characterization of Bacteriocins in Enterococcal Isolates of Different Sources. *Indian Journal of Microbiology* [online]. 2011, **51**(2), 182-187 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0046-8991. Dostupné z: doi:10.1007/s12088-011-0143-0
- [55] NAGARAJ, Sowmya, Shylaja RAMLAL, Bhavani VENKATASWAMACHARI, Soumya PAUL, Joseph KINGSTON a Harsh BATRA. Differentiation of entC1 from entC2/entC3 with a single primer pair using simple and rapid SYBR Green-based RT-PCR melt curve analysis. *Applied Microbiology and Biotechnology* [online]. 2016, **100**(19), 8495-8506 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0175-7598. Dostupné z: doi:10.1007/s00253-016-7637-y
- [56] SCHUBERT, S., D. FISCHER a J. HEESEMANN. Ferric Enterochelin Transport in *Yersinia enterocolitica*: Molecular and Evolutionary Aspects. *Journal of Bacteriology* [online]. 1999, **181**(20), 6387-6395 [cit. 2023-03-03]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.181.20.6387-6395.1999
- [57] JANDA, J. Michael a Sharon L. ABBOTT. The Genus *Aeromonas*: Taxonomy, Pathogenicity, and Infection. *Clinical Microbiology Reviews* [online]. 2010, **23**(1), 35-73 [cit. 2023-04-20]. ISSN 0893-8512. Dostupné z: doi:10.1128/CMR.00039-09
- [58] MANAFI, M. Chapter 12 Media for detection and enumeration of 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and *Escherichia coli* from water and foods. In: *Handbook of Culture Media for Food Microbiology* [online]. Elsevier, 2003, s. 167-193 [cit. 2023-04-02]. Progress in Industrial Microbiology. ISBN 9780444510846. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6352(03)80015-2
- [59] ZIMBORO, Mary, David POWER, Sharon MILLER, George WILSON a Julie JOHNSON, ed. *Difco & BBL Manual: Manual of Microbiological Culture Media* [online]. Second edition. Sparks, Maryland: Becton, Dickinson and Company, 2009 [cit. 2022-02-20]. ISBN 0972720715. Dostupné z: <https://www.trios.cz/wp-content/uploads/sites/149/2016/08/DIFCO-A-BBL-MANUAL-2.pdf>
- [60] LECLERCQ, A., C. WANEGUE a P. BAYLAC. Comparison of Fecal Coliform Agar and Violet Red Bile Lactose Agar for Fecal Coliform Enumeration in Foods. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 2002, **68**(4), 1631-1638 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.68.4.1631-1638.2002
- [61] HALKMAN, H.B.D. a A.K. HALKMAN. Indicator Organisms. In: *Encyclopedia of Food Microbiology* [online]. 2nd edition. Elsevier, 2014, s. 358-363 [cit. 2023-05-10]. ISBN 9780123847331. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384730-0.00396-7
- [62] WESEVICH, Austin, Granger SUTTON, Felicia RUFFIN, Lawrence P. PARK, Derrick E. FOUTS, Vance G. FOWLER, Joshua T. THADEN a Nathan A. LEDEBOER. Newly Named *Klebsiella aerogenes* (formerly *Enterobacter aerogenes*) Is Associated with Poor Clinical Outcomes Relative to Other *Enterobacter* Species in Patients with Bloodstream Infection. *Journal of Clinical Microbiology* [online]. 2020,

- 58(9), 00582-20 [cit. 2023-05-10]. ISSN 0095-1137. Dostupné z: doi:10.1128/JCM.00582-20
- [63] ZAKRZEWSKI, Arkadiusz, Urszula ZARZECKA, Wioleta CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA a Anna ZADERNOWSKA. A Comparison of Methods for Identifying Enterobacterales Isolates from Fish and Prawns. *Pathogens* [online]. 2022, **11**(4) [cit. 2023-04-02]. ISSN 2076-0817. Dostupné z: doi:10.3390/pathogens11040410
- [64] *Microbiology brochure: Smart Identification and Antibiotic Susceptibility Determination System* [online]. Version No. 1.1. Brno, Czech Republik: Erba Lachema s.r.o, 2022 [cit. 2023-04-14]. Dostupné z: [https://www.erbalachema.com/attachments/Mikrolatest\\_katalog\\_EN\\_2022-yftYbCj28z.pdf](https://www.erbalachema.com/attachments/Mikrolatest_katalog_EN_2022-yftYbCj28z.pdf)
- [65] JEZIOROWSKI, Anne a David GORDON. Evolution of Microcin V and Colicin Ia Plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. 2007, **189**(19), 7045-7052 [cit. 2023-04-08]. ISSN 0021-9193. Dostupné z: doi:10.1128/JB.00243-07
- [66] KUZNETSOVA, Marina, Veronika MIHAILOVSKAYA, Natalia REMEZOVSKAYA a Marjanca STARČIČ ERJAVEC. Bacteriocin-Producing *Escherichia coli* Isolated from the Gastrointestinal Tract of Farm Animals: Prevalence, Molecular Characterization and Potential for Application. *Microorganisms* [online]. 2022, **10**(8) [cit. 2023-04-06]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms10081558
- [67] KUO, Pei-An, Chih-Horng KUO, Yiu-Kay LAI, Peter GRAUMANN a Jenn TU. Phosphate limitation induces the intergeneric inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by *Serratia marcescens* isolated from paper machines. *FEMS Microbiology Ecology* [online]. 2013, **84**(3), 577-587 [cit. 2023-04-05]. ISSN 01686496. Dostupné z: doi:10.1111/1574-6941.12086
- [68] GORDON, David a Claire O'BRIEN. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology* [online]. 2006, **152**(11), 3239-3244 [cit. 2023-04-08]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.28690-0
- [69] LI, Pengpeng, Amy KWOK, Jingwei JIANG, Tingting RAN, Dongqing XU, Weiwu WANG, Frederick LEUNG a Gabriele BERG. Comparative Genome Analyses of *Serratia marcescens* FS14 Reveals Its High Antagonistic Potential. *PLOS ONE* [online]. 2015, **10**(4) [cit. 2023-04-05]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: doi:10.1371/journal.pone.0123061
- [70] Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. In: *The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* [online]. Version 13.0. 2023 [cit. 2023-04-10]. Dostupné z: <http://www.eucast.org>
- [71] WAYNE, PA. *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing* [online]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 2020, [cit. 2023-04-10]. ISBN 978-1-68440-1-067-6. ISSN 2162-2914.
- [72] FAROOQ, Muhammad, Camilla SMOGLICA, Fausto RUFFINI, Lidia SOLDATI, Fulvio MARSILIO a Cristina DI FRANCESCO. Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Conventional and Antibiotic-Free Poultry Farming, Italy. *Animals* [online]. 2022, **12**(18) [cit. 2023-04-12]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani12182310
- [73] AHMED, Ashraf, Hirofumi SHIMABUKURO a Tadashi SHIMAMOTO. Isolation and Molecular Characterization of Multidrug-Resistant Strains of *Escherichia coli*

- and Salmonella from Retail Chicken Meat in Japan. *Journal of Food Science* [online]. 2009, **74**, 405-410 [cit. 2022-11-24]. Dostupné z: doi:<https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01291.x>
- [74] IREDELL, Jon, Jeremy BROWN a Kaitlin TAGG. Antibiotic resistance in Enterobacteriaceae: mechanisms and clinical implications. *BMJ* [online]. 2015, 1-14 [cit. 2023-04-12]. ISSN 1756-1833. Dostupné z: doi:[10.1136/bmj.h6420](https://doi.org/10.1136/bmj.h6420)
- [75] *Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2010: Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net)* [online]. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2011 [cit. 2023-04-13]. ISBN 978-92-9193-323-5.
- [76] RYBAK, Bartosz, Natalia WAWRZY尼亚K, Lidia WOLSKA a Marta POTRYKUS. Escherichia coli and Serratia fonticola ESBLs as a potential source of antibiotics resistance dissemination in the Tricity water reservoirs. *Acta Biochimica Polonica* [online]. 2021 [cit. 2023-04-14]. ISSN 1734-154X. Dostupné z: doi:[10.18388/abp.2020\\_5740](https://doi.org/10.18388/abp.2020_5740)
- [77] The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2019–2020. *EFSA Journal* [online]. 2022, **20**(3) [cit. 2023-04-11]. ISSN 18314732. Dostupné z: doi:[10.2903/j.efsa.2022.7209](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7209)
- [78] STOCK, I., S. BURAK, K. SHERWOOD, T. GRÜGER a B. WIEDEMANN. Natural antimicrobial susceptibilities of strains of 'unusual' Serratia species: S. ficaria, S. fonticola, S. odorifera, S. plymuthica and S. rubidaea. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. 2003, **51**(4), 865-885 [cit. 2023-04-13]. ISSN 14602091. Dostupné z: doi:[10.1093/jac/dkg156](https://doi.org/10.1093/jac/dkg156)
- [79] TORRES, Diana, Helena SETH-SMITH, Nicole JOOSSE, Claudia LANG, Olivier DUBUIS, Magdalena NÜESCH-INDERBINEN, Vladimira HINIC a Adrian EGLI. Colistin resistance in Gram-negative bacteria analysed by five phenotypic assays and inference of the underlying genomic mechanisms. *BMC Microbiology* [online]. 2021, **21**(1) [cit. 2023-04-14]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:[10.1186/s12866-021-02388-8](https://doi.org/10.1186/s12866-021-02388-8)
- [80] *The detection and reporting of colistin resistance* [online]. In: . Geneva: World Health Organization, 2018 [cit. 2023-04-12]. Dostupné z: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/277175/WHO-WSI-AMR-2018.4-eng.pdf>
- [81] SALIU, Eva-Maria, Wilfried VAHJEN a Jürgen ZENTEK. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Animal Health Research Reviews* [online]. 2017, **18**(1), 46-57 [cit. 2023-04-17]. ISSN 1466-2523. Dostupné z: doi:[10.1017/S1466252317000020](https://doi.org/10.1017/S1466252317000020)
- [82] ABRAR, Samyyia, Noor Ul AIN, Huma LIAQAT, Shahida HUSSAIN, Farhan RASHEED a Saba RIAZ. Distribution of blaCTX-M, blaTEM, blaSHV and blaOXA genes in Extended-spectrum-β-lactamase-producing Clinical isolates: A three-year multi-center study from Lahore, Pakistan. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* [online]. 2019, **8**(1) [cit. 2023-04-27]. ISSN 2047-2994. Dostupné z: doi:[10.1186/s13756-019-0536-0](https://doi.org/10.1186/s13756-019-0536-0)
- [83] COQUE, T M, F BAQUERO a R CANTÓN. Increasing prevalence of ESBL-producing Enterobacteriaceae in Europe. *Eurosurveillance* [online]. 2008, **13**(47) [cit. 2023-04-23]. ISSN 1560-7917. Dostupné z: doi:[10.2807/ese.13.47.19044-en](https://doi.org/10.2807/ese.13.47.19044-en)

- [84] SZMOLKA, Ama a Béla NAGY. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology* [online]. 2013, **4** [cit. 2023-04-23]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2013.00258
- [85] MARAZZATO, Massimiliano, Marta ALEANDRI, Maria Rosa MASSARO et al. *Escherichia coli* strains of chicken and human origin: Characterization of antibiotic and heavy-metal resistance profiles, phylogenetic grouping, and presence of virulence genetic markers. *Research in Veterinary Science* [online]. 2020, **132**, 150-155 [cit. 2023-04-24]. ISSN 00345288. Dostupné z: doi:10.1016/j.rvsc.2020.06.012
- [86] MURASE, Toshiyuki a Hiroichi OZAKI. Relationship between phylogenetic groups of *Escherichia coli* and Pathogenicity among Isolates from chickens with Colibacillosis and healthy chickens. *Poultry Science* [online]. 2022, **101**(9) [cit. 2023-04-24]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.1016/j.psj.2022.102007
- [87] RUIZ DEL CASTILLO, Belén, Alain A. OCAMPO-SOSA a Luis MARTÍNEZ-MARTÍNEZ. Detection of phylogenetic group B1 *Escherichia coli* by multiplex PCR: Description of a new amplification pattern. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* [online]. 2011, **29**(10), 785-786 [cit. 2023-04-24]. ISSN 0213005X. Dostupné z: doi:10.1016/j.eimc.2011.07.004
- [88] DE CARLI, Silvia, Nilo IKUTA, Fernanda Kieling Moreira LEHMANN, Vinicius Proença DA SILVEIRA, Gabriela DE MELO PREDEBON, André Salvador Kazantzi FONSECA a Vagner Ricardo LUNGE. Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Science* [online]. 2015, **94**(11), 2635-2640 [cit. 2023-04-25]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.3382/ps/pev256
- [89] ŠMAJS, David, Lenka MICENKOVÁ, Jan ŠMARDA, Martin VRBA, Alena ŠEVČÍKOVÁ, Zuzana VALÍŠOVÁ a Vladana WOZNICOVÁ. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology* [online]. 2010, **10**(1) [cit. 2023-05-10]. ISSN 1471-2180. Dostupné z: doi:10.1186/1471-2180-10-288
- [90] JANSEN, T, C SCHWARZ, P PREIKSCHAT, M VOSS, H C PHILIPP a L H WIELER. Virulence-associated genes in avian pathogenic (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2001, **291**(5), 371-378 [cit. 2023-04-26]. ISSN 14384221. Dostupné z: doi:10.1078/1438-4221-00143
- [91] MOKADY, Daphna, Uri GOPHNA a Eliora Z. RON. Virulence factors of septicemic *Escherichia coli* strains. *International Journal of Medical Microbiology* [online]. 2005, **295**(6-7), 455-462 [cit. 2023-04-26]. ISSN 14384221. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijmm.2005.07.007
- [92] PAKBIN, Babak, Wolfram M. BRÜCK a John W. A. ROSSEN. Virulence Factors of Enteric Pathogenic *Escherichia coli*: A Review. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2021, **22**(18) [cit. 2023-04-25]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms22189922
- [93] AGUIRRE-SÁNCHEZ, José R., José B. VALDEZ-TORRES, Nohemí Castro DEL CAMPO, Jaime MARTÍNEZ-URTAZA, Nohelia Castro DEL CAMPO, Bertram G. LEE, Beatriz QUIÑONES a Cristóbal CHAIDEZ-QUIROZ. Phylogenetic group and virulence profile classification in *Escherichia coli* from distinct isolation sources in Mexico. *Infection, Genetics and Evolution* [online]. 2022, **106** [cit. 2023-04-26]. ISSN 15671348. Dostupné z: doi:10.1016/j.meegid.2022.105380



**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

A/S	ampicilin sulbactam
ADO	adonitol
AFEC	aviárně fekální <i>E. coli</i>
AK	amikacin
AMP	ampicilin
AmpC	ampicilináza C
AMX	amoxicilin
APEC	aviárně patogenní <i>E. coli</i>
ARG	arginin
ART	arabitol
ATP	adenozintrifosfát
$a_w$	aktivita vody
AZM	azitromycin
bp	base pair
bXY	$\beta$ -xylosidáza
C	chloramfenikol
CAZ	ceftazidim
CEL	celobióza
CEP	cefalotin
CIP	ciprofloxacín
CL	kolistin
CTR	ceftriaxon
CX	cefoxotin
CXM	cefuroxim
CZ	cafazolin
DAEC	difuzně agregativní <i>E. coli</i>

---

DNA	deoxyribonukleová kyselina
DO	doxycyklin hydrochlorid
dsDNA	dvouvláknová deoxyribonukleová kyselina
DUL	dulcitol
EAEC	enteroagregativní <i>E. coli</i>
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
EFSA	The European Food Safety Authority
EHEC	enterohemoragická <i>E. coli</i>
EIEC	enteroinvazivní <i>E. coli</i>
EPEC	enteropatogenní <i>E. coli</i>
ESBL	širokospektré $\beta$ -laktamázy
ESL	esculin
ETEC	enterotoxigenní <i>E. coli</i>
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
ExPEC	extraintestinální patogenní <i>E. coli</i>
GAR	gen antibiotické rezistence
GLR	$\beta$ -glukuronidáza
H <sub>2</sub> O	voda
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	peroxid vodíku
H <sub>2</sub> S	sirovodík
HUS	hemolyticko-uremický syndrom
IMP	impenem
INO	inositol
LAC	laktóza
LYS	lysin
MAL	malonát
MAN	mannitol

McF	McFarland
MH	Mueller-Hinton
MLB	melibióza
MU	mupirocin,
NaCl	chlorid sodný
NMEC	<i>E. coli</i> způsobující novorozeneckou meningitidu
ONP	$\beta$ -galaktosidáza
ORN	ornitin
PCA	plate count agar
PCR	polymerase chain reaction (polymerázová řetězová reakce)
pH	power of hydrogen
RAF	rafinóza
RCF	relative centrifugal force (relativní odstředivá síla)
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	revolutions per minute (otáčky za minutu)
rRNA	ribozomální ribonukleová kyselina
S	Svedberg
SAL	salicin
SCI	Simmons citrát
SEPEC	<i>E. coli</i> spojená s lidskou sepsí
SOR	sorbitol
spp.	species (druh; množné číslo)
STEC	<i>E. coli</i> produkující Shiga toxin
subsp.	subspecies (poddruh)
SUC	sacharóza
sv.	serovar
T <sub>A</sub>	teplota annealingu

TE	tetracyklin
TRE	trehalóza
tRNA	transferová ribonukleová kyselina
URE	ureáza
UTI	infekce močových cest
UV	ultrafialové záření
VRBL	violet red bile agar
WHO	World Health Organization

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obrázek 1 Schéma postupných kroků porážky drůbeže a možné cesty kontaminace [9]... 16	16
Obrázek 2 Mechanismy horizontálního a vertikálního přenosu u bakterií pro vývoj [36].. 31	31
Obrázek 3 Rozdělení kmenů <i>E. coli</i> do fylogenetických skupin podle dichotomického klíče [94]..... 50	50
Obrázek 4 Inhibiční zóny kmene <i>Escherichia coli</i> K34C na MH agaru ..... 61	61
Obrázek 5 Počet rezistentních kmenů pro skupiny antibiotik ..... 62	62
Obrázek 6 Výskyt genů rezistence u multirezistentních kmenů..... 63	63
Obrázek 7 Triplex PCR reakce pro stanovení fylogenetických skupin ..... 67	67
Obrázek 8 Výskyt genů virulence..... 68	68

**SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Epidemiologie patogenních skupin <i>Escherichia coli</i> [15; 16].....	19
Tabulka 2 Vzorky kuřecího masa a jejich původ .....	34
Tabulka 3 Indikátorové mikroorganismy a jejich původ.....	34
Tabulka 4 Seznam použitých primerů pro sekvenaci genu pro 16S rRNA .....	43
Tabulka 5 Seznam použitých PCR primerů pro detekci kolicinů [50] .....	46
Tabulka 6 Seznam použitých PCR primerů pro detekci mikrocinů [50].....	46
Tabulka 7 Seznam použitých PCR primerů pro detekci genů rezistence na $\beta$ -laktamová antibiotika [50].....	48
Tabulka 8 Seznam použitých PCR primerů pro detekci genů rezistence [50] .....	48
Tabulka 9 Seznam použitých PCR primerů pro zařazení kmenů <i>Escherichia coli</i> do fylogenetických skupin [50] .....	50
Tabulka 10 Seznam PCR primerů pro detekci genů virulence .....	51
Tabulka 11 Procentuální zastoupení rodů enterobakterií identifikovaných pomocí ENTEROtestu 24N a sekvenováním genu pro 16S rRNA .....	55
Tabulka 12 Výsledky detekce genů pro tvorbu bakteriocinů .....	57
Tabulka 13 Zastoupení jednotlivých kolicinů .....	58
Tabulka 14 Zastoupení jednotlivých mikrocinů .....	58
Tabulka 15 Prevalence rezistence u jednotlivých kmenů.....	61

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha I: Seznam vzorků kuřecího masa, z nich izolované kmeny a jejich identifikace

Příloha II: Výsledky identifikace ENTEROtestem 24N a sekvenací genu pro 16S rRNA

**PŘÍLOHA I: SEZNAM VZORKŮ KUŘECÍHO MASA, Z NICH  
IZOLOVANÉ KMENY A JEJICH IDENTIFIKACE**

Vzorek	Část	Řeznictví	Kmen
K2	Špalíček	Slezské uzeniny	K2B
			K2D
K3	Špalíček	Slezské uzeniny	K3A
			K3B
			K3C
K4	Špalíček	Slezské uzeniny	K4B
K5	Špalíček	Slezské uzeniny	K5A
			K5B
K6	Křídlo	Slezské uzeniny	K6A
K7	Křídlo	Slezské uzeniny	K7A
			K7B
			K7D
K8	Křídlo	Slezské uzeniny	K8A
			K8B
K9	Křídlo	Slezské uzeniny	K9B
			K9C
			K9D
K10	Křídlo	Slezské uzeniny	K10A
			K10E
K11	Křídlo	Slezské uzeniny	K11B
K12	Křídlo	Slezské uzeniny	K12A
			K12B
K13	Křídlo	Slezské uzeniny	K13C
			K13D
K14	Křídlo	Slezské uzeniny	K14A
			K14C
K15	Křídlo	Slezské uzeniny	K15B
K16	Křídlo	Rostislav Matula	K16B
K17	Křídlo	Rostislav Matula	K17B
K18	Křídlo	Rostislav Matula	K18A
			K18B
K20	Křídlo	Rostislav Matula	K20C
K22	Špalíček	Slezské uzeniny	K22A
			K22C
K23	Špalíček	Slezské uzeniny	K23C
K24	Špalíček	Slezské uzeniny	K24C
K26	Křídlo	Rostislav Matula	K26C
K29	Křídlo	Rostislav Matula	K29B



**PŘÍLOHA II: VÝSLEDKY IDENTIFIKACE ENTEROTESTEM 24N A SEKVENACÍ GENU PRO 16S rRNA**

<b>Kmen</b>	<b>ENTEROtest 24N</b>	<b>16S</b>
<b>K2B</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K2D</b>	Neuspokojivý	<i>Serratia liquefaciens</i>
<b>K3A</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-
<b>K3B</b>	Neuspokojivý	<i>Serratia fonticola</i>
<b>K3C</b>	<i>Citrobacter farmeri</i>	-
<b>K4B</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-
<b>K5A</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-
<b>K5B</b>	Neuspokojivý	<i>Aeromonas salmonicida</i>
<b>K6A</b>	Neuspokojivý	<i>Buttiauxella</i> sp.
<b>K7A</b>	Neuspokojivý	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>K7B</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K7D</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K8A</b>	<i>Escherichia hermannii</i>	-
<b>K8B</b>	<i>Citrobacter farmeri</i>	-
<b>K9B</b>	<i>Leclercia adecarboxylata</i>	-
<b>K9C</b>	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	-
<b>K9D</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K10A</b>	Neuspokojivý	<i>Hafnia alvei</i>
<b>K10E</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K11B</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K12A</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K12B</b>	<i>Serratia marcescens</i>	-
<b>K13C</b>	Neuspokojivý	<i>Hafnia alvei</i>
<b>K13D</b>	Neuspokojivý	<i>Buttiauxella agrestis</i>
<b>K14A</b>	Neuspokojivý	<i>Serratia liquefaciens</i>
<b>K14C</b>	<i>Buttiauxella gaviniae</i>	-
<b>K15B</b>	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	-
<b>K16B</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K17B</b>	<i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i>	-

<b>K18A</b>	<i>Serratia grimesii</i>	-
<b>K18B</b>	<i>Serratia marcescens</i>	-
<b>K20C</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K22A</b>	Neuspokojivý	<i>Aeromonas</i> sp.
<b>K22C</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K23C</b>	<i>Hafnia alvei</i>	-
<b>K24C</b>	Neuspokojivý	<i>Aeromonas aquatica</i>
<b>K26C</b>	<i>Serratia fonticola</i>	-
<b>K29B</b>	Neuspokojivý	<i>Aeromonas</i> sp.
<b>K31A</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K31B</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K31E</b>	Neuspokojivý	<i>Serratia fonticola</i>
<b>K32B</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K32C</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K32D</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K32E</b>	Neuspokojivý	<i>Moellerella wisconsensis</i>
<b>K33A</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K33B</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K33C</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K34A</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K34B</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K34C</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K35B</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>
<b>K35D</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K36A</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K36B</b>	<i>Escherichia coli</i>	-
<b>K36C</b>	Neuspokojivý	<i>Escherichia coli</i>