



**Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně**  
**Fakulta technologická**

Dizertační práce

**Charakterizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných  
z potravin**

**Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from food**

Autor: **Ing. Mgr. Silvie Pavlíčková**

Studijní program: Chemie a technologie potravin

Studijní obor: Technologie potravin

Školitel: doc. MVDr. Ivan Holko, Ph.D.

Konzultant: Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.

Zlín, 2016

© Silvie Pavlíčková

Vydala **Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně** v edici **Doctoral Thesis**.  
Publikace byla vydána v roce 2016

Klíčová slova: *antibiotická rezistence, Escherichia coli, faktory virulence, potraviny, bakteriociny, PCR*

Key words: *antibiotic resistance, Escherichia coli, virulence factors, foodstuffs, bacteriocins, PCR*

**Motto:**

„Důkazem vysokého vzdělání je schopnost mluvit o největších věcech jednodušším způsobem.“

[David Hume]

**Poděkování:**

Touto cestou bych ráda poděkovala mému školiteli, doc. MVDr. Ivanu Holkovi, Ph.D. a konzultantce Mgr. Magdě Doležalové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a svůj čas, který mi věnovali během celého doktorského studia. Ráda bych také poděkovala laborantkám Lence Machákové a Bc. Veronice Kučabové za pomoc v mikrobiologických laboratořích. Mé zvláštní poděkování patří rovněž kolegům z Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí FT UTB ve Zlíně za vytvoření příjemného pracovního prostředí, jejich podporu a motivaci k sepisování této práce. V neposlední řadě bych ráda vyjádřila svůj velký dík mým blízkým za trpělivost a důvěru, kterou do mne po celou dobu studia vkládali.

Tato práce vznikla za podpory interních grantů Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně (IGA/FT/2013/013, IGA/FT/2014/005, IGA/FT/2015/012, IGA/FT/2016/012).

# ABSTRAKT

Doktorská práce pojednává o bakterii *Escherichia coli* v potravinách. Práce se zabývá její charakterizací pomocí fenotypizačních a genotypizačních metod.

Bakterie *Escherichia coli* se mohou vyskytovat v různých druzích potravin, zejména živočišného původu. Rezistence k antimikrobiálním látkám je v současnosti celosvětovým problémem, jelikož je zaznamenán vysoký nárůst rezistentních bakterií člověka a zvířat. Ke zjištění prevalence rezistentních kmenů *E. coli* v potravinách bylo provedeno testování na citlivost k vybraným antibiotikům diskovou difúzní metodou. Kromě toho byla také zjišťována přítomnost genů rezistence pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR), zejména na beta-laktamová antibiotika. Jelikož se *E. coli* řadí mezi podmíněně patogenní mikroorganismy, bylo dalším cílem zjišťování přítomnosti vybraných faktorů virulence pomocí klasické a multiplex PCR. Pro určení patogenního potenciálu izolovaných kmenů přispělo také zařazení kmenů do fylogenetických skupin metodou triplex PCR. Součástí charakterizace bylo taktéž stanovení schopnosti produkce bakteriocinů s následnou genotypizací pro určení přesného typu kolicinu nebo mikrocinu. V neposlední řadě byla zjišťována schopnost kmenů *E. coli* tvořit biofilm spektrofotometrickým měřením absorbance v mikrotitračních destičkách.

Získané výsledky přináší nové poznatky o antibiotické rezistenci a virulenci kmenů *E. coli* izolovaných z potravin a přispívají k hlubšímu poznání vlastností této bakterie. Na základě získaných výsledků byl zhodnocen význam a potencionální nebezpečí přítomnosti *E. coli* v potravinách a prostředí.

## ABSTRACT

The doctoral thesis focuses on bacterium *Escherichia coli* in food. The PhD thesis deals with the characterization using phenotypic and genotypic methods.

*Escherichia coli* is found in various kinds of food, especially in food of animal origin. Currently, resistance to antimicrobial agents is a worldwide problem because of a large increasing of resistant bacteria of humans and animals. To determine the prevalence of resistant *E. coli* strains from foodstuffs, antibiotics sensitivity testing to selected antibiotics by discs diffusion method has been carried out. Furthermore, it has been tested the presence of resistance genes by the PCR method, especially to beta-lactam antibiotics. Since *E. coli* belongs among potentially pathogenic microorganisms, another objective of characterization was to determined selected virulence factors using classical and multiplex PCR. Classification of strains into phylogenetic groups by triplex PCR also contributed to determine the pathogenic potential of isolates. Another part of characterization was to found out the production of bacteriocins with subsequent genotyping by PCR to determine the exact type of colicin or microcin. Finally, it was determined biofilm formation ability by spectrofotometrically measuring of absorbance in microtiter plates.

All these results bring new insights about virulence and antibiotic resistance in *E. coli* strains isolated from food and contribute to a deeper understanding about physiological characteristics of this bacterium. Based on the obtained results was evaluated importance and potential dangers of the occurrence of *E. coli* in food and environment.

# OBSAH

|  |    |
|--|----|
| ABSTRAKT .....   | 4  |
| ABSTRACT .....   | 5  |
| OBSAH.....   | 6  |
| ÚVOD.....  | 9  |
| 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....   | 10 |
| 1.1 Charakteristika a význam bakterie <i>Escherichia coli</i> .....  | 10 |
| 1.2 Patogenita.....  | 11 |
| 1.3 Faktory virulence .....  | 11 |
| 1.3.1 Adheziny .....   | 12 |
| 1.3.2 Toxiny.....  | 13 |
| 1.4 Patogenní skupiny <i>Escherichia coli</i> .....  | 13 |
| 1.4.1 Intestinální patogenní kmeny <i>Escherichia coli</i> .....   | 14 |
| 1.4.2 Extraintestinální patogenní kmeny <i>Escherichia coli</i> .....  | 16 |
| 1.5 Antimikrobiální látky.....   | 18 |
| 1.5.1 Mechanizmy účinku antimikrobiálních látek .....  | 18 |
| 1.5.2 Antibiotická rezistence .....  | 19 |
| 1.5.3 Mechanizmy bakteriální rezistence .....  | 19 |
| 1.5.4 Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům .....  | 20 |
| 1.5.5 Šíření antibiotické rezistence prostředím .....  | 21 |
| 1.5.6 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů <i>Escherichia coli</i><br>izolovaných z hospodářských zvířat ..... | 22 |
| 1.5.7 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů <i>Escherichia coli</i><br>izolovaných z volně žijících zvířat..... | 23 |
| 1.5.8 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů <i>Escherichia coli</i><br>izolovaných z potravin .....             | 24 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 1.6   | Zařazení kmenů <i>Escherichia coli</i> do fylogenetických skupin .....     | 24 |
| 1.7   | Produkce bakteriocinů .....  | 25 |
| 1.7.1 | Koliciny .....   | 26 |
| 1.7.2 | Mikrociny .....  | 27 |
| 1.7.3 | Význam bakteriocinogenních kmenů <i>Escherichia coli</i> .....             | 27 |
| 1.8   | Schopnost bakterií <i>Escherichia coli</i> tvořit biofilm .....            | 28 |
| 2.    | CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE.....   | 30 |
| 3.    | MATERIÁL A METODIKA .....  | 31 |
| 3.1   | Materiál.....  | 31 |
| 3.1.1 | Seznam bakteriálních kmenů .....   | 31 |
| 3.1.2 | Laboratorní přístroje.....   | 31 |
| 3.1.3 | Kultivační média .....   | 32 |
| 3.1.4 | Chemikálie a antibiotika .....   | 33 |
| 3.1.1 | Použité roztoky.....   | 34 |
| 3.2   | Metody.....  | 36 |
| 3.2.1 | Fenotypizační metody .....   | 36 |
| 3.2.2 | Genotypizační metody .....   | 39 |
| 3.2.3 | Statistické metody hodnocení dat .....                                     | 44 |
| 4.    | VÝSLEDKY A DISKUZE.....  | 46 |
| 4.1   | Zařazení kmenů do fylogenetických skupin.....                              | 46 |
| 4.2   | Charakterizace kmenů izolovaných z kuřecího masa a zvěřiny .....           | 49 |
| 4.2.1 | Výskyt antibiotické rezistence .....                                       | 51 |
| 4.2.2 | Výskyt faktorů virulence.....  | 59 |
| 4.3   | Charakterizace kmenů <i>Escherichia coli</i> izolovaných ze zeleniny ..... | 67 |
| 4.3.1 | Výskyt antibiotické rezistence .....                                       | 68 |
| 4.3.2 | Výskyt faktorů virulence.....  | 71 |

|       |   |     |
|-------|---|-----|
| 4.4   | Schopnost tvorby biofilmu u kmenů izolovaných z kuřecího masa a<br>zvěřiny .....                      | 72  |
| 4.4.1 | Výskyt antibiotické rezistence a faktorů virulence u biofilm-<br>tvořících kmenů <i>E. coli</i> ..... | 74  |
| 4.5   | Bakteriocinogenotypizace kmenů <i>E. coli</i> .....   | 78  |
| 4.5.1 | Vpichový pokus .....  | 79  |
| 4.5.2 | PCR typizace kolicinogenních kmenů <i>E. coli</i> .....   | 79  |
| 4.5.3 | Inhibiční vliv bakteriocinů kmenů <i>E. coli</i> izolovaných z potravin ..                            | 83  |
| 5.    | SOUHRN VÝSLEDKŮ .....   | 87  |
| 5.1   | Charakterizace kmenů izolovaných z kuřecího masa .....  | 87  |
| 5.2   | Charakterizace kmenů izolovaných z volně žijící zvěře.....  | 88  |
| 5.3   | Charakterizace kmenů izolovaných ze zeleniny .....  | 89  |
| 6.    | ZÁVĚR.....  | 90  |
| 7.    | PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI.....  | 92  |
| 8.    | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....  | 95  |
| 9.    | SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....   | 119 |
| 10.   | SEZNAM TABULEK.....   | 122 |
| 11.   | SEZNAM ILUSTRACÍ .....  | 123 |
| 12.   | SEZNAM PŘÍLOH.....  | 124 |
| 13.   | CURRICULUM VITAE.....   | 126 |
| 14.   | SEZNAM PUBLIKACÍ.....   | 128 |
| 15.   | PŘÍLOHY .....   | 130 |



# ÚVOD

Bakterie *Escherichia coli* je hojně rozšířenou bakterií v prostředí včetně potravin. Běžně se vyskytuje v intestinálním traktu člověka a teplokrevných živočichů, kde přispívá k celkové rovnováze mikroorganismů střevní mikroflóry. Avšak ne všechny kmeny jsou pro člověka prospěšné. *Escherichia coli* patří mezi podmíněně-patogenní mikroorganismy, které pokud jsou vybaveny specifickými faktory virulence, mohou za určitých podmínek vyvolat intestinální nebo extraintestinální infekce. Onemocnění způsobená patogenními kmeny *E. coli* se šíří fekálně-orální cestou, kontaminovanými potravinami nebo vodou.

Rezistence k antimikrobiálním látkám je v současné době celosvětovým problémem. Se zvýšeným používáním antimikrobiálních látek ve veterinární a humánní medicíně byl v posledních letech zaznamenán vysoký nárůst rezistentních patogenních bakterií člověka a zvířat. Tyto rezistentní bakterie se pak mohou ke člověku šířit prostřednictvím potravinového řetězce a stát se tak zdrojem snadno šířitelných genů rezistence nesených plazmidy nebo transpozony a tím představují závažný problém při léčbě bakteriálních infekcí. Prevalence antibiotické rezistence bakterií *E. coli* ve střevním traktu člověka i zvířat může sloužit jako vhodný ukazatel selekčního tlaku vzniklého v důsledku používání antimikrobiálních látek.

*E. coli* je na základě dlouhodobých studií rozdělena do fylogenetických skupin, které se liší ve svých fenotypových vlastnostech včetně odolnosti vůči antibiotikům či přítomnosti faktorů virulence. Na základě zařazení do fylogenetických skupin lze usoudit, zda se jedná o kmeny komenzální nebo patogenní. Schopnost tvorby biofilmu je taktéž významným faktorem, který umožňuje bakteriím odolávat vnějším vlivům prostředí. Z hlediska hygienického se jedná o závažný problém. Biofilmy v potravinářství mohou být odolné vůči dezinfekčním přípravkům a být tak zdrojem oportunně patogenních bakterií.

Zařazení kmenů do fylogenetických skupin, monitoring antibiotické rezistence, detekce faktorů virulence a další kroky charakterizace mohou přispět k důkladnějšímu poznání vlastností *E. coli* včetně určení patogenního potenciálu a vlivu na zdraví člověka.

# 1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

## 1.1 Charakteristika a význam bakterie *Escherichia coli*

*Escherichia coli* je gramnegativní fakultativně anaerobní nesporulující bakterie tyčinkovitého tvaru o velikosti 1,1 – 1,5  $\mu\text{m}$ . Tato bakterie se řadí do rodu *Escherichia*, patřící do čeledi *Enterobacteriaceae*. Na svém povrchu může mít dva typy fimbrií. První typ je složen z kyselého hydrofobního proteinu-fimbrinu, který umožňuje bakterii přichytit se na tkáň hostitele a kolonizovat jej. Fimbrie tohoto typu jsou vysoce antigenní (F antigeny). Druhým typem fimbrií jsou sex pili, které jsou důležité při konjugaci bakterií. Bakterie se pohybují pomocí bičků, které jsou taktéž vysoce antigenní (H antigeny). Bakterie *E. coli* nevytvářejí spory, takže nejsou uzpůsobeny k dlouhodobému přežívání ve volné přírodě. Naproti tomu součástí buněčné stěny je vnější membrána, která jim propůjčuje poměrně značnou odolnost k chemickým i fyzikálním vlivům vnějšího prostředí. Roste na běžných půdách v širokém rozmezí podmínek a má značnou biochemickou aktivitu. Je kataláza pozitivní, oxidáza negativní, zkvašuje laktózu na kyseliny (mléčnou, octovou) s tvorbou plynu ( $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2$ ), zkvašuje také glukózu a ostatní sacharidy. Optimální teplota pro růst na běžných živných půdách je 37 °C. Kmeny *E. coli* izolované z teplokrevných živočichů jsou schopny růstu i při teplotách 45-46 °C [1, 2].

*Escherichia coli* je nejznámější a asi i nejdůležitější složkou normální mikrobiální flóry tlustého střeva u člověka i ostatních savců. Tyto komenzální nepatogenní kmeny *E. coli* patří do mnoha různých sérotypů a mohou být izolovány z faeces zdravých jedinců [3]. Svými exoproteiny s antibakteriálním účinkem (koliciny) a svou metabolickou aktivitou se významně podílí na regulaci střevního ekosystému, její přítomnost pomáhá zajišťovat bezproblémový průběh trávicích pochodů. Je také považována za hlavního přirozeného producenta vitamínu K. Mimo střevní trakt se běžně nachází v půdě, prachu, povrchových a odpadních vodách, často také v potravinách. Patří mezi tzv. indexové mikroorganismy, které informují o mikrobiálním stavu a procesech probíhajících ve vyšetřovaných potravinách a surovinách. *E. coli* slouží také jako ukazatel použití správných technologických postupů a jako indikátorový organismus při stanovení kvality pitné vody. Z experimentálního hlediska tato bakterie slouží jako modelový mikroorganismus, na kterém byla prokázána bakteriální konjugace a replikace DNA [2]. Do jejího genomu byly vneseny geny zodpovědné za produkci látek, jako je například lidský inzulin

či interferon, nebo také geny kódující antigeny jiných bakterií, což vedlo ke vzniku rekombinantních vakcín [2].

Komenzální *E. coli*, přítomná ve střevní mikroflóře, je za normálních okolností pro hostitele neškodná. Za určitých podmínek (například v případě oslabené imunity nebo při porušení přirozené bariéry mezi gastrointestinálním traktem a jinak sterilními místy v těle) se však tyto kmeny mohou dostat mimo střevní trakt a mohou u oslabeného jedince vyvolat intestinální nebo extraintestinální infekce. Vše se děje pomocí tzv. faktorů virulence, které jsou specifické pro daný patotyp *E. coli*. Kromě trávicího traktu kmeny *E. coli* také kolonizují prostředí a mohou sekundárně kontaminovat potraviny živočišného a rostlinného původu a také povrchové a podzemní vody. Obecně je většina patogenních kmenů *E. coli* biochemicky a ekologicky podobná ostatním nepatogenním kmenům, což může činit problém při jejich detekci mezi komenzálními kmeny [4].

## 1.2 Patogenita

Patogenita je schopnost mikrobiálního druhu vyvolat onemocnění konkrétního druhu hostitele. *Escherichia coli* patří mezi oportunní (fakultativní) patogeny, které vyžadují k vyvolání infekce určité podmínky. Aby mohly uplatnit svoji patogenitu, je zapotřebí snížené odolnosti hostitele. Jednotlivé kroky infekčního procesu souvisejí s produkcí tzv. faktorů virulence [3]. Bakterie mohou poškozovat hostitele různými mechanismy jako například adherencí a invazí do buněk (umožňující bakterii kolonizaci, průnik a množení) nebo produkcí toxinů [5].

## 1.3 Faktory virulence

Virulence značí míru či stupeň patogenity mikrobiálního kmene. Ta zahrnuje tři složky: kontagiozitu, invazivitu a toxicitu. Kontagiozitou se rozumí schopnost mikroba přenášet se mezi jednotlivými hostiteli. Invazivita zahrnuje několik schopností bakterie, které jim umožňují překonávat obranné mechanismy hostitele. První je to schopnost vstoupit do hostitele přilnutím na jeho povrchy adherencí, dále je to schopnost proniknout do vnitřního prostředí penetrací a schopnost množení se a šíření ve vnitřním prostředí hostitele. Toxicita je schopnost mikroba poškozovat hostitele produkcí toxických látek uvolňovaných bakterií do prostředí nebo vázaných na bakteriální buňku a uvolňovaných až po jejím rozpadu [5].

Všechny tyto schopnosti jsou u bakterií zprostředkovány faktory virulence, což jsou proteiny, které jsou kódovány na mobilních genetických útvarech (plazmidy, transpozony, bakteriofágy a ostrůvky patogenity) [1]. Mezi základní faktory virulence *E. coli* patří zejména adheziny, invaziny a toxiny včetně sekrečního systému typu III [1, 6, 7]. Přehled faktorů virulence u jednotlivých patogenních kmenů *E. coli* je uveden v Tabulce 1.

### 1.3.1 Adheziny

U většiny známých patogenů se vyvinul určitý způsob adherence (schopnosti přilnout na povrch hostitelské buňky). Děje se tak pomocí speciálních struktur na povrchu bakterie (fimbrie, fimbrily, curli a nefimbriální adheziny) nebo pomocí specifických proteinů (vnější membránový protein intimin) [8].

Fimbriální a afimbriální adheziny *E. coli* byly poprvé popsány u enterotoxigenní *E. coli* (ETEC) izolované z prasat, telat a člověka [6, 9]. Později byly také popsány u uropatogenní *E. coli* (UPEC), septikemické *E. coli* (SePEC), aviárně patogenní *E. coli* (APEC) a nekrotoxigenní *E. coli* (NTEC) [7, 10, 11]. Fimbrie typu I (*fim*) vlastní většina patogenních i komenzálních kmenů *E. coli*, včetně laboratorního kmene *E. coli* K-12. P fimbrie (*pap*), F1C fimbrie (*foc*) a S fimbrie (*sfa*) jsou typické u kmenů UPEC. S fimbrie jsou také často přítomné u kmenů *E. coli* způsobujících meningitidu (NMEC). Antigeny kolonizačního faktoru CFA/I a CFA/II jsou typické adheziny kmenů ETEC [9], které umožňují bakteriím adherenci na střevní mukózu tenkého střeva. Pro ETEC jsou také charakteristické fimbriální adheziny F2, F3, F4, F5, F6, F18, F41. U enteropatogenní *E. coli* (EPEC) jsou typické tzv. bundle forming pili (fimbrie 4, BFP). Kmeny enteroagregativní *E. coli* (EAEC) obsahují jiný typ BFP, nazývané fimbrie agregativní adherence (*aaf/I*), které způsobují typické léze u infekcí způsobených EAEC [3]. Pro UPEC, SePEC, APEC, NTEC jsou charakteristické F7–F16 fimbrie. Fimbriální adheziny F17 jsou produkovány ETEC, SePEC, UPEC, APEC, a NTEC [6, 7, 9, 12]. Geny kódující fimbriální adheziny jsou lokalizovány na plazmidech (především u ETEC) nebo chromozomálně na ostrovech patogenity (například u UPEC) [8].

Afimbriální rodina adhezinů (Afa) sestává z pravých afimbriálních adhezinů (Afa, Dr, M), jiné tvoří malé fimbrie (F1845) nebo mají kapsule chránící buněčný povrch (Nfa). Vnější membránový protein intimin (kódován genem *eae*) je zodpovědný za těsné ulpění bakterií na střevní buňky a podílí se na vymizení mikrokloků střeva při vzniku tzv. attaching/effacing lézí (A/E lézí) u EPEC a enterohemoragické *E. coli* (EHEC) [7, 9]. A/E léze jsou u EPEC

a ETEC vyvolány také přítomností sekrečního systému typu III (T3SS). Intimin a T3SS je u EPEC a EHEC lokalizován na ostrově patogenity, tj. úsek chromozomu kódující tvorbu faktorů virulence [6, 9].

### 1.3.2 Toxiny

Mezi další faktory virulence kmenů *E. coli* patří produkce toxinů. Bakterie aktivně transportují do svého okolí nebo při svém rozpadu uvolňují toxické látky, které poškozují hostitele. Působí na buněčný skelet (systém sekrece typu III) nebo na metabolismus buňky (intracelulární AB toxiny s enzymatickou aktivitou, oligopeptidové toxiny aktivující metabolickou kaskádu po fixaci na buněčnou cytoplazmatickou membránu) nebo na buněčnou cytoplazmatickou membránu (enzymatické a póry tvořící cytolyziny) [8]. Systém sekrece typu III je multimolekulární systém, který je využíván G- bakteriemi k sekreci molekul ovlivňujících hostitelské buňky tak, aby vytvářely prostředí vhodné k přežití intracelulárního bakteriálního patogena. Ničí cytoskeleton a blokuje fagocytózu, zabraňuje uvolnění cytokinů a indukuje apoptózu. Systém se aktivuje kontaktem s cytoplazmatickou membránou eukaryotické buňky a umožňuje bakteriím injikovat své proteiny do napadené buňky [13].

Některé bakteriální toxiny se skládají ze dvou samostatných podjednotek; z jedné kopie A podjednotky a jedné nebo více kopií podjednotky B. Podjednotka A je toxická složka a podjednotka B váže celé toxiny na membránové receptory eukaryotické buňky. Po aktivaci enzymatického štěpení může podjednotka A uplatnit svou toxickou aktivitu při interferenci s cytoskeletární integritou, při syntéze bílkovin, DNA metabolismu nebo různých způsobů sekrece. Kmeny STEC jsou známé produkcí tzv. shiga toxinů Stx1 a Stx2. Termolabilní toxiny (LTI a LTII) a tepelně stabilní toxiny (STa a STb) jsou přítomné u kmenů ETEC. Pro UPEC je charakteristická přítomnost  $\alpha$ -hemolyzinu (*hly*), který navíc bývá také prokazován u kmenů STEC, způsobující edémovou chorobu prasat. Cytotoxický nekrotizační faktor (CNF1) je důležitým faktorem virulence UPEC kmenů. Tepelně stabilní enterotoxin EAST1 není produkován konkrétním patotypem *E. coli*, ale může být přítomen u kmenů EAEC, ETEC, EPEC a STEC člověka, skotu a prasat [6, 9].

## 1.4 Patogenní skupiny *Escherichia coli*

Patogenní kmeny *E. coli* jsou široce rozšířené v prostředí a mohou kontaminovat vodu, potraviny živočišného původu nebo i jiné potraviny jako je zelenina, ovoce a jejich výrobky [3]. Podle místa a účinku působení

v organismu jsou kmeny *E. coli* rozděleny na enteropatogenní a extraintestinální, které způsobují tři hlavní infekce: enterální a průjmové onemocnění, uropatogenní infekce, sepse a meningitidy [6]. Přítomnost faktorů virulence spolu s klinickými příznaky slouží jako kritéria pro jejich klasifikaci.

#### **1.4.1 Intestinální patogenní kmeny *Escherichia coli***

Mezi intestinální patogenní kmeny *E. coli* patří enteropatogenní *E. coli* (EPEC), enterotoxigenní *E. coli* (ETEC), shiga toxin-produkující *E. coli* (STEC), enteroinvazivní *E. coli* (EIEC), enteroagregativní *E. coli* (EAEC), nekrotoxigenní *E. coli* (NTEC) a difuzně adherentní *E. coli* (DAEC) [1,3].

Enteropatogenní kmeny *E. coli* se vyskytují především u dětí a kojenců ve věku do 2 let jako původce vodnatých průjmových onemocnění s horečkou a zvracením. [6, 14]. Tyto kmeny jsou na svém povrchu opatřeny adhezními vlákny (fimbriemi) pro prvotní uchycení na cílovou buňku. Pomocí sekrečního systému typu III pak těmito vlákny vypouští signální proteiny do epiteliálních buněk napadené buňky, které se zabudují do její buněčné membrány. Tento cytoskeletonový protein v další fázi působí jako receptor pro další adhezní molekuly (intimin) na povrchu *E. coli*. Ta při své adhezi zničí mikrokly na povrchu střevního epitelu a tím způsobuje A/E léze na enterocytech, čímž se podstatně zhorší podmínky pro transport kapalin a elektrolytů ze střeva [15].

Enterotoxigenní *E. coli* bývá hlavní příčinou průjmů u malých dětí v rozvojových zemích a u dospělých může při cestování do těchto zemí způsobit tzv. cestovatelský průjem. Hlavní příčinou infekce ETEC je fekální kontaminace potravin a pitné vody. Infekce způsobené kmeny ETEC nejsou obvykle příčinou žádného lokálního zánětu nebo histologických změn. ETEC kolonizuje tenké střevo pomocí kolonizačních faktorů (proteinové fimbrie) napadá jeho mukózu a produkuje tepelně labilní (LT) nebo tepelně stabilní (ST) enterotoxin. Kmeny ETEC mohou produkovat jeden nebo zároveň oba toxiny. Toxin aktivuje v buňkách střevní sliznice sekreční systém, který do střeva vylučuje chloridové a sodíkové ionty; druhotně tyto ionty doprovázejí i molekuly vody. To pak vede k typickým příznakům ETEC infekce (vodnatý průjem, kolísající horečka, zvracení, křeče a nauzea) [3].

Shiga toxin-produkující *E. coli* produkuje Shiga toxiny Stx1 a Stx2 a kolonizuje trávicí trakt zdravých domácích zvířat, především přežvýkavců, které jsou hlavním rezervoárem těchto patogenů [9]. Hlavní sérotypy STEC O157, O26, a O111 jsou označovány jako enterohemoragické *E. coli* a jsou

zodpovědné za vznik hemoragické kolitidy, hemolyticko-uremického syndromu (HUS) a vyhlazení střevního epitelu (A/E léze) [16, 17]. Kmeny STEC mají podobný mechanismus adherence jako EPEC, ale váží se především v tlustém střevě. Nejběžnějším sérotypem je O157:H7. *Escherichia coli* O157:H7 produkují *Shigella* podobné toxiny Stx1 a Stx2, kolonizují epitel tlustého střeva a vyvolávají akutní zánět tračníku. Povrchový protein intimin (*eae*) zvyšuje virulenci kmenů STEC schopností adherence k epiteliálním intestinálním buňkám a způsobuje charakteristické A/E léze na apikální buněčné membráně kolonocytů [17]. Některé kmeny STEC mohou navíc vlastnit gen kódující enterohemolyzin (*hlyA*), který se synergicky podílí na virulenci [18]. Tyto potravinové patogeny se vyskytují převážně v nedostatečně tepelně upraveném mase (především hovězí, skopové, ale také i kuřecí maso) [18] a nepasterizovaném mléce [16]. Zdrojem může také být jogurt, brambory, čerstvý jablečný džus a jiné potraviny [19].

Enteroinvazivní *E. coli* vyvolávají u člověka onemocnění typu dyzenterie. Biologicky i antigeně jsou EIEC blízce příbuzné bakteriím rodu *Shigella* [2]. Obsahují velký plazmid, který nese geny pro adhezi na buňky tlustého střeva. Kmeny EIEC zasahují střevní epitel, lyzují fagozomy a dále v buňce procházejí jádrem aktinových mikrofilamentů a vyvolávají dyzenterický syndrom. Infekce se projevuje krvavými průjmy a horečkou [6, 9].

Enteroagregativní *E. coli* se zřejmě vyskytují převážně v asijských zemích a podobně jako ETEC je také tento kmen příčinou tzv. cestovatelských průjmů [2]. Adherují na epitel tenkého a tlustého střeva v podobě tenkého biofilmu a produkují enterotoxiny (EAST I) a cytotoxiny. EAEC může kromě tvorby slizničního biofilmu vyvolat na střevní sliznici cytotoxický efekt nebo zkrácení či hemoragickou nekrózu klků [9].

Nekrotoxigenní *E. coli* jsou charakterizovány produkcí toxinů- cytotoxických nekrotizačních faktorů (CNF) [10]. Kmeny NTEC1, které produkují CNF1 byly izolovány především u lidí, prasat, psů a koček trpících extraintestinálními infekcemi, dále při enteritidách u přežvýkavců, prasat, psů, koček a koní [20]. Kmeny NTEC2 s produkcí CNF2 byly izolovány z přežvýkavců trpících průjmy nebo septikémií [20].

Difuzně adherentní *E. coli* je především u dětí příčinou infekce doprovázené vodnatým průjmem [9]. Patogenní mechanismy jsou z velké části stále neznámé [1]. Bylo prokázáno, že DAEC po adherenci na buňkách HEp-2 vyvolává

signální transdukci v enterocytech tenkého střeva, což se projevuje růstem podlouhlých útvarů z jejich povrchu [21].

#### 1.4.2 Extraintestinální patogenní kmeny *Escherichia coli*

Extraintestinální patogenní kmeny *E. coli* způsobují systémové infekce krevního řečiště, dýchacího a močového ústrojí a meningitidu. Tyto kmeny mají široké spektrum faktorů virulence (adheziny, toxiny), které oproti faktorům virulence enteropatogenních kmenů nemají specifický faktor virulence a nevyvolávají charakteristické klinické příznaky. Mezi tyto kmeny patří uropatogenní *E. coli* (UPEC), *E. coli* způsobující neonatální meningitidu (NMEC) a aviárně patogenní *E. coli* (APEC) [1, 22].

Uropatogenní *E. coli* představují nejčastější příčinu infekcí močových cest u člověka. UPEC adherují k uroepiteliálním buňkám pomocí specifických adhezínů (P fimbrie a S fimbrie) a použitím cytolytického toxinu ( $\alpha$ -hemolyzin) poškozují epitel. Současně se také chrání před systémem imunitní obrany tvorbou kapsulí [1]. UPEC také často způsobuje infekce močových cest u psů a koček. U uropatogenních kmenů izolovaných ze zvířat byla prokázána podobnost s UPEC humánního původu. Infekce se může projevovat asymptomatickou bakteriurií a nekomplikovanou cystitidou, ale při vážnější infekci může být také příčinou pyelonefritidy [12].

NMEC způsobují novorozeneckou meningitidu a sepse u dětí. Mohou být taktéž příčinou infekcí močového traktu [1]. NMEC s největší pravděpodobností vstupuje do těla přes střevní sliznici a následně způsobuje sepsi nebo lokální změny v centrálním nervovém systému [1, 3]. NMEC jsou schopny tvorby ochranných kapsulí. Adherují na epiteliálních a endoteliálních buňkách pomocí patogenních adhezínů (S-fimbrií) a jsou schopny přes tyto bariéry proniknout [1].

Aviárně patogenní *Escherichia coli* způsobuje především extraintestinální infekce drůbeže. Aviární kolibacilóza se projevuje jako infekce horních cest dýchacích a často vede k celkové infekci vnitřních orgánů (perikarditida, peritonitida). APEC adherují na tracheální epitel, kde po překonání bariéry (v podobě tracheálního hlenu) kolonizují. APEC kolonizuje také na plicích a vzdušných vacích. Tento mechanismus adherence je zprostředkovaný pomocí proteinových struktur (F1 fimbrie). Ve vnitřních orgánech adherují APEC pomocí P fimbrií [11]. Díky podobnosti s uropatogenními kmeny a možnosti



horizontálního přenosu genů mohou kmeny APEC sloužit jako rezervoár genů virulence pro UPEC [11, 12].

Tab.1: Faktory virulence patogenních kmenů *Escherichia coli* [7].

| <b>kmen</b> | <b>faktory virulence</b>  | <b>kódování genu</b>                         | <b>onemocnění</b>  |
|-------------|---|--|--|
| <b>EPEC</b> | A/E léze, 4BFP fimbrie  | ostrovy patogenity (A/E léze), plazmid       | průjem   |
| <b>ETEC</b> | fimbriální adheziny (F2–F6, F17, F18, F41); tepelně stabilní (ST) a tepelně labilní (LT) enterotoxiny | chromozomy, plazmidy (adheziny), transpozony | cestovatelský průjem, profuzní neonatální průjem u dětí, telat, selat a štěňat           |
| <b>EIEC</b> | invaze a pomnožení v enterocytech   | plazmid                                      | dyzenterie   |
| <b>EAEC</b> | malé fimbriální adheziny (AAF/Hda); toxiny (Pet, EAST1, ShET1); transkripční genový aktivátor (aggR)  | plazmidy, ostrovy patogenity (ShET1)         | průjem   |
| <b>STEC</b> | shiga toxiny (Stx1 a Stx2), afimbriální a fimbriální adheziny   | fágy (Stx), chromozomy nebo plazmidy         | hemolytická kolitida, HUS, edémová choroba u prasat                                      |
| <b>EHEC</b> | Stx a A/E léze  | fágy (Stx), ostrov patogenity (A/E léze)     | hemoragická kolitida, HUS a trombotická trombocytopenická purpura u lidí, průjem u telat |
| <b>DAEC</b> | afimbriální adheziny (AFA)  | chromozomy, plazmidy                         | průjem, infekce močového traktu, septikémie  |

Tab. 1: pokračování

| kmen        | faktory virulence  | kódování genu  | onemocnění  |
|-------------|--|--|---|
| <b>UPEC</b> | $\alpha$ -hemolyzin;<br>fimbriální (Pap/Prs,<br>Sfa/F1C a nebo F17)<br>a nebo afimbriální<br>adheziny; siderofory  | chromozomy včetně<br>ostrovů patogenity,<br>plazmidy | cystitida,<br>pyelonefritida,<br>bakteriemie,<br>septikémie |
| <b>NTEC</b> | cytotoxický<br>nekrotizující faktor<br>(CNF1 nebo CNF2),<br>$\alpha$ Hly; fimbriální<br>(Pap/Prs, Sfa/F1C<br>a nebo F17) a nebo<br>afimbriální adheziny;<br>siderofory | chromozomy včetně<br>ostrovů patogenity,<br>plazmidy | průjem, infekce<br>močového traktu,<br>septikémie           |
| <b>APEC</b> | fimbriální (Pap/Prs,<br>Sfa/F1C a nebo F17)<br>a nebo afimbriální<br>adheziny; siderofory  | chromozomy včetně<br>ostrovů patogenity,<br>plazmidy | septikémie,<br>bakteriemie,<br>systémové infekce            |

## 1.5 Antimikrobiální látky

Jako antimikrobiální látky označujeme léčiva používaná k profylaxi a k terapii infekčních onemocnění. Mnohé z těchto látek jsou mikrobiálního původu a nazýváme je antibiotika. Tyto látky jsou pro bakterie selektivně toxické s bakteriocidním nebo bakteriostatickým účinkem.

### 1.5.1 Mechanizmy účinku antimikrobiálních látek

Antimikrobiální látky jsou často rozděleny do kategorií podle jejich hlavního mechanismu účinku. Mezi hlavní mechanismy patří inhibice syntézy buněčné stěny (např.  $\beta$ -laktamy a glykopeptidy), inhibice syntézy proteinů působením na bakteriální ribozom (makrolidy, aminoglykosidy, tetracykliny), inhibice syntézy nukleových kyselin zásahem do enzymatické aktivity DNA-gyrázy

(chinolony), nebo zásahem do mechanismu transkripce nebo přímé rozrušení molekuly DNA (fluorochinolony a rifampicin), narušení metabolické dráhy (např. sulfonamidy, trimetoprim-sulfametoxazol) a narušení bakteriální membránové struktury (polymyxiny) [13].

### **1.5.2 Antibiotická rezistence**

Rezistence bakterií k antimikrobiální látce je schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného antibiotika [23]. Některé druhy bakterií jsou přirozeně rezistentní na určitou antimikrobiální látku. Primární rezistence je dána druhem bakterie a je geneticky podmíněná bez ohledu na předchozí kontakt s antibiotikem. Odolnost přirozeně rezistentních bakterií je dána tím, že nenesou pro dané antibiotikum zásahové místo. U bakterií žijících v prostředí s jinými mikroorganismy, které přirozeně produkují antimikrobiální látky, se může vyskytovat přirozená vícenásobná rezistence [24].

Větší obavou je ale rezistence získaná, kde se zpočátku vnímavé populace bakterií stanou rezistentními a rozmnožují se a šíří za selektivního tlaku používání těchto látek [25]. Sekundárně rezistentní bakterie mohou být rezistentní na více než jednu skupinu antimikrobiálních látek. Bakterie mohou získat rezistenci mutací nebo také získáním genů rezistence z jiných organismů. Získání nového genetického materiálu citlivými bakteriemi od rezistentních bakteriálních kmenů dochází prostřednictvím konjugace, transformace, transdukce nebo také transpozony, které často usnadňují začlenění četných genů rezistence do genomu hostitele [26].

### **1.5.3 Mechanizmy bakteriální rezistence**

Většina antimikrobiálních látek používaných v humánní a veterinární medicíně inhibují růst bakterií nebo je dokonce usmrcují již při velmi nízkých koncentracích. Léčba bakteriálních infekcí je ale stále komplikována schopností bakterií vytvářet rezistenci na antimikrobiální látky. V důsledku působení těchto látek se u exponovaných bakterií projevuje vysoký nárůst počtu genů rezistence, což zdůrazňuje mimořádnou schopnost bakterií rychle a efektivně reagovat na selekční tlak použité látky [13, 24, 26].

Existuje několik způsobů, při nichž bakterie získají odolnost vůči antimikrobiálním látkám. Jedním ze způsobů je získání genů rezistence od producentů antimikrobiálních látek, které jsou následně upraveny s ohledem na optimalizaci funkce v novém hostiteli. Například, bakterie mohou získat geny, které jsou kódované  $\beta$ -laktamázou. Tyto geny rezistence umožňují bakterii

produkovat enzymy, které ničí antibakteriální látku. Jsou lokalizovány v chromozomální DNA a jejich šíření do jiných bakterií je zprostředkováno pomocí mobilních genetických elementů, jako jsou plazmidy a transpozony. Druhým způsobem vzniku rezistence je postupná mutace genů, jejichž produkty hrají roli ve fyziologickém buněčném metabolismu. Další možností je, že získané geny mohou změnit cílové místo působení antibiotika nebo produkovat alternativní metabolické cesty, čímž se vyhýbají účinku látky [25]. Změna cílové molekuly je známa u rezistence na makrolidy a beta-laktamy [13]. Dalším způsobem je zabránění průniku antimikrobiální látky do buňky. Zhoršený průnik do buňky byl popsán například u rezistence k aminoglykosidům, tetracyklinům nebo chinolonům [5].

Nejčastějším podkladem pro vznik rezistence je inaktivace antibiotika vlivem bakteriálních enzymů. Typické jsou enzymy modifikující aminoglykosidy a zejména enzymy rozkládající beta-laktamy. Beta-laktamázy jsou enzymy, které štěpí beta-laktamový kruh a jsou nejčastější příčinou rezistence k penicilinovým a cefalosporinovým antibiotikům. S rostoucím užíváním cefalosporinů se začaly objevovat nové laktamázy, označovány jako beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinnosti (ESBL) [5].

#### **1.5.4 Rezistence k beta-laktamovým antibiotikům**

Beta-laktamová antibiotika představují širokou skupinu antibiotik zahrnující penicilinové deriváty, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy, které jsou účinné proti grampozitivním a gramnegativním bakteriím. Bakterie vyvinuly vůči beta-laktamovým antibiotikům účinnou zbraň v podobě enzymových beta-laktamáz, které jsou schopny hydrolyzovat beta-laktamový kruh antibiotika a tím tak zabránit jeho letálnímu účinku.

Veterinární použití beta-laktamů s rozšířeným spektrem účinnosti vedlo během několika let u kmenů *E. coli* k nárůstu multirezistentních kmenů, v důsledku produkce betalaktamáz širokého spektra (ESBL), kterými bakterie hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy [27].

Kmeny produkující úzké spektrum beta-laktamových enzymů jsou rezistentní k penicilinům (ampicilin), první (cefalotin, cefazolin) a druhé generaci cefalosporinů (cefuroxim), zatímco kmeny produkující ESBL jsou navíc rezistentní ke třetí (ceftazidim, ceftiofur), čtvrté generaci cefalosporinů (cefepim) a aztreonamu. Cefamyciny (cefoxitin) a karbapenemy (imipenem, meropenem) nejsou ESBL hydrolyzovány [28].

Tyto ESBL jsou často kódovány na mobilních genetických elementech (plazmidech), které obvykle sdružují kromě genů beta-laktamáz také geny determinující rezistenci k aminoglykosidům, chloramfenikolu, rifampicinu, sulfonamidům, případně i k dalším antibiotikům [29]. Tím se bakterie mohou stát extrémně rezistentními a léčba infekcí způsobená těmito multirezistentními bakteriemi může být velmi obtížná.

V současné době jsou u kmenů *E. coli* nejběžnější typy beta-laktamáz: TEM (Temoneira), SHV (sulfhydryl variable), CTX - M (cefotaximáza) a OXA (oxacilináza). Zatímco většina TEM beta-laktamáz jsou širokospektré beta-laktamázy, typy TEM-1, TEM-2 a TEM-13 jsou schopné hydrolyzovat pouze deriváty penicilinu, tudíž nejsou považovány za ESBL. TEM-1 je nejčastěji se vyskytující beta-laktamázou u gram-negativních bakterií. Bylo zjištěno, že více než 90 % kmenů *E. coli* rezistentních na ampicilin produkovalo TEM-1 [30]. Beta-laktamázy SHV jsou také převážně ESBL produkující. Avšak typ SHV-1 uděluje pouze rezistenci k širokospektrým penicilinům a typ SHV-2 je schopen hydrolyzovat cefotaxim [31]. Oproti TEM a SHV beta-laktamázám, většina typů ze skupiny OXA beta-laktamáz nejsou považovány za ESBL, protože nehydrolyzují třetí generaci cefalosporinů s výjimkou OXA-10, OXA-2 a jejich derivátů [31].

V současnosti je nejvýznamnější skupinou ESBL typ CTX-M zahrnující více než 70 různých CTX-M enzymů, rozdělených do pěti skupin podle jejich aminokyselinové sekvence. U komenzálních kmenů *E. coli* izolovaných z drůbeže, prasat a dobytka se nejčastěji vyskytují varianty CTX-M-1, CTX-M-2, CTX-M-3, CTX-M-9, CTX-M-13, CTX-M-14, CTX-M-18, a CTX-M-24 [27].

### **1.5.5 Šíření antibiotické rezistence prostředím**

Při šíření genů rezistence hrají důležitou roli mobilní genetické elementy, jako jsou plazmidy, transpozony a genové kazety. Plazmidy jsou nezávisle se replikující extrachromozomální molekuly kyseliny deoxyribonukleové, které byly prokázány téměř u všech lékařsky a veterinárně významných bakteriálních rodů. Jejich velikost se pohybuje od méně než 2 do více než 100 kb. Díky jejich replikačnímu systému jsou schopny autonomní replikace. Vlastnosti přenášené plazmidy nejsou za fyziologických podmínek pro přežití bakterií nezbytné, ale za specifických podmínek mohou být pro bakterie přínosné. Mezi tyto vlastnosti patří například rezistence k antimikrobiálním látkám, kationtům těžkých kovů, aniontům nebo bakteriocinům a různé metabolické a virulentní vlastnosti.

Plazmidy mohou nést jeden či více genů rezistence. Běžně se přenášejí konjugací, ale i transdukcí nebo transformací DNA bez přítomnosti nosiče [24].

Transpozony nemají na rozdíl od plazmidů replikační systém, tudíž se musí integrovat do vektorových molekul v buňce, které jsou schopné replikace, jako je chromozomální DNA nebo plazmidy. Transpozony se také liší velikostí, která se pohybuje od méně než 1 do 60 kb. Nejmenší transpozony nesou pouze jeden gen, který je zodpovědný za pohyb elementů. Větší transpozony obvykle nesou jeden nebo více dalších genů, z nichž většina kóduje vlastnosti pro antibiotickou rezistenci. Transpozony mohou kódovat rezistenci na široké spektrum antibiotik [32]. Mnoho transpozonů má malou nebo žádnou cílovou specifičnost, proto se mohou vkládat na různé pozice v chromozomální nebo plazmidové DNA [24].

Genové kazety představují malé mobilní elementy menší než 2 kb. Běžně obsahují specifické rekombinační místo a jediný gen, který je ve většině případů genem antimikrobiální rezistence. Pohybují se místně specifickou rekombinací a jsou obvykle přítomny na specifických místech uvnitř integronů [24]. Integrony se mohou také přemisťovat, čímž umožňují šíření genů mezi různými bakteriálními druhy. Schopnost integronů přijímat více než jednu kazetu kódující rezistenci, spojení integronů s většími transpozony, které mohou nést další geny rezistence a spojení vícenásobných transpozonů v tomtéž plazmidu, vysvětluje nyní již zcela obecný výskyt klinických kmenů patogenních bakterií, jež jsou rezistentní vůči mnoha různým antibiotikům zároveň [33].

### **1.5.6 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z hospodářských zvířat**

V posledních letech byl zaznamenán vysoký nárůst rezistentních patogenních bakterií izolovaných z potravinových zvířat [34]. Rezistentní kmeny *E. coli* jsou izolovány zejména z prasat [35, 36, 37, 38], drůbeže [34, 37, 38] a skotu [36, 38]. U těchto kmenů byla zaznamenána vysoká rezistence zejména na tetracyklin, ampicilin, trimetoprim/sulfametoxazol, sulfonamidy a streptomycin [37, 38, 39, 40]. Pozorována byla také rezistence na chloramfenikol, kyselinu nalidixovou, enrofloxacin [37, 38] a gentamicin [40]. V současnosti prudce vzrostl výskyt rezistentních kmenů vůči beta-laktamovým antibiotikům včetně kmenů produkujících širokospektré beta-laktamázy. Tyto bakteriální enzymy hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy, čímž se stávají více rezistentními a infekce způsobené těmito kmeny jsou tak obtížně léčitelné [41, 42]. Zvýšený výskyt ESBL-

produkcijících kmenů *E. coli* byl zaznamenán u skotu, prasat a drůbeže [43, 44, 45].

Prostřednictvím mnoha studií bylo zjištěno, že izoláty *E. coli* ze zvířat jsou na antimikrobiální látky více rezistentní, než izoláty získané od člověka [40]. Dále bylo prokázáno, že prevalence rezistentních izolátů *E. coli* z prasat a drůbeže je mnohem vyšší, než rezistence izolátů získaných ze skotu, což je spojováno s nadměrnou aplikací antibiotik v chovech prasat a drůbeže [36, 46]. U drůbeže se liší počet rezistentních izolátů v závislosti na způsobu chovu [47]. Je prokázáno, že se počet rezistentních izolátů může zvyšovat během růstu brojlerů při výkrmu, dokonce i za nepřítomnosti použití antimikrobiálních látek. Toto zjištění lze vysvětlit možností horizontálního přenosu R-plazmidů, který vede ke vzniku různých fenotypů rezistence ve sledovaných hospodářstvích [48].

### **1.5.7 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z volně žijících zvířat**

*Escherichia coli* je používána jako efektivní indikátor pro monitoring prevalence rezistence v různých populacích a také pro hodnocení šíření rezistentních bakterií v odlišných ekosystémech. *E. coli* kolonizuje gastrointestinální trakt mnoha zvířat a představují tak zdroj genů rezistence, které mohou hrát roli v šíření rezistence [49].

Výskyt antibiotické rezistence (7 %) byl zaznamenán u kmenů *E. coli* izolovaných z farmově chovaných jelenů a drobné lovné zvěře [50]. Podobně nízká prevalence rezistentních kmenů byla zaznamenána také v předešlých studiích zabývajících se výskytem rezistence u volně žijících zvířat [51, 52]. Vyšší míra rezistence bývá zpravidla zaznamenána u hospodářských zvířat [53, 54]. Avšak někteří autoři zaznamenali srovnatelnou prevalenci rezistentních kmenů *E. coli* u některých druhů volně žijících ptáků a velké zvěře [55, 56, 57, 58, 59]. V současné době také významně vzrostl počet studií popisujících výskyt ESBL rezistentních kmenů *E. coli* u volně žijící zvěře [51, 60, 61].

Volně žijící zvěř není přímo vystavena účinku antimikrobiálních látek, ale existuje řada možností, jak se geny rezistence mohou dostat do prostředí. Hlavním zdrojem šíření genů rezistence prostředím může být například hnojení polí hnojem z chovů hospodářských zvířat, blízkost lidského obydlí, vyústění odpadních vod do vodních toků apod. [24]. Také migrace ptáků může přispět k šíření antibiotické rezistence [62]. Navíc bylo zjištěno, že úroveň antibiotické rezistence je taktéž ovlivněna stravou zvířat, kdy u býložravců byl zaznamenán

nižší počet rezistentních izolátů v porovnání s všežravci a masožravci [63]. Toto může být vysvětleno tím, že masožravci stojí na vrcholu potravinového řetězce a mohou tedy akumulovat rezistentní kmeny bakterií získaných z jejich stravy.

### **1.5.8 Výskyt antibiotické rezistence u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin**

Rezistentní kmeny patogenní *E. coli* jsou nejčastěji izolovány z potravin živočišného původu, a to zejména z vepřového, hovězího [46] a drůbežího masa [46, 64, 65]. Výskyt antibiotické rezistence byl zaznamenán také u kmenů *E. coli* izolovaných z ryb a mořských plodů chovaných v akvakulturách, kde jsou antimikrobiální látky, stejně jako u hospodářských zvířat, používány ve velkém množství pro preventivní a léčebné účely [66]. Antibiotická rezistence byla také zjištěna u kmenů izolovaných z vajec [47]. Záchyt rezistentních izolátů je zpravidla vyšší u potravinových zvířat než u jejich produktů [37, 38].

Geny antimikrobiální rezistence se mohou na člověka přenést prostřednictvím konzumace živočišných produktů [65]. Rezistentní bakterie střevní flóry jatečných zvířat mohou během porážky kontaminovat jatečně upravená těla poražených zvířat a tím přenést geny rezistence do střevní mikroflóry člověka prostřednictvím potravinového řetězce [67]. Tyto rezistentní bakterie pak představují nepřímé ohrožení lidského zdraví [37].

Rezistentní kmeny *E. coli* jsou také v menší míře izolovány z čerstvé zeleniny a ovoce, včetně jejich produktů [68].

## **1.6 Zařazení kmenů *Escherichia coli* do fylogenetických skupin**

Druh *Escherichia coli* se vyznačuje velkou různorodostí (fyziologickými znaky, životním cyklem, patogenními vlastnostmi, růstem ve specifickém prostředí, apod.). Kmeny *Escherichia coli* mohou být rozděleny do čtyř hlavních fylogenetických skupin (A, B1, B2 a D) na základě přítomnosti nebo absence dvou genů: *chuA*, který se vyskytuje u kmenů EHEC (konkrétně sérotypu O157:H7); *yjaA*, který se nachází u *E. coli* typu K12; a anonymního DNA fragmentu TSPE4.C2, který byl nalezen u kmenů *E. coli* způsobujících novorozenecké meningitidy [69]. Kmeny jednotlivých fylogenetických skupin se liší fenotypickými charakteristikami (schopnost využívat různé cukry, vztah teploty k jejich růstu a rozdílné profily antibiotické rezistence) [70]. Taktéž velikost genomu se liší mezi jednotlivými fylogenetickými skupinami. Skupiny A a B mají obvykle menší genom, než skupina B2 a D. Důležitým rozdílem



mezi skupinami je také přítomnost faktorů virulence. Komenzální kmeny jsou obvykle řazeny do fylogenetické skupiny A a B1. Izoláty, které jsou schopny přežít v prostředí (např. půda, voda), patří zejména do fylogenetické skupiny B1 [71]. Kmeny *E. coli* způsobující extraintestinální infekce patří převážně do skupiny B2 a v menší míře do skupiny D [36, 69], zatímco střevní patogenní kmeny (STEC) jsou obvykle zařazeny do skupin B1 [72] nebo D (enterohemoragická *E. coli* O157:H7) [73]. Na základě zařazení kmenů do fylogenetických skupin lze mimo původ a jiné charakteristiky posoudit, zda se jedná o kmeny komenzální nebo kmeny s patogenním potenciálem.

Rozdílnost ve fylogenetických skupinách je také dána původem izolátů. Escobar-Paramo *et al.* [74] pozoroval nejvyšší zastoupení skupiny D a B1 u fekálních izolátů z ptáků, skupin A a B1 u kmenů izolovaných z různých druhů savců a skupin A a B2 u fekálních kmenů humánního původu. Ve studii Carlos *et al.* [75] bylo zjištěno, že kmeny izolované z kuřat patří převážně do skupiny A, kdežto kmeny izolované ze skotu, koz a ovcí do skupiny B1.

Gordon a Cowling [76] uvádí, že relativní četnost jednotlivých fylogenetických skupin u zvířat závisí také na způsobu stravování zvířat, tělesné váze a klimatu. Baldy-Chudzik *et al.* [77] ve své práci analyzovali fekální kmeny izolované ze zvířat žijících v zoologických zahradách, kde zjistili vyšší prevalenci skupiny B1 u býložravců a skupiny A u kmenů izolovaných z masožravých a všežravých zvířat.

## 1.7 Produkce bakteriocinů

Mikroorganismy disponují velkým množstvím různých obranných systémů, jako je produkce širokospektrálních antibiotických látek, vedlejších produktů metabolismu (kyselina mléčná), lytických enzymů (lyzozym) a různých exotoxinů s antibakteriálním účinkem.

Bakteriociny byly objeveny téměř u každého bakteriálního druhu [78]. Jsou produkovány jak grampozitivními, tak i gramnegativními bakteriemi. Jedná se o bohatou a různorodou skupinu vysokomolekulárních, ribozomálně syntetizovaných proteinů antibiotické povahy usmrcující citlivé kmeny bakterií stejného nebo příbuzného druhu [79]. Od tradičních antibiotik se liší jejich složením a úzkým spektrem aktivity [78]. Tyto účinné a často vysoce specifické toxiny jsou většinou kódovány na plazmidech a jsou produkovány bakteriemi během stresových podmínek za účelem rychlé eliminace sousedících buněk,

kteře nejsou na účinek těchto toxinů imunní nebo rezistentní. Produkční kmeny jsou obvykle imunní na bakteriociny, které samy vyprodukují [80].

Bakteriociny tvoří rozmanitou skupinu s odlišnými morfologickými a biochemickými vlastnostmi. Mezi nejlépe prostudované bakteriociny patří koliciny a mikrocin y produkované gramnegativními bakteriemi *E. coli* [81]. Kmeny *E. coli* mohou produkovat jeden i více kolicinů nebo současně koliciny a mikrocin y [80].

### 1.7.1 Koliciny

Koliciny jsou různorodou skupinou proteinů s antimikrobiální aktivitou. Jsou to toxické exoproteiny produkované bakteriemi kolicinogenních kmenů *E. coli* a některých příbuzných druhů a rodů čeledi *Enterobacteriaceae* během jejich růstu. Působí inhibičně na citlivé bakterie téže čeledi. Koliciny se klasifikují a označují na základě své receptorové specifity velkými písmeny abecedy. Váže-li se více typů kolicinů na jeden receptor, jsou dále diferencovány na základě zkřížené imunity produkčních kmenů a označovány indexy, které jsou připisovány k typovému písmenu. Důležitým kritériem třídění kolicinů je i typ translokačního mechanismu, který koliciny využívají k transportu přes buněčný obal [82]. Toto další kritérium umožňuje řazení kolicinů do dvou skupin A a B. Skupina A zahrnuje koliciny, které využívají systém Tol, skládající se z proteinů TolA, TolB, TolQ a TolR a patří sem koliciny E1 až E9, K, L, N, S4, U a Y. Koliciny skupiny B využívají systém Ton, skládající se z proteinů TonB, ExbB a ExbD a patří sem koliciny B, D, Ia, Ib, M, 5 a 10 [81, 83].

Syntéza kolicinů je kódována geny na tzv. Col-plazmidech. Podle velikosti, schopnosti amplifikace, počtu kopií v buňce a schopnosti samostatného přenosu konjugací je možné Col-plazmidy rozdělit do tří skupin. První skupina *Ia* jsou malé plazmidy (3 - 6 MDa), které se vyskytují v mnoha kopiích, jsou schopné replikace i bez syntézy proteinů hostitelskou buňkou, ale neschopné samostatného přenosu konjugací (*Tra*<sup>-</sup>). Druhou skupinou *Ib* jsou malé, v mnoha kopiích se vyskytující plazmidy, neschopné amplifikace ani přenosu konjugací (*Tra*<sup>-</sup>). Třetí skupina *II* jsou velké (70 - 90 MDa), v málo kopiích se vyskytující plazmidy neschopné amplifikace, často však schopné přenosu konjugací (*Tra*<sup>+</sup>) [79]. Koliciny jsou také rozděleny podle typu letálního účinku kolicinové molekuly na koliciny depolarizující plazmatickou membránu (A, E1, B, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5, 10), koliciny s endonukleázovou aktivitou, které mohou na citlivé bakterie působit jako nespecifické DNA-endonukleázy (E1, E7, E8,

E9) nebo jako specifické 16S-rRNA-endonukleázy blokující proteosyntézu (E3, E4, E6, DF13) a koliciny degradující nebo inhibující syntézu peptidoglykanu (M) [82, 83].

### 1.7.2 Mikrociny

*Escherichia coli* produkuje kromě kolicinů také mikrociny, které mají úzké spektrum antimikrobiální aktivity proti bakteriálním druhům, které jsou fylogeneticky příbuzné s produkčními kmeny. Mikrociny mají v porovnání s koliciny menší velikost molekul (méně než 10 kDa) a liší se také některými fyzikálními vlastnostmi. Vznikají jako prekurzory podléhající četným posttranslačním modifikacím [84]. Geny jsou kódovány chromozomálně nebo na plasmidech. Jejich produkce je indukována za stresových podmínek, zejména při nedostatku živin, například při nedostatku fosforečnanu, uhlíku a dusíku (MccB17), nedostatku uhlíku a fosforečnanu (MccJ25), nebo nedostatku uhlíku (MccC51) v prostředí [85]. Uvolnění mikrocínů z buňky není tak jako u kolicinů způsobeno lyzí, ale jsou z buňky aktivně exportovány. Podle biochemických vlastností a mechanismu účinku jsou mikrociny rozděleny do dvou tříd [84]. První třída zahrnuje mikrociny s nízkou molekulovou hmotností pod 5 kD, které bývají často posttranslačně modifikovány a mají různý mechanismus účinku. Patří sem mikrocín B17, C7, D93 a J25. Do druhé třídy patří mikrociny E492, H47, V, L, 24 s molekulovou hmotností 7 až 10 kDa. Dále mohou být tyto mikrociny rozděleny na nemodifikované a modifikované peptidy. Nemodifikované mikrociny jsou vylučovány pouze s cílem působit na citlivé buňky. Jejich genetické skupiny se nacházejí v plasmidech a jsou velmi jednoduché. Do této skupiny patří mikrociny E492, H47, 24, V a L. Modifikované mikrociny jsou peptidy, které před vyloučením podstoupí posttranslační modifikaci. Patří sem mikrociny B17, C7 a J25 [84, 86].

### 1.7.3 Význam bakteriocinogenních kmenů *Escherichia coli*

Mnoho studií se zabývá využitím různých bakteriálních rodů v probiotických terapiích pro lidský organizmus (gastrointestinální trakt, ústní dutina, dýchací trakt) [87]. Ve studii Trautnera *et al.* [88] bylo prokázáno, že kolicin E2 je vysoce účinný proti růstu uropatogenních kmenů *E. coli*, čímž je možno předcházet vzniku infekcí močových cest při používání katetru. Dále bylo prokázáno, že u 13 různých kolicinů, k nimž patří kolicin E2, E8, E7 byla zjištěna schopnost inhibice 11 patogenních kmenů. Kolicin 5 je díky úzkému spektru působnosti vysoce efektivní pro léčbu infekcí u lidí i zvířat způsobených patogenními kmeny *E. coli* [89]. Kolicinogenní *E. coli* byly rovněž aktivně

zkoumány k inhibici enterohemoragického kmene *E. coli* O157:H7, kde účinnost proti tomuto sérotypu projevil kolicin E1 [90]. Ve studii Patton *et al.* [91] byla účinnost kolicinu E1 taktéž vyhodnocována proti *Listeria monocytogenes* v bujónu a na povrchu potravin určených k přímé spotřebě, kde se kolicin E1 ukázal jako vysoce účinný proti této bakterii. Jiné studie prokázaly vysokou inhibiční aktivitu mikrocinu J25 vůči tomuto patogenu [92]. Mikrocin J25 je taktéž vysoce účinný proti některým sérovarům *Salmonella* [92]. Významná je také produkce mikrocinu E492, který má cytotoxický účinek na lidské nádorové buňky [93]. Některé studie uvádějí toxický účinek mikrocinu E492 na zhoubné buňky a jeho možné využití při léčbě rakoviny [93, 94]. Mimo jiné bylo prokázáno, že buňky vystavené účinkům mikrocinů, zůstávají životaschopné, avšak nejsou schopné růstu a vytváření kolonie. Bakteriostatické účinky vyvolané mikrocinem se liší od běžných antibiotik v tom, že buňky nejsou schopny obnovit růst ani po odstranění mikrocinů z prostředí. Tato trvalá inhibice růstu je zřejmě způsobena v důsledku těsné asociace mikrocinů s buňkou. Na rozdíl od běžných antibiotik, která volně difundují dovnitř nebo ven z buňky, jsou mikrocinové molekuly trvale zachyceny v cytoplazmě [92].

V uplynulých letech si některé bakteriociny získaly zvláštní pozornost vzhledem k jejich potenciální aplikaci v konzervaci potravin. James *et al.* [95] potvrdili možné využití kolicinů při vývoji antibiotik a konzervačních prostředků.

Kromě pozitivních účinků bakteriocinů bylo také prokázáno, že některé bakteriociny se často vyskytují u patogenních kmenů *E. coli* a mohou být tedy považovány za faktory virulence [86]. Například kolicin E1 je známý pro svůj toxický efekt na eukaryotické buňky a často se vyskytuje u kmenů UPEC. Také produkce mikrocinu H47, M, E492 a V byla často zaznamenána u extraintestinálních patogenních kmenů *E. coli* [86, 96, 97].

## **1.8 Schopnost bakterií *Escherichia coli* tvořit biofilm**

Schopnost tvorby biofilmu je pro bakterie významným faktorem, který umožňuje bakteriálním buňkám odolávat vnějším vlivům prostředí [98]. Výhodou růstu ve formě biofilmu je zejména ochrana před antimikrobiálními prostředky, zvýšení míry dostupnosti živin a transferu plazmidů, schopnost vázat molekuly vody, atd.. Biofilmové nárosty se vyskytují prakticky všude a mohou mít vzhledem ke své metabolické aktivitě a místu působení jak

pozitivní (čištění vod, součást potraviny, např. plísňové sýry), tak i negativní účinky (infekce, zubní kaz). Kromě prostředí (voda, půda) se biofilmy vyskytují také v různých průmyslových odvětvích lidské činnosti (vodárenství, čištění odpadních vod), ve zdravotnictví (implantáty, katetry), kde výskyt biofilmu způsobuje celou řadu chronických a vzhledem k jejich rezistenci i obtížně eliminovatelných infekcí. Výskyt biofilmů je také zcela běžný v potravinářství [98]. Adheze mikrobiálních buněk k povrchům v potravinářských provozech, vede k vážným hygienickým problémům a ekonomickým ztrátám v důsledku znehodnocení potravin. Biofilm nabízí ochranu řadě patogenů a technologicky škodlivým a nežádoucím mikroorganismům, které odolávají nebo si vytvářejí rezistenci vůči zavedeným standardům sanitačních postupů a mohou být tak zdrojem některých patogenních infekcí. Přítomnost bakteriálního biofilmu může také vést k poškození zařízení a jiného vybavení výrobních linek (koroze), ke kontaminaci produktu a jeho následnému znehodnocení, včetně potenciálního ohrožení zdraví konzumenta [98]. Vedle toho bývá také stále častěji prokazována perzistence patogenních mikroorganismů s výskytem v podobě biofilmu přímo na potravinářských surovinách a konečných potravinářských produktech [98]. Například u patogenní *E. coli* O157:H7 byla prokázána schopnost tvorby biofilmu na jablkách [99] a ledovém salátu [100].

## 2. CÍLE DIZERTAČNÍ PRÁCE

Cílem dizertační práce byla izolace kmenů bakterie *Escherichia coli* z potravin a jejich následná fenotypová a genotypová charakterizace pomocí klasických mikrobiologických a molekulárně-biologických metod.

Dílčí cíle práce zahrnovaly:

- zařazení kmenů do fylogenetických skupin metodou PCR;
- stanovení citlivosti vůči vybraným antibiotikům podle metodiky EUCAST (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing);
- testování kmenů na přítomnost genů rezistence metodou PCR;
- zmapování výskytu rezistence u kmenů *E. coli* izolovaných z volně žijících zvířat a potvrzení možnosti šíření genů rezistence v prostředí;
- detekci faktorů virulence pomocí klasické a multiplex PCR pro určení patogenního potenciálu;
- kvalitativní zjišťování produkce bakteriocinů u testovaných kmenů;
- typizaci bakteriocinogenních kmenů metodou PCR;
- stanovení schopnosti tvorby biofilmu u izolátů živočišného původu.

## 3. MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Seznam bakteriálních kmenů

Seznam 120 kmenů *E. coli* použitých v této práci je uveden v Příloze č. 1. Izoláty z kuřat (n=70 / Příloha 1A) byly izolovány z kuřecího masa zakoupeného v maloobchodních sítích ve Zlínském kraji během let 2006-2014. Izoláty ze zeleniny (n=15 / Příloha 1B) byly získány z různých druhů čerstvé zeleniny zakoupené v maloobchodních sítích ve Zlíně během roku 2015. Izoláty z volně žijící zvěře (n=35 / Příloha 1C) byly získány z výtěrů ulovené zvěře pocházející z honiteb na území Moravy v období let 2010-2014.

Pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů bylo v této práci použito 18 kmenů *E. coli* (Příloha 1D) včetně indikátorových kmenů uvedených v Příloze 1E. Dále byly pro tento experiment použity Sbírkové kmeny získané z České sbírky mikroorganismů MU Brno a Biologického ústavu LF MU, Brno (Příloha 1F).

#### 3.1.2 Laboratorní přístroje

- |                                     |                               |
|-------------------------------------|-------------------------------|
| - AURA PRC pracovní box             | BioAir Instruments, Itálie    |
| - Automatické mikropipety           | Nichiryo, Japonsko            |
| - Automatické mikropipety           | Eppendorf Research, Německo   |
| - Běžné laboratorní sklo a pomůcky  |                               |
| - Box laminární, Telstar Bio II - A | KRD, Velká Británie           |
| - Bio Vortex V1                     | Biotech, Česká republika      |
| - Centrifuga – MiniSpin plus        | Eppendorf Research, Německo   |
| - Centrifuga – Hermle Z100 M        | Labnet Inc., Korea            |
| - Denzitometr – Densi-La-metr       | Erba Lachema, Česká republika |
| - Digitální váha                    | Kern & Sohn GmbH, Německo     |
| - Elektroforéza horizontální HU10   | EV 243, Belgie                |
| - Elektroforetické zařízení         | MP-300N, Tajwan               |
| - Homogenizátor Stomacher           | Labsystem Kft., Maďarsko      |
| - Mikrotitrační destičky            | Nunc, Dánsko                  |
| - Tecan Safire II – TIP             | Švýcarsko                     |
| - Tecan Infinite M200 PRO           | Rakousko                      |
| - Souprava mikrotestů ENTEROtest 24 | Erba Lachema, Česká republika |
| - Termoblok BIO TDB                 | Litva                         |

- Termocykler PTC 100 MJ Research Bio-Rad, USA
- Termocykler C1000 Touch Bio-Rad, Singapur
- Termostat BT 120 Česká republika
- UV transluminátor In Genius SynGene Imaging, Velká Británie

### 3.1.3 Kultivační média

#### **Endo agar**

41,5 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení živné půdy (g/l):

|                          |     |
|--------------------------|-----|
| Pepton                   | 10  |
| Laktóza                  | 10  |
| Di- fosforečnan draselný | 3,5 |
| Siřičitan sodný          | 2,5 |
| Agar                     | 12  |

#### **Masopeptonový agar (MPA)**

28 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení půdy (g/l):

|                |    |
|----------------|----|
| Agar           | 15 |
| Masový výtažek | 10 |
| Pepton         | 10 |
| NaCl           | 5  |

#### **Masopeptonový bujón (MPB)**

13 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení bujonu (g/l):

|                |   |
|----------------|---|
| Masový výtažek | 3 |
| Pepton         | 5 |
| NaCl           | 3 |

#### **Mueller Hinton agar (MH)**

38 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení živné půdy (g/l):

|                                    |      |
|------------------------------------|------|
| Dehydrovaná infuze z hovězího masa | 300  |
| Hydrolyzát kaseinu                 | 17,5 |
| Škrob                              | 1,5  |
| Agar                               | 17   |

#### **Plate Count Agar (PCA)**

23,5 g živné půdy (HiMedia Laboratories, Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení (g/l):



|                    |         |
|--------------------|---------|
| Trypton            | 5       |
| Kvasinkový extrakt | 2,5     |
| Glukóza            | 1       |
| Agar               | 15      |
| <b>Soft agar</b>   |         |
| Složení (g/l):     |         |
| Pepton             | 5       |
| Masový výtažek     | 3       |
| NaCl               | 5       |
| Agar               | 10,5    |
| Destilovaná voda   | 1000 ml |

### **Tryptózo-sojový bujon (TSB)**

30 g živné půdy (OXOID Ltd.) + 1000 ml destilované vody

Složení živné půdy (g/l):

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Hydrolyzát kaseinu           | 17  |
| Enzymaticky štěpená sója     | 3   |
| NaCl                         | 5   |
| Hydrogenfosforečnan draselný | 2,5 |
| Glukóza                      | 2,5 |

### **3.1.4 Chemikálie a antibiotika**

- Antibiotické disky Oxoid Ltd., Velká Británie (Tabulka 2)
  - Agaróza Sea Kem LE Agarose, Lonza, USA
  - Bromfenolová modř SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
  - DNA marker 100 bp New England Biolabs, USA
  - dNTP Mix-12,5 mM Roche Diagnostics GmbH, Německo
  - EDTA (0,5M roztok EDTA) Lachema a.s., Česká republika
  - Ethanol 98% Lach-Ner s.r.o., Česká republika
  - Etidium bromid Sigma Aldrich, Německo
  - Chloroform Sigma, St. Louis, USA
  - Krystalová violet Merck, Německo
  - Kyselina octová Lachema a.s., Česká republika
  - Nanášecí pufr Lb 6x TopBio, Česká republika
  - PCR pufr 10x New England BioLabs, USA
  - Primery – Invitrogen ThermoPol Reaction Buffer
  - Primery – Invitrogen KDR Česká republika
- (seznam primerů je uveden v Příloze A-G)

- Roztok MgCl<sub>2</sub> Roche Diagnostics GmbH, Německo
- Sodium dodecyl sulfát 10% SERVA Electrophoresis GmbH, Německo
- Tris-acetátový pufr (TAE pufr)
- TRIZMA<sup>®</sup>-base(Tris-hydroxymetyl-aminometan), Sigma-Aldrich, USA
- *Taq* DNA polymeráza+ThermoPol Buffer, New England BioLabs, USA

### 3.1.1 Použité roztoky

#### Fyziologický roztok

|                  |         |
|------------------|---------|
| NaCl             | 8,5 g   |
| Destilovaná voda | 1000 ml |

#### TAE pufr 50x koncentrovaný

|                  |         |
|------------------|---------|
| TRIS             | 242 g   |
| 0,5 M EDTA       | 100 ml  |
| Kyselina octová  | 57,1 ml |
| Destilovaná voda | 800 ml  |

#### TAE pufr 1x koncentrovaný

|                  |        |
|------------------|--------|
| TAE 50x          | 20 ml  |
| Destilovaná voda | 980 ml |

#### 1,5% Agarózový gel

|                |        |
|----------------|--------|
| 1x TAE pufr    | 200 ml |
| Agaróza        | 3 g    |
| Etidium bromid | 10 µl  |

#### Nanášecí pufr

|                   |        |
|-------------------|--------|
| Bromfenolová modř | 10 mg  |
| 0,5 M EDTA        | 1,2 ml |
| 10% SDS           | 600 µl |
| Glycerol, PENTA   | 1,2 ml |

#### 100 bp DNA marker

|               |        |
|---------------|--------|
| Voda          | 180 µl |
| Nanášecí pufr | 50 µl  |
| DNA ladder    | 20 µl  |

Tab. 2: Seznam antibiotických disků (Oxoid Ltd.), koncentrací a průměrů inhibičních zón udávající MIC testovaného antibiotika.

| <b>antibiotikum</b>             | <b>zkratka</b> | <b>koncentrace<br/>(<math>\mu\text{g}</math>)</b> | <b>R</b>  | <b>C</b>  |
|---------------------------------|----------------|---|-----------|-----------|
| <b>peniciliny</b>               |                |   |           |           |
| amoxicilin/klavulanová kyselina | AMC            | 30  | $\leq 14$ | $\geq 18$ |
| ampicilin                       | AMP            | 10  | $\leq 14$ | $\geq 17$ |
| piperacilin/tazobactam          | TZP            | 36  | $\leq 17$ | $\geq 20$ |
| <b>cefalosporiny</b>            |                |   |           |           |
| cefalotin                       | CEF            | 30  | $\leq 14$ | $\geq 18$ |
| cefepim                         | FEP            | 30  | $\leq 21$ | $\geq 24$ |
| cefotaxim                       | CTX            | 5   | $\leq 17$ | $\geq 20$ |
| cefuroxim                       | CXM            | 30  | $\leq 18$ | $\geq 18$ |
| ceftazidim                      | CAZ            | 10  | $\leq 19$ | $\geq 19$ |
| sulbactam/cefoperazon           | SCF            | 10  | $\leq 15$ | $\geq 21$ |
| <b>chinoliny</b>                |                |   |           |           |
| ciprofloxacin                   | CIP            | 5   | $\leq 19$ | $\geq 21$ |
| <b>tetracykliny</b>             |                |   |           |           |
| doxycyklin                      | DO             | 30  | $\leq 10$ | $\geq 14$ |
| <b>fenikoly</b>                 |                |   |           |           |
| chloramfenikol                  | C              | 30  | $\leq 17$ | $\geq 18$ |
| <b>aminoglykosidy</b>           |                |   |           |           |
| gentamicin                      | CN             | 10  | $\leq 14$ | $\geq 15$ |
| streptomycin                    | S              | 10  | $\leq 11$ | $\geq 15$ |
| <b>karbapenemy</b>              |                |   |           |           |
| imipenem                        | IPM            | 10  | $\leq 16$ | $\geq 22$ |
| <b>monobaktamy</b>              |                |   |           |           |
| aztreonam                       | AT             | 30  | $\leq 21$ | $\geq 24$ |
| <b>potencované sulfonamidy</b>  |                |   |           |           |
| sulfametoxazol/trimetoprim      | SXT            | 25  | $\leq 13$ | $\geq 16$ |

R – rezistentní; C – citlivý

## 3.2 Metody

### 3.2.1 Fenotypizační metody

#### *Izolace kmenů Escherichia coli z potravin*

Kmeny byly izolovány ze vzorků jak živočišného (kuřecí maso, bažanti, divoké kachny, zajáci, prase divoké), tak i rostlinného původu (různé druhy zeleniny). Získané vzorky byly zhomogenizovány v devítinásobném množství sterilního fyziologického roztoku pomocí stomacheru. Následně byla suspenze vyočkována na Endův agar a bakterie kultivovány při 37 °C / 24 h. Suspektní kolonie, které se na Endově agaru jeví jako purpurové kolonie s kovovým leskem, byly identifikovány pomocí biochemického mikrotestu Enterotest 24.

Kmeny byly dále přeočkovány na MPA, popř. na PCA pro krátkodobé uchování. Pro dlouhodobé uchování byly kmeny zaočkovány do MPB a po kultivaci 37 °C / 24 h byly zamrazeny v 30% glycerolu při –80 °C.

#### *Identifikace kmenů Escherichia coli pomocí Enterotestu 24*

Pro identifikaci kmenů byla použita biochemická souprava ENTEROtest 24, která je určena pro rutinní identifikaci významných druhů střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Souprava je složena z 24 biochemických testů pro průkaz biochemické aktivity specifické pro daný druh bakterií (ureáza URE, arginin ARG, ornitin ORN, lysin LYS, sirovodík H<sub>2</sub>S, simmons citrát SCI, malonát MAL, β-galaktosidáza ONP, salicin SAL, sorbitol SOR, melibióza MLB, celobióza CEL, laktóza LAC, trehalóza TRE, mannitol MAN, β-glukuronidáza GLR, dulcitol DUL, adonitol ADO, arabitol ART, sacharóza SUC, inositol INO, rafinóza RAF, esculin ESL, β-xylosidáza bXY), které jsou umístěny do mikrotitrační destičky. Diagnostika pozitivní biochemické reakce je založena na změně barvy testovacího média, ke které dochází změnou příslušného indikátoru.

Testy byly provedeny dle pokynů výrobce. Do sterilních zkumavek byla připravena suspenze kultury ve fyziologickém roztoku odpovídající 1. stupni zákalu McFarlandovy stupnice, která byla důkladně zhomogenizována. Poté bylo do každé jamky pipetováno 100 µl této suspenze. Pro anaerobní kultivaci byly některé jamky (URE, ARG, ORN, LYS, H<sub>2</sub>S) zakapány několika kapkami parafínového oleje. Takto připravená destička byla vložena do sáčku a ponechána inkubovat při 37 °C / 24 h. Výsledky byly vyhodnoceny dle barevné srovnávací stupnice dodávané výrobcem. Výsledky jednotlivých

reakcí byly zaznamenány a vyhodnoceny pomocí softwaru TNW Lite (Erba Lachema, ČR).

### ***Stanovení antibiotické rezistence diskovou difúzní metodou***

Disková difuze je jedním z nejstarších způsobů vyšetřování citlivosti k antimikrobiálním látkám a patří stále mezi nejpoužívanější metody, jelikož vyhovuje pro vyšetřování téměř všech antibiotik a nevyžaduje žádné zvláštní vybavení.

U izolovaných kmenů *E. coli* byl sledován výskyt antibiotické rezistence na vybraná antibiotika (Tabulka 5) diskovou difúzní metodou, která byla provedena dle metodiky EUCAST [101]. EUCAST vyvinul diskovou difúzní metodu založenou na půdách MH a kalibrovanou na klinické breakpointy, které určují, zda je vyšetřovaná bakterie citlivá, intermediárně rezistentní nebo rezistentní k testovanému antibiotiku. Na povrch Petriho misky s živnou půdou (Mueller-Hintonův agar) se rovnoměrně naočkuje testovaný mikroorganismus. Inokulum by mělo odpovídat 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Papírové disky se známými koncentracemi různých antibiotik se přiloží na povrch agaru. Takto připravené misky jsou inkubovány při teplotě 37°C / 24 hodin, kdy účinné antibiotikum vytvoří kolem disku průzračnou zónu bez nárůstu buněk. Hodnocení antimikrobiálního účinku se provádí měřením průměru inhibiční zóny kolem disku v mm.

### ***Stanovení biologické aktivity bakteriocinů - vpichový pokus***

Biologická aktivita bakteriocinů byla stanovena kvalitativně vpichovým pokusem. Bakterie produkčního kmene byly naočkovány pomocí vpichu na misky s MPA a kultivovány v termostatu při teplotě 37 °C / 48 hodin. Poté byly bakterie na miskách usmrceny parami chloroformu, které působily 30 minut. Následně byly půdy přelity suspenzí obsahující 3 ml 1,05 % agaru (soft agar) a 100 µl indikátorového kmene, který byl den předem zaočkován do MPB a ponechán inkubovat po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Jako indikátorové kmeny byly použity sbírkové kmeny *E. coli* (Row, P400, B1, φ a Sabina 40) a *Shigella sonnei* 17, které byly získány ze sbírky Biologického ústavu, Lékařské fakulty Masarykovy univerzity v Brně. Přelití misky byly poté vloženy opět do termostatu po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po 24h kultivaci byla zjišťována přítomnost inhibičních zón vytvořených okolo jednotlivých kmenů bakterií a hodnocena jejich velikost (-/+ , + , ++ , +++ , ++++).

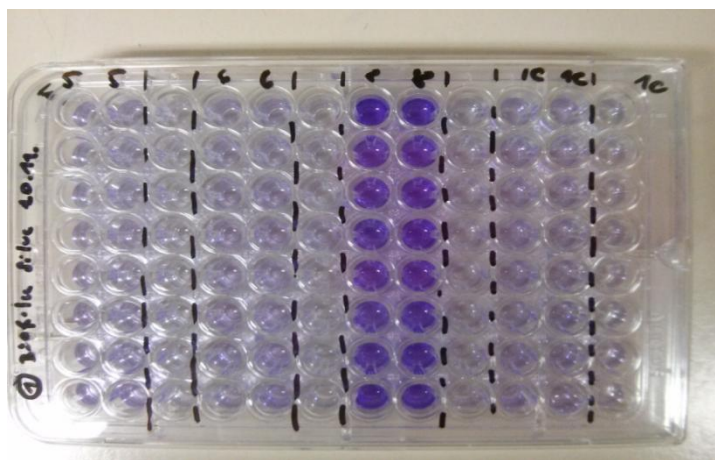
### ***Stanovení schopnosti tvořit biofilm***

Ke stanovení a kvantifikaci biofilmu byla použita barvicí metoda za použití krystalové violeti v mikrotitračních destičkách podle Kurinčič *et al.* [102].

Do jamek mikrotitrační destičky bylo inokulováno 200  $\mu$ l TSB s bakteriální kulturou o výsledné koncentraci  $10^6$  CFU/ml. Pro negativní kontrolu bylo do 12 jamek každé destičky přidáno 200  $\mu$ l sterilního TSB. Po inkubaci (24 h / 37°C) byly jamky mikrotitračních destiček třikrát promyty fyziologickým roztokem a ulpělé buňky byly při teplotě 60 °C / 10 minut fixovány na povrch mikrotitračních destiček. Poté byly obarveny 1% krystalovou violetí po dobu 15 minut a znovu fixovány při teplotě 60 °C / 10 minut. Pro uvolnění barviva bylo do jamek přidáno 200 ml 98% etanolu. Následně bylo provedeno měření absorbance při vlnových délkách 584 nm přístrojem Tecan Safire II. Experimenty byly provedeny celkem ve třech opakováních. Míra adheze bakteriálního kmene byla zjištěna na základě vypočtených průměrů absorbance pro daný kmen podle rovnice [103],

$$\Delta\bar{A} = \sum \frac{(A - \bar{A}_0)}{n}$$

kde  $\Delta\bar{A}$  je průměr absorbance bakteriálního kmene,  $\bar{A}_0$  je aritmetický průměr absorbance 12 jamek mikrotitrační destičky s negativní kontrolou a  $n$  je počet jamek inokulovaných bakteriální suspenzí. Po odečtu naměřených hodnot absorbance kontrolního média byly kmene na základě výsledné hodnoty absorbance ( $A$ ) rozděleny na slabě, středně a silně adherentní podle Stepanovic *et al.* [104].



*Obr. 1: Stanovení schopnosti tvorby biofilmu v mikrotitračních destičkách.*

### 3.2.2 Genotypizační metody

V této práci byla ke stanovení přítomnosti faktorů virulence, genů rezistence a k bakteriocinotypizaci produkčních kmenů *E. coli* použita polymerázová řetězová reakce (PCR) v provedení single, duplex, triplex nebo multiplex PCR. Tato metoda slouží k amplifikaci DNA úseků *in vitro* za pomoci enzymu DNA-polymerázy. Na principu komplementarity dochází k elongaci nového DNA řetězce podle úseku řetězce původní DNA, který je vymezen dvěma primery [105]. Fragmenty nově syntetizované DNA jsou následně separovány pomocí gelové elektroforézy v agarózovém gelu. Pro odhad velikosti pozorovaných DNA fragmentů se do jedné jamky gelu nanáší tzv. velikostní marker (standard, DNA ladder) o definované velikosti jednotlivých fragmentů.

#### *Příprava matricové DNA*

Izolace DNA byla provedena jednoduchou metodou povařením kolonií, kdy se ve 100 µl 1x ředěného PCR pufru zhomogenizuje bakteriální suspenze na vortexu a následně ponechá v termobloku při teplotě 95 °C / 20 minut. Poté je centrifugací oddělen supernatant, který slouží jako templát do PCR reakce.

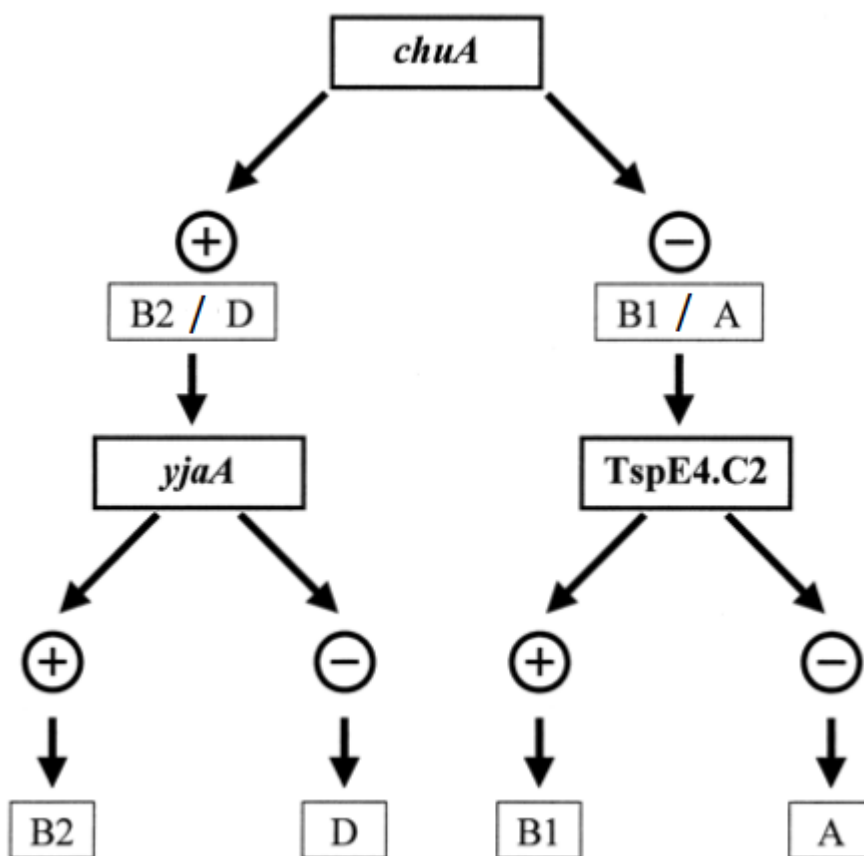
Izolace DNA z kmenů *E. coli* byla provedena taktéž pomocí kitu DNeasy® Blood & Tissue Kit, QIAGEN (Německo) pro izolaci nukleových kyselin podle návodu poskytnutého výrobcem.

Následně byla změřena čistota a koncentrace (ng/µl) izolované DNA spektrofotometricky při vlnových délkách 260–280 nm přístrojem Tecan Infinite M200. Absorbance při 260 nm odráží koncentraci nukleové kyseliny, absorbance při 280 nm odráží její čistotu, tj. míru přítomnosti proteinů [106]. Na destičku Nano Quant bylo naneseno 5 µl AE pufru sloužící ke kalibraci přístroje. Poté bylo naneseno stejné množství testované DNA a po změření se následně vyhodnotil poměr absorbancí. Za čistou DNA se považuje vzorek s absorbancí v rozmezí hodnot 1,8 až 2 [106].

#### *Zařazení do fylogenetických skupin*

Kmeny *E. coli* byly zařazeny do fylogenetických skupin na základě přítomnosti genů *chuA*, *yjaA* a fragmentu TSPE4.C2 metodou PCR, kdy reakční objem i teplotní podmínky reakce probíhaly podle Clermont *et al.* [69]. Seznam primerů včetně anealingových teplot pro tuto reakci je uveden v Příloze 2B. Tuto metodu lze provádět klasickou single PCR, kdy se jednotlivé geny amplifikují zvlášť nebo také v uspořádání triplex PCR tzn. amplifikovat všechny

tři geny současně. Následně lze *E. coli* rozdělit do skupin A, B1, B2 a D podle dichotomického klíče (Obr. 2).



Obr. 2: Rozdělení kmenů *E. coli* do fylogenetických skupin podle dichotomického klíče [69].

*Složení amplifikační směsi pro triplex reakci PCR (μl):*

|                              |         |
|------------------------------|---------|
| PCR pufr                     | 2       |
| dNTP mix                     | 0,4     |
| <i>Taq</i> DNA - polymeráza  | 0,5     |
| MgCl <sub>2</sub>            | 0,4     |
| <i>chuA</i> F/ <i>chuA</i> R | 0,1/0,1 |
| <i>yjaA</i> F/ <i>yjaA</i> R | 0,1/0,1 |
| TSPE4.C2 F/ TSPE4.C2 R       | 0,1/0,1 |
| Templátová DNA               | 2       |
| H <sub>2</sub> O             | 14,1    |



Detekce produktů byla provedena pomocí elektroforézy v 1,5% agarózovém gelu, v prostředí 1x TAE pufru, při napětí 90 V a času separace 50 minut. Výsledky byly vyhodnoceny v UV-transluminátoru pomocí programu SynGene InGenius.

### ***Detekce genů virulence a rezistence metodou PCR***

#### **Detekce faktorů virulence:**

Všechny kmeny byly testovány na přítomnost 16 faktorů virulence zahrnující toxiny (*tsh*, *vat*, *CNF1*, *CNF2*, *LT I*, *ST I*, *ST II*, *VT I*, *VT II*), adheziny (*papC*, *eaeA*), invaziny (*neuC*), gen kódující zvýšenou rezistenci k séru (*iss*), aerobaktin (*iucD*) a geny zodpovědné za enteroinvazivní (*EinV*) a enteroagregativní (*Eagg*) mechanismus (Tab. 3). Seznam primerů použitých pro detekci faktorů virulence a jednotlivé velikosti PCR produktů jsou uvedeny v Příloze 2A. PCR směs a amplifikační profil byl zvolen podle Holko *et al.* [107] a Ewers *et al.* [108].

V této práci byla také použita skupina primerů sloužící k detekci faktorů virulence ExPEC, a které jsou navíc spojené s tvorbou biofilmu. Tato skupina zahrnovala geny kódující přítomnost adhezínů (*sfaS*, *afa/draBC*, *fimH*, *iutA*), kapsulí (*kpsMTII*, *kpsMTIII*), toxinů (*hlyA* a *hlyD*) a invazinů (*ibeA*) (Tab. 3). Seznam primerů použitých pro detekci těchto faktorů virulence včetně velikostí PCR produktů je uveden v Příloze č. 2C.

Tab. 3: Faktory virulence determinující intestinální/extraintestinální kmeny.

| <b>skupina faktorů virulence</b> | <b>faktory virulence</b>                          |   |
|----------------------------------|---|---|
|                                  | <b>intestinální patogeny</b>                      | <b>extraintestinální patogeny</b>       |
| toxiny                           | <i>LT I, ST I, ST II, VT I, VT II, hlyA, hlyD</i> | <i>tsh, vat, CNF1, CNF2, hlyA, hlyD</i> |
| adheziny                         | <i>eaeA</i>                                       | <i>papC, sfaS, afa/draBC, fimH</i>      |
| invaziny                         | <i>EinV</i>                                       | <i>neuC, EinV, ibeA</i>                 |
| zvýšené přežívání v séru         |   | <i>iss</i>                              |
| siderofory, aerobaktin           |   | <i>iutA, iucD</i>                       |
| agregativní faktor               | <i>Eagg</i>                                       |   |
| kapsuly                          |   | <i>kpsMTII, kpsMTIII</i>                |

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

|                      |      |
|----------------------|------|
| PCR pufr             | 2,5  |
| dNTP mix             | 0,5  |
| Taq DNA - polymeráza | 0,1  |
| Primer F             | 0,25 |
| Primer R             | 0,25 |
| Templátová DNA       | 0,5  |
| H <sub>2</sub> O     | 21   |

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

|                      |     |
|----------------------|-----|
| PCR pufr             | 2,5 |
| dNTP mix             | 1   |
| Taq DNA - polymeráza | 0,5 |
| MgCl <sub>2</sub>    | 2   |
| Primer F             | 0,1 |
| Primer R             | 0,1 |
| Templátová DNA       | 2   |
| H <sub>2</sub> O     | 16  |

*Podmínky klasické PCR:*

|                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| Úvodní denaturace | 94 °C / 3min      |
| Denaturace        | 94 °C / 30s       |
| Annealing         | *58 - 63 °C / 30s |
| Extenze           | 68 °C / 3min      |
| Závěrečná extenze | 72 °C / 10min     |
| Opakování cyklu   | 30x               |
| Chlazení          | 4°C / $\infty$    |

\* Annealingové teploty pro jednotlivé primery faktorů virulence jsou uvedeny v Příloze 2A.

*Podmínky multiplex PCR:*

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Úvodní denaturace | 94 °C / 3min    |
| Denaturace        | 94 °C / 30s     |
| Annealing         | 58 °C / 30s     |
| Extenze           | 68 °C / 3min    |
| Závěrečná extenze | 72 °C / 10min   |
| Opakování cyklu   | 30x             |
| Chlazení          | 4 °C / $\infty$ |

### **Detekce genů rezistence:**

Vybrané kmeny byly dále testovány na přítomnost 24 genů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaOXA-1*, *blaOXA-7*, *blaPSE-4*, *blaCTX-M-3*, *CTX-M-1g*); aminoglykosidům (*aac6 IbC*, *aph(3')-Ia*, *aph(3')-II*); tetracyklinům (*tetA*, *tetB*); fenikolům (*flor*); trimetoprimům (*dhfr I*, *dhfr V*), sulfonamidům (*sul 1*, *sul 2*, *sul 3*); fluorochinolonům (*qnrS*); integronům I a II třídy (*int I*, *int II*); rezistenci vůči kvartérním amoniovým sloučeninám (*qac*) a rtuti (*merA*). Přítomnost těchto genů rezistence byla stanovena pomocí klasické PCR. Seznam primerů použitých pro detekci genů rezistence včetně annealingových teplot a velikostí PCR produktů je uveden v Příloze 2D a 2E. Reakční podmínky byly zvoleny podle protokolu pro jednotlivé geny rezistence [109, 110, 111, 112] (Příloha 2D a 2E).

#### *Složení amplifikační směsi pro jednoduchou reakci PCR (μl):*

|                  |     |
|------------------|-----|
| Master mix       | 10  |
| Primer F         | 0,3 |
| Primer R         | 0,3 |
| H <sub>2</sub> O | 8,4 |
| DNA              | 1   |

Amplifikované PCR produkty byly následně detekovány elektroforézou v 1,5% agarózovém gelu v prostředí 1x TAE pufru a vizualizovány pomocí UV-záření na transluminátoru.

### ***PCR typizace bakteriocinogenních kmenů***

U izolovaných kmenů byla zjišťována produkce 24 kolicinů (A, B, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, K, L, M, N, U, Y, Js, 5, 10, S4) a 8 mikrocinů (B17, C7, J25, H47, V, L, M, E492) pomocí jednoduché a duplex PCR. Seznam primerů použitých pro detekci kolicinů a mikrocinů, annealingové teploty a velikosti PCR produktů jsou uvedeny v tabulkách Přílohy č. 2F a 2G.

#### *Složení amplifikační směsi pro jednoduchou reakci PCR (μl):*

|                    |      |
|--------------------|------|
| PCR pufr           | 2,5  |
| dNTP mix           | 0,5  |
| Taq DNA polymeráza | 0,1  |
| Primer-F1          | 0,25 |
| Primer-R1          | 0,25 |
| Templátová DNA     | 0,5  |
| H <sub>2</sub> O   | 21   |

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

|                    |           |
|--------------------|-----------|
| PCR pufr           | 2,5       |
| dNTP mix           | 0,5       |
| Taq DNA polymeráza | 0,1       |
| Primer-F1/R1       | 0,25/0,25 |
| Primer-F2/R2       | 0,25/0,25 |
| Templátová DNA     | 0,5       |
| H <sub>2</sub> O   | 20,4      |

*Podmínky PCR reakce:*

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Úvodní denaturace | 95 °C/ 10 minut |
| Opakování cyklu   | 35x             |
| Denaturace        | 95 °C/1 minuta  |
| Annealing         | 55 °C/ 1 minuta |
| Extenze           | 72 °C/ 1 minuta |
| Závěrečná extenze | 72 °C/3 minuty  |
| Chlazení          | 4 °C/ $\infty$  |

Pro detekci PCR produktů byla použita elektroforéza v 1,5% agarózovém gelu, v prostředí 1x TAE pufru, při napětí 90 V a času separace 50 minut. Po ukončení elektroforézy bylo provedeno vizuální vyhodnocení v UV světle pomocí transluminátoru a fotodokumentačního zařízení SynGene, InGenius.

### **3.2.3 Statistické metody hodnocení dat**

Výsledky jednotlivých experimentů byly zapisovány do tabulek v programu Excel (MS Office) a následně statisticky zpracovány. Výsledky analýzy byly ve všech experimentech vyhodnoceny výpočtem procentuálního podílu z celkové hodnoty (z celkového počtu hodnocených izolovaných kmenů *E. coli*). Ve výše uvedených experimentech byl dle potřeby použit výpočet pro zjištění korelace mezi jednotlivými sledovanými veličinami.

#### ***Pearsonův kolerační koeficient***

Pearsonův korelační koeficient měří statistickou závislost u lineárních dat a je velmi ovlivněn odlehlými hodnotami. Korelační koeficient se počítá pomocí směrodatných odchylek obou proměnných a jejich kovariance (*kovariance* = míra vzájemné vazby mezi veličinami). Nabývá hodnot od -1 do +1, které značí perfektní lineární vztah (záporný nebo kladný). V případě kladné korelace hodnoty obou proměnných zároveň stoupají. V případě záporné korelace

hodnota jedné proměnné stoupá a druhé klesá. Pokud lineární vztah neexistuje,  $r=0$  [113].

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}}$$

### ***Jednofaktorová analýza rozptylu (ANOVA)***

Jednofaktorovou analýzou rozptylu analyzujeme účinek jednoho faktoru na zkoumanou závisle proměnnou. V podstatě se jedná o podobnost nepárového t-testu, kde se zjišťuje rozdíl průměrů mezi dvěma nezávislými skupinami. V případě jednofaktorové analýzy rozptylu se zjišťuje rozdíl průměrů mezi více skupinami prostřednictvím výpočtu testovacího kritéria F. Hodnotí se, zda skupiny vytvořené klasifikačním faktorem jsou si podobné, nebo zda jednotlivé průměry tvoří nějaké identifikovatelné shluky (homogenní skupiny s podobnými hodnotami). Základní statistikou počítanou v analýze rozptylu je obecně testovací kritérium  $F$ , pomocí něhož se testuje hypotéza, zda průměry ve skupinách určených působícím faktorem (příp. faktory) se od sebe liší více než na základě působení přirozené variability (náhodného kolísání).

V Excelu můžeme jak podmíněné průměry, tak i hodnoty všech součtů čtverců, testového kritéria, kritickou hodnotu i hodnotu  $p$  zjistit pomocí analytického nástroje Anova: jeden faktor [114, 115].

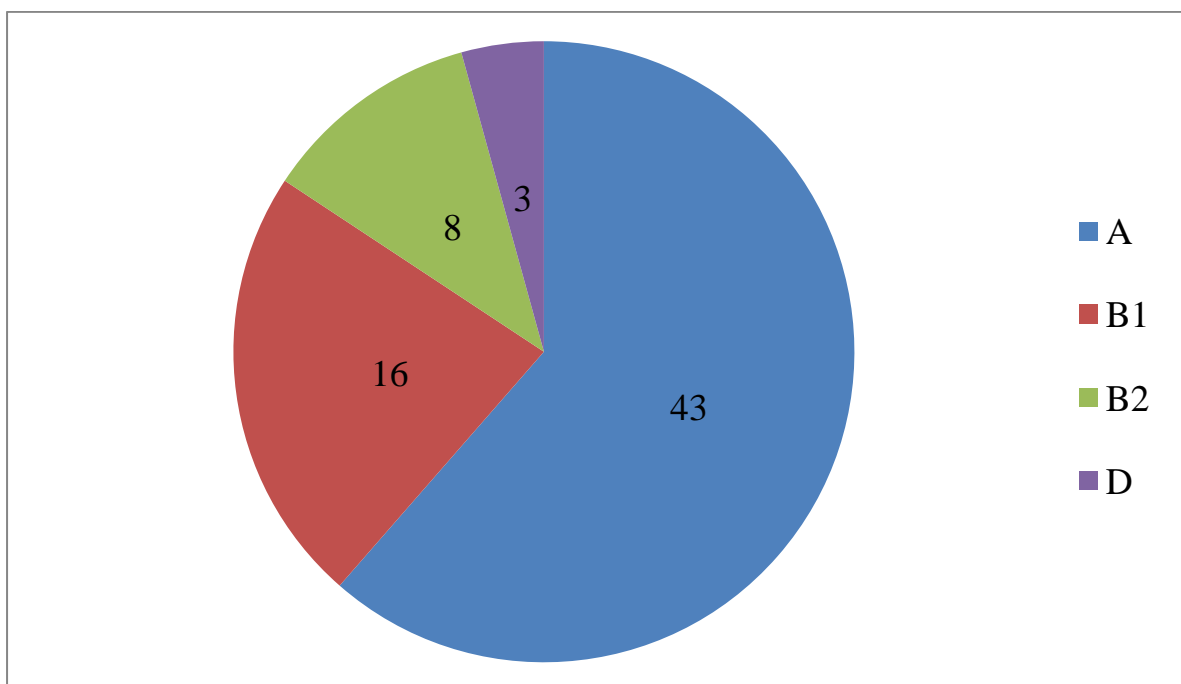
## 4. VÝSLEDKY A DISKUZE

### 4.1 Zařazení kmenů do fylogenetických skupin

Izolované kmeny byly zařazeny do čtyř hlavních fylogenetických skupin A, B1, B2 a D podle Clermont *et al.* [69]. U kmenů se zastoupení fylogenetických skupin může lišit podle místa výskytu, původu a fenotypových vlastností (například rezistence k antimikrobiálním látkám). Fylogenetické skupiny se mohou také lišit na základě přítomnosti faktorů virulence, čímž lze určit patogenní potenciál bakterie [75]. Kmeny zařazené do fylogenetických skupin B2 a D obsahují více faktorů virulence v porovnání s komenzálními fylogenetickými skupinami A a B1, které naopak disponují vyšší rezistencí k antimikrobiálním látkám [116]. Extraintestinální kmeny obvykle patří do skupiny B2 a D, komenzální kmeny do skupiny A a B1, zatímco intestinální patogenní kmeny do skupin A, B1 a D [117, 118]. Trnkov *et al.* [119] zjistili u kmenů izolovaných z různých druhů potravin převážné zastoupení fylogenetických skupin A a B1. Například fylogenetické skupiny A1 a B1 se často vyskytují u izolátů z drůbeže [120]. Oproti tomu, fylogenetické skupiny B2 a D jsou typické pro extraintestinální kmeny humánního původu [75, 109].

Více než polovina všech kmenů izolovaných z kuřecího masa a zvěřiny (53/105, 51 %) byla zařazena do skupiny A, do skupiny B1 bylo klasifikováno 25 kmenů (24 %), do skupiny D 15 kmenů (14 %) a 12 kmenů (11 %) patřilo do skupiny B2. Při podrobnějším zkoumání byly zjištěny rozdíly v zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin podle původu izolátů (Obr. 3 a 4). Odlišný původ se zdá být hlavní příčinou této rozdílnosti zastoupení fylogenetických skupin. Stejně tak druh stravy a prostředí, ve kterém zvířata žijí, může přispět k různorodému zastoupení fylogenetických skupin u obou skupin izolátů [75].

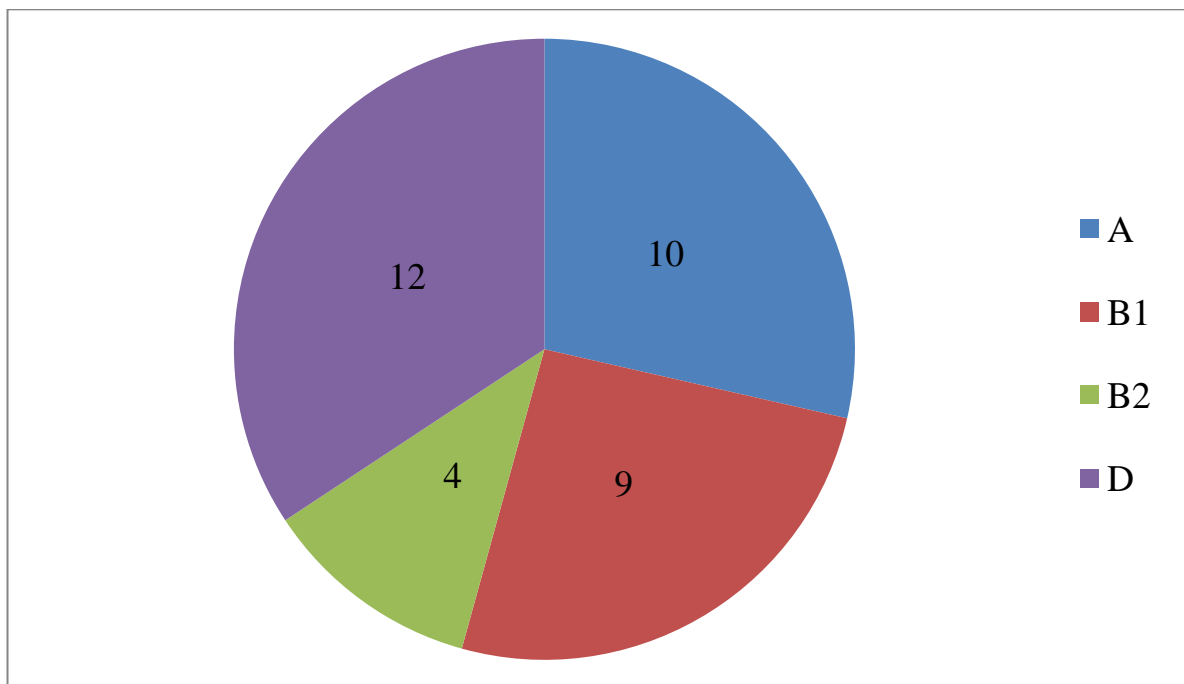
V práci bylo charakterizováno celkem 70 kmenů izolovaných z kuřat, z nichž více než polovina (61 %) byla zařazena do fylogenetické skupiny A a 23 % do skupiny B1, což naznačuje, že se jedná především o komenzální kmeny. Dále bylo 11 % kmenů klasifikováno do skupiny B2 a pouze 4 % kmenů byla zařazena do skupiny D (Obr. 3). Drugdová *et al.* [121] pozorovali u izolátů z kuřecího masa taktéž vyšší prevalenci komenzálních skupin A a B1. Tyto výsledky potvrzují fakt, že fylogenetické skupiny A1 a B1 jsou obvykle zastoupeny u izolátů z drůbeže, zatímco skupiny B2 a D se u těchto izolátů vyskytují méně [120].



Obr. 3: Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů z kuřat (n= 70).

Další skupinu testovaných kmenů tvořilo 35 izolátů získaných z výtěrů bažantů (n= 24), divokých kachen (n= 11), zajíců (n=3) a prasete divokého (n= 1), u nichž byla nejvíce zastoupena fylogenetická skupina D (34 %) a skupina A (29 %). Skupina D je typická pro extraintestinální patogenní kmeny [75] ale vyskytuje se také u intestinálních kmenů (např. EHEC, sérotyp O157:H7) [73]. V této práci byly kmeny vlastníci faktory virulence ExPEC a také intestinálních patogenů (LT, ST) zařazeny právě do skupiny D. Skupina A se vyskytuje především u komenzálních kmenů, ale může být přítomna také u intestinálních patogenů [117, 118]. Skupina A se často také vyskytuje u kmenů izolovaných z ptáků [75] a spolu s fylogenetickou skupinou D bývají často přítomné u aviárně patogenní *E. coli* (APEC) [109, 122]. Lze tedy usoudit, že se jedná o kmeny s patogenním potenciálem a je zřejmé, že i izoláty fylogenetické skupiny A mohou být zodpovědné za extraintestinální infekce [108,123]. Dále byla u těchto kmenů zastoupena skupina B1 (26 %) a v menší míře skupina B2 (11 %) (Obr. 4). Skupina B1 se hojně vyskytuje u komenzálních kmenů, ale také intestinálních patogenů [73]. V této práci byl do skupiny B1 zařazen jeden kmen, vlastníci faktor virulence LT enterotoxigenní *E. coli*. Skupina B1 je také ve velké míře zastoupena u kmenů *E. coli* z býložravců [75] a kmenů, které jsou schopny setrvávat v prostředí [124]. Alonso *et al.* [50] uvádí velkou různorodost v zastoupení fylogenetických skupin u volně žijících zvířat, avšak skupina B1 byla nejvíce dominantní. Skupina B2 patří převážně k extraintestinálním kmenům, obsahující široké spektrum faktorů virulence ExPEC [74]. V této práci

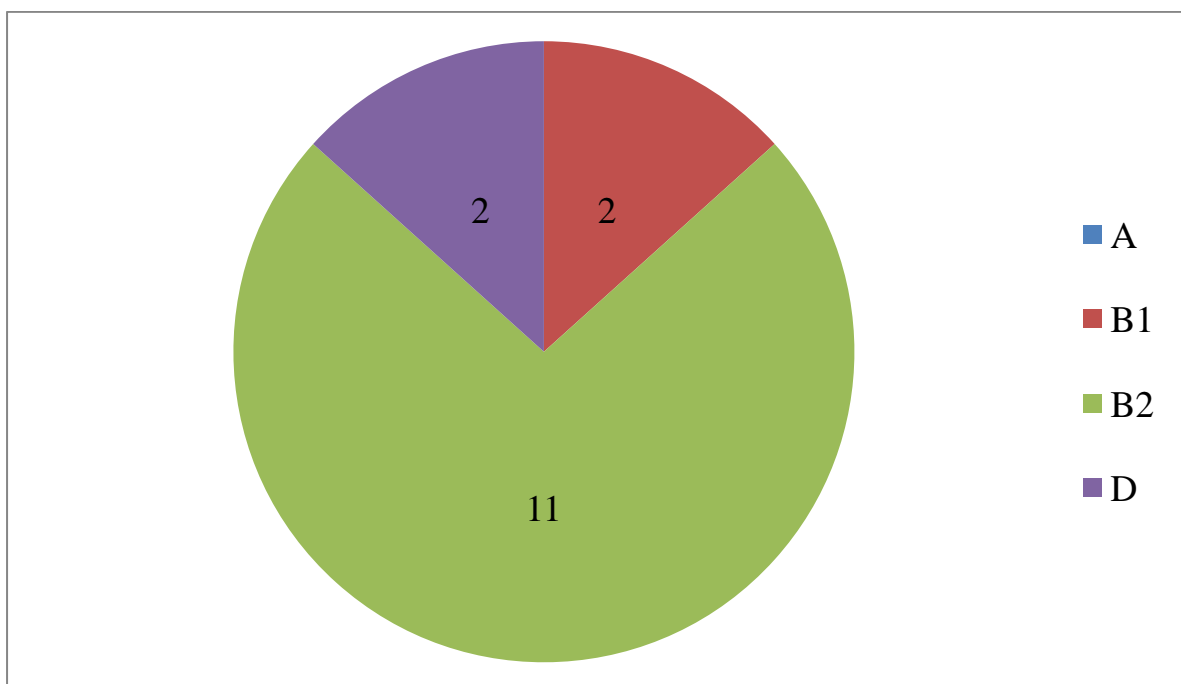
kmeny, zařazené do skupiny B2, taktéž disponovaly vyšším počtem faktorů virulence.



Obr. 4: Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů z volně žijící zvěře ( $n=35$ ).

Přítomnost *E. coli* byla také prokázána v zelenině, kde bylo z celkem 105 vzorků čerstvé zeleniny izolováno a identifikováno 15 kmenů *E. coli* (14 %). Jednalo se především o mungo klíčky, listový salát, rajčata a ředkvičky. Většina kmenů (11/15) byla zařazena do fylogenetické skupiny B2 indikující extraintestinální kmeny humánního původu [109, 75]. Dva kmeny byly zařazeny do skupiny D a dva kmeny do skupiny B1. Žádný kmen nebyl zařazen do komenzální fylogenetické skupiny A. Prevalence jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů ze zeleniny je znázorněna na Obr. 5. Jelikož výskyt fylogenetických skupin B2 a D byl ve velké míře prokázán u humánních kmenů *E. coli* způsobujících neonatální meningitidu [69] a uropatogenních kmenů způsobujících bakteriemi [125] lze usoudit, že tyto kmeny mohou mít patogenní potenciál. Kmeny izolované ze zeleniny, které byly zařazeny do fylogenetické skupiny B2, lze považovat za indikátory fekální kontaminace humánního původu [75], které mohly zeleninu kontaminovat během pěstování, zpracování, skladování zeleniny a jiné manipulaci.





Obr. 5: Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů ze zeleniny (n=15).

## 4.2 Charakterizace kmenů izolovaných z kuřecího masa a zvěřiny

V práci bylo charakterizováno celkem 105 kmenů *E. coli* izolovaných z kuřecího masa (n=70) a volně žijící zvěře (n=35). Kmeny byly zařazeny do fylogenetických skupin (A, B1, B2 a D) a následně testovány na přítomnost rezistence k 13 antibiotikům diskovou difúzní metodou a na přítomnost 14 faktorů virulence metodu PCR. Součástí charakterizace bylo také stanovení schopnosti kmenů *E. coli* tvořit biofilm. Výsledky jsou uvedeny v Tabulce č. 4.

Pro určení podobnosti jednotlivých kmenů *E. coli* z kuřecího masa a zvěřiny byly jednotlivé charakteristiky použity pro sestavení fylogenetického stromu. Fylogenetický strom sestavený na základě výskytu antibiotické rezistence pomocí softwaru Bionumerics, verze 7.5 je uveden v Příloze 7. Fylogenetický strom znázorňuje korelaci mezi přítomností faktorů virulence, zařazením do fylogenetických skupin a schopností tvorby biofilmu u jednotlivých kmenů *E. coli* podle výskytu antibiotické rezistence.

Tab. 4: Charakterizace kmenů izolovaných z volně žijící zvěře a kuřecího masa.

| charakterizace                 | volně žijící zvěř |    | kuřata        |    |
|--------------------------------|-------------------|----|---------------|----|
|                                | <i>n</i> = 35     | %  | <i>n</i> = 70 | %  |
| <b>fylogenetické skupiny</b>   |                   |    |               |    |
| A                              | 10                | 29 | 43            | 61 |
| B1                             | 9                 | 26 | 16            | 23 |
| B2                             | 4                 | 11 | 8             | 11 |
| D                              | 12                | 34 | 3             | 4  |
| <b>biofilm</b>                 |                   |    |               |    |
| slabě adherentní               | 13                | 37 | 13            | 19 |
| středně adherentní             | 3                 | 9  | 19            | 27 |
| silně adherentní               | 5                 | 14 | 18            | 26 |
| <b>faktory virulence</b>       |                   |    |               |    |
| <i>tsh</i>                     | 6                 | 17 | 19            | 27 |
| <i>CNF1</i>                    | 10                | 29 | 0             | 0  |
| <i>CNF2</i>                    | 0                 | 0  | 0             | 0  |
| <i>papC</i>                    | 4                 | 11 | 4             | 6  |
| <i>eaeA</i>                    | 0                 | 0  | 2             | 3  |
| <i>iss</i>                     | 7                 | 20 | 24            | 34 |
| <i>iucD</i>                    | 7                 | 20 | 23            | 33 |
| <i>neuC</i>                    | 4                 | 11 | 1             | 1  |
| <i>EinV</i>                    | 11                | 31 | 0             | 0  |
| <i>Eagg</i>                    | 0                 | 0  | 0             | 0  |
| <b>antibiotická rezistence</b> |                   |    |               |    |
| AMC                            | 14                | 40 | 27            | 39 |
| AMP                            | 7                 | 20 | 26            | 37 |
| C                              | 0                 | 0  | 9             | 13 |
| CEF                            | 4                 | 11 | 12            | 17 |
| CN                             | 7                 | 20 | 13            | 19 |
| CIP                            | 0                 | 0  | 6             | 9  |
| CTX                            | 2                 | 6  | 1             | 1  |
| CXM                            | 4                 | 11 | 4             | 6  |
| DO                             | 8                 | 23 | 15            | 21 |
| FEP                            | 1                 | 3  | 5             | 7  |
| IPM                            | 0                 | 0  | 0             | 0  |
| SXT                            | 1                 | 3  | 7             | 10 |
| TZP                            | 2                 | 6  | 0             | 0  |

*n* - celkový počet pozitivních kmenů, % - procentuální zastoupení pozitivních kmenů

#### 4.2.1 Výskyt antibiotické rezistence

Přítomnost rezistentních bakterií v potravinách je obávaným problémem, jelikož představují potenciální riziko přenosu patogenních rezistentních bakterií na člověka. Rezistentní bakterie přítomné v trávicím traktu jatečných zvířat mohou kontaminovat jatečně upravená těla během porážky a tím se geny rezistence mohou dostat do intestinálního traktu člověka přímo nebo prostřednictvím potravinového řetězce [67].

Rezistentní kmeny *E. coli* jsou velmi často izolovány z potravinových zvířat, zejména drůbeže. V této práci bylo izolováno 64 % rezistentních kmenů z kuřat. Výsledky ukazují, že více než polovina všech kmenů (66/105, 63 %) byla rezistentní k jednomu nebo více testovaným antibiotikům a 30 kmenů ze 105 (29 %) bylo multirezistentních. Prevalence rezistentních kmenů k testovaným antibiotikům je uvedena v Tab. 5. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána na peniciliny (ampicilin (38 %) a amoxicilin/klavulanovou kyselinu (32 %), dále pak na gentamicin (20 %) a doxycyclin (16 %). Rezistence k ostatním antibiotikům byla nižší (méně než 14 %).

Tab. 5: Výskyt antibiotické rezistence u kmenů izolovaných z kuřecího masa a volně žijících zvířat.

| antibiotika                     | zóna pro rezistenci (mm) | kmeny (n= 105) |    |    |    |     |    |
|---------------------------------|--------------------------|----------------|----|----|----|-----|----|
|                                 |                          | R              |    | I  |    | C   |    |
|                                 |                          | n              | %  | n  | %  | n   | %  |
| amoxicilin/klavulanová kyselina | ≤ 14                     | 34             | 32 | 10 | 10 | 61  | 58 |
| ampicilin                       | ≤ 14                     | 40             | 38 | 3  | 3  | 62  | 59 |
| piperacilin/tazobactam          | ≤ 17                     | 2              | 2  | 6  | 6  | 97  | 92 |
| cefalotin                       | ≤ 14                     | 15             | 14 | 43 | 41 | 47  | 45 |
| cefepim                         | ≤ 21                     | 6              | 6  | 11 | 10 | 88  | 84 |
| cefotaxim                       | ≤ 17                     | 3              | 3  | 8  | 8  | 94  | 90 |
| cefuroxim                       | ≤ 18                     | 8              | 8  | 1  | 1  | 96  | 91 |
| ciprofloxacín                   | ≤ 19                     | 6              | 6  | 15 | 14 | 84  | 80 |
| doxycyklin                      | ≤ 10                     | 17             | 16 | 6  | 6  | 82  | 78 |
| chloramfenikol                  | ≤ 17                     | 9              | 9  | 1  | 1  | 95  | 90 |
| gentamycin                      | ≤ 14                     | 21             | 20 | 43 | 41 | 41  | 39 |
| imipenem                        | ≤ 16                     | 0              | 0  | 5  | 5  | 100 | 95 |
| sulfametoxazol/trimetoprim      | ≤ 13                     | 8              | 8  | 0  | 0  | 97  | 92 |

n – počet kmenů; R – rezistentní; I – intermediální; C – citlivý

Aminopeniciliny (ampicilin a amoxicilin/klavulanová kyselina) patří do skupiny antibiotik, která jsou často používána při prevenci a léčbě

bakteriálních infekcí drůbeže [126]. Taktéž tetracykliny, sulfonamidy a chinolony patří mezi nejčastěji používané antimikrobiální látky v chovech drůbeže. Ve velkochovech České republiky jsou často používány aminopeniciliny (ampicilin), tetracykliny (doxycyklin) a aminoglykosidy (gentamicin) [127], což odpovídá prevalenci rezistence na tyto antibiotika u izolovaných kmenů z kuřat.

Vyšší rezistence k AMP a AMC (35-75 %) byla podobně zjištěna u jatečných zvířat v jiných státech Evropské unie [39, 41, 53, 128], u drůbeže dokonce 89 % [44]. Je tedy zřejmé, že vysoká prevalence rezistence k aminopenicilinům je způsobena častým užíváním těchto antibiotik v chovech drůbeže. Oproti tomu, u kmenů izolovaných z různých druhů masa bývá také zaznamenávána vyšší rezistence k trimetoprim/sulfametoxazolu, třetí generaci cefalosporinů a fluorochinolonům [65]. Avšak v této práci byla zjištěna rezistence nižší. Například k sulfametoxazol/trimetoprimu bylo rezistentních 8 % kmenů a k ciprofoxacinu pouze 6 % kmenů. Jiné studie uvádí rezistenci k CIP vyšší, zejména u izolátů z kuřat [41], což může být způsobeno vyšším užíváním chinolonových antibiotik v chovech drůbeže [65].

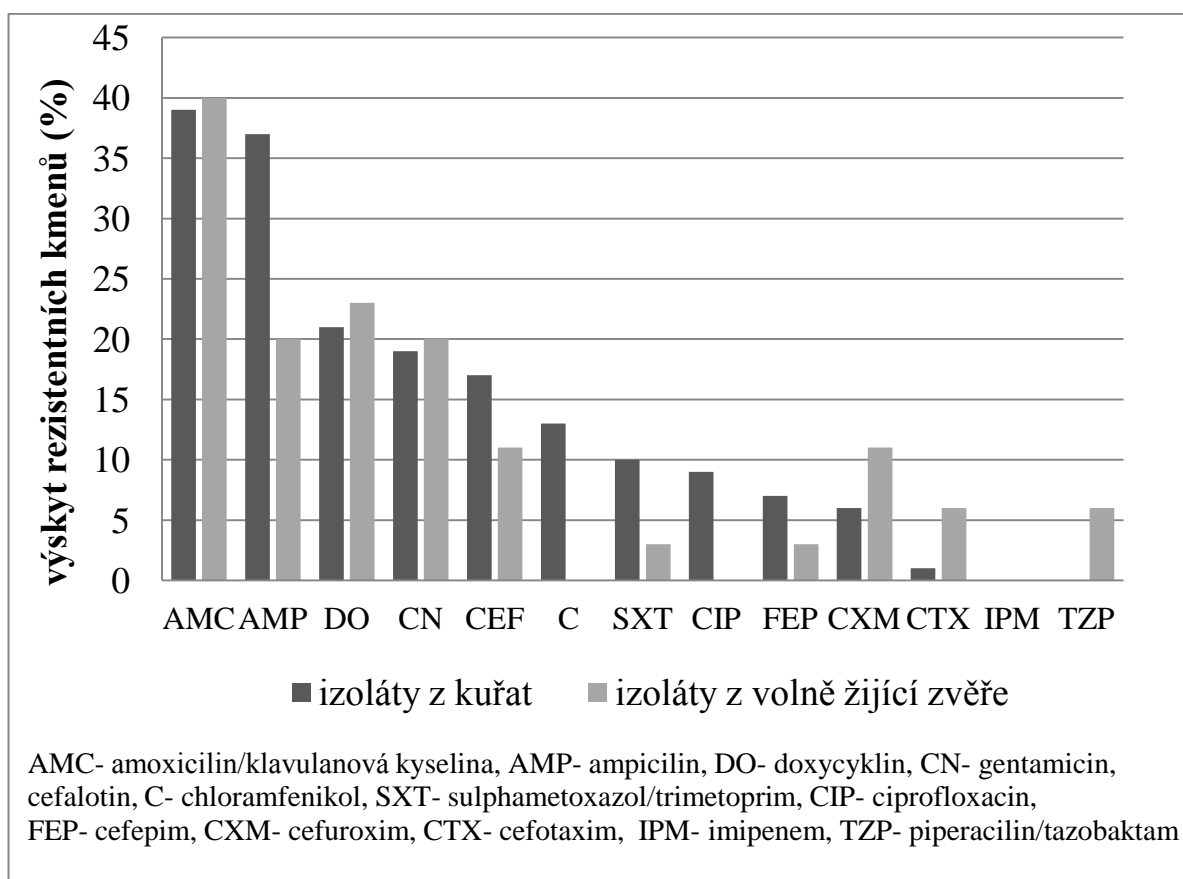
U kmenů byla dále zjištěna rezistence k chloramfenikolu (9 %). Někteří autoři uvádějí rezistenci k chloramfenikolu vyšší (16 - 21 %) [39, 41].

V poslední době se taktéž zvyšuje záchyt rezistentních kmenů izolovaných z volně žijící zvěře. Na území států Evropské unie byl zaznamenán výskyt antibiotické rezistence u různých druhů zvířat, například u volně žijících ptáků [129, 130], králíků [52], vlků [49] a lišek [59]. V této práci byla zjištěna rezistence u 21 z 35 (60 %) izolátů z bažantů, kachen, divokých zajíců a divokého prasete. Ve volné přírodě nepřichází zvěř do přímého kontaktu s antibiotiky, ale může získat geny rezistence humánního nebo veterinárního původu zejména prostřednictvím potravy a vody, která bývá považovaná za hlavní zdroj šíření genů rezistence prostředím [130]. Nedávné studie potvrzují, že volně žijící zvěř slouží jako rezervoár genetických elementů nesoucích geny rezistence, které se mohou šířit prostředím [49, 60, 131, 132].

Na Obrázku č. 6 je znázorněna rozdílnost v četnosti antibiotické rezistence mezi kmeny izolovanými z kuřecího masa a volně žijící zvěře. Prevalence antibiotické rezistence byla podobná u obou skupin izolátů. Kmeny izolované z kuřat byly k testovaným antibiotikům více rezistentní (64 %) v porovnání s kmeny izolovanými z volně žijící zvěře (60 %). Avšak profil antibiotické

rezistence byl u těchto dvou skupin odlišný. Obecně je u kmenů *E. coli* z volně žijících zvířat převládající fenotypová rezistence vůči streptomycinu, ampicilinu a tetracyklinu [133]. Kmet *et al.* [129] zjistili vysoký počet rezistentních izolátů vůči těmto antibiotikům také u havranů. V této práci byla u izolátů z volně žijící zvěře pozorována nejvyšší rezistence k amoxicilin/klavulanové kyselině, doxycyklinu a gentamicinu. Rezistence k amoxicilin/klavulanové kyselině byla téměř srovnatelná u obou skupin izolátů. Oproti tomu, rezistence k chloramfenikolu a ciprofloxacinu byla prokázána pouze u kmenů z kuřecího masa a rezistence k piperacilin/tazobaktamu byla zaznamenána pouze u kmenů z volně žijící zvěře. U těchto kmenů byla také zjištěna vyšší rezistence k cefalosporinům (cefepim, cefuroxim, cefotaxim) v porovnání s kuřecími izoláty.

Jako velmi účinné antimikrobiální látky používané v terapii proti multirezistentním gram-negativním bakteriálním infekcím jsou považovány karbapenemy. Avšak bakterie mohou být vybaveny specifickými enzymy, tzv. karbapenemázami, které selekční účinek těchto antibiotik potlačují. Výsledky práce ukazují, že rezistence k jedinému zástupci karbapenemu (imipenemu) nebyla prokázána u žádného kmene, avšak 5 kmenů bylo vyhodnoceno jako intermediální. Ačkoliv evropská databáze ECDC (Antimicrobial resistance interactive database of European Centre for Disease Prevention and Control) [134] uvádí pouze 0,0 – 0,2 % kmenů *E. coli* rezistentních ke karbapenemům, počet intermediálních kmenů v České republice narůstá (1 % v roce 2011). Tudíž je nutné věnovat pozornost monitoringu výskytu intermediálních a rezistentních kmenů k této skupině antibiotik.



Obr. 6: Porovnání antibiotické rezistence u izolátů z kuřat a volně žijící zvěře.

V porovnání s jinými studii zabývající se výskytem antibiotické rezistence u volně žijící zvěře, většina autorů uvádí prevalenci rezistentních kmenů nižší. Například nízký výskyt rezistentních kmenů byl zaznamenán u kmenů izolovaných z jelenů a drobných lesních savců (6,7 %) [50], divokých zajíců 13,6 % [52] a divokých prasat (6 %) [51]. Oproti tomu, několik jiných autorů uvádějí rezistenci mnohonásobně vyšší, zejména u volně žijících ptáků [56, 57] a vysoké zvěře [51, 58]. Například Costa *et al.* [135] zaznamenali u volně žijící zvěře dokonce 71 % rezistentních izolátů. Takto vysoká prevalence rezistentních kmenů bývá přítomna obvykle u kmenů izolovaných z domácích nebo hospodářských zvířat [136].

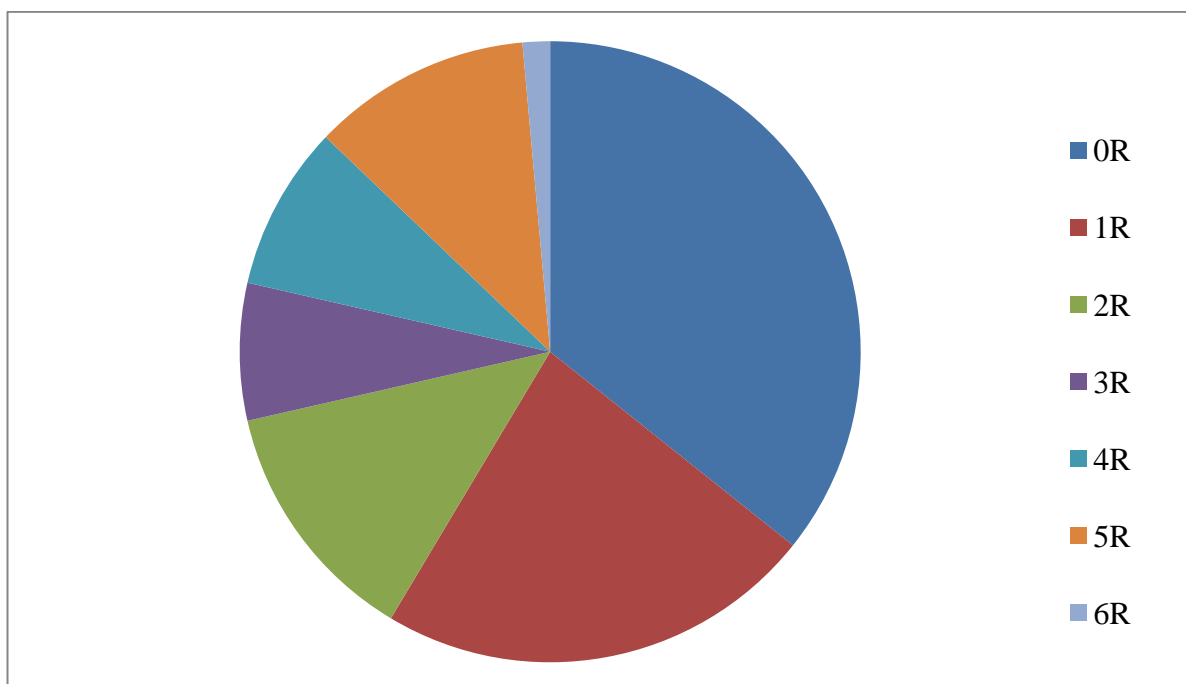
Tyto rozdíly v prevalenci antibiotické rezistence u volně žijící zvěře mohou být vysvětleny různými faktory jako je nadměrné užívání antibiotik ve veterinární a humánní medicíně a následné šíření genů rezistence do prostředí prostřednictvím mobilních genetických elementů. Zvířata žijící ve volné přírodě nepřicházejí za normálních okolností s antimikrobiálními látkami do styku. Nicméně, existuje několik cest, které mohou přispět k získání genů rezistence

vůči antibiotikům. Může to být například pohyb zvířat v bezprostřední blízkosti lidského obydlí či migrace ptáků [24, 62].

Dalším významným faktorem, kterým lze významně ovlivnit prevalenci rezistentních bakterií ve střevní mikroflóře zvířat je strava hostitele [137]. Například velmi nízký výskyt rezistentních kmenů byl zaznamenán u kmenů *E. coli* izolovaných z faeces býložravců [50].

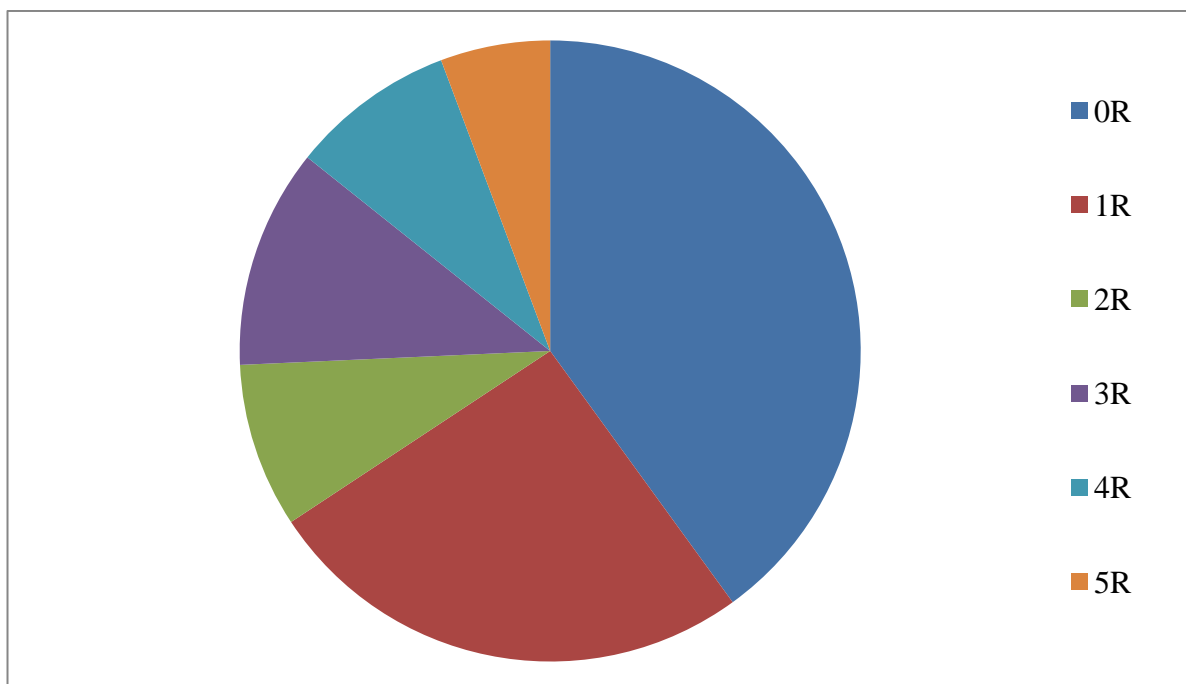
V současné době je multirezistence bakterií považována za velmi závažný problém při léčbě bakteriálních infekcí. Podle Schwarz *et al.* [138] se za multirezistentní kmeny považují takové, u kterých byla prokázána rezistence ke třem a více antimikrobiálním látkám odlišné skupiny. Multirezistentní kmeny se mohou vyskytovat v různých druzích potravin a ke člověku se mohou dostat prostřednictvím konzumace. Multirezistentní kmeny bývají často izolovány z masa [18, 139], mléčných výrobků [18], ale také z jiných druhů potravin. Například 19 % multirezistentních kmenů bylo izolováno z ryb a mořských plodů [66], a pouhých 1,2 % ze zeleniny [68].

Multirezistentní kmeny *E. coli* se často vyskytují u izolátů z drůbeže, které se mohou šířit dále prostředím prostřednictvím konjugativních plazmidů [139]. Rashid *et al.* [18] izolovali 40 % multirezistentních kmenů z kuřecího masa. Álvarez-Fernandez *et al.* [128] izolovali dokonce 87 % multirezistentních izolátů. V této práci bylo u kuřat izolováno 29 % multirezistentních kmenů, z toho 5 kmenů bylo rezistentních ke třem skupinám antibiotik, 6 kmenů ke čtyřem, 8 kmenů k pěti a jeden kmen dokonce k šesti testovaným antibiotikům odlišné skupiny (Obr. 7). Toto zjištění ukazuje opět na fakt, že antibiotika jsou v chovech drůbeže nadměru používána a bakterie se tak mohou stát multirezistentními v důsledku selekčního tlaku používaných antibiotik.



*Obr. 7: Výskyt rezistence a multirezistence u kmenů E. coli z kuřat.*

Výskyt multirezistentních kmenů byl taktéž zaznamenán u izolátů z volně žijící zvěře (5-7 %) [52, 60]. V této práci bylo zjištěno 9/35 (26 %) multirezistentních kmenů (Obr. 8), z toho 4 kmeny byly rezistentní ke třem, 3 kmeny ke čtyřem a 5 kmenů k pěti testovaným antibiotikům.



*Obr. 8: Výskyt rezistence a multirezistence u kmenů E. coli z volně žijící zvěře.*



V této práci byla také sledována souvislost mezi výskytem antibiotické rezistence a fylogenetickými skupinami. U kmenů izolovaných z kuřecího masa (n=70) byly rezistentní a multirezistentní kmeny zařazeny převážně do fylogenetických skupin A a B1 (Tab. 6). Podobně tomu bylo i ve studii Jakobsen *et al.* [140], kde multirezistentní kmeny patřily převážně do fylogenetické skupiny A a B1. Toto zjištění potvrzuje také Johnson *et al.* [139], který taktéž zaznamenal vyšší prevalenci rezistentních izolátů fylogenetických skupin A a B1 v porovnání se skupinami B2 a D, které spíše disponovaly vyšším zastoupením faktorů virulence.

Bylo prokázáno, že kmeny rezistentní k antimikrobiálním látkám (převážně klasifikovány do fylogenetických skupin A1 a B1) disponují nižší prevalencí faktorů virulence, jejichž výskyt je obvykle četnější u kmenů fylogenetických skupin B2 a D [116]. Dále bylo zjištěno, že kmeny, rezistentní a určitý typ antibiotik (například fluorochinolony), vykazují nižší prevalenci extraintestinálních faktorů virulence. Avšak u kmenů rezistentních na aminopeniciliny je prevalence faktorů virulence srovnatelná jak u rezistentních, tak i citlivých kmenů [177]. V této práci byly kmeny rezistentní právě k aminopenicilinům, u nichž bylo zjištěno různorodé zastoupení faktorů virulence.

Tab. 6: Výskyt antibiotické rezistence u jednotlivých fylogenetických skupin izolátů z kuřecího masa.

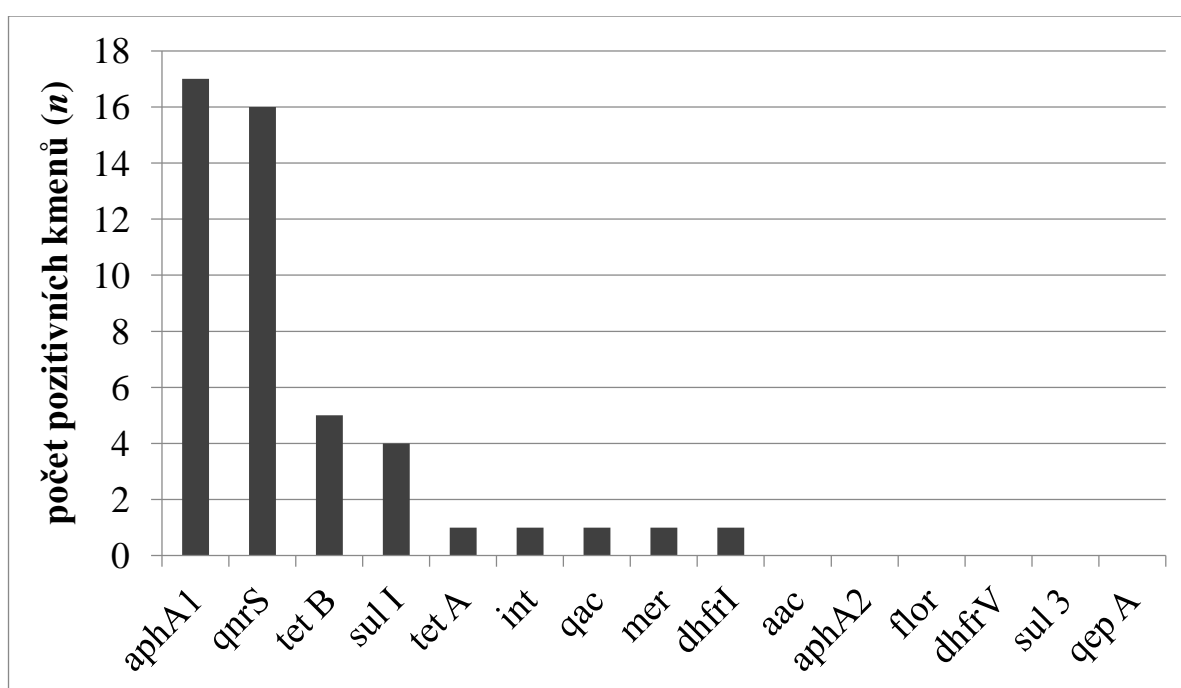
| antibiotika | A        |      | B1       |      | B2       |     | D        |     |
|-------------|----------|------|----------|------|----------|-----|----------|-----|
|             | <i>n</i> | %    | <i>n</i> | %    | <i>n</i> | %   | <i>n</i> | %   |
| <b>AMC</b>  | 9/3      | 12/4 | 9/0      | 12/0 | 2/1      | 3/1 | 0/0      | 0/0 |
| <b>AMP</b>  | 13/1     | 17/1 | 12/0     | 16/0 | 2/1      | 3/1 | 0/0      | 0/0 |
| <b>C</b>    | 4/0      | 5/0  | 3/0      | 4/0  | 1/0      | 1/0 | 0/0      | 0/0 |
| <b>CIP</b>  | 8/4      | 11/5 | 2/5      | 3/7  | 2/0      | 3/0 | 0/0      | 0/0 |
| <b>CTX</b>  | 0/2      | 0/3  | 0/4      | 0/5  | 0/2      | 0/3 | 0/0      | 0/0 |
| <b>CXM</b>  | 0/2      | 0/3  | 0/0      | 0/0  | 0/2      | 0/3 | 0/1      | 0/1 |
| <b>IPM</b>  | 0/2      | 0/3  | 0/1      | 0/1  | 0/0      | 0/0 | 0/0      | 0/0 |
| <b>SXT</b>  | 3/0      | 4/0  | 4/0      | 5/0  | 0/0      | 0/0 | 0/0      | 0/0 |

*n*- počet rezistentních/intermediálních kmenů *E. coli*; AMC- amoxicilin/klavulanová kyselina; AMP- ampicilin; C- chloramfenikol; CIP- ciprofloxacin; CTX- cefotaxim; IPM- imipenem; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim.

U kmenů izolovaných ze zvěřiny byla prováděna navíc detekce přítomnosti genů rezistence metodou PCR. U těchto izolátů byl nejčastěji detekován gen

nesoucí rezistenci vůči aminoglykosidům (*aphA1*), který byl prokazatelný u 17/35 kmenů (49 %) a gen kódující rezistenci k fluorochinolonům (*qnrS*), který byl přítomen u 16/35 (46 %) ačkoliv rezistence k fluorochinolonům nebyla u těchto kmenů prokázána diskovou difuzní metodou (všechny kmeny byly citlivé na ciprofloxacin). Méně často byl pak detekován gen pro rezistenci k tetracyklinu (*tetB*) (6/35) a sulfonamidům (*sul I*) (4/35) (Obr. 9).

Výskyt kmenů rezistentních k antimikrobiálním látkám se může lišit v závislosti na vzdálenosti od lidského obydlí či hospodářství, kde zvířata, pohybující se v bezprostřední blízkosti, mohou vlastnit více genů rezistence [141].

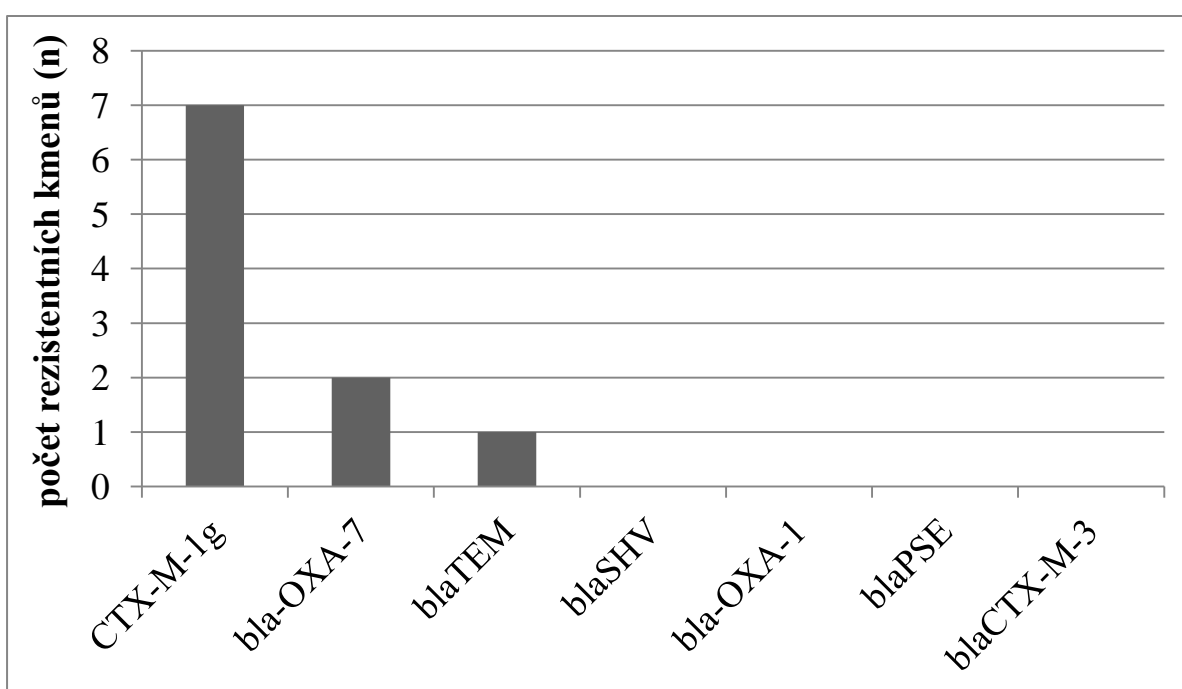


Obr. 9: Výskyt genů rezistence u izolátů z volně žijící zvěře. Geny patří do skupin kódující rezistenci k aminoglykosidům (*aphA1*, *aphA2*, *aac*), fluorochinolonům (*qnrS*, *qepA*), tetracyklinům (*tetA*, *tetB*), sulfonamidům (*sul1*, *sul3*), trimetoprimu (*dhfrI*, *dhfrV*), fenikolům (*flor*), kvartérním amoniovým sloučeninám (*qac*), rtuti (*mer*) a přítomnost integrázy (*int*).

Veterinární použití beta-laktamů s rozšířeným spektrem účinnosti vedlo během několika let u kmenů *E. coli* k nárůstu multirezistentních kmenů, v důsledku produkce beta-laktamázy širokého spektra (ESBL), kterými bakterie hydrolyzují peniciliny, cefalosporiny všech generací a monobaktamy [27]. Nejvýznamější skupinou ESBL je typ CTX-M zahrnující více než 70 různých CTX-M enzymů [27].

V současné době významně vzrostl počet studií popisující výskyt ESBL rezistentních kmenů *E. coli* nejen u zvířat chovaných k produkci masa [41, 42, 44, 142], ale také u volně žijící zvěře [51, 60, 61]. Metodou PCR byla prokázána rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u 10 kmenů (29 %). Při zjišťování konkrétního typu kódujícího rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům byly kmeny testovány na přítomnost 7 genů (*blaTEM*, *blaSHV*, *blaPSE*, *bla-OXA-1*, *bla-OXA-7*, *bla-CTX-M-3* a *CTX-M-1g*), kdy nejčastěji byl detekován gen kódující produkci ESBL - CTX-M-1g (7/35) (Obr. 10).

V převážné většině studií prováděných u volně žijících zvířat, byl u ESBL-produkujících kmenů taktéž nejvíce zastoupen gen *blaCTX-M-1* [51, 56, 58]. Kromě toho, *CTX-M-1* je jedním z nejrozšířenějších ESBL genů v Evropě. Jeho výskyt je často zaznamenáván jak u veterinárních tak i humánních kmenů [50]. V této práci byla zjištěna vyšší prevalence ESBL-produkujících kmenů v porovnání s jinou volně žijící zvěří. Například u lišek byla zjištěna 4,0 % [59] a u divokých prasat 10,4 % ESBL- produkujících kmenů [58].



Obr. 10: Výskyt genů rezistence kódujících produkci beta-laktamáz u izolátů z volně žijící zvěře. Gen *CTX-M-1g* a *CTX-M-3* kóduje produkci ESBL.

#### 4.2.2 Výskyt faktorů virulence

Faktory virulence jsou u bakterií přímo spojeny s mechanismem patogenity. Molekulární analýzou genů virulence lze určit potenciální patogenitu kmenů.

Kromě toho, jednotlivé typy *E. coli* se liší zastoupením různých faktorů virulence. Pomocí typizace lze tak určit rozdílnost v patotypech izolovaných kmenů *E. coli* [3].

V této práci bylo zjištěno, že 60 ze 105 kmenů izolovaných z kuřecího masa a volně žijící zvěře (57 %) obsahovalo jeden nebo více faktorů virulence a z toho 19 kmenů (32 %) bylo označeno za multivirulentní (přítomnost 3 a více genů virulence). Nejčastěji se vyskytovaly faktory virulence ze skupiny toxinů (*CNF1* a *tsh*), sideroforů (*iucD*) a faktor zvyšující přežívání v séru (*iss*), které jsou typické pro extraintestinální kmeny APEC a UPEC. Prevalence faktorů virulence u jednotlivých kmenů *E. coli* z kuřecího masa a zvěřiny je uvedena v Příloze č. 4 a 5.

Aviárně patogenní *E. coli* patří mezi ExPEC, způsobující ptačí kolibacilózu, která je zodpovědná za významné ekonomické ztráty v chovech drůbeže [11]. Kmeny APEC jsou známé přítomností specifických faktorů virulence, jako jsou geny *iss*, teplotně senzitivní hemaglutinin (*tsh*), receptor pro aerobaktin (*iucD*) a další [143]. Pro tyto geny je charakteristické uložení na velkých plazmidech, kódujících produkci bakteriocinu ColV. Sekvence plazmidu 180–kb ColV odhalila přítomnost 94-kb klastru putativních genů virulence (aerobaktin, salmochelin, *sit* a *eit* ABC transportní systém, *iss*, *hlyF* a *ompT*). 174-kb ColBM plazmid byl původně identifikován u kmenů UPEC, u kterého bylo zjištěno kódování kolicinů B a M. U kmenů APEC byl identifikován plazmid pAPEC-O1-ColBM, obsahující několik genů již dříve prokazatelných u APEC – *etsABC*, *sitABCD*, *iucABCD*, *iutA*, *iss*, *iroBCDEN*, *cvaA*, *cvaB*, *eitABCD*, a *tsh* [144]. Kmeny aviárně patogenní *E. coli* nesoucí tyto plazmidy mohou být přeneseny na člověka prostřednictvím konzumace drůbeže a způsobit extraintestinální infekce nebo tyto plazmidy mohou sloužit jako zdroj genů virulence či rezistence pro humánní patogeny [122].

V Tabulce 7 je uvedena prevalence vybraných faktorů virulence u 105 testovaných kmenů, které byly použity pro tento experiment. Nejvíce byl zastoupen gen *iss*, který se ve velké míře nachází na plazmidu ColV kmenů APEC [145]. Druhým nejčastěji detekovaným faktorem virulence byl gen *iucD*, který se taktéž nachází na plazmidu ColV a podílí se na syntéze aerobaktinu [146]. Častý výskyt tohoto faktoru virulence byl zaznamenán také u humánních kmenů UPEC [125]. Dalším frekventovaně se vyskytujícím faktorem virulence byl gen *tsh*, což je autotransportní protein, taktéž uložený na ColV plazmidu, kódující teplotně senzitivní hemaglutinin. Podílí se na adherenci a produkci

cytotoxinů [147] a stejně jako předchozí geny, bývá gen *tsh* často prokazován u extraintestinálních kmenů *E. coli* APEC a UPEC [139]. U multivirulentních kmenů se tyto geny vyskytovaly nejčastěji v kombinaci *iss*, *iucD* a *tsh* (nebo *CNF1*). Johnson *et al.* [148] pozorovali, že kmeny *E. coli* izolované z kuřecího masa mají podobný profil virulence jako izoláty humánních extraintestinálních kmenů. U kmenů APEC byla prokázána podobnost k humánním kmenům UPEC, vzhledem k jejich podobnému genotypu virulence a zařazením do fylogenetických skupin [149]. Je tedy zřejmé, že získané izoláty z kuřat a volně žijící zvěře mohou být zdrojem kmenů *E. coli*, které jsou schopné vyvolat extraintestinální infekce u člověka. Taktéž Bergeron *et al.* [150] potvrzuje zjištění, že kuřecí maso může být zdrojem ExPEC a být tak potenciálním nebezpečím pro konzumenty.

Tab. 7: Zastoupení jednotlivých faktorů virulence u kmenů *E. coli* izolovaných z kuřecího masa a volně žijící zvěře.

| kategorie         | gen         | popis                                      | typ <i>E.coli</i> | n  | %  |
|-------------------|-------------|--|-------------------|----|----|
| <i>toxiny</i>     | <i>tsh</i>  | teplotně senzitivní hemaglutinin           | APEC              | 25 | 58 |
|                   | <i>CNF1</i> | cytotoxický nekrotizační faktor            | UPEC              | 10 |    |
|                   | <i>CNF2</i> |  |                   | 0  |    |
| <i>adheziny</i>   | <i>papC</i> | pilus spojený s pyelonefritidou            | APEC              | 8  | 17 |
|                   | <i>eaeA</i> | intimin                                    | EPEC              | 2  |    |
|                   | <i>iss</i>  | zvýšené přežívání v séru                   | APEC              | 33 | 56 |
| <i>siderofory</i> | <i>iucD</i> | aerobaktin                                 | APEC              | 31 | 53 |
| <i>invaziny</i>   | <i>neuC</i> | K1 kapsulární polysacharid                 | NMEC              | 5  | 27 |
|                   | <i>EinV</i> | gen kódující enteroinvazivní mechanismus   | EIEC              | 11 |    |
|                   | <i>Eagg</i> | gen kódující enteroagregativní mechanismus | EAEC              | 0  | 0  |

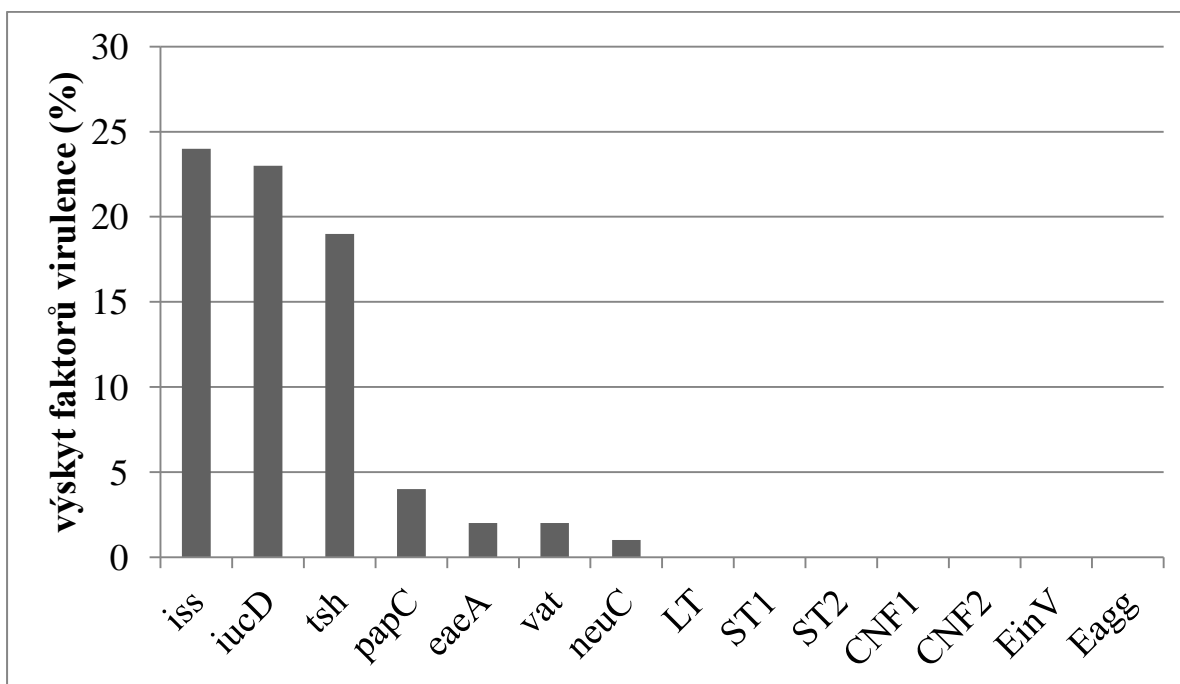
n- počet kmenů vlastnící daný typ faktoru virulence; % - procentuální zastoupení mezi 60 virulentními kmeny.

U 11 kmenů byla také zjištěna přítomnost genu *EinV* kódující enteroinvazivní mechanismus u EIEC [151]. Dále byl u 10 kmenů detekován cytotoxický nekrotizační faktor *CNF1*, který se vyskytuje zejména u kmenů UPEC [8]. Zajímavé bylo také zjištění, že 5 izolátů obsahovalo gen *neuC*, který bývá prokazován u kmenů způsobujících neonatální meningitidu [108]. U dvou

kmenů byl také detekován gen *eae*, pomocí kterého dochází k adhezenci kmenů na střevní sliznici a tvorbě tzv. A/E lézí. Tyto změny jsou pak příčinou průjmů doprovázející infekce způsobené EPEC [8]. Výsledky práce ukazují, že více než polovina všech testovaných kmenů získaných z kuřat a volně žijící zvěře obsahovala jeden nebo více faktorů virulence, které mají patogenní potenciál a mohou se za specifických podmínek uplatnit při patogenním mechanismu daného kmene.

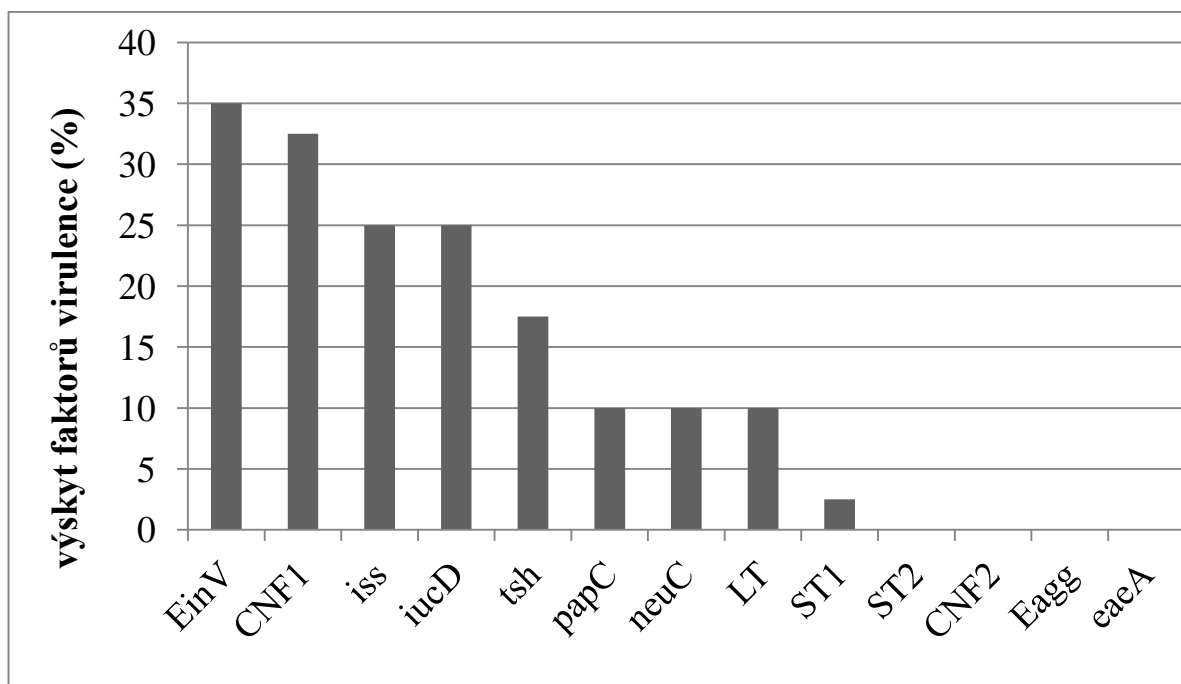
U kmenů byla také sledována rozdílnost v prevalenci faktorů virulence podle původu izolátů. Výskyt faktorů virulence byl rozdílný u kmenů izolovaných z kuřat (n=70) v porovnání s kmeny z volně žijící zvěře (n=35). Obrázek č. 11 znázorňuje výskyt faktorů virulence u kmenů izolovaných z kuřecího masa. U těchto izolátů byl nejčastěji přítomen gen *iss*, *iucD* a *tsh*. V jiné studii byla u izolátů z kuřecího masa taktéž pozorována častá prevalence výše zmíněných genů virulence [121]. V předchozích studiích bylo prokázáno, že tyto geny virulence jsou uloženy na plazmidu pAPEC-O1-ColBM nebo jeho části. U čtyř izolátů z kuřat (120, 121, 273, 285) bylo potvrzeno kódování genů pro kolicin B a M, včetně dvou ze tří faktorů virulence (*iucD*, *iss* a *tsh*), které jsou úzce spojeny s tímto plazmidem a mohou tak být považovány za kmene APEC [108]. U třech izolátů byl dále zjištěn gen ze skupiny adhezínů - *papC*, který se u kmenů podílí na adhezenci k hostitelské buňce a bývá často prokazován u extraintestinálních kmenů APEC a UPEC. U dvou kmenů byl přítomen gen *eaeA* (intimin), který se také řadí mezi adheziny a patří mezi hlavní faktor virulence u kmenů EPEC a také se vyskytuje u EHEC [8]. Gen *vat* kóduje autotransportní cytotoxin a taktéž se často nachází u APEC [152]. Avšak tento gen byl přítomen pouze u dvou kmenů.

Z výsledků je zřejmé, že většina izolovaných kmenů (46/70) může mít patogenní potenciál, jelikož převážná většina zjištěných genů virulence je spojena s extraintestinálními kmeny APEC. Kromě toho, byla u jednoho kmene zjištěna přítomnost genu *neuC*, jehož výskyt bývá sledován nejčastěji u kmenů NMEC (92 %) ale také u APEC (30 %) [108]. Výsledky práce ukazují, že kmene *E. coli* izolované z kuřecího masa mohou být zdrojem faktorů virulence ExPEC podílejících se na vyvolání infekce. Tyto kmene lze tedy považovat za potenciální patogeny přítomné v potravinách, které mohou ohrožovat lidské zdraví.



Obr. 11: Výskyt faktorů virulence u kmenů *E. coli* izolovaných z kuřecího masa. Uvedené geny kódují produkci toxinů (*tsh*, *CNF1*, *CNF2*, *vat*, *LT*, *ST1*, *ST2*), adheziny (*papC*, *eaeA*), invaziny (*neuC*, *EinV*) siderofory (*iucD*), enteroagregativní mechanismus (*Eagg*) a zvýšené přežívání v séru (*iss*).

Při porovnání obou skupin izolátů byla zjištěna rozdílnost jak v zastoupení jednotlivých faktorů virulence, tak i v četnosti. Vyšší prevalence genů virulence byla zjištěna u kmenů izolovaných z kuřat (66 %) v porovnání s izoláty z volně žijící zvěře (40 %), které obsahovaly nejčastěji geny *EinV* a *CNF1* (Obr. 12). Izoláty z volně žijící zvěře zahrnovaly i takové faktory virulence, které u izolátů z kuřecího masa nebyly vůbec zaznamenány. U tří kmenů (4MB, 2/S a 1F) byla potvrzena přítomnost genu kódující termolabilní toxin (*LT*) a u jednoho kmene (3 MB) byla zjištěna přítomnost faktoru virulence kódující tepelně stabilní toxin (*ST*) produkovaný kmeny ETEC [8]. Kromě toho, tyto kmeny obsahovaly další faktory virulence udělující kmenům vyšší patogenní potenciál (Příloha č. 4 a 5). Ačkoliv bylo více faktorů virulence zjištěno ve skupině kuřecích izolátů, mohou se izoláty z volně žijící zvěře považovat za více virulentní z důvodu fylogenetického zařazení a přítomnosti faktorů virulence indikující intestinální a extraintestinální patogenní kmeny *E. coli*.

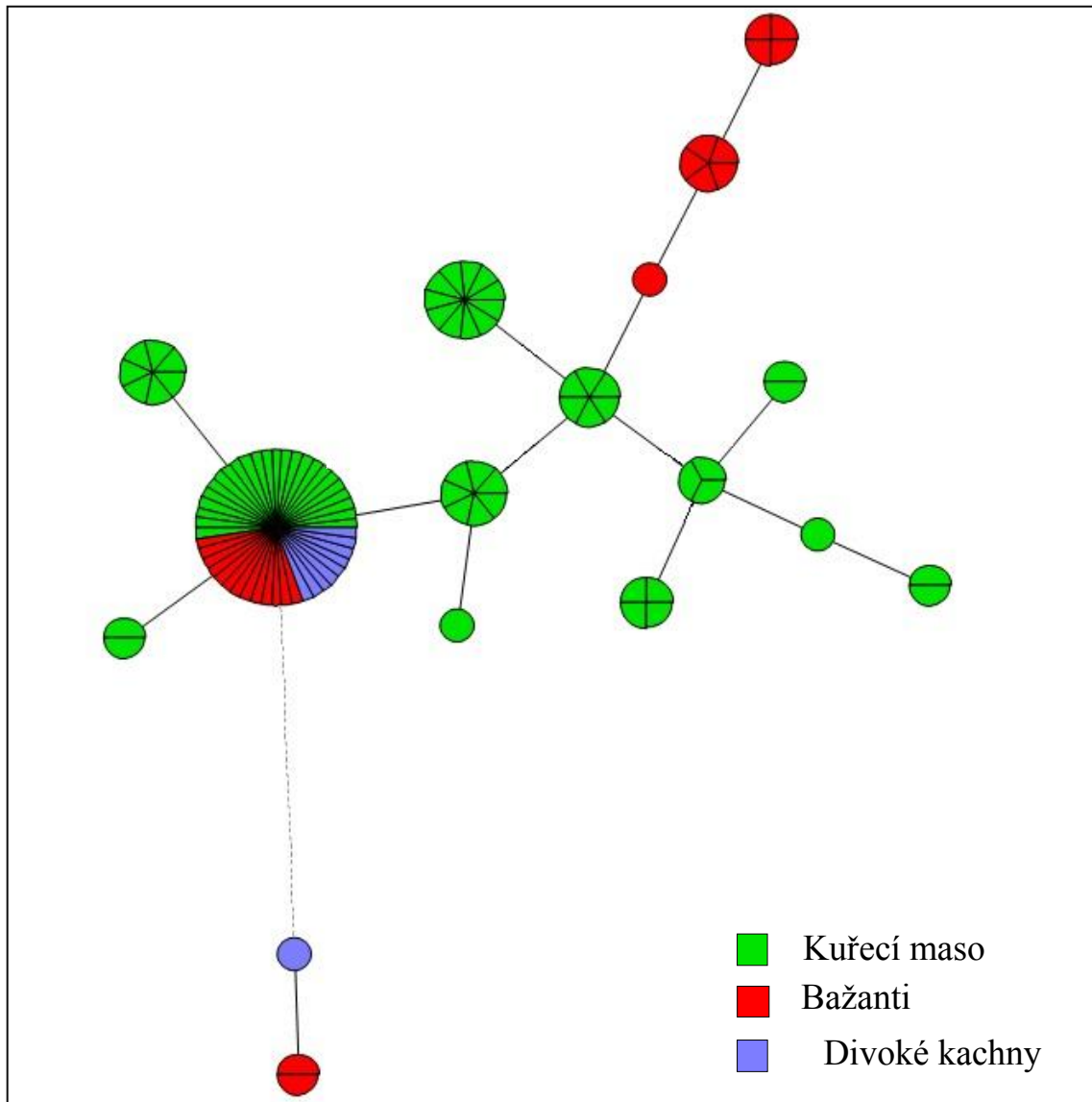


Obr. 12: Výskyt faktorů virulence u kmenů *E. coli* izolovaných z volně žijící zvíře. Geny zde uvedené kódují produkci toxinů (*tsh*, *CNF1*, *CNF2*, *vat*, *LT*, *ST1*, *ST2*), adheziny (*papC*, *eaeA*), invaziny (*neuC*, *EinV*) siderofory (*iucD*), enteroagregativní mechanismus (*Eagg*) a zvýšené přežívání v séru (*iss*).

Korelace mezi výskytem faktorů virulence a původem izolátů byla zjišťována pomocí Minimum spanning tree, který byl sestaven na základě multilokusové sekvenční typizace (MLST) pomocí softwaru Bionumerics, verze 7.5 (Obr. 13). Každý kruh představuje jednotlivý gen virulence a znázorňuje četnost kmenů, u kterých se daný faktor virulence vyskytoval. Původ kmenů je rozdělen barvami: zelená (kuřecí maso), červená (bažanti) a modrá (divoké kachny). Spojnice mezi kruhy znázorňují jednotlivé charakteristiky: silnou korelaci (černé, tučně zvýrazněné čáry), mírnou korelaci (šedé, tučně zvýrazněné čáry), slabou korelaci (šedé, čárkované čáry).

Z Obrázku č. 13 vyplývá rozdílnost v zastoupení jednotlivých faktorů virulence u kmenů odlišného původu. Kuřecí izoláty (zelená barva) obsahovaly jiné faktory virulence než izoláty z bažantů (červená barva) a divokých kachen (modrá barva).





Obr. 13: Korelace mezi výskytem faktorů virulence a původem izolátů.

V této práci bylo také sledováno zastoupení faktorů virulence v jednotlivých fylogenetických skupinách. Nejvíce faktorů virulence bylo zjištěno u kmenů, zařazených do fylogenetických skupin B2 (8/12, 67 %) a A (30/53, 57 %). O něco méně faktorů virulence bylo pozorováno ve skupině B1 (56 %) a D (53 %). Při porovnání prevalence faktorů virulence u jednotlivých fylogenetických skupin izolátů odlišného původu bylo zjištěno, že u kmenů z kuřecího masa se nejvíce faktorů virulence vyskytovalo ve fylogenetické skupině B2 (88 %) a B1 (81 %). Oproti tomu, u kmenů z volně žijící zvěře byla převážná většina faktorů virulence přítomná ve fylogenetických skupinách A (60 %) a D (42 %).

Výsledky práce ukazují různorodé zastoupení faktorů virulence v jednotlivých fylogenetických skupinách. Skupina A a B1 patří obecně mezi komenzální fylogenetické skupiny, u kterých bývá prokazována spíše nižší prevalence faktorů virulence v porovnání s fylogenetickými skupinami B2 a D [109]. Avšak výsledky některých studií potvrdily hypotézu, že i izoláty fylogenetické skupiny A mohou být zodpovědné za extraintestinální infekce [123, 108]. V této práci byl zjištěn vysoký počet faktorů virulence spojených s ExPEC (zejména *iss*, *iucD* a *tsh*) jak u kmenů zařazených do skupiny A a B1 (57 a 56 %), tak i u skupin B2 a D (67 a 53 %). Taktéž Drugdová *et al.* [121] pozorovali vyšší prevalenci faktorů virulence extraintestinálních kmenů u izolátů z kuřecího masa komenzálních skupin A a B1. Tyto skupiny se hojně vyskytují u izolátů z drůbeže či jiného ptactva a bývají často prokazovány u aviárně patogenních kmenů *E. coli* [109]. U kmenů fylogenetické skupiny A byl nejčastěji detekován gen *iucD*, *iss* a *tsh*. Gen *iss* byl také nejfrekventovanějším faktorem virulence skupiny B1 a D a geny *tsh* a *iucD* měly nejvyšší zastoupení ve skupině B2 (Tabulka 8).

Analýzou fylogenetických skupin spolu s výskytem jednotlivých faktorů virulence lze zhodnotit potencionální zdravotní riziko spojené s výskytem *E. coli* v potravinách a prostředí [72]. Avšak v této práci korelace mezi zastoupením fylogenetických skupin a výskytem faktorů virulence nebyla prokázána, tudíž nelze na základě přítomnosti faktorů virulence v jednotlivých fylogenetických skupinách jednoznačně determinovat komenzální a patogenní kmeny. Nicméně zařazení do fylogenetických skupin jasně ukazuje na původ kmenů a jejich možné patogenní vlastnosti. Z výsledků vyplývá, že i izoláty komenzálních fylogenetických skupin A a B1 mohou vlastnit faktory virulence extraintestinálních kmenů APEC a mít tak patogenní potenciál.

Tab. 8: Výskyt faktorů virulence u jednotlivých fylogenetických skupin kmenů izolovaných kuřecího masa a volně žijících zvířat ( $n=105$ ).

| faktor virulence | A        |    | B1       |    | B2       |    | D        |    |
|------------------|----------|----|----------|----|----------|----|----------|----|
|                  | <i>n</i> | %  | <i>n</i> | %  | <i>n</i> | %  | <i>n</i> | %  |
| <i>tsh</i>       | 13       | 25 | 4        | 16 | 5        | 42 | 3        | 20 |
| <i>CNF1</i>      | 4        | 8  | 1        | 4  | 1        | 8  | 4        | 27 |
| <i>CNF2</i>      | 0        | 0  | 0        | 0  | 0        | 0  | 0        | 0  |
| <i>papC</i>      | 4        | 8  | 2        | 8  | 0        | 0  | 2        | 13 |
| <i>eaeA</i>      | 0        | 0  | 0        | 0  | 2        | 17 | 0        | 0  |
| <i>iss</i>       | 13       | 25 | 12       | 48 | 2        | 17 | 6        | 40 |
| <i>iucD</i>      | 18       | 34 | 5        | 20 | 4        | 33 | 4        | 27 |
| <i>neuC</i>      | 3        | 6  | 1        | 4  | 0        | 0  | 1        | 7  |
| <i>EinV</i>      | 5        | 9  | 1        | 4  | 1        | 8  | 4        | 27 |
| <i>Eagg</i>      | 0        | 0  | 0        | 0  | 0        | 0  | 0        | 0  |

*n* – počet pozitivních kmenů; % - procentuální zastoupení pozitivních kmenů v jednotlivých fylogenetických skupinách; *tsh*- teplotně senzitivní hemaglutinin; *CNF1*, *CNF2*- cytotoxický nekrotizační faktor; *papC*- pilus spojený s pyelonefritidou; *eaeA*- intimin; *iss*- zvýšená odolnost přežívání v séru; *iucD*- aerobaktin; *neuC*- K1 kapsulární polysacharid, *EinV*- invazinový gen; *Eagg*- gen kódující enteroagregativní mechanismus.

### 4.3 Charakterizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných ze zeleniny

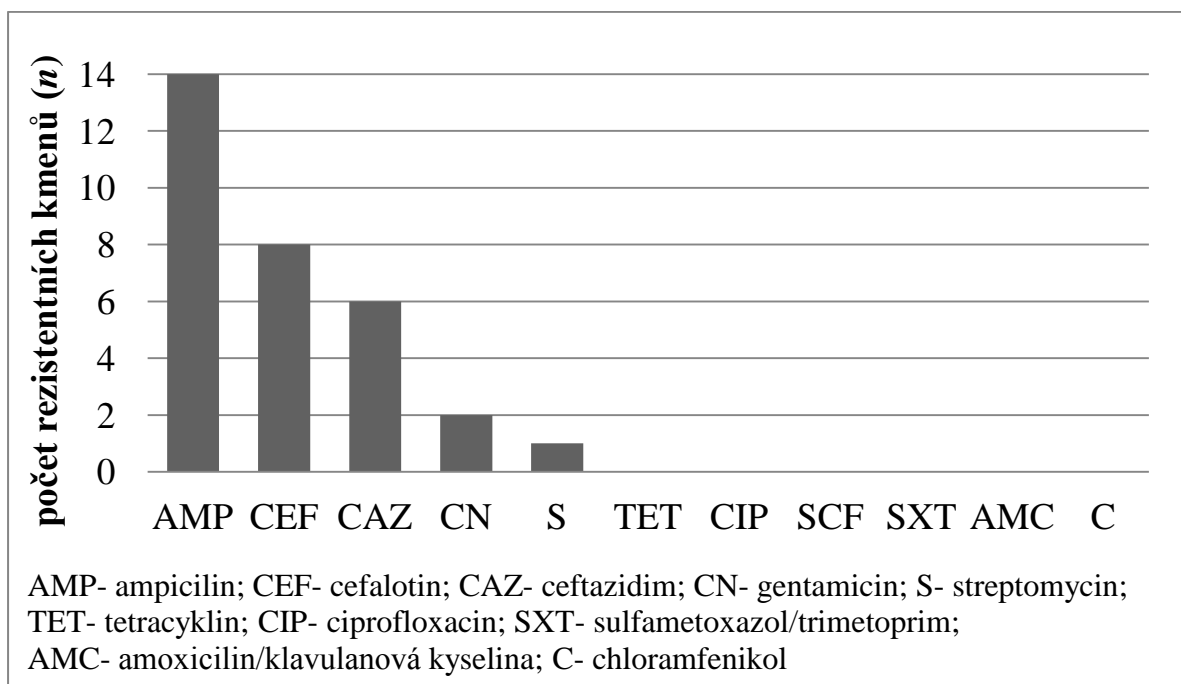
V syrové zelenině mohou být přítomné různé patogenní mikroorganismy včetně *E. coli*. V posledních letech byl zaznamenán nárůst nemocí přenášených potravinami ze syrové zeleniny, které byly kontaminovány patogenními kmeny STEC nebo EHEC. Poslední epidemie byla zaznamenána v Německu v roce 2011, kde kontaminace klíčků semen pískavice patogenními kmeny EHEC (konkrétně sérotypem O104:H4), způsobila u mnoha lidí HUS s různě závažnými komplikacemi [153]. Také čerstvé ovoce a nepasterované ovocné šťávy mohou být zdrojem patogenní *E. coli* O157:H7 [154]. V této práci byla provedena izolace kmenů *E. coli* ze 105 vzorků různých druhů zeleniny zakoupených v maloobchodní síti ve Zlínském kraji. Seznam zeleniny včetně prevalence izolovaných kmenů *E. coli* je uveden v Příloze č. 3. *Escherichia coli* byla prokázána u 15 vzorků (14 %) a jednalo se především o mungo klíčky, rajčata, mrkev, jarní cibuli a ředkvičky. Při porovnání s jinými studiemi, Mukherjee *et al.* [155] zjistili v zelenině 10% výskyt kmenů *E. coli*. Dále bylo

zjištěno, že listová zelenina a klíčky semen jsou nejčastějším zdrojem výskytu *E. coli* v zelenině [69]. Tzschoppe *et al.* [153] detekovali *E. coli* u pěti z 40 (12,5 %) vzorků různých druhů listových salátů a klíčků semen. Také v této práci bylo nejvíce kmenů izolováno z mungo klíčků (4/12), avšak pouze jeden kmen byl izolován z 23 vzorků listové zeleniny. *E. coli* byla častěji izolována z ředkvi (2/7), jarní cibule (2/4) a rajčat (2/10). Zelenina může být kontaminována bakteriemi *E. coli* během její produkce, při sklizni nebo při přípravě ke konzumaci. Před sklizňové období je považováno za nejčastější způsob kontaminace, jelikož mu nelze nijak předcházet. Mikroorganismy jsou běžně přítomné v hnojivu, půdě i vodě a zelenina se tak snadno může kontaminovat různými druhy mikroorganismů, zahrnující *E. coli*. Porušené pletivo či jiné části rostlin jsou navíc náchylnější ke kontaminaci mikroorganismy [156]. Vyšší prevalence *E. coli* u mungo klíčků může být způsobena také podmínkami, vhodnými pro klíčení, které jsou zároveň ideální pro mikrobiální růst [157].

#### 4.3.1 Výskyt antibiotické rezistence

U kmenů ze zeleniny byla stanovena rezistence k 11 antimikrobiálním látkám diskovou difúzní metodou dle metodiky EUCAST (Obr. 14). Výsledky ukazují nejvyšší rezistenci k AMP, která byla zaznamenána u 14/15 kmenů. Skočková *et al.* [69] také zjistili vyšší rezistenci k AMP u kmenů *E. coli* izolovaných z různých druhů zeleniny. Dále byla prokázána rezistence k cefalosporinovým antibiotikům (cefalotin a ceftazidim), dva kmeny byly rezistentní k gentamicinu a jeden kmen k streptomycinu. Rezistence k ostatním antibiotikům nebyla diskovou difúzní metodou potvrzena.

Vzhledem k narůstající spotřebě antibiotik ve veterinární a humánní medicíně, se také zvyšuje záchyt rezistentních a multirezistentních kmenů, izolovaných z různých druhů potravin, včetně zeleniny [69, 139]. Avšak v této práci byla multirezistence stanovena pouze u jednoho kmene (F107), který byl rezistentní k ampicilinu, ceftazidimu, cefalotinu a gentamicinu. Nicméně, někteří autoři ukazují na potenciální problém spojený s výskytem rezistentních bakterií v tepelně neupravených potravinách, včetně zeleniny [158, 159, 160, 161].



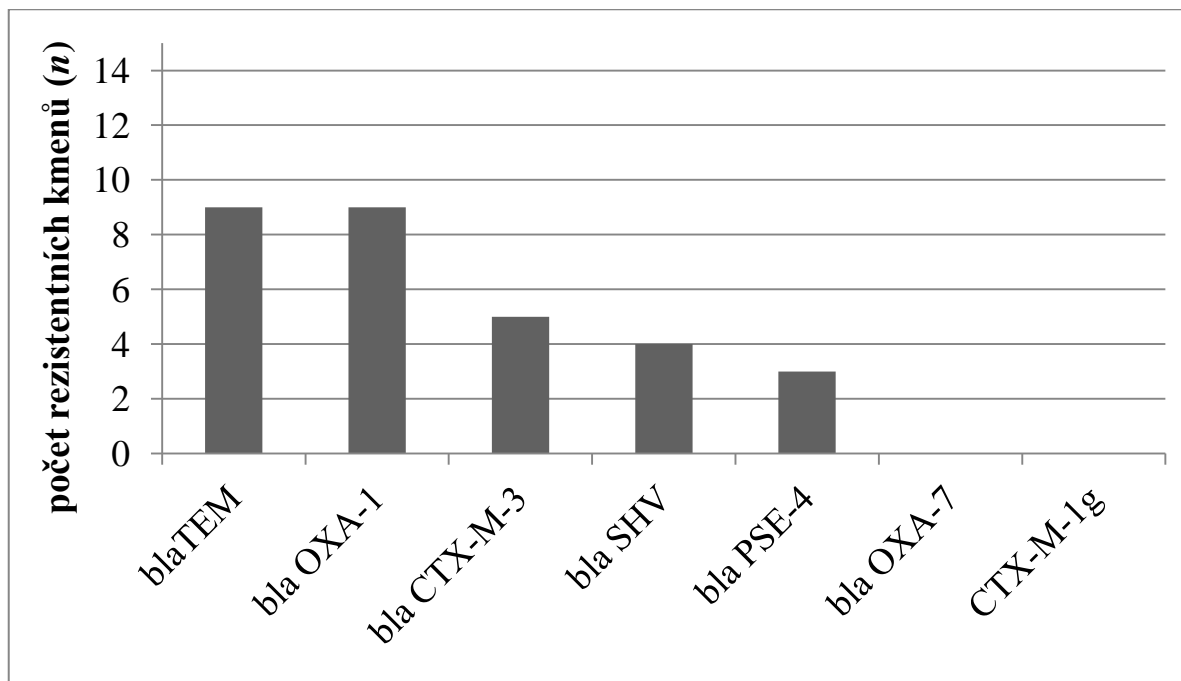
Obr. 14: Výskyt antibiotické rezistence u izolátů *E. coli* ze zeleniny.

U kmenů ze zeleniny bylo dále testováno 24 párů primerů pro stanovení přítomnosti genů kódující antibiotickou rezistenci. Nejčastěji byly detekovány geny pro rezistenci vůči beta-laktamovým antibiotikům: *blaOXA1* (9/15) a *blaTEM* (9/15) jak znázorňuje Obr. 15.

Bakterie s beta-laktamásovou aktivitou, přítomné v potravinách včetně zeleniny, mohou představovat pro konzumenta zdravotní riziko, jelikož tyto bakterie mohou být ke člověku přeneseny prostřednictvím potravinového řetězce. Větší předpoklad přenosu je také dán tím, že se zelenina konzumuje převážně v syrovém stavu, tudíž by toto riziko nemělo být podceňováno. Kmeny *E. coli* rezistentní k beta-laktamovým antibiotikům bývají často izolovány z masa potravinových zvířat [41, 42, 44, 142] a jsou taktéž přítomné u izolátů z volně žijící zvěře [51, 60, 129]. V poslední době je jejich výskyt potvrzen také v zelenině [162, 163].

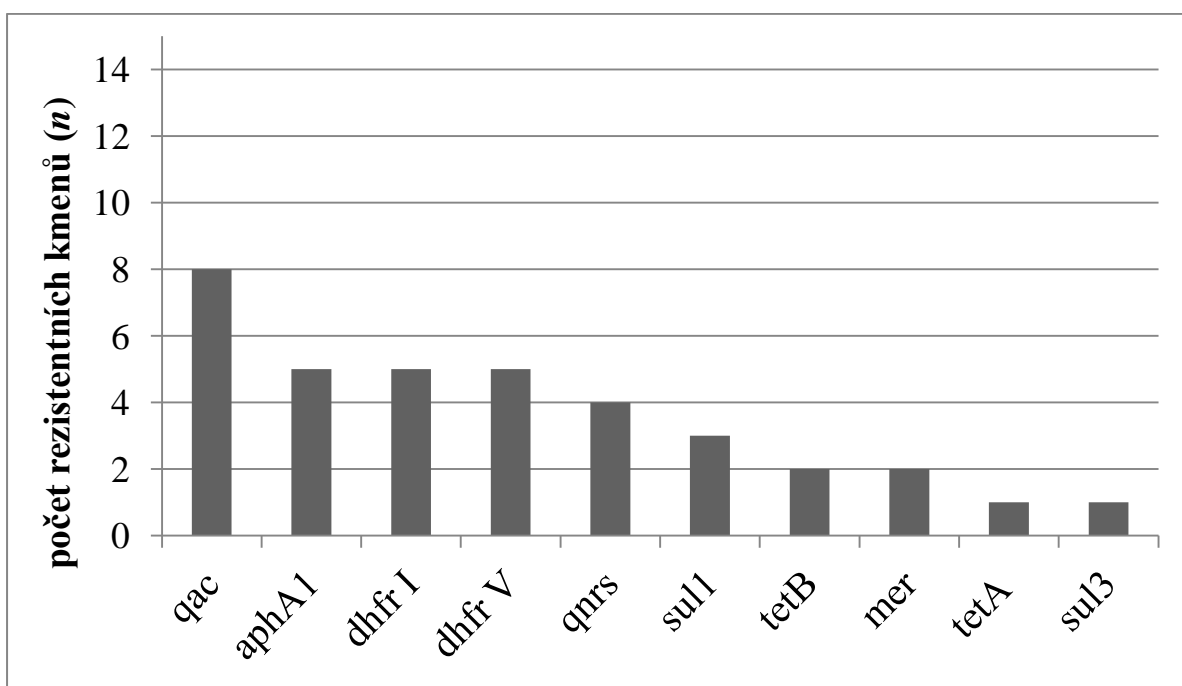
V současné době je věnována velká pozornost produkci beta-laktamázy s rozšířeným spektrem účinnosti (ESBL), které jsou schopny hydrolyzovat většinu beta-laktamových antibiotik, která jsou v současnosti používána. Kromě toho byly také zaznamenány případy onemocnění z potravin způsobené patogenními ESBL kmeny *E. coli* přítomných v zelenině [164, 165]. V této práci bylo u izolátů ze zeleniny zjištěno pět kmenů disponujících geny pro ESBL. Lze tedy konstatovat, že izoláty ze zeleniny mohou být, tak jako potraviny

živočišného původu, zdrojem rezistentních kmenů včetně kmenů ESBL rezistentních k širokému spektru beta-laktamových antibiotik.



Obr. 15: Prevalence genů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u izolátů *E. coli* ze zeleniny. Geny CTX-M-3 a CTX-M-1g kódují produkci beta-laktamázy širokého spektra (ESBL).

U 8 kmenů byl detekován gen *qac*, který je u gram-negativních bakterií spojen s plazmidově zprostředkovanou třídou integronu 1 vlastní celou řadou genů rezistence [166]. U čeledi *Enterobacteriaceae* bývají geny *qac* nejčastěji v kombinaci s geny kódujícími rezistenci vůči aminoglykosidům (*aphA1*, *aphA2*) chloramfenikolu, sulfonamidům (*sul 1*, *sul 3*), trimethoprimu (*dhfr I*, *dhfr II*) a beta-laktamům (*blaTEM*, *blaOXA*) [167], což odpovídá výsledkům této práce (Obr. 16). Prevalence antibiotické rezistence u kmenů ze zeleniny je uvedena v Příloze 6.



Obr. 16: Prevalence genů rezistence u izolátů *E. coli* ze zeleniny. Geny patří do skupin kódující rezistenci k aminoglykosidům (*aphA1*), fluorochinolonům (*qnrS*), tetracyklinům (*tetA*, *tetB*), sulfonamidům (*sul1*, *sul3*), trimetoprimu (*dhfrI*, *dhfrV*), kvartérním amoniovým sloučeninám (*qac*) a rtuti (*mer*).

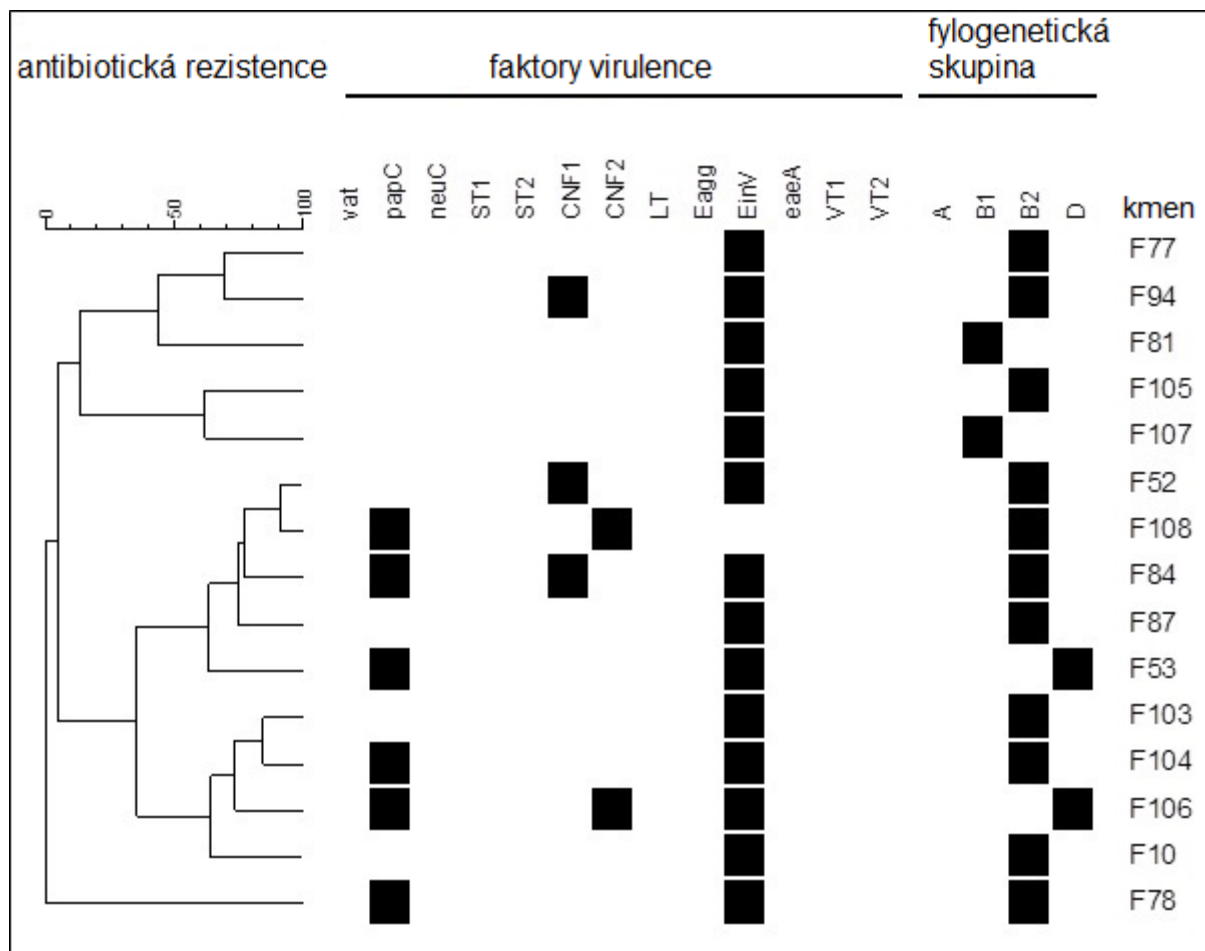
#### 4.3.2 Výskyt faktorů virulence

U izolátů ze zeleniny byla stanovena přítomnost 16 faktorů virulence. Výskyt jednotlivých faktorů virulence je uveden v Příloze č. 6. Ze všech genů byl nejvíce zastoupen faktor invazivity - gen *EinV* (93 %) (Obr. 17), který je u kmenů *E. coli* zodpovědný za kódování enteroinvazivního mechanismu [151]. Také u izolátů z volně žijící zvěře se gen *EinV* vyskytoval nejčastěji. Tyto kmeny byly převážně zařazeny do fylogenetických skupin A a D, které mohou značit intestinální patogenní kmeny, kam se řadí i EIEC. Avšak kmeny ze zeleniny byly klasifikovány zejména do skupiny B2 (Obr. 17) typické pro extraintestinální kmeny humánního původu. Je tedy zřejmé, že se gen *EinV* může vyskytovat i u ExPEC.

U kmenů ze zeleniny byl dále detekován gen *vat* kódující vakuolizační toxin, vyskytující se u ExPEC a u 5 kmenů byl přítomen cytotoxický nekrotizační faktor *CNF1*, který se vyskytuje zejména u kmenů UPEC [8].

Jelikož u kmenů izolovaných ze zeleniny byla zjištěna přítomnost faktorů virulence extraintestinálních kmenů a převážná část kmenů patřila do skupiny B2, lze i tyto kmeny považovat za potenciální zdroj virulentních kmenů

s extraintestinálním patogenním účinkem, které mohou pro konzumenta představovat zdravotní riziko spojené s konzumací syrové zeleniny. Proto by se měl před konzumací syrové zeleniny klást důraz na její důkladné omytí vodou a hygienu při manipulaci a kulinární úpravě.



Obr. 17: *Fylogenetický strom sestavený na základě výskytu antibiotické rezistence pomocí softwaru Bionumerics, verze 7.5. Fylogenetický strom znázorňuje prevalenci faktorů virulence a fylogenetických skupin u kmenů izolovaných ze zeleniny podle výskytu antibiotické rezistence.*

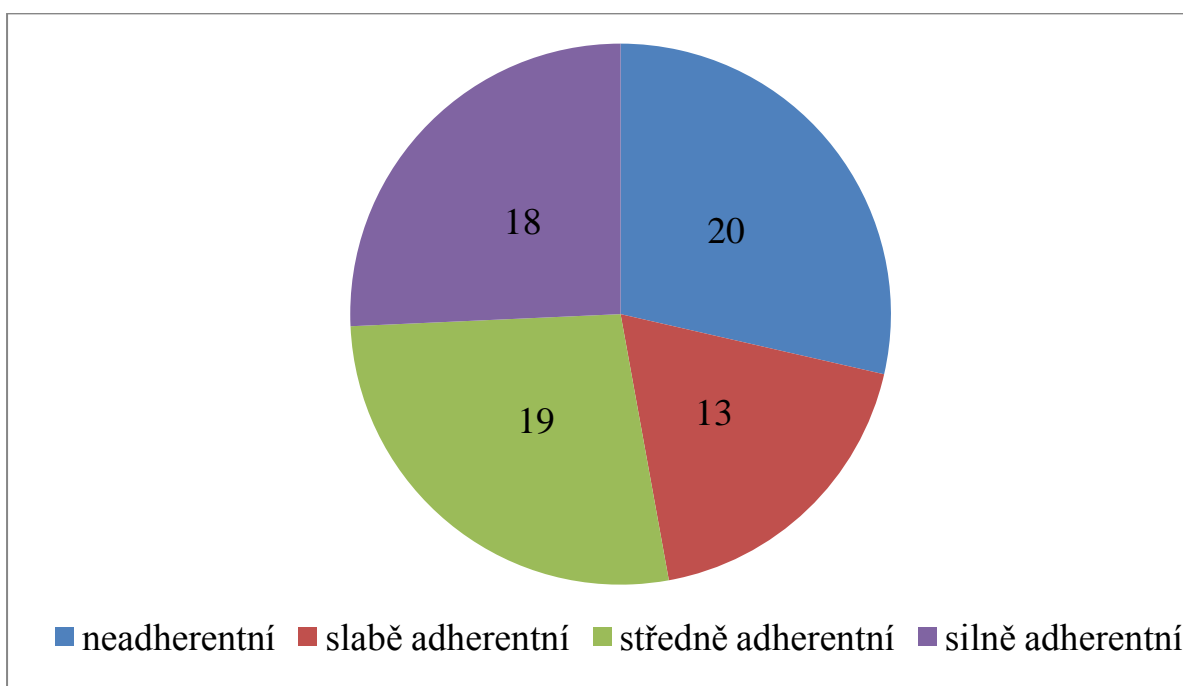
#### 4.4 Schopnost tvorby biofilmu u kmenů izolovaných z kuřecího masa a zvěřiny

Schopnost tvorby biofilmu je pro bakterie významným faktorem umožňující bakteriálním buňkám odolávat vnějším vlivům prostředí. Život v biofilmu je pro mnoho bakterií důležitý jak pro přežívání a perzistenci v prostředí,

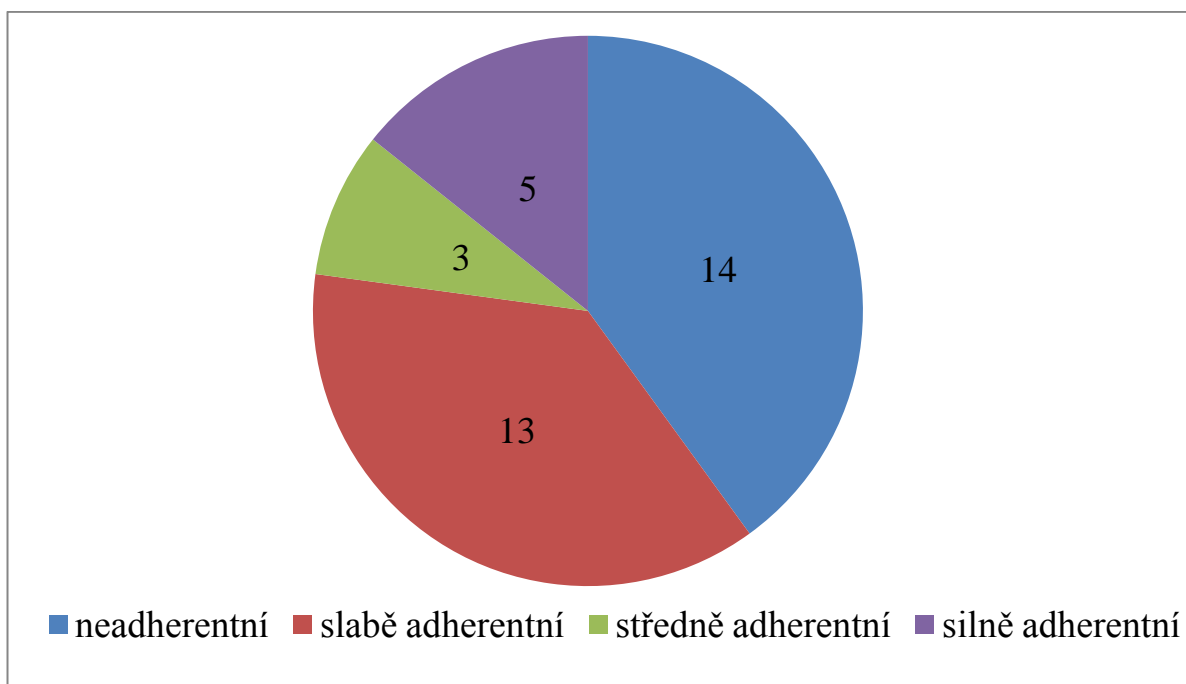


tak i pro vyvolání různých infekcí. Existuje mnoho veterinárních patogenů, které díky biofilmu mají schopnost způsobovat perzistentní infekce [168].

V této práci bylo na schopnost tvorby biofilmu testováno 105 kmenů izolovaných z kuřecího masa (n=70) a volně žijící zvěře (n=35). Z celkového počtu testovaných kmenů vykazovalo schopnost tvorby biofilmu 71 kmenů (68 %) s rovnoměrným zastoupením silně (23/105, 22 %), středně (22/105, 21 %) a slabě adherentních kmenů (26/105, 25 %). Schopnost adherence se lišila mezi oběma skupinami testovaných kmenů. Kuřecí izoláty (50/70, 71 % kmenů) vykazovaly vyšší schopnost tvorby biofilmu (Obr. 18) v porovnání s izoláty z volně žijící zvěře, u kterých byla tato vlastnost prokázána u 21 kmenů (60 %) (Obr. 19). Navíc byla mezi těmito dvěma testovanými skupinami kmenů prokázána statisticky významná rozdílnost ve schopnosti tvorby biofilmu ( $p < 0,05$ ). Kuřecí izoláty zahrnovaly více silně adherentních kmenů, které zahrnovaly 18 silně (26 %) a 19 středně (27 %) biofilm-produkujících kmenů. Kmeny z volně žijící zvěře zahrnovaly 5 (14 %) silně a 3 (9 %) středně biofilm-produkujících kmenů.



Obr. 18: Tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z kuřat.



Obr. 19: Tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z volně žijící zvíře.

#### 4.4.1 Výskyt antibiotické rezistence a faktorů virulence u biofilm-tvořících kmenů *E. coli*

Korelace mezi antibiotickou rezistencí a přítomností faktorů virulence v závislosti na schopnosti kmenů tvořit biofilm byla zhodnocena pomocí Pearsonova korelačního koeficientu. Z celkového počtu šedesáti rezistentních izolátů, 46 kmenů (70 %) vykazovalo schopnost tvořit biofilm. Na základě získaných výsledků byla zjištěna statisticky významná souvislost mezi výskytem antibiotické rezistence a tvorbou biofilmu ( $p < 0,05$ ). Tabulka 9 ukazuje, že silně adherentní kmeny byly více citlivé k antimikrobiálním látkám, než kmeny slabě adherentní či neadherentní. Toto zjištění je v souladu s výsledky studie Naves *et al.* [169], kde vyšší rezistence byla zaznamenána také u slabě adherentních kmenů. Ačkoliv se některé biofilm-tvořící kmeny jevily k testovaným antibiotikům jako citlivé, lze předpokládat, že v biofilmu mohou odolnost k těmto antibiotikům získat. Bylo prokázáno, že rezistence k antimikrobiálním látkám bývá obecně vyšší u buněk žijících v biofilmu, než u buněk planktonických [168].

Tab. 9: Prevalence antibiotické rezistence u biofilm-tvořících kmenů.

| antibiotika | výskyt antibiotické rezistence |                            |                         |                     |
|-------------|--------------------------------|----------------------------|-------------------------|---------------------|
|             | silně adherentní (n=23)        | středně adherentní (n= 22) | slabě adherentní (n=26) | neadherentní (n=34) |
| AMP         | 5                              | 7                          | 14                      | 15                  |
| AMC         | 5                              | 7                          | 13                      | 8                   |
| TZP         | 0                              | 0                          | 2                       | 0                   |
| CEF         | 2                              | 5                          | 7                       | 1                   |
| FEP         | 2                              | 0                          | 2                       | 2                   |
| CTX         | 0                              | 1                          | 1                       | 1                   |
| CXM         | 0                              | 3                          | 4                       | 1                   |
| CIP         | 2                              | 2                          | 1                       | 1                   |
| DO          | 4                              | 3                          | 5                       | 5                   |
| C           | 2                              | 1                          | 4                       | 2                   |
| CN          | 2                              | 0                          | 7                       | 12                  |
| IPM         | 0                              | 0                          | 0                       | 0                   |
| SXT         | 0                              | 3                          | 5                       | 0                   |
| celkem:     | <b>24</b>                      | <b>32</b>                  | <b>65</b>               | <b>48</b>           |

n- počet adherentních/neadherentních kmenů; AMC- amoxicilin/klavulanová kyselina; AMP- ampicilin; DO- doxycyklin; CN- gentamicin; cefalotin; C- chloramfenikol; SXT- sulfametoxazol/trimetoprim; CIP- ciprofloxacin; FEP- cefepim; CXM- cefuroxim; CTX- cefotaxim; IPM- imipenem; TZP- piperacilin/tazobaktam.

Bakterie žijící v biofilmu jsou kromě zvýšené rezistence považovány také za více virulentní [169]. Avšak korelace mezi výskytem faktorů virulence (tsh, CNF1, CNF2, papC, eaeA, iss, iucD, neuC, EinV, Eagg) a tvorbou biofilmu nebyla v této práci potvrzena. Nicméně, více faktorů virulence bylo zaznamenáno u biofilm-tvořících kmenů, zejména slabě adherentních. Výskyt faktorů virulence u biofilm-tvořících kmenů z potravin je nižší v porovnání s prevalencí faktorů virulence u producentů biofilmu získaných z humánních izolátů [125], což může být důsledkem odlišného genotypu a podmínek prostředí, ve kterém se bakterie nachází [170, 171]. V Tabulce 10 je uvedena prevalence faktorů virulence u biofilm-tvořících kmenů. Ve studii Skyberg *et al.* [122] vykazovalo schopnost tvorby biofilmu 76 % aviárně patogenních kmenů *E. coli* v porovnání s fekálními izoláty pocházejících ze zdravých ptáků a (55 %). Jednalo se především o středně a silně adherentní kmeny. Je tedy zřejmé, že patogenní kmeny mají vyšší schopnost tvorby biofilmu.

V této práci bylo u biofilm-tvořících kmenů (zejména silně a slabě adherentních) zjištěno největší zastoupení genů *iss*, *iucD* a *tsh*, které jsou součástí konjugativních plazmidů aviárně patogenní *E. coli*. Biofilm umožňuje snadnější šíření těchto plazmidů mezi bakteriemi, které mohou být zdrojem genů virulence APEC, zejména u izolátů z drůbeže [122]. Naves *et al.* [169] uvádí gen *tsh* jako nejčastěji se vyskytující u slabě adherentních kmenů. U slabě adherentních kmenů se nacházely také virulenční faktory ze skupiny adhezínů *papC*, dále invazinový faktor *EinV*, *neuC* a cytotoxický nekrotizační faktor *CNF1*, které se u biofilm tvořících kmenů běžně vyskytují [169].

Tab. 10: Prevalence faktorů virulence u biofilm-tvořících kmenů.

| faktor virulence | výskyt faktorů virulence |    |                    |    |                  |    |              |    |
|------------------|--------------------------|----|--------------------|----|------------------|----|--------------|----|
|                  | silně adherentní         |    | středně adherentní |    | slabě adherentní |    | neadherentní |    |
|                  | n= 23                    | %  | n= 22              | %  | n= 26            | %  | n= 36        | %  |
| <i>tsh</i>       | 6                        | 26 | 2                  | 9  | 10               | 39 | 6            | 17 |
| <i>CNF1</i>      | 1                        | 4  | 0                  | 0  | 5                | 19 | 5            | 14 |
| <i>CNF2</i>      | 0                        | 0  | 0                  | 0  | 0                | 0  | 0            | 0  |
| <i>papC</i>      | 0                        | 0  | 2                  | 9  | 4                | 15 | 1            | 3  |
| <i>eaeA</i>      | 1                        | 4  | 1                  | 5  | 0                | 0  | 0            | 0  |
| <i>iss</i>       | 6                        | 26 | 7                  | 32 | 10               | 39 | 11           | 31 |
| <i>iucD</i>      | 7                        | 30 | 7                  | 32 | 11               | 42 | 8            | 22 |
| <i>neuC</i>      | 0                        | 0  | 1                  | 5  | 2                | 8  | 1            | 3  |
| <i>EinV</i>      | 2                        | 9  | 0                  | 0  | 5                | 19 | 4            | 11 |
| <i>Eagg</i>      | 0                        | 0  | 0                  | 0  | 0                | 0  | 0            | 0  |
| <b>celkem</b>    | <b>23</b>                |    | <b>20</b>          |    | <b>47</b>        |    | <b>36</b>    |    |

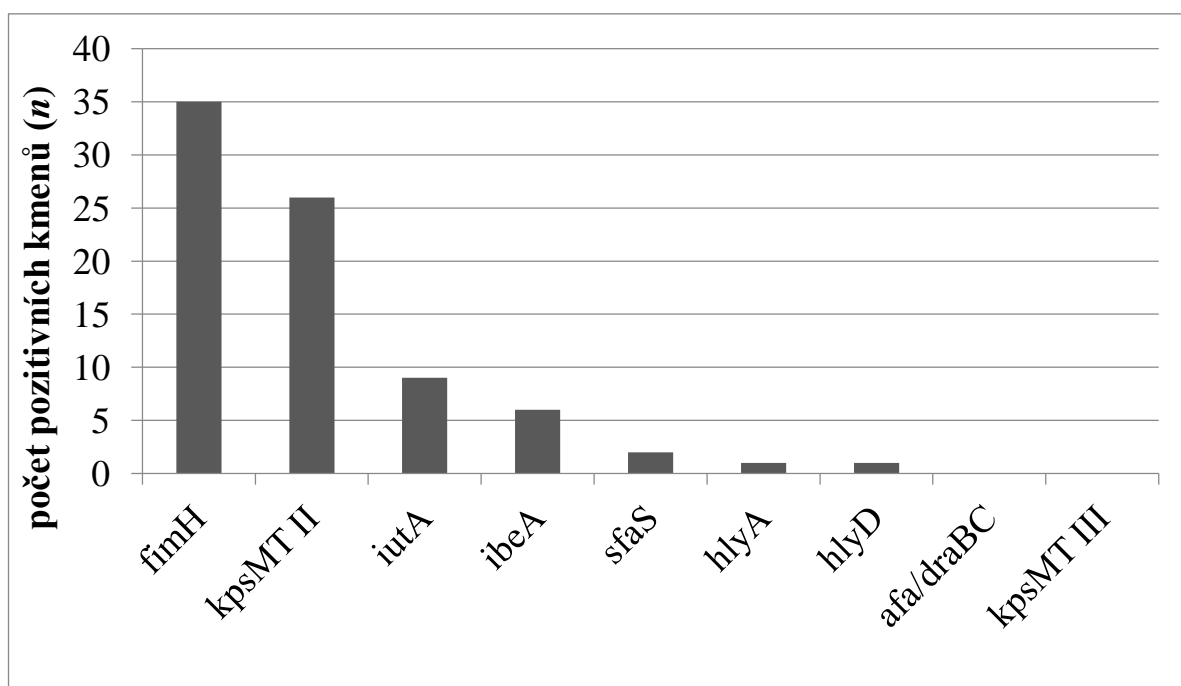
n- počet adherentních / neadherentních kmenů; *tsh*- teplotně senzitivní hemagglutinin; *CNF1*, *CNF2*- cytotoxický nekrotizační faktor; *papC*- pilus spojený s pyelonefritidou; *eaeA*- intimin; *iss*- zvýšená odolnost přežívání v séru; *iucD*- aerobaktin; *neuC*- K1 kapsulární polysacharid, *EinV*- invazinový gen; *Eagg*- gen kódující enteroagregativní mechanismus.

V této práci byla zaznamenána různá variabilita mezi tvorbou biofilmu a přítomností výše zmíněných faktorů virulence (Tabulka 10). Jiné studie uvádí pozitivní asociaci mezi schopností tvorby biofilmu a výskytem uro-virulentních genů (*papC*, *sfa/foc* a *CNF1*) [172]. Dále bylo prokázáno, že kmeny schopné tvorby biofilmu vykazují významně vyšší expresi genu kódující hemolyzin (*hly*) a vlastní fimbrie typu 1 (*fimH*) [173]. Někteří autoři zjistili pozitivní korelaci

mezi tvorbou biofilmu a výskytem fimbrií typu 1 (*fimH*), 3 a F9 u laboratorních kmenů *E. coli* [174, 175, 176]. V této práci bylo u izolátů z volně žijící zvěře dále provedeno testování přítomnosti devíti faktorů virulence, které mohou mít souvislost s tvorbou biofilmu (Obr. 20). U těchto kmenů byla prokázána přítomnost genu *hlyA* a *hlyD* pouze u dvou kmenů, zatímco gen *fimH* (fimbrie typu 1) byl přítomen u všech testovaných kmenů. Gen *kpsMT II* byl druhým nejčastěji detekovaným genem (26/35, 74 %), který byl přítomen u slabě i silně adherentních kmenů. Ve studii Naves *et al.* [169] byl podobně zaznamenán vysoký výskyt tohoto genu u biofilm-tvořících kmenů (80 %). Je tedy zřejmé, že gen kódující kapsulární polysacharid typu 2, je taktéž významným faktorem podílejícím se na schopnosti kmenů *E. coli* tvořit biofilm. Nefimbriální adheziny *afa/draBC* a *kpsMT III* nebyly přítomny u žádného kmene. Také Naves *et al.* [169] nepotvrdili přítomnost těchto genů u biofilm-tvořících kmenů.

Kromě významu při tvorbě biofilmu bylo také prokázáno, že tyto faktory virulence jsou často přítomné u extraintestinálních patogenních kmenů *E. coli*. Ve studii Johnson *et al.* [177] je molekulární definice ExPEC izolátů založena na přítomnosti 2 nebo více genů zahrnujících *papA*, *papC*, *sfa/foc*, *afa/dra*, *kpsMT II* a *iutA*. Na základě této definice lze 8 kmenů (2MB, 3 MB, 3 FB, 4MB, BO2, 1, 6, ZP) označit za extraintestinálně patogenní, jelikož patřily zejména do fylogenetické skupiny D a současně obsahovaly 2 a více těchto faktorů virulence, zejména *kpsMTII* a *iutA*. Kromě toho zahrnovaly také další faktory virulence typické pro ExPEC, jako například *iss*, *iucD*, *tsh* a *CNF1*. Toto zjištění znovu potvrzuje domněnku, že se jedná o kmeny s vysokým patogenním potenciálem.

Dále byla u kmenů *E. coli* zjištěna rozdílnost v zastoupení fylogenetických skupin v závislosti na tvorbě biofilmu (Tabulka 11). Většina silně adherentních kmenů byla zařazena do fylogenetické skupiny A, která je typická pro komenzální kmeny. Podobně tomu bylo i ve studii Skyberg *et al.* [122], ve které zjistili větší zastoupení silně adherentních kmenů v komenzálních fylogenetických skupinách. Kromě toho, byla u testovaných izolátů zjištěna souvislost mezi přítomností faktorů virulence a původem kmenů. Kuřecí izoláty obsahovaly více faktorů virulence v porovnání s izoláty z volně žijící zvěře, ačkoliv většina těchto kmenů patřila do komenzálních fylogenetických skupin A a B1 (viz. Tabulka 3).



Obr. 20: Výskyt faktorů virulence ExPEC spojených s tvorbou biofilmu u kmenů izolovaných z volně žijící zvěře. Geny kódující fimbrie typu 1 (*fimH*); kapsule typu 2 (*kpsMT II*); receptor aerobaktinu (*iutA*); invazi do mikrovaskulárních endoteliálních buněk (*ibeA*); S fimbrie (*sfaS*); hemolyzin (*hlyA,D*); afimbriální adheziny (*afa/draBC*) a kapsule typu 3 (*kpsMT III*).

Tab.11: Výskyt biofilm-produkujících kmenů v jednotlivých fylogenetických skupinách.

| kmeny                       | fylogenetické skupiny |    |          |    |          |    |          |    |
|-----------------------------|-----------------------|----|----------|----|----------|----|----------|----|
|                             | A                     |    | B1       |    | B2       |    | D        |    |
|                             | <i>n</i>              | %  | <i>n</i> | %  | <i>n</i> | %  | <i>n</i> | %  |
| silně adherentní (n= 23)    | 15                    | 65 | 3        | 13 | 3        | 13 | 2        | 9  |
| středně adherentní (n = 22) | 11                    | 50 | 6        | 27 | 1        | 5  | 4        | 18 |
| slabě adherentní (n= 26)    | 7                     | 27 | 12       | 46 | 3        | 12 | 4        | 15 |
| neadherentní (n=36)         | 20                    | 56 | 4        | 11 | 5        | 14 | 4        | 11 |

n- počet kmenů

#### 4.5 Bakteriocinogenotypizace kmenů *E. coli*

Bakteriocinogenie je bakteriální vlastnost udávající svým producentům značnou ekologickou výhodu, a to zejména v případě produkce kombinace několika kolicinů a mikrocinů.

V této práci byla kvalitativně vpichovým pokusem (Obr. 21) zjišťována produkce bakteriocinů u 129 izolátů, získaných z kuřecího masa, zvěřiny a zeleniny. U produkujících kmenů byla následně provedena PCR typizace pro určení konkrétního druhu bakteriocinu. Kmeny *E. coli* mohou produkovat jeden i více kolicinů nebo současně koliciny a mikrocinů [80]. V této práci byla u izolovaných kmenů zjišťována produkce 24 kolicinů (A, B, D, E1, E2, E3, E4, E5, E6, E7, E8, E9, Ia, Ib, K, L, M, N, U, Y, Js, 5, 10, S4) a 8 mikrocinů (B17, C7, J25, H47, V, L, M, E492).

#### 4.5.1 Vpichový pokus

Z celkového počtu 129 testovaných kmenů bylo zjištěno 55 (43 %) produkujících kmenů. Výskyt bakteriocinogenie u izolátů z potravin je podobný s bakteriocinogenií humánních izolátů. Šmarda a Obdržálek [178] zaznamenali u humánních izolátů *E. coli* pocházejících ze zdravého střeva 41,4 % produkčních kmenů. V jiné studii bylo zjištěno 226/411 (55 %) produkčních kmenů izolovaných ze stolice zdravých pacientů [179]. Gordon a O'Brien [85] zjistili u humánních izolátů *E. coli* produkčních kmenů méně (38 %). Výskyt produkčních kmenů byl zjištěn také u patogenních kmenů *E. coli*. Například O'Brien a Chambers [180] zaznamenali výskyt 43 % bakteriocinogenních izolátů *E. coli* způsobující infekce urinárního traktu (UTI). Podobně tomu bylo také ve studii Šmajse *et al.* [179], kde bylo vyhodnoceno 195/361 (54 %) produkčních kmenů *E. coli* izolovaných od pacientů s UTI. Oproti tomu, u hemolytických kmenů *E. coli* byl zaznamenán výskyt kolicinogenie nižší (22,4 %) [178]. Mezi počtem kolicinogenních kmenů u izolátů UTI v porovnání s kmeny získanými od zdravých pacientů nebyl shledán významný rozdíl.

#### 4.5.2 PCR typizace kolicinogenních kmenů *E. coli*

Bakteriocinogenotypizací byla u produkčních kmenů zjištěna přítomnost jednoho nebo více kolicinů či mikrocinů (viz. Příloha 1D, 4 a 5). Z celkového počtu produkčních kmenů, 28 kmenů (51 %) produkovalo pouze koliciny, 5 kmenů (9 %) produkovalo mikrocinů a 22 kmenů (40 %) produkovalo současně koliciny a mikrocinů. U 29 produkčních kmenů (53 %) byla zjištěna produkce tří a více bakteriocinů současně a byly tak označeny jako kmeny multiprodukční. Kmeny produkující jen jeden typ bakteriocinu mohou usmrtit pouze senzitivní buňky. Avšak pokud získá gen pro jiný typ bakteriocinu a stane se tak multiproducentem, může usmrtit nejen senzitivní buňky, ale i buňky monoprodukčního kmene [85]. Multiprodukce bakteriocinů je tedy pro bakterie výhodnější v boji proti konkurenčním druhům bakterií.

U izolátů z potravin patřily mezi nejčastěji detekované bakteriociny koliciny M, B, Y, E7, E8, Ia a Ib a mikrocinů mB17, mV a mC7 (Tabulka 12). Produkce kolicinů A, D, E4, L, JS, 5, 10, 5 a mikrocinů J25, H47 a E492 nebyla u testovaných produkčních kmenů potvrzena.

Nejčastěji se vyskytující koliciny B a M jsou uloženy na plazmidu nazývaný ColBM, který byl původně identifikován u kmenů UPEC. U kmenů APEC byl taktéž identifikován plazmid pAPEC-O1-ColBM, obsahující několik genů virulence prokazatelných u APEC (např. *iucD*, *iutA*, *iss* a *tsh*) včetně genů kódující produkci kolicinu B a M [144]. Je tedy zřejmé, že tyto koliciny mohou přispívat ke zvýšení virulence produkčního kmene.

Při porovnání s humánními izoláty byla u izolátů z potravin zjištěna rozdílnost v produkci určitých typů kolicinů a mikrocinů. Humánní izoláty *E. coli* nejčastěji produkují koliciny Ia, E1 a M a mikrocinů mH47, mM a mV [85].

Kolicin M je zodpovědný za inhibici syntézy peptidoglykanu. Koliciny E7 a E8 působí primárně vůči plazmidové i chromozomální DNA, kterou poškozují [181] a koliciny Ia, Ib a B působí na senzitivní bakterie tvorbou pórů v cytoplazmatické membráně. Mikrocin C7 působí bakteriocidně inhibicí aspartyl-tRNA syntetázy, čímž následně dochází k zastavení translace proteinů [182]. Mikrocin V působí na membrány bakteriálních buněk a inhibuje tvorbu iontových kanálů [183].

Koliciny B a M se řadí mezi jedny z nejčastěji produkovaných kolicinů kmenů *E. coli*, které jsou v mnoha případech produkovány jednou bakterií současně [85, 184]. V této práci byl u produkčních kmenů také často zaznamenán současný výskyt kolicinů E7 a E8. Současný výskyt dvou bakteriocinů je často dán jejich kódováním poblíž sebe na stejném plazmidu [85]. Dále bylo zaznamenáno, že při výskytu kolicinu Ia se často vyskytuje také kolicin Ib, protože geny těchto kolicinů vykazují vysokou sekvenční homologii [185]. V některých studiích byl také prokázán současný výskyt kolicinu Ia a mikrocinu V [85, 186], jelikož jsou často kódovány na stejném plazmidu [186]. V této práci většina kmenů produkujících mikrocin V taktéž současně produkovala kolicin Ia nebo Ib. Dále byl popsán současný výskyt kolicinu E1 a M, ale pouze za předpokladu, že se nevyskytoval kolicin B [85]. Toto zjištění však v této práci potvrzeno nebylo, jelikož se kolicin E1 vyskytoval současně s kolicinem M i za přítomnosti kolicinu B. Gordon a O'Brien [85] popisují také



současný výskyt kolicinů E1 s kolicinem Ia, pokud chybí mikrocin V. Výsledky práce toto tvrzení potvrdily. Kolicin E1 patří mezi často detekované bakteriociny u humánních izolátů i izolátů z potravin [85]. Kolicin E1 byl detekován u 11 kmenů, které navíc obsahovaly geny virulence typické pro extraintestinální kmeny *E. coli* (viz Příloha 4 a 5). Ve studii Šmajse *et al.* [179] je tento typ kolicinů označen za potenciální faktor virulence uropatogenních kmenů *Escherichia coli*. Je tedy zřejmé, že tento typ kolicinů je součástí faktorů virulence podílejících se na vzniku extraintestinálních infekcí.

Z dalších kolicinů často se vyskytujících u ExPEC je uváděn také kolicin Ia [179]. V této práci byla zjištěna produkce kolicinů Ia u 16 testovaných kmenů. Z mikrocinů se u produkčních kmenů nejčastěji vyskytoval mikrocin mV, mB17, mC7. U mikrocinu mV byla taktéž prokázána spojitost s virulencí [179].

Micenkova *et al.* (97) dále ukazují na rozdílnost v produkci bakteriocinů mezi komenzálními (33 %), intestinálně patogenními (37 %) a extraintestinálními kmeny (kódujících S-fimbrie *sfa*, P fimbrie *pap*, geny pro syntézu aerobaktinu *iucC*,  $\alpha$ -hemolyzin *hly* a cytotoxický nekrotizační faktor *cnf1*), u kterých byla prokázána bakteriocinogenie vyšší (až 74 %). Také v této práci byla zjištěna produkce bakteriocinů převážně u kmenů vlastnících geny virulence typické pro ExPEC (viz. Příloha 4 a 5).

Na základě uvedených výsledků lze u bakterií zhodnotit produkci bakteriocinů jako ekologickou výhodu, díky jejich úzkému spektru inhibiční aktivity proti příbuzným bakteriálním druhům, ale také jako vlastnost zvyšující patogenní potenciál.

Tab. 12: Zastoupení jednotlivých bakteriocinů produkovaných kmeny *E. coli*.

| <b>bakteriociny</b> | <b>typ</b> | <b>n- izoláty z kuřat</b> | <b>n- izoláty ze zvířiny</b> | <b>celkem</b> |
|---------------------|------------|---------------------------|------------------------------|---------------|
| kolicinů            | B          | 5                         | 14                           | 19            |
|                     | E1         | 6                         | 5                            | 11            |
|                     | E2         | 3                         | 0                            | 3             |
|                     | E3         | 0                         | 0                            | 1             |
|                     | E5         | 2                         | 0                            | 2             |
|                     | E6         | 1                         | 0                            | 1             |
|                     | E7         | 13                        | 0                            | 13            |

Tab. 12: Pokračování

| <b>bakteriociny</b> | <b>typ</b> | <b><i>n</i>- izoláty z kuřat</b> | <b><i>n</i>- izoláty ze zvěřiny</b> | <b>celkem</b> |
|---------------------|------------|----------------------------------|-------------------------------------|---------------|
| koliciny            | E8         | 14                               | 0                                   | 14            |
|                     | E9         | 1                                | 0                                   | 1             |
|                     | Ia         | 8                                | 8                                   | 16            |
|                     | Ib         | 4                                | 10                                  | 14            |
|                     | K          | 0                                | 1                                   | 1             |
|                     | M          | 6                                | 15                                  | 21            |
|                     | N          | 0                                | 1                                   | 1             |
|                     | U          | 1                                | 1                                   | 2             |
|                     | Y          | 6                                | 10                                  | 16            |
| mikrociny           | mB17       | 0                                | 12                                  | 12            |
|                     | mC7        | 4                                | 3                                   | 7             |
|                     | mV         | 9                                | 2                                   | 11            |
|                     | mL         | 1                                | 0                                   | 1             |
|                     | mM         | 1                                | 0                                   | 1             |
|                     | cea2       | 0                                | 2                                   | 2             |

*n*- počet kmenů produkujících daný typ bakteriocinu

V této práci byla u testovaných izolátů zjištěna rozdílnost v produkci bakteriocinů v závislosti na původu kmenů. U kuřecích izolátů bylo zjištěno 38/70 (51 %) produkčních kmenů, z toho 13 kmenů bylo multiprodukčních. Dva kmeny (náležící do fylogenetické skupiny B2) produkovaly 5 kolicinů a kmen 93 (z fylogenetické skupiny A) produkoval celkem 7 bakteriocinů. U produkčních izolátů z kuřat byla nejčastěji zjišťována produkce kolicinů E7, E8, M a Ia a mikrocínů mC7 a mV (Tabulka 12). Tyto produkční kmeny patřily zejména do fylogenetické skupiny A a B1.

U izolátů ze zvěřiny bylo pozorováno méně produkčních kmenů 17/40 (34 %), avšak téměř všechny kmeny byly multiprodukční (16/17) (viz. Příloha 5). Čtyři kmeny produkovaly pět bakteriocinů, sedm kmenů produkovalo šest bakteriocinů a jeden kmen (3MB) produkoval dokonce 9 bakteriocinů současně. Tento kmen, zařazený do fylogenetické skupiny D, je kromě multiprodukce bakteriocinů zajímavý také tím, že vlastní několik faktorů virulence, včetně genu kódujícího produkci termostabilního toxinu ST1. Dále tento kmen disponuje rezistencí k několika skupinám antibiotik a byla u něj také prokázána schopnost tvorby biofilmu.

V této práci bylo pozorováno, že produkční kmeny volně žijící zvěře patřily zejména do fylogenetické skupiny D v porovnání s produkčními kmeny z kuřat, které náležely zejména do skupiny A. U izolátů z kuřat byly do skupiny D zařazeny pouze tři kmeny, u kterých produkce bakteriocinů nebyla prokázána. Ve studii Gordon a O'Brien [85] byly bakteriocinogenní kmeny zařazeny převážně do fylogenetické skupiny B2, jelikož se jednalo o humánní izoláty obsahující faktory virulence kmenů ExPEC a je tedy zřejmé že produkce bakteriocinů přispívá ke zvýšení virulence produkčního kmene.

U produkčních kmenů z volně žijící zvěře se nejčastěji vyskytovaly koliciny B a M, dále koliciny Y, Ia a Ib a mikrocin mB17, který u izolátů z kuřat nebyl prokázán u žádného kmene. Zajímavé je také zjištění, že koliciny skupiny E (zejména E7 a E8) byly produkovány pouze produkčními kmeny z kuřat, kdežto u izolátů ze zvěře byla zjištěna produkce pouze kolicinu E1.

V této práci bylo dále zjištěno, že bakteriocinogenní byly pouze veterinární izoláty. U izolátů ze zeleniny nebyla produkce bakteriocinů prokázána u žádného z izolovaných kmenů. Je zřejmé, že je jedná o izoláty humánního původu, které zrovna testované koliciny či mikrocinu neprodukují.

Mezi nejčastěji detekované mikrocinu patří u humánních izolátů mikrocin H47 [85], jehož přítomnost nebyla v této práci zjištěna u žádného produkčního kmene. Naproti tomu mikrocin B17, který byl v této práci detekován nejčastěji, byl u humánních izolátů nalezen pouze u 1 % produkčních kmenů [85]. U mikrocinů bylo dále zjištěno, že jsou méně často produkovány multirezistentními kmeny [187], což bylo v této práci potvrzeno u mikrocinu mC7 a mB17. Mikrocin mV byl zjištěn také u multirezistentních kmenů.

V porovnání s jinými studii, zabývající se bakteriocinogenií humánních izolátů, je u drůbežích izolátů a fekálních izolátů volně žijící zvěře multiprodukce kolicinů a mikrocinů zřejmě rozšířeným jevem [85].

#### **4.5.3 Inhibiční vliv bakteriocinů kmenů *E. coli* izolovaných z potravin**

V této práci byl vpichovým pokusem sledován inhibiční vliv bakteriocinů produkováných 18 kmeny *E. coli* izolovanými z potravin na indikátorové kmeny sbírkových kmenů *E. coli*, *Shigella* a *Salmonella* (Příloha 1F) a jiné gramnegativní bakterie (Příloha 1E), z nichž 3 patří do rodu *Aeromonas*, 1 do rodu *Citrobacter*, 5 do rodu *Enterobacter*, 7 do rodu *Klebsiella*, 1 do rodu *Leclercia*, *Moraxella*, *Pantoea* a *Proteus* sp., 3 do rodu *Pseudomonas*, 3 do rodu *Serratia* a 1 do rodu *Yersinia*. Produkce bakteriocinů se projevila vytvořením

inhibiční zóny kolem místa vpichu narostlého produkčního kmene (Obr. 21). Seznam kmenů použitých pro tento experiment je uveden v Příloze č. 1D.

Nejsilnější biologická aktivita bakteriocinů byla zjištěna u kmene 225, který inhiboval jak všechny indikátorové kmeny *E. coli*, tak i jiné testované indikátorové mikroorganismy (*S. sonnei* 17, *Shigella boydii* U8, *Shigella flexneri*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis, *Salmonella* sp. 22W, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium a *Salmonella* sp. 20W) (viz. Příloha 8). Tento kmen produkoval koliciny E1, B, M, Ia, Ib a mikrocin mB17. Vysoký inhibiční efekt kmene 225 ukazuje na to, že multiprodukce bakteriocinů umožňuje produkčním kmenům zvýšenou selekci příbuzných druhů bakterií, než kmenům monoprodukčním. Také Budic *et al.* [187] ukazují na zvýšený inhibiční efekt multiprodukčních kmenů.

U testovaných izolátů byl nejčastěji pozorován inhibiční účinek bakteriocinů na indikátorové kmeny *E. coli*, *S. sonnei* 17, *Shigella boydii* U8 a *Shigella flexneri* (Příloha 8). Kmeny 107W, 222, 224, 225, 229, 230 vykazovaly navíc inhibiční účinek na některé druhy Salmonel, zejména sérovar Enteritidis. Dále bylo zjištěno, že u kmene *E. coli* 125W je citlivost na testované bakteriociny velmi podobná sbírkovým indikátorovým kmenům. Tudíž by se tento kmen dal používat jako indikátorový kmen pro detekci bakteriocinů *E. coli*.

*Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Enteritidis byla inhibována kombinací kolicinů B, M s mikrocinem mB17 (Tabulka 13). U mikrocinu mB17 bylo zjištěno, že má potenciální antibakteriální aktivitu proti širokému spektru gramnegativních bakterií zahrnujících rody *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* a *Pseudomonas* [188].

Tab.13: Inhibiční účinek produkčních kmenů *E. coli* na kmeny rodu *Salmonella*.

| producent | bakteriociny        | počet citlivých/testovaných kmenů rodu <i>Salmonella</i> |
|-----------|---------------------|--|
| 225       | E1, B,M,Ia/Ib,mB17  | 5/6  |
| 229       | B,M,Ia/Ib,mB17      | 2/6  |
| 224       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV | 2/6  |
| 222       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV | 2/6  |
| 230       | B,M,mB17            | 1/6  |

Zajímavým výsledkem byl dále inhibiční účinek na bakterii *Aeromonas hydrophila* multibakteriocinogenními kmeny (222, 224, 225, 229, 93). Bakterie

rodu *Moraxella* byla inhibována taktéž multibakteriocinogenními kmeny 224, 225 a 229 (viz. Příloha 8). Mikrocin C7 by měl mít inhibiční účinky kromě rodů *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* a *Yersinia*, také na rod *Proteus* [188], což se v této práci při testu na jeden izolát rodu *Proteus* nepotvrdilo. Naopak byl izolát tohoto rodu (a také dalších čtyř testovaných kmenů z rodů *Leclercia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*) nejvíce citlivý na multibakteriocinogenní kmen 225, který ve svém genomu taktéž kóduje mikrocin B17. Je tedy zřejmé, že mikrocin B17 je jedním z bakteriocinů u tohoto kmene, který velmi rozšiřuje jeho inhibiční spektrum.

Multiprodukce bakteriocinů přináší producentům selekční výhodu oproti konkurenčním druhům, kdy baktericidní účinek je zacílen na blízké příbuzné kmeny stejného druhu [187]. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že největší inhibiční efekt na gramnegativní bakterie izolované z potravin mají právě multibakteriocinogenní kmeny *E. coli*, zejména kmen 225. Účinnější na tuto skupinu bakterií se jevily mikrocininy, z nichž nejefektivnější inhibiční účinek byl prokázán u kmenů, produkujících mikrocin B17.

Nejvyšší inhibiční účinek byl prokázán na indikátorové kmeny stejného druhu *E. coli* a příbuzný rod *Shigella*. Inhibiční efekt produkčních kmenů na ostatní gram-negativní bakterie byl nižší a 11 indikátorových kmenů bylo dokonce rezistentních na inhibiční účinek všech testovaných produkčních kmenů (viz. Příloha 8). Na základě získaných výsledků lze zhodnotit, že kmeny produkující jeden či více kolicinů či mikrocinů s baktericidním účinkem jsou schopny inhibice řady konkurenčních druhů bakterií. Multiprodukce bakteriocinů je tedy pro produkční bakterie výhodnější. Tyto testované produkční kmeny jsou účinné zejména na řadu příbuzných kmenů *E. coli*, ale inhibiční efekt byl potvrzen také na jiné druhy bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Ačkoliv byl prokázán inhibiční účinek kolicinů a mikrocinů na růst intestinálních a uropatogenních kmenů *E. coli* [189], jiné studie uvádějí některé bakteriociny jako potenciální faktory virulence [125, 179, 190]. V této práci bylo zjištěno, že testované kmeny produkovaly kromě jiných, také koliciny E1, Ia a mikrocininy (mV) současně se vyskytující s faktory virulence ExPEC a mohou být tak považovány za potenciální faktory zvyšující virulenci daných kmenů.



*Obr. 21. Vpichový pokus. Inhibiční efekt bakteriocinů se projevuje jako průzračná zóna růstu indikátorového kmene kolem vpichu.*

## 5. SOUHRN VÝSLEDKŮ

Výskyt *E. coli* byl zjištěn v různých druzích potravin. Nejvyšší četnost kmenů *E. coli* byla zaznamenána v potravinách živočišného původu, zejména v kuřecím mase, kde byla kultivací na Endův agar a následnou identifikací Enterotestem 24 potvrzena přítomnost *E. coli* téměř u všech testovaných vzorků. Taktéž u ulovené volně žijící zvěře byla zjištěna častá incidence kmenů *E. coli*. U izolátů ze zeleniny byl v porovnání s ostatními druhy potravin zaznamenán výskyt *E. coli* nižší, kdy ze 105 vzorků bylo 15 pozitivních na přítomnost kmenů *E. coli*. Po izolaci kmenů bylo provedeno zařazení izolátů do fylogenetických skupin a další kroky charakterizace, zahrnující stanovení antibiotické rezistence, zjištění přítomnosti faktorů virulence, stanovení schopnosti tvorby biofilmu a zjišťování produkce bakteriocinů.

### 5.1 Charakterizace kmenů izolovaných z kuřecího masa

Kuřecí izoláty (n=70) byly zařazeny převážně do fylogenetických skupin A a B1, které se běžně vyskytují u fekálních komenzálních izolátů z drůbeže a kuřecího masa. Jejich výskyt je ale také často zaznamenáván u extraintestinálních kmenů APEC.

U těchto kmenů byla diskovou difúzní metodou potvrzena 64% rezistence k jednomu či více antibiotikům, z toho 29 % kmenů bylo multirezistenčních. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána zejména k aminopenicilinům (ampicilin, amoxicilin/klavulanová kyselina) a pouze u této skupiny izolátů byla zjištěna rezistence k chloramfenikolu a ciprofloxacinu, jejíž výskyt může mít souvislost s častým užíváním těchto antibiotik v chovech drůbeže.

U kmenů z kuřecího masa byla dále prokázána přítomnost různých faktorů virulence, určující míru patogenity jednotlivých kmenů. U těchto izolátů se nejčastěji vyskytovaly samostatně nebo současně geny *iucD*, *iss*, a *tsh*, které jsou typické pro APEC. Aviárně patogenní *E. coli* patří mezi extraintestinální patogenní kmene způsobující ptačí kolibacilózu. Kromě toho byla u těchto kmenů prokázána genotypová podobnost s humánními kmeny UPEC, tudíž je zřejmé, že kuřecí maso může být zdrojem ExPEC kmenů schopných vyvolat u člověka extraintestinální infekce. Kmeny izolované z kuřecího masa lze tedy považovat za potenciální patogeny.

U kmenů izolovaných z kuřat byla dále prokázána vysoká schopnost tvorby biofilmu. Z celkového počtu testovaných kuřecích izolátů vykazovalo schopnost tvorby biofilmu 71 % kmenů, zahrnujících 26 % silně a 27 % středně

adherentních kmenů. Přítomnost kmenů se schopností adherence na potravinách může mít negativní vliv na hygienu výrobních provozů a produktů v důsledku tvorby nesnadno eliminovatelných biofilmů.

U izolátů z kuřat bylo zaznamenáno 34 bakteriocinogenních kmenů, z nichž 12 kmenů se vyznačovalo multiprodukcí. Multiprodukce je pro produkční bakteriální kmeny ekologickou výhodou umožňující selekci konkurenčních bakterií stejného nebo příbuzného rodu. Tyto bakteriocinogenní kmeny produkovaly nejčastěji koliciny skupiny E (nejčastěji E7 a E8), kolicin M a mikrocín mV. Bylo zaznamenáno, že některé bakteriociny se vyskytují současně s faktory virulence. Je tedy možné, že tyto bakteriociny mohou být považovány za faktory podílející se na zvýšení virulence daného kmene.

## 5.2 Charakterizace kmenů izolovaných z volně žijící zvěře

Izoláty z volně žijící zvěře (n=35) byly zařazeny převážně do fylogenetické skupiny D, indikující intestinální patogenní nebo extraintestinální kmeny *E. coli*, a do skupiny A, která se vyskytuje hlavně u komenzálních kmenů, ale její výskyt je také možný u intestinálních či extraintestinálních patogenů. Izoláty z volně žijící zvěře lze na základě zařazení do fylogenetických skupin považovat za kmeny s vyšším patogenním potenciálem.

Ačkoliv volně žijící zvěř není vystavena přímému kontaktu s antimikrobiálními látkami, v této práci bylo zjištěno 60 % rezistentních kmenů, z nichž 26 % bylo multirezistentních. Podobně jako u izolátů z kuřecího masa byla nejvyšší rezistence zaznamenána na amoxicilin/klavulanovou kyselinu a ampicilin. U těchto kmenů byla dále prokázána přítomnost genů kódující rezistenci k aminoglykosidům a beta-laktamovým antibiotikům. Navíc byla u některých kmenů potvrzena přítomnost genů rezistence kódujících ESBL. Výsledky práce tak potvrzují možnost šíření genů rezistence prostředím. Podle zjištěné vysoké prevalence rezistentních kmenů může být také volně žijící zvěř považována za rezervoár genů rezistence.

U izolátů ze zvěřiny byla zjištěna přítomnost několika typů faktorů virulence. Nejčastěji byl detekován gen *EinV*, typický pro intestinální patogenní kmeny enteroinvazivní *E. coli* a kolonizačně nerotizační faktor *CNF1* vyskytující se převážně u extraintestinálních kmenů uropatogenní *E. coli*. U některých kmenů byla navíc prokázána přítomnost genů kódujících termolabilní a termostabilní toxin produkovaný kmeny ETEC a další faktory virulence udělující kmenům vyšší patogenní potenciál.



Ačkoliv tyto izoláty disponovaly vyšším zastoupením faktorů virulence, v porovnání s izoláty z kuřecího masa byla u kmenů z volně žijící zvěře prokázána nižší schopnost tvorby biofilmu (celkem 60 % kmenů), zahrnující 14 % silně a 9 % středně adherentních kmenů. Tato rozdílnost může souviset s nižším počtem testovaných kmenů.

U izolátů z volně žijící zvěře bylo bakteriocinotypizací zjištěno 17 bakteriocinogenních kmenů (34 %) produkujících nejčastěji koliciny B, M, Y a mikrocin mB17. Zajímavým zjištěním byla multiprodukce kmenů, kdy 16 z 17 produkčních kmenů produkovalo 5 až 9 bakteriocinů současně, což pro bakterie přináší selekční výhodu v boji proti konkurenčním druhům bakterií.

### **5.3 Charakterizace kmenů izolovaných ze zeleniny**

Izoláty ze zeleniny (n=15) byly zařazeny převážně do fylogenetických skupin B2 a D, které jsou typické zejména pro humánní extraintestinální kmeny *E. coli*. Kmeny izolované ze zeleniny lze tedy považovat za indikátory fekální kontaminace, které mohou zeleninu kontaminovat během zpracování či jiné manipulaci.

U kmenů ze zeleniny byla prokázána fenotypová rezistence k ampicilinu a cefalosporinovým antibiotikům- cefalotinu a ceftazidimu. Dále byla u těchto kmenů genotypicky potvrzena přítomnost genů kódujících rezistenci k beta-laktamovým antibiotikům, včetně genů kódujících produkci ESBL. Lze tedy konstatovat, že izoláty získané ze zeleniny mohou být zdrojem ESBL kmenů. Bakterie s beta-laktamázovou aktivitou mohou pro člověka představovat určité zdravotní riziko, jelikož se tyto bakterie mohou ke člověku dostat prostřednictvím potravinového řetězce. Riziko možnosti přenosu genů rezistence z potravin je o to větší u zeleniny, která se konzumuje převážně v syrovém stavu a bakterie tak nejsou dostatečně eliminovány. Proto by neměla být podceňována důkladná hygiena při manipulaci se zeleninou.

Z faktorů virulence byl u izolátů ze zeleniny nejčastěji detekován, tak jako u volně žijící zvěře, invazinový gen *EinV* a cytotoxický nekrotizační faktor *CNF1*, typický pro extraintestinální kmeny uropatogenního původu. Lze tedy usoudit, že i tyto kmeny vlastní patogenní potenciál. U kmenů ze zeleniny nebyl prokázán výskyt bakteriocinogenie.

## 6. ZÁVĚR

V této práci byla provedena charakterizace kmenů izolovaných z různých druhů potravin za účelem vyhodnocení potenciálního zdravotního rizika spojeného s konzumací potravin obsahujících rezistentní a potenciálně patogenní kmeny *E. coli*. Izolací kmenů *E. coli* bylo zjištěno, že se tato bakterie hojně vyskytuje zejména v kuřecím mase, ale také zvěřině. Její přítomnost byla zaznamenána i v zelenině.

Zařazením kmenů do fylogenetických skupin a detekcí faktorů virulence byl u těchto kmenů zjištěn patogenní potenciál. Izoláty z kuřat byly převážně zařazeny do kmenových skupin A a B1. Tyto skupiny však obsahovaly faktory virulence typické pro avinárně patogenní *E. coli*, tudíž lze kmeny považovat za zdroj faktorů virulence extraintestinálních patogenů. U izolátů z volně žijící zvěře byla nejvíce zastoupena fylogenetická skupina D a A, taktéž s hojným zastoupením faktorů virulence typických zejména pro extraintestinální (APEC), ale také intestinální patogeny. Většina kmenů ze zeleniny byla zařazena do fylogenetické skupiny B2, indikující extraintestinální kmeny humánního původu.

Celkem 57 % kmenů obsahovalo jeden nebo více různých faktorů virulence. U izolátů z kuřat se nejčastěji vyskytovaly faktory virulence ze skupiny toxinů (*tsh*), sideroforů (*iucD*) a faktor zvyšující přežívání v séru (*iss*), které jsou typické pro extraintestinální kmeny APEC a UPEC. U izolátů z volně žijící zvěře a zeleniny byl nejčastěji detekován faktor *EinV*, který je u kmenů *E. coli* zodpovědný za kódování enteroinvazivního mechanismu, který umožňuje bakteriím adherenci a invazi do hostitelské buňky. U této skupiny izolátů patřil k nejvíce frekventovaným faktorům virulence také cytotoxický nekrotizační faktor *CNF1*, jehož výskyt je spojen s uropatogenními kmeny *E. coli*. Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že kmeny *E. coli* izolované z potravin představují potenciální zdroj patogenních kmenů, které jsou schopny u člověka vyvolat extraintestinální infekce.

Přítomnost rezistentních bakterií v potravinách je v současné době velmi obávaným problémem, v důsledku narůstající rezistence patogenních kmenů, které jsou velmi často izolovány z hospodářských zvířat, zejména drůbeže. V této práci byla potvrzena vysoká prevalence rezistentních kmenů z kuřat (64 %), včetně kmenů multirezistentních (29 %). Nejvyšší rezistence byla zaznamenána na antibiotika ampicilin a amoxicilin/klavulanovou kyselinu,

kteřá jsou hojně používána v chovech drůbeže k prevenci a profylaxi bakteriálních infekcí. Alarmující je také zjištění vysoké rezistence u izolátů získaných ze zvěřiny (60 %), u nichž byla navíc prokázána přítomnost genů kódujících produkci ESBL. Výskyt rezistence u volně žijící zvěře tak potvrzuje možnost šíření genů rezistence prostředím. Rezistentní kmeny byly izolovány také z různých druhů zeleniny. Je tedy zřejmé, že potraviny představují zdroj rezistentních kmenů, které se ke člověku mohou šířit prostřednictvím konzumace nebo přímým kontaktem s potravinami. Toto riziko hrozí zvláště při konzumaci kontaminované syrové zeleniny bez předchozí tepelné úpravy.

U 68 % kmenů izolovaných z kuřecího masa a zvěřiny byla prokázána schopnost tvorby biofilmu. Tato vlastnost umožňuje bakteriím zvýšenou perzistenci v prostředí a odolnost k antimikrobiálním látkám. Korelace mezi přítomností faktorů virulence a tvorbou biofilmu nebyla v této práci potvrzena. Schopnost adherence se lišila mezi oběma skupinami testovaných kmenů, kde kuřecí izoláty vykazovaly vyšší schopnost tvorby biofilmu. Biofilmy na surovinách či v potravinářských provozech mohou být zdrojem patogenních mikroorganismů, které mohou sekundárně kontaminovat potravinářské produkty.

U izolátů z potravin bylo zjištěno celkem 46 bakteriocinogenních kmenů. Genotypizací byla u kmenů zjištěna produkce jednoho či více kolicinů nebo mikrocinů a u 18 % kmenů byla potvrzena multiprodukce, zejména u kmenů ze zvěřiny. Bakteriocinogenie uděluje bakteriím ekologickou výhodu v boji proti konkurenčním bakteriálním druhům. Tuto významnou vlastnost využívají zejména bakterie v biofilmech, ale také střevní kmeny, které produkcí bakteriocinů vyselektují konkurenční mikroflóru. Produkční kmeny mohou díky inhibičnímu účinku bakteriocinů přežít v prostředí a dále se množit. Vyšší produkce byla zaznamenána u kmenů s vlastnostmi ExPEC, tudíž lze bakteriociny považovat za faktory podílející se na zvýšení virulence.

Na základě získaných výsledků bylo zjištěno, že kmeny *E. coli* izolované z potravin lze považovat za potenciální patogeny, které mohou u člověka za určitých podmínek vyvolat onemocnění. Kromě toho tyto potraviny představují zdroj rezistentních kmenů, které se mohou šířit prostředím a ke člověku dostat prostřednictvím konzumace či manipulace. Na závěr lze konstatovat, že jednotlivé kroky charakterizace mohou přispět k hlubšímu poznání patogenních vlastností této bakterie a tím zhodnotit potenciální riziko spojené s konzumací potravin.

## 7. PŘÍNOS PRO VĚDU A PRAXI

Bakterie *Escherichia coli* je běžnou součástí gastrointestinálního traktu člověka a teplokrevných živočichů, kde přispívá k celkové rovnováze střevní mikroflóry. Kromě střevního traktu je *E. coli* také hojně rozšířená v prostředí včetně potravin, kde její výskyt indikuje fekální kontaminaci. *E. coli* patří mezi oportunní patogeny, které mohou za specifických podmínek vyvolat u člověka intestinální nebo extraintestinální infekce. Navíc tyto kmeny mohou být zdrojem rezistence, která se může šířit prostřednictvím potravinového řetězce. Zvláště nebezpečné jsou infekce způsobené rezistentními patogenními kmeny produkující beta-laktamázy širokého spektra, jejichž léčba je velmi obtížná. Zvýšený patogenní potenciál mají kmeny se schopností tvorby biofilmu a kmeny bakteriocinogenní, které disponují zvýšenou schopností přežít v prostředí. Charakterizace kmenů *E. coli* je tedy důležitá pro posouzení významných vlastností udělující kmenům patogenní potenciál a na základě kterých lze zhodnotit vliv kmenů přítomných v potravinách na lidské zdraví.

Přínos pro vědu:

- jednotlivými kroky charakterizace byly důkladně prostudovány fenotypové i genotypové vlastnosti kmenů *E. coli* z potravin;
- mapováním výskytu antibiotické rezistence a faktorů virulence u 120 kmenů izolovaných z potravin byly získány nové poznatky o rezistenci a patogenitě bakterie *E. coli*;
- byl porovnán výskyt rezistence u izolátů z kuřecího masa a volně žijící zvěře;
- u izolátů z volně žijící zvěře byla genotypizací potvrzena možnost šíření genů rezistence prostředím;
- bylo provedeno zařazení kmenů *E. coli* do čtyř hlavních fylogenetických skupin za účelem zjištění původu a patogenního potenciálu izolovaných kmenů;
- u kmenů byla zjištěna korelace mezi přítomností faktorů virulence a původem izolátů za účelem posouzení, které izoláty z potravin mohou mít vyšší patogenní potenciál;
- u kmenů z kuřecího masa a zvěřiny bylo součástí charakterizace také stanovení schopnosti tvorby biofilmu;
- u kmenů byla sledována souvislost mezi schopností tvorby biofilmu s výskytem faktorů virulence za účelem zjištění, jaké geny virulence mají vliv na tvorbu biofilmu;

- u izolátů byla zhodnocena produkce bakteriocinů a následně provedena bakteriocinotypizace produkčních kmenů.

#### Přínos pro praxi:

- výsledky antibiotické rezistence ukazují na vysokou prevalenci rezistentních kmenů u izolátů z kuřat, která přímo souvisí s užíváním antibiotik v chovech drůbeže;
- výskyt rezistentních kmenů v České republice je srovnatelný s jinými státy Evropské unie;
- získané výsledky dále potvrzují možnost šíření genů rezistence potravinami a prostředím, jelikož výskyt rezistence byl zaznamenán také u kmenů izolovaných z volně žijící zvěře;
- u izolátů ze zvěřiny a zeleniny byl prokázán výskyt ESBL kmenů, což značí riziko šíření těchto multirezistentních kmenů prostřednictvím potravinového řetězce;
- u kmenů izolovaných z potravin a volně žijící zvěře byl potvrzen výskyt faktorů virulence charakteristických pro extraintestinální patogenní kmeny, zejména aviárně patogenní *E. coli*;
- kmeny izolované z potravin představují zdroj patogenních kmenů, které jsou schopny u člověka vyvolat extraintestinální infekce;
- u kmenů izolovaných z potravin byla zjištěna schopnost tvorby biofilmu. Tyto kmeny tak mohou mít negativní vliv na hygienu výrobních zařízení potravinářských provozů;
- bylo zjištěno, že kmeny komenzálních skupin A a B1, které se nejvíce vyskytovaly u izolátů z kuřecího masa, zahrnovaly faktory virulence extraintestinálních patogenních kmenů *E. coli* (APEC) a mohou být tedy také považovány za potenciální patogeny;
- zařazení kmenů do fylogenetických skupin se jeví pouze jako pomocná charakteristika sloužící k zhodnocení patogenního potenciálu kmenů, jelikož korelace mezi přítomností faktorů virulence a zařazením do fylogenetických skupin nebyla u kmenů z potravin prokázána;
- zařazením kmenů do fylogenetických skupin lze určit humánní/veterinární původ kmenů;
- na základě získaných výsledků byl zhodnocen význam a potenciální nebezpečí přítomnosti *E. coli* v potravinách a prostředí;
- charakterizací kmenů bylo zhodnoceno riziko výskytu *E. coli* v potravinách a byl zjištěn možný negativní vliv pro konzumenta. Tato práce tedy

upozorňuje v rámci zvýšení bezpečnosti potravin a zamezení šíření antibiotické rezistence na nutnost zvýšené pozornosti při kulinářské úpravě a zajištění dostatečného tepelného opracování kuřecího masa a masa z volně žijící zvěře. Dále klade také důraz na řádné omytí zeleniny tekoucí vodou a celkové dodržování hygienických zásad.

## 8. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] SCHULZE, Jürgen, SCHIEMANN, Martina a Ulrich SONNENBORN. 120 years of *E. coli*, its importance in research and medicine. Alfred-Nissle-Gesellschaft, Hagen, 2006. 9-50 s. ISBN 3-9811198-1-9.
- [2] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie speciální. Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902896-6-5.
- [3] KUHNERT, Peter, Patrick BOERLIN a Joachim FREY. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, roč. 24, č. 1, s. 107-117. ISSN 1574-6976.
- [4] VIAZIS, S. a F. DIEZ-GONZALES. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: The Twentieth Century's Emerging Foodborne Pathogen: A Review. *Advances in Agronomy*. 2011, roč. 111, s. 1–50. ISSN 00652113.
- [5] BEDNÁŘ, Marek. Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie. Praha: Marvil, 1996, s. 137-155. ISBN 80-238-0297-6.
- [6] KAPER, James B., James P. NATARO a Harry L. T. MOBLEY. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004, roč. 2, č. 2, s. 123-140. ISSN 1740-1526.
- [7] MAINIL, Jacques a S. Vant BOSS. Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: Les adhésines et facteurs de colonisation, *Annales de Médecine Vétérinaire*. 2003, roč. 147, s. 105–126. ISSN 1781-3875.
- [8] MAINIL, Jacques. *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 2013, roč. 152, č. 1-2, s. 2-12. ISSN 01652427.
- [9] NATARO, James P. a James B. KAPER. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1998, roč. 11, č. 1, s. 142-201. ISSN: 1098-6618.
- [10] DE RYCKE, J., J. F. GUILLOT a R. BOIVIN. Cytotoxins in non-enterotoxigenic strains of *Escherichia coli* isolated from feces of diarrheic calves. *Veterinary Microbiology*. 1987, roč. 15, č. 1-2, s. 137-150. ISSN 03781135.

- [11] DHO-MOULIN M., a J. M. FAIRBROTHER. Avian Pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Research*. 1999, roč. 30, č. 2-3, s. 299-316. ISSN 1297-9716.
- [12] JOHNSON, James R. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 1991, roč. 4, s. 80-128. ISSN 1098-6618.
- [13] VOTAVA, Miroslav. Lékařská mikrobiologie obecná. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [14] MELLIES, Jay. L., BARON, Alex. M. S. a Anna M. CARMONA. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Virulence Gene Regulation. *Infection and Immunity*. 2007, roč. 75, č. 9, s. 4199-4210. ISSN: 1098-5522.
- [15] BENEŠ, Jiří a Ladislav MACHALA. Dobrý sluha, ale zlý pán. Aneb Poučení z epidemie *Escherichia coli* EHEC O104:H4. *Vesmír* [online]. 2011, roč. 90, s. 484-487 [cit. 2016-02-01]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/dobry-sluha-ale-zly-pan>.
- [16] KARMALI, M. A. Infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*. 1989, roč. 2, s. 15-38. ISSN: 1098-6618.
- [17] YU, J. a J. B. KAPER. Cloning and characterization of the eae gene of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Molecular Microbiology*. 1992, roč. 6, č. 3, s. 411-417. ISSN 0950-382x.
- [18] RASHID, Mohd, Sanjay KOTWAL, M. MALIK a Maninder SINGH. Prevalence, genetic profile of virulence determinants and multidrug resistance of *Escherichia coli* isolates from foods of animal origin. *Veterinary World*. 2013, roč. 6, č. 3, s. 139-142. ISSN 0972-8988.
- [19] KAPER, James B. a Alison D. O'BRIEN. *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxin-producing *E. coli* strains. Washington, DC: ASM Press, 1998, xxii, 465 p. ISBN 1555811299.
- [20] DE RYCKE, J., A. MILON, a E. OSWALD. Necrotoxic *Escherichia coli* (NTEC): two emerging categories of human and animal pathogens. *Veterinary Research*. 1999, roč. 30, s. 221-233. ISSN 1297-9716.
- [21] COOKSON, Susan Temporado a James P. NATARO. Characterization of HEp-2 cell projection formation induced by diffusely adherent *Escherichia*



- coli. Microbial Pathogenesis*. 1996, roč. 21 č. 6, s. 421-434. ISSN 08824010.
- [22] NTÃO, Esther-Maria, Lothar H WIELER a Christa EWERS. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathogens*. 2009, roč. 1, č. 1, s. 22. ISSN 1757-4749.
- [23] SCHWARZ, S., C. KEHRENBURG a T. R. WALSH. Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001, roč. 17, č. 6, s. 431-437. ISSN 09248579.
- [24] SCHWARZ, S. a E. CHASLUS-DANCLA. Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance. *Veterinary Research*. 2001, roč. 32, s. 201-225. ISSN 1297-9716.
- [25] McMANUS, M. Claire. Mechanisms of bacterial resistance to antimicrobial agents. *American Journal of Health-System Pharmacy*. 1997, roč. 54, č. 12, s. 1420-1433. ISSN 1079-2082.
- [26] TENOVER, Fred C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American Journal of Infection Control*. 2006, roč. 34, č. 5, s. 3-10. ISSN 01966553.
- [27] SZMOLKA, Ama a Béla NAGY. Multidrug resistant commensal *Escherichia coli* in animals and its impact for public health. *Frontiers in Microbiology*. 2013, roč. 4, s. 258. ISSN 1664-302x.
- [28] PATERSON, D. L. a R. A. BONOMO. Extended-Spectrum -Lactamases: a Clinical Update. *Clinical Microbiology Reviews*. 2005, roč. 18, č. 4, s. 657-686. ISSN 0893-8512.
- [29] BRADFORD, P. A. Extended-Spectrum -Lactamases in the 21st Century: Characterization, Epidemiology, and Detection of This Important Resistance Threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001, roč. 14, č. 4, s. 933-951. ISSN 0893-8512.
- [30] COOKSEY, R., J. SWENSON, N. CLARK, E. GAY a C. THORNSBERRY. Patterns and mechanisms of beta-lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1990, roč. 34, č. 5, s. 739-745. ISSN 0066-4804.
- [31] GUPTA, Kalpana, Daniel F. SAHM, David MAYFIELD a Walter E. STAMM. Antimicrobial Resistance Among Uropathogens that Cause Community-Acquired Urinary Tract Infections in Women: A Nationwide

Analysis. *Clinical Infectious Diseases*. 2001, roč. 33, č. 1, s. 89-94. ISSN 1058-4838.

- [32] RECCHIA, G. D. a R. M. HALL. Gene cassettes: a new class of mobile element. *Microbiology*. 1995, roč. 141, č. 12, s. 3015-3027. ISSN 1350-0872.
- [33] SPÍŽEK Jaroslav. Rezistence na antibiotika, *Vesmír* [online]. 1999, roč. 78, s. 27-31 [cit. 2015-10-28]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/rezistence-na-antibiotika>.
- [34] GARCIA-MIGURA, Lourdes, Rene S. HENDRIKSEN, Lorenzo FRAILE a Frank M. AARESTRUP. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*. 2014, roč. 170, č. 1-2, s. 1-9. ISSN 03781135.
- [35] TESHAGER, Tirushet, Inmaculada A. HERRERO, M. Concepción PORRERO, Julian GARDE, Miguel A. MORENO a Lucas DOMÍNGUEZ. Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, roč. 15, č. 2, s. 137-142. ISSN 09248579.
- [36] LIM, Suk-Kyung, Hee-Soo LEE, Hyang-Mi NAM, Yun-Sang CHO, Jong-Man KIM, Si-Wook SONG, Yong-Ho PARK a Suk-Chan JUNG. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. *International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 116, č. 2, s. 283-286. ISSN 01681605.
- [37] LEI, Tao, Wei TIAN, Liu HE, et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology*. 2010, roč. 146, č. 1-2, s. 85-89. ISSN 03781135.
- [38] LU, Liming, Lei DAI, Yang WANG, et al. Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China. *Acta Tropica*. 2010, roč. 113, č. 1, s. 20-25. ISSN 0001706x.
- [39] RAMOS, Sonia, Nuno SILVA, Manuela CANIC, José Luiz CAPELO-MARTINES, Francisco BRITO, Gilberto IGREJAS a Patrícia POETA. High prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* from animals at slaughter: a food safety risk. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012, roč. 93, s. 517-526. ISSN 1097-0010.

- [40] TADESSE, Daniel A., Shaohua ZHAO, Emily TONG, Sherry AYERS, Aparna SINGH, Mary J. BARTHOLOMEW a Patrick F. MCDERMOTT. Antimicrobial Drug Resistance in *Escherichia coli* from Humans and Food Animals, United States, 1950–2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, roč. 18, č. 5, s. 741-749. ISSN 1080-6040.
- [41] DRUGDOVÁ, Zuzana a Vladimír KMEŤ. Prevalence of  $\beta$ -lactam and fluoroquinolone resistance, and virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chickens in Slovakia. *Biologia*. 2013, roč. 68, č. 1, s. 11-18. ISSN 1336-9563.
- [42] LI, Xian-Zhi, Manisha MEHROTRA, Shiva GHIMIRE a Lateef ADEWOYE.  $\beta$ -Lactam resistance and  $\beta$ -lactamases in bacteria of animal origin. *Veterinary Microbiology*. 2007, roč. 121, č. 3-4, s. 197-214. ISSN 03781135.
- [43] EGEA, Pilar, Lorena LÓPEZ-CERERO, Eva TORRES, María del Carmen GÓMEZ-SÁNCHEZ, Lara SERRANO, María Dolores NAVARRO SÁNCHEZ-ORTIZ, Jesús RODRIGUEZ-BAÑO a Alvaro PASCUAL. Increased raw poultry meat colonization by extended spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in the south of Spain. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, roč. 159, č. 2, s. 69-73. ISSN 01681605.
- [44] GREGOVA, Gabriela, KMETOVA, Marta, KMET, Vladimír, VENGLOVSKY, Jan a Alexander FEHER. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from a poultry slaughterhouse. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2012, roč. 19, s. 75-77. ISSN 1232-1966.
- [45] KLUYTMANS, J. A. J. W., I. T. M. A. OVERDEVEST, I. WILLEMSSEN, et al. Extended-Spectrum -Lactamase-Producing *Escherichia coli* From Retail Chicken Meat and Humans: Comparison of Strains, Plasmids, Resistance Genes, and Virulence Factors. *Clinical Infectious Diseases*. 2013, roč. 56, č. 4, s. 478-487. ISSN 1058-4838.
- [46] MAYRHOFER, Sigrid, Peter PAULSEN, Frans J. M. SMULDERS a Friederike HILBERT. Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 2004, roč. 97, č. 1, s. 23-29. ISSN 01681605.
- [47] OBENG, Akua Serwaah, Heather RICKARD, Olasumbo NDI, Margaret SEXTON a Mary BARTON. Antibiotic resistance, phylogenetic grouping

and virulence potential of *Escherichia coli* isolated from the faeces of intensively farmed and free range poultry. *Veterinary Microbiology*. 2012, roč. 154, č. 3-4, s. 305-315. ISSN 03781135.

- [48] OZAKI, Hiroichi, Hidetake ESAKI, Kouhei TAKEMOTO, Akira IKEDA, Yasutaka NAKATANI, Azusa SOMEYA, Norio HIRAYAMA a Toshiyuki MURASE. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Veterinary Microbiology*. 2011, roč. 150, č. 1-2, s. 132-139. ISSN 03781135.
- [49] GONÇALVES, A., G. IGREJAS, H. RADHOUANI, et al. Antimicrobial resistance in faecal enterococci and *Escherichia coli* isolates recovered from Iberian wolf. *Letters in Applied Microbiology*. 2013, roč. 56, č. 4, s. 268-274. ISSN 02668254.
- [50] ALONSO, C. A., D. GONZÁLEZ-BARRIO, Carmen TENORIO, F. RUIZ-FONS a C. TORRES. Antimicrobial resistance in faecal *Escherichia coli* isolates from farmed red deer and wild small mammals. Detection of a multiresistant *E. coli* producing extended-spectrum beta-lactamase. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016, roč. 45, s. 34-39. ISSN 01479571.
- [51] LITERAK, Ivan, Monika DOLEJSKA, T. RADIMERSKY, KLIMES J., M. FRIEDMAN, F. M. AARESTRUP H. HASMAN a A. CIZEK. Antimicrobial-resistant faecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum beta-lactamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology*. 2010, roč. 108, s. 1702–1711. ISSN 1364-5072.
- [52] SILVA, Nuno, Gilberto IGREJAS, Nicholas FIGUEIREDO, Alexandre GONÇALVES, Hajer RADHOUANI, Jorge RODRIGUES a Patrícia POETA. Molecular characterization of antimicrobial resistance in enterococci and *Escherichia coli* isolates from European wild rabbit (*Oryctolagus cuniculus*). *Science of The Total Environment*. 2010, roč. 408, č. 20, s. 4871-4876. ISSN 00489697.
- [53] WASYL, Dariusz, Andrzej HOSZOWSKI, Magdalena ZAJĄC a Krzysztof SZULOWSKI. Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter. *Frontiers in Microbiology*. 2013, roč. 4, s. 221. ISSN 1664-302x.

- [54] IBRAHIM, Delveen R., Christine E. R. DODD, Dov J. STEKEL, Stephen J. RAMSDEN, Jon L. HOBMAN a Pascal SIMONET. Multidrug resistant, extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from a dairy farm. *FEMS Microbiology Ecology*. 2016, roč. 92, č. 4, s. 13. ISSN 1574-6941.
- [55] BEN SALLEM, Rym, Karim BEN SLAMA, Yolanda SÁENZ, et al. Prevalence and Characterization of Extended-Spectrum Beta-Lactamase (ESBL) – and CMY-2 – Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Food-Producing Animals in Tunisia. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2012, roč. 9, č. 12, s. 1137-1142. ISSN 1535-3141.
- [56] PINTO, L., H. RADHOUANI, C. COELHO, P. M. COSTA, R. SIMOES, R. M. BRANDAO, C. TORRES, G. IGREJAS a P. POETA. Genetic detection of extended-spectrum beta-lactamase-containing *Escherichia coli* isolates from birds of prey from Serra da Estrela Natural Reserve in Portugal. *Applied and Environmental Microbiology*. 2010, roč. 76, s. 4118–4120. ISSN 1098-5336.
- [57] HASAN, B., A. MELHUS, L. SANDEGREN, M. ALLAM a B. OLSEN. The gull (*Chroicocephalus brunnicephalus*) as an environmental bioindicator and reservoir for antibiotic resistance on the coastlines of the Bay of Bengal. *Microbial Drug Resistance*. 2014, roč. 20, č. 5, s. 466–471. ISSN 1931-8448.
- [58] POETA, Patricia, Hajer RADHOUANI, Luis PINTO, et al. Wild boars as reservoirs of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) producing *Escherichia coli* of different phylogenetic groups. *Journal of Basic Microbiology*. 2009, roč. 49, č. 6, s. 584-588. ISSN 0233111x.
- [59] RADHOUANI, Hajer, Gilberto IGREJAS, Alexandre GONÇALVES, Vanesa ESTEPA, Roberto SARGO, Carmen TORRES a Patricia POETA. Molecular characterization of extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates from red foxes in Portugal. *Archives of Microbiology*. 2013, roč. 195, č. 2, s. 141-144. ISSN 0302-8933.
- [60] GUENTHER, Sebastian, Mirjam GROBBEL, Antina LÜBKE-BECKER, Andreas GOEDECKE, Nicole D. FRIEDRICH, Lothar H. WIELER a Christa EWERS. Antimicrobial resistance profiles of *Escherichia coli* from common European wild bird species. *Veterinary Microbiology*. 2010, roč. 144, č. 1-2, s. 219-225. ISSN 03781135.

- [61] LITERAK, Ivan, Monika DOLEJSKA, Jana RYBARIKOVA, Alois CIZEK, Pavla STREJCKOVA, Martina VYSKOCILOVA, Miroslava FRIEDMAN a Jiri KLIMES. Highly Variable Patterns of Antimicrobial Resistance in Commensal *Escherichia coli* Isolates from Pigs, Sympatric Rodents, and Flies. *Microbial Drug Resistance*. 2009, roč. 15, č. 3, s. 229-237. ISSN 1076-6294.
- [62] DOLEJSKÁ, M., B. BIEROŠOVÁ, L. KOHOUTOVÁ, I. LITERÁK a A. ČÍŽEK. Antibiotic-resistant *Salmonella* and *Escherichia coli* isolates with integrons and extended-spectrum beta-lactamases in surface water and sympatric black-headed gulls. *Journal of Applied Microbiology*. 2009, roč. 106, č. 6, s. 1941-1950. ISSN 13645072.
- [63] MARTINEZ, Jose Luis. Environmental pollution by antibiotics and by antibiotic resistance determinants. *Environmental Pollution*. 2009, roč. 157, č. 11, s. 2893-2902. ISSN 02697491.
- [64] VAN DEN BOGAARD, A. E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2001, roč. 47, č. 6, s. 763-771. ISSN 14602091.
- [65] SCHROEDER, Carl M., David G. WHITE a Jianghong MENG. Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant *Escherichia coli*. *Food Microbiology*. 2004, roč. 21, č. 3, s. 249-255. ISSN 07400020.
- [66] RYU, Seung-Hee, Seog-Gee PARK, Sung-Min CHOI, et al. Antimicrobial resistance and resistance genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial fish and seafood. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, roč. 152, č. 1-2, s. 14-18. ISSN 01681605.
- [67] AARESTRUP, Frank M. a Henrik C. WEGENER. The effects of antibiotic usage in food animals on the development of antimicrobial resistance of importance for humans in *Campylobacter* and *Escherichia coli*. *Microbes and Infection*. 1999, roč. 1, č. 8, s. 639-644. ISSN 12864579.
- [68] SKOČKOVÁ, Alena, Renáta KARPÍŠKOVÁ, Ivana KOLÁČKOVÁ a Šárka CUPÁKOVÁ. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, roč. 167, č. 2, s. 196-201. ISSN 01681605.
- [69] CLERMONT O., S. BONACORSI a E. BINGEN. Rapid and Simple Determination of the *Escherichia coli* Phylogenetic Group. *Applied and*

*Environmental Microbiology*. 2000, roč. 66, č. 10, s. 4555-4558. ISSN 0099-2240.

- [70] GORDON, David M., Olivier CLERMONT, Heather TOLLEY a Erick DENAMUR. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*. 2008, roč. 10, č. 10, s. 2484-2496, ISSN 14622912.
- [71] WALK, Seth T., Elizabeth W. ALM, Lisa M. CALHOUN, Janice M. MLADONICKY a Thomas S. WHITTAM. Genetic diversity and population structure of *Escherichia coli* isolated from freshwater beaches. *Environmental Microbiology*. 2007, roč. 9, č. 9, s. 2274-2288. ISSN 1462-2912.
- [72] ISHII, S., K.P. MEYER a M. J. Sadowsky. Relationship between phylogenetic groups, genetic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007, roč. 73, s. 5703-5710. ISSN 1098-5336.
- [73] BIDET, Philippe, Patricia MARIANI-KURKDJIAN, F. GRIMONT, N. BRAHIMI, C.COURROUX, GRIMONT, P. a E. BINGEN. Characterization of *Escherichia coli* O157: H7 isolates causing haemolytic uraemic syndrome in France. *Journal of Medical Microbiology*. 2005, roč. 54, s. 71-75. ISSN 0022-2615.
- [74] ESCOBAR-PÁRAMO, Patricia, Arnaud LE MENAC'H, Tony LE GALL, Christine AMORIN, Stéphanie GOURIOU, Bertrand PICARD, David SKURNIK a Erick DENAMUR. Identification of forces shaping the commensal *Escherichia coli* genetic structure by comparing animal and human isolates. *Environmental Microbiology*. 2006, roč. 8, č. 11, s. 1975-1984. ISSN 1462-2912.
- [75] CARLOS, Camila, Mathias M. PIRES, Nancy C. STOPPE, Elayse M. HACHICH, Maria I. Z. SATO, Tânia A. T. GOMES, Luiz A. AMARAL a Laura M. M. OTTOBONI. *Escherichia coli* phylogenetic group determination and its application in the identification of the major animal source of fecal contamination. *BMC Microbiology*. 2010, roč. 10, č. 1., s. 161. ISSN 1471-2180.
- [76] GORDON, D. M. a A. COWLING. The distribution and genetic structure of *Escherichia coli* in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology*. 2003, roč. 149, s. 3575-3586. ISSN 1608-3237.

- [77] BALDY-CHUDZIK, Katarzyna, Paweł MACKIEWICZ a Michał STOSIK. Phylogenetic background, virulence gene profiles, and genomic diversity in commensal *Escherichia coli* isolated from ten mammal species living in one zoo. *Veterinary Microbiology*. 2008, roč. 131, č. 1-2, s. 173-184. ISSN 03781135.
- [78] RILEY, Margaret A. a John E. WERTZ. Bacteriocins: Evolution, Ecology, and Application. *Annual Review of Microbiology*. 2002, roč. 56, č. 1, s. 117-137. ISSN 0066-4227.
- [79] DAW, Mohamed A. a Fredrick R. FALKINER. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996, roč. 27, č. 6, s. 467-479. ISSN 09684328.
- [80] RILEY, Margaret A. a David M. GORDON. The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends in Microbiology*. 1999, roč. 7, č. 3, s. 129-133. ISSN 0966842x.
- [81] ŠMAJS, David, Holger PILSL a Volkmar BRAUN. Colicin U, a novel colicin produced by *Shigella boydii*. *Journal of Bacteriology*. 1997, roč. 179, s. 4919-4928. ISSN 1098-5530.
- [82] ŠMAJS David, a Jan ŠMARDA. Koliciny- letální proteiny z čeledi *Entebacteriaceae*. *Biologické listy*, Praha: Ústav molekulární genetiky AV ČR. 1997, roč. 62, č. 2, s. 135-158. ISSN 0366-486.
- [83] CASCALES, E., S. BUCHANAN, D. DUCHÉ, C. KLEANTHOS, R. LLOUBES, K. POSTLE, M. RILEY, S. SLATIN a D. CAVARD. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2007, roč. 71, s. 158-229. ISSN 1098-5557.
- [84] PONS, A. M., F. DELALANDE, M. DUARTE, S. BENOIT, I. LANNELUC, S. SABLE, A. VAN DORSSELAER a G. COTTENCEAU. Genetic Analysis and Complete Primary Structure of Microcin L. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2004, roč. 48, č. 2, s. 505-513. ISSN 0066-4804.
- [85] GORDON, D. M., a C. L O'BRIEN. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2006, roč. 152, s. 3239-3244. ISSN 1608-3237.
- [86] AZPIROZ, M. F. a LAVIÑA, M. Modular structure of microcin H47 and colicin V. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2007, roč. 51, s. 2412-2419. ISSN 1098-6596.



- [87] GILLOR, O., A. ETZION a M. A. RILEY. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008, roč. 81, č. 4, s. 591-606. ISSN 0175-7598.
- [88] TRAUTNER, B. W. Colicins prevent colonization of urinary catheters. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005, roč. 56, č. 2, s. 413-415. ISSN 0305-7453.
- [89] YANG, Hao, Lin WAN, Xiaowei LI, et al. High level expression of His-tagged colicin 5 in *E. coli* and characterization of its narrow-spectrum bactericidal activity and pore-forming action. *Protein Expression and Purification*. 2007, roč. 54, č. 2, s. 309-317. ISSN 10465928.
- [90] CHALÓN, Miriam C., Leonardo ACUÑA, Roberto D. MORERO, Carlos J. MINAHK a Augusto BELLOMIO. Membrane-active bacteriocins to control *Salmonella* in foods. *Food Research International*. 2012, roč. 45, č. 2, s. 735-744. ISSN 09639969.
- [91] PATTON, Brenda S. a James S. DICKSON. Inhibitory activity of colicin E1 against *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 2007, roč. 70, s. 1256-1262. ISSN 1944-9097.
- [92] VINCENT, P. Inhibition of *Salmonella enterica* serovars by microcin J25. *FEMS Microbiology Letters*. 2004, roč. 236, č. 1, s. 103-107. ISSN 03781097.
- [93] LAGOS, Rosalba., Mario TELLO, Gabriela MERCADO, V. GARCIA a Octavio MONASTERIO. Antibacterial and antitumorigenic properties of microcin E492, a pore-forming bacteriocin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 2009, roč. 10, s. 74-85. ISSN 1873-4316.
- [94] MERCADO, Gabriela., Mario TELLO, Macarena MARÍN, Octavio MONASTERIO a Rosalba LAGOS. The production in vivo of microcin E492 with antibacterial activity depends on salmochelin and EntF. *Journal of Bacteriology*. 2008, roč. 190, s. 5464-547. ISSN 1098-5530.
- [95] JAMES, R., C. KLEANTHOS a G. R. MOORE. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*. 1996, roč. 142, č. 7, s. 1569-1580. ISSN 1350-0872.
- [96] PETKOVSEK, Z., D. ZGUR-BERTOK a M. STARCIC ERJAVEC. Colicin insensitivity correlates with a higher prevalence of extraintestinal virulence factors among *Escherichia coli* isolates from skin and soft-tissue infections. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, roč. 61, s. 762-765. ISSN 0022-2615.

- [97] MICENKOVÁ, Lenka, Barbora ŠTAUDOVÁ, Juraj BOSÁK, et al. Bacteriocin-encoding genes and ExPEC virulence determinants are associated in human fecal *Escherichia coli* strains. *BMC Microbiology*. 2014, roč. 14, č. 1, s. 109. ISSN 1471-2180.
- [98] RULÍK, Martin. Mikrobiální biofilmy. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2011, s. 448. ISBN 978-80-244-2747-8.
- [99] BURNETT, S. L., J. CHEN a L. R. BEUCHAT. Attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to the Surfaces and Internal Structures of Apples as Detected by Confocal Scanning Laser Microscopy. *Applied and Environmental Microbiology*. 2000, roč. 66, č. 11, s. 4679-4687. ISSN 0099-2240.
- [100] TAKEUCHI, Kazue, Ashraf N. HASSAN a Joseph F. FRANK. Penetration of *Escherichia coli* O157:H7 into lettuce as influenced by modified atmosphere and temperature. *Journal of Food Protection*. 2001, roč. 64, č. 11, s. 1820-1823. ISSN 1944-9097.
- [101] 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*. 2014, roč. 20, č. 4, s. 255-266. ISSN 1198743x.
- [102] KURINČIČ, Marija, Barbara JERŠEK, Anja KLANČNIK, Sonja Smole MOŽINA, Rok FINK, Goran DRAŽIĆ, Peter RASPOR a Klemen BOHINC. Effects of natural antimicrobials on bacterial cell hydrophobicity, adhesion, and zeta potential. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology*. 2016, roč. 67, č. 1, s. 39-42. ISSN 0004-1254.
- [103] HARVEY, J., K. P. KEENAN a A. GILMOUR. Assessing biofilm formation by *Listeria monocytogenes* strains. *Food Microbiology*. 2007, roč. 24, č. 4, s. 380-392. ISSN 07400020.
- [104] STEPANOVIĆ, S., VUKOVIĆ, D., DAKIĆ, I., SAVIĆ, B. a M. ŠVABIĆ-VLAHOVIĆ. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 2000, roč. 40, č. 2, s. 175-179. ISSN 01677012.
- [105] ŠMARDA, Jan, Jiří DOŠKAŘ, Roman PANTŮČEK, Vladislava RŮŽIČKOVÁ a Jana KOPTÍKOVÁ. Metody molekulární biologie. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005, 194 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [106] BARBAS, Carlos F., Dennis R. BURTON, Jamie K. SCOTT a Gregg J. SILVERMAN. Quantitation of DNA and RNA. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2007 roč. 11, s. 47. ISSN 1940-3402.

- [107] HOLKO, Ivan, Tatiana BISOVA, Zuzana HOLKOVA a Vladimir KMET. Virulence markers of *Escherichia coli* strains isolated from traditional cheeses made from unpasteurised sheep milk in Slovakia. *Food Control*. 2006, roč. 17, č. 5, s. 393-396. ISSN 09567135.
- [108] EWERS, C., G. LI, H. WILKING, et al. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *International Journal of Medical Microbiology*. 2007, roč. 297, č. 3, s. 163-176. ISSN 14384221.
- [109] MAYNARD, C., S. BEKAL, F. SANSCHAGRIN, R. C. LEVESQUE, R. BROUSSEAU, L. MASSON, S. LARIVIERE a J. HAREL. Heterogeneity among Virulence and Antimicrobial Resistance Gene Profiles of Extraintestinal *Escherichia coli* Isolates of Animal and Human Origin. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004, 42, č. 12, s. 5444-5452. ISSN 0095-1137.
- [110] NG, Lai-King, MULVEY, Michael R., MARTIN, Irene, PETERS, A. GEOFFREY a Wendy JOHNSON. Genetic Characterization of Antimicrobial Resistance in Canadian Isolates of *Salmonella* Serovar Typhimurium DT104. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 1999, roč. 43, s. 3018–3021. ISSN 1098-6596.
- [111] MAZEL, D., B. DYCHINCO, V. A. WEBB a J. DAVIES. Antibiotic Resistance in the ECOR Collection: Integrons and Identification of a Novel *aad* Gene. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2000, roč. 44, č. 6, s. 1568-1574. ISSN 0066-4804.
- [112] KEHRENBURG, C., A. DE JONG, S. FRIEDERICHS, A. CLOECKAERT a S. SCHWARZ. Molecular mechanisms of decreased susceptibility to fluoroquinolones in avian *Salmonella* serovars and their mutants selected during the determination of mutant prevention concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, roč. 59, č. 5, s. 886-892. ISSN 0305-7453.
- [113] BEDÁŇOVÁ, I. a V. VEČEREK. Základy statistiky pro studující veterinární medicíny a farmacie. Vyd. 1. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, 2007, 130 s. ISBN 978-80-7305-026-9.
- [114] SOUČEK, E. *Základy statistiky*. Žilina: Poradca podnikateľa, 2006. ISBN 8088931509.
- [115] BURKE, S., HARDCASTLE, B. Statistics in context: Analysis of variance (ANOVA). *VAM Bulletin*. Spring. 1999, roč. 20, s. 28-31. Český překlad DOHNAL Luděk, Analýza rozptylu-ANOVA. *Fons*

- [online]. 1999, roč. 4, s. 21-25 [cit. 2015-10-27]. Dostupné z: [http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap\\_7\\_ANOVA.pdf](http://www1.lf1.cuni.cz/~ldohna/publik/Kap_7_ANOVA.pdf).
- [116] JOHNSON, James R., Parissa DELAVARI, Michael KUSKOWSKI a Adam L. STELL. Phylogenetic Distribution of Extraintestinal Virulence-Associated Traits in *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2001, roč. 183, č. 1, s. 78-88. ISSN 0022-1899.
- [117] JOHNSON, James R. a Adam L. STELL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000, roč. 181, č. 1, s. 261-272. ISSN 0022-1899.
- [118] PICARD, Bertrand, José S. GARCIA, Stéphanie GOURIOU, Patrick DURIEZ, Naïma BRAHIMI, Edouard BINGEN, Jacques ELION a Erick DENAMUR. The Link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection. *Infection and Immunity*. 1999, roč. 67, č. 2, s. 546-553. ISSN 1098-5522.
- [119] TRNKOV, Marija, Tatjana RUPEL, Darja ŽGUR-BERTOK, Sara TRONTELJ, Gorazd AVGUŠTIN a Jerneja A. AVGUŠTIN. Molecular Characterization of *Escherichia coli* Strains Isolated from Different Food Sources. *Food Technology and Biotechnology*. 2014, roč. 52, č. 2, s. 255–262. ISSN 1330-9862.
- [120] UNNO, T., D. HAN, J. JANG, S. N. LEE, G. KO, H. Y. CHOI, J. H. Kim, M. J. Sadowsky a H. G. Hur. Absence of *Escherichia coli* phylogenetic group B2 strains in humans and domesticated animals from Jeonnam Province, Republic of Korea. *Applied Environmental Microbiology*. 2009, roč. 75, č. 17, s. 5659-66. ISSN 1098-5336.
- [121] DRUGDOVÁ, Zuzana, Vladimír KMEŤ a V. BUJŇÁKOVÁ. Virulence factors in *Escherichia coli* isolated from chicken meat in Slovakia. *Journal of Food and Nutrition Research*. 2010, roč. 49, č. 1., s. 10-13. ISSN 1338-4260.
- [122] SKYBERG, J. A., K. E. SIEK, C. DOETKOTT a L. K. NOLAN. Biofilm formation by avian *Escherichia coli* in relation to media, source and phylogeny. *Journal of Applied Microbiology*. 2007, roč. 102, č. 2, s. 548-554. ISSN 1364-5072.
- [123] MORENO, E. Quinolone, fluoroquinolone and trimethoprim/sulfamethoxazole resistance in relation to virulence

determinants and phylogenetic background among uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, roč., 57, č. 2, s. 204-211. ISSN 0305-7453.

- [124] RADHOUANI, Hajer, Nuno SILVA, Patrícia POETA, Carmen TORRES, Susana CORREIA a Gilberto IGREJAS. Potential impact of antimicrobial resistance in wildlife, environment and human health. *Frontiers in Microbiology*. 2014, roč. 5, s. 23. ISSN 1664-302x.
- [125] RIJAVEC, M., M. MULLER-PREMUR, B. ZAKOTNIK a D. ZGURBERTOK. Virulence factors and biofilm production among *Escherichia coli* strains causing bacteraemia of urinary tract origin. *Journal of Medical Microbiology*. 2008, roč. 57, č. 11, s. 1329-1334. ISSN 0022-2615.
- [126] LÖHREN, Ulrich, Antonia RICCI a Timothy S. CUMMINGS. Guidelines for Antimicrobial Use in Poultry. *Guide to Antimicrobial Use in Animals*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, Ltd, 2008, 126 s. ISBN 9781444302639.
- [127] HERA, Alfred, Lenka KOUTECKÁ, Dalibor DORN a Lucie POKLUDOVÁ. Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně v ČR. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv [online]. [cit. 2015-10-28]. Dostupné z: [http://www.uskvbl.cz/attachments/749\\_věstník%206%2013%20ATB%20spotřeba%202010-2012%20finální%20draft.pdf](http://www.uskvbl.cz/attachments/749_věstník%206%2013%20ATB%20spotřeba%202010-2012%20finální%20draft.pdf)
- [128] ÁLVAREZ-FERNÁNDEZ, Elena, Amaya CANCELO, Carmen DÍAZ-VEGA, Rosa CAPITA a Carlos ALONSO-CALLEJA. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food Control*. 2013, roč. 30, č. 1, s. 227-234. ISSN 09567135.
- [129] KMEŤ, Vladimír, Zuzana DRUGDOVÁ, Marta KMEŤOVÁ a Michal STANKO. Virulence and antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolated from rooks. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 2013, roč. 20, č. 2, s. 273-275. ISSN 1232-1966.
- [130] KOZAK, Gosia K., Patrick BOERLIN, Nicol JANEČKO, Richard J. REID-SMITH a Claire JARDINE. Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* Isolates from Swine and Wild Small Mammals in the Proximity of Swine Farms and in Natural Environments in Ontario, Canada. *Applied Environmental Microbiology*. 2009, roč. 75, č. 3, s. 559–566. ISSN 1098-5336.

- [131] SANTOS, Tiago, Nuno SILVA, Gilberto IGREJAS, et al. Dissemination of antibiotic resistant *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* from wild birds of Azores Archipelago. *Anaerobe*. 2013, roč. 24, s. 25-31. ISSN 10759964.
- [132] SHOBRAK, Mohammed Y. a Aly E. ABO-AMER. Role of wild birds as carriers of multi-drug resistant *Escherichia coli* and *Escherichia vulneris*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015, roč. 45, č. 4, s. 1199-209. ISSN 1678-4405.
- [133] GUERRA, B. Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial resistance in German *Escherichia coli* isolates from cattle, swine and poultry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2003, roč. 52, č. 3, s. 489-492. ISSN 1460-2091.
- [134] European Centre for Disease Prevention and Control. ECDC. Antimicrobial Resistance Interactive Database EARS- net [online]. [cit. 2016-03-05]. Dostupné z: [http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial\\_resistance/database/Pages/database.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/database/Pages/database.aspx)
- [135] COSTA, D., P. POETA, Y. SAENZ, et al. Detection of *Escherichia coli* harbouring extended-spectrum -lactamases of the CTX-M, TEM and SHV classes in faecal samples of wild animals in Portugal. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2006, roč. 58, č. 6, s. 1311-1312. ISSN 0305-7453.
- [136] DIERIKX, C. M., E. VAN DUIJKEREN, A. H. W. SCHOORMANS, et al. Occurrence and characteristics of extended-spectrum-lactamase and AmpC-producing clinical isolates derived from companion animals and horses. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2012, roč. 67, č. 6, s. 1368-1374. ISSN 0305-7453.
- [137] WILLIAMS, N. J., C. SHERLOCK, T. R. JONES, et al. The prevalence of antimicrobial-resistant *Escherichia coli* in sympatric wild rodents varies by season and host. *Journal of Applied Microbiology*. 2011, roč. 110, č. 4, s. 962-970. ISSN 13645072.
- [138] SCHWARZ, Stefan, Peter SILLEY, Shabbir SIMJEE, Neil WOODFORD, Engeline VAN DUIJKEREN, Alan P. JOHNSON a Wim GAASTRA. Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. *Veterinary Microbiology*. 2010, roč. 141, č. 1-2, s. 1-4. ISSN 03781135.
- [139] JOHNSON, Timothy J., Catherine M. LOGUE, James R. JOHNSON, et al. Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and

- Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* from Humans and Poultry. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2012, roč. 9, č. 1, s. 37-46. ISSN 1535-3141.
- [140] JAKOBSEN, Lotte, Azra KURBASIC, Line SKJØT-RASMUSSEN, et al. *Escherichia coli* Isolates from Broiler Chicken Meat, Broiler Chickens, Pork, and Pigs Share Phylogroups and Antimicrobial Resistance with Community-Dwelling Humans and Patients with Urinary Tract Infection. *Foodborne Pathogens and Disease*. 2010, roč. 7, č. 5, s. 537-547. ISSN 1535-3141.
- [141] ALLEN, Samantha E., Patrick BOERLIN, Nicol JANECKO, John S. LUMSDEN, Ian K. BARKER, David L. PEARL, Richard J. REID-SMITH, and Claire JARDINE. Antimicrobial Resistance in Generic *Escherichia coli* Isolates from Wild Small Mammals Living in Swine Farm, Residential, Landfill, and Natural Environments in Southern Ontario, Canada. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 3, s. 882–888. ISSN 1098-5336.
- [142] DOLEJSKA, M., M. MATULOVA, L. KOHOUTOVA, I. LITERAK, J. BARDON a A. CIZEK. Extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* in turkey meat production farms in the Czech Republic: National survey reveals widespread isolates with blaSHV-12 genes on IncFII plasmids. *Letters in Applied Microbiology*. 2011, roč. 53, č. 3, s. 271-277. ISSN 02668254.
- [143] DELICATO, Elaine R., Benito Guimarães DE BRITO, Luis Carlos J. GAZIRI a Marilda C. VIDOTTO. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology*. 2003, roč. 94, č. 2, s. 97-103. ISSN 03781135.
- [144] JOHNSON, Timothy J., Sara J. JOHNSON a Lisa K. NOLAN. Complete DNA Sequence of a ColBM Plasmid from Avian Pathogenic *Escherichia coli* Suggests that It Evolved from Closely Related ColV Virulence Plasmids. *Journal of Bacteriology*. 2006, roč. 188, č. 16, s. 5975–5983. ISSN 1098-5530.
- [145] JOHNSON, T. J., K. E. SIEK, S. J. JOHNSON a L. K. NOLAN. DNA Sequence of a ColV Plasmid and Prevalence of Selected Plasmid-Encoded Virulence Genes among Avian *Escherichia coli* Strains. *Journal of Bacteriology*. 2005, roč. 188, č. 2, s. 745-758. ISSN 0021-9193.
- [146] HERRERO, Marta, Victor de LORENZO a J. B. NEILAND. Nucleotide Sequence of the iucD Gene of the pColV-K30 Aerobactin Operon and

- Topology of Its Product Studied with *phoA* and *lacZ* Gene Fusions. *Journal of Bacteriology* . 1988, roč. 170, č. 1, s. 56-64. ISSN 0021-9193.
- [147] DOZOIS, C. M., M. DHO-MOULIN, A. BREE, J. M. FAIRBROTHER, C. DESAUTELS a R. CURTISS. Relationship between the Tsh Autotransporter and Pathogenicity of Avian *Escherichia coli* and Localization and Analysis of the *tsh* Genetic Region. *Infection and Immunity*. 2000, roč. 68, č. 7, s. 4145-4154. ISSN 0019-9567.
- [148] JOHNSON, J. R., A. C. MURRAY, A. GAJEWSKI, M. SULLIVAN, P. SNIPPES, M. A. KUSKOWSKI a K. E. SMITH. Isolation and Molecular Characterization of Nalidixic Acid-Resistant Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* from Retail Chicken Products. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, roč. 47, č. 7, s. 2161-2168. ISSN 0066-4804.
- [149] RODRIGUEZ-SIEK, Kylie E., Cathrine W. GIDDINGS, Curt DOETKOTT, Timothy J. JOHNSON, Mohamed K., FAKHR, Lisa K., NOLAN. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology*. 2005, roč. 151, s. 2097-2110. ISSN 1465-2080.
- [150] BERGERON, Catherine Racicot, Catharine PRUSSING, Patrick BOERLIN, Danielle DAIGNAULT, Lucie DUTIL, Richard J. REID-SMITH, George G. ZHANEL a Ameer R. MANGES. Chicken as Reservoir for Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Humans, Canada. *Emerging Infectious Diseases*. 2012, roč. 18, č. 3, s. 415-421. ISSN 1080-6040.
- [151] MURPHY, J., M. L. DEVANE, B. ROBSON a B. J. GILPIN. Genotypic characterization of bacteria cultured from duck faeces. *Journal of Applied Microbiology*. 2005, roč. 99, č. 2, s. 301-309. ISSN 1364-5072.
- [152] PARREIRA, V. R. a C. L. GYLES. A Novel Pathogenicity Island Integrated Adjacent to the *thrW* tRNA Gene of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Encodes a Vacuolating Autotransporter Toxin. *Infection and Immunity*. 2003, roč. 71, č. 9, s. 5087-5096. ISSN 0019-9567.
- [153] TZSCHOPPE, Markus, Annett MARTIN a Lothar BEUTIN. A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International Journal of Food Microbiology*. 2012, roč. 152, č. 1-2, s. 19-30. ISSN 01681605.



- [154] BEUCHAT, Larry R. Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. *Microbes and Infection*. 2002, roč. 4, č. 4, s. 413-423. ISSN 12864579.
- [155] MUKHERJEE, Avik, Dorinda SPEH, Elizabeth DYCK a Francisco DIEZ-GONZALEZ. Preharvest Evaluation of Coliforms, *Escherichia coli*, *Salmonella*, and *Escherichia coli* O157:H7 in Organic and Conventional Produce Grown by Minnesota Farmers. *Journal of Food Protection*. 2004, č. 5, s. 864-1070. ISSN 1944-9097.
- [156] HARAPAS, Dean, Robert PREMIER, Bruce TOMKINS, Peter FRANZ a Said AJLOUNI. Persistence of *Escherichia coli* on injured vegetable plants. *International Journal of Food Microbiology* . 2010, roč. 138, č. 3, s. 232-237. ISSN 01681605.
- [157] GABRIEL, Alonzo A., Mirasol C. BERJA, Ana Marie P. ESTRADA, Ma. Gracia Angelica A. LOPEZ, John Gilbert B. NERY a Edwin Jaimes B. VILLAFLORES. Microbiology of retail mung bean sprouts vended in public markets of National Capital Region, Philippines. *Food Control*. 2007, roč. 18, č. 10, s. 1307-1313. ISSN 09567135.
- [158] BLAAK, Hetty, Angela H.A.M. VAN HOEK, Christiaan VEENMAN, Arieke E. DOCTERS VAN LEEUWEN, Gretta LYNCH, Wendy M. VAN OVERBEEK a Ana Maria DE RODA HUSMAN. Extended spectrum  $\beta$ -lactamase- and constitutively AmpC-producing *Enterobacteriaceae* on fresh produce and in the agricultural environment. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, roč. 168-169, s. 8-16. ISSN 01681605.
- [159] HAMILTON-MILLER, J.M.T a Saroj SHAH. Identity and antibiotic susceptibility of enterobacterial flora of salad vegetables. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001, roč. 18, č. 1, s. 81-83. ISSN 09248579.
- [160] SCHWAIGER, Karin, Katharina HELMKE, Christina Susanne HÖLZEL a Johann BAUER. Antibiotic resistance in bacteria isolated from vegetables with regards to the marketing stage (farm vs. supermarket). *International Journal of Food Microbiology*. 2011, roč. 148, č. 3, s. 191-196. ISSN 01681605.
- [161] VELDMAN, Kees, Arie KANT, Cindy DIERIKX, Alieda VAN ESSEN-ZANDBERGEN, Ben WIT a Dik MEVIUS. *Enterobacteriaceae* resistant to third-generation cephalosporins and quinolones in fresh culinary herbs imported from Southeast Asia. *International Journal of Food Microbiology*. 2014, roč. 177, s. 72-77. ISSN 01681605.

- [162] REULAND, E. A., N. A. L. NAIEMI, S. A. RAADSEN, P. H. M. SAVELKOUL, J. A. J. W. KLUYTMANS a C. M. J. E. VANDENBROUCKE-GRAULS. Prevalence of ESBL-producing *Enterobacteriaceae* in raw vegetables. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 2014, roč. 33, č. 10, s. 1843-1846. ISSN 0934-9723.
- [163] BEN SAID, Leila, Ahlem JOUINI, Naouel KLIBI, Raoudha DZIRI, Carla Andrea ALONSO, Abdellatif BOUDABOUS, Karim BEN SLAMA a Carmen TORRES. Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Enterobacteriaceae* in vegetables, soil and water of the farm environment in Tunisia. *International Journal of Food Microbiology*. 2015, č. 203, s. 86-92. ISSN 01681605.
- [164] BUCHHOLZ, UDO, Helen BERNARD, Dirk WERBER et al. German outbreak of *Escherichia coli* O104:H4 associated with sprouts. *The New England Journal of Medicine*. 2011, roč. 365, s. 1763-1770. ISSN 1533-4406.
- [165] KING, L. A., F. NOGAREDA, F. X. WEILL, et al. Outbreak of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O104: H4 Associated With Organic Fenugreek Sprouts, France, June 2011. *Clinical Infectious Diseases*. 2012, roč. 54, č. 11, s. 1588-1594. ISSN 1058-4838.
- [166] ZHAO, W. H., G. CHEN, R. ITO, S. KIMURA a Z. Q. HU. Identification of a plasmid-borne blaIMP-11 gene in clinical isolates of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*. 2012, roč. 61, č. 2, s. 246-251. ISSN 0022-2615.
- [167] JAGLIC, Z., a D. CERVINKOVA. Genetic basis of resistance to quaternary ammonium compounds – the *qac* genes and their role: a review, *Veterinarni Medicina*. 2012, roč. 57, s. 275–281. ISSN 1805-9392.
- [168] COSTERTON, J. W. Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*. 1999, roč. 284, s. 1318-1322. ISSN 00368075.
- [169] NAVES, Plínio, Gema DEL PRADO, Lorena HUELVES, et al. Correlation between virulence factors and in vitro biofilm formation by *Escherichia coli* strains. *Microbial Pathogenesis*. 2008, roč. 45, č. 2, s. 86-91. ISSN 08824010.
- [170] REISNER, A., K. A. KROGFELT, B. M. KLEIN, E. L. ZECHNER a S. MOLIN. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic

- Factors. *Journal of Bacteriology* . 2006, roč. 188, č. 10, s. 3572-3581. ISSN 0021-9193.
- [171] SALA, Claudia, Adriana MORAR, Olimpia COLIBAR a Attila A. MORVAY. Antibiotic resistance of gram negative bacteria isolated from meat surface biofilm. *Romanian Biotechnical letters*, roč. 17, č. 4, 2012, s. 7483. ISSN 1224 – 5984.
- [172] KANAMARU, Sojun, Hisao KURAZONO, Akito TERAJ, Koichi MONDEN, Hiromi KUMON, Yoshimitsu MIZUNOE, Osamu OGAWA a Shingo YAMAMOTO. Increased biofilm formation in *Escherichia coli* isolated from acute prostatitis. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2006, roč. 28, s. 21-25. ISSN 09248579.
- [173] SOTO, S. M., A. SMITHSON, J. P. HORCAJADA, J. A. MARTINEZ, J. P. MENSA a J. VILA. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology and Infection*. 2006, roč. 12, č. 10, s. 1034-1036. ISSN 1198743x.
- [174] SOTO, S. M., A. SMITHSON, J. A. MARTINEZ, J.P. HORCAJADA, J. MENSA a J. VILA. Biofilm Formation in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains: Relationship With Prostatitis, Urovirulence Factors and Antimicrobial Resistance. *The Journal of Urology*. 2007, roč. 177, č. 1, s. 365-368. ISSN 00225347.
- [175] ONG, C. L. Y., G. C. ULETT, A. N. MABBETT et al. Identification of 3 type fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in biofilm formation. *Journal of Bacteriology*. 2008, roč. 190, s. 1054-1063. ISSN 1098-5530.
- [176] ULETT, G. C., A. N. MABBETT, K. C. FUNG, R. I. WEBB a M. A. SCHEMBRI. The role of F9 fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* in biofilm formation. *Microbiology*. 2007, roč. 153, č. 7, s. 2321-2331. ISSN 1350-0872.
- [177] JOHNSON, James R., Michael A. KUSKOWSKI, Kirk SMITH, Timothy T. O'BRYAN a Sita TATINI. Antimicrobial-Resistant and Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* in Retail Foods. *The Journal of Infectious Diseases*. 2005, roč. 191, č. 7, 1040-1049. ISSN 0022-1899.
- [178] ŠMARDA, J. a OBDRŽÁLEK, V. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *Journal of Basic Microbiology*. 2001, roč. 41, s. 367-374. ISSN 1521-4028.
- [179] ŠMAJS, David, Lenka MICENKOVÁ, Jan ŠMARDA, Martin VRBA, Alena ŠEVČÍKOVÁ, Zuzana VALIŠOVÁ a Vladana WOZNICOVÁ.

- Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, roč. 10. č. 1, s. 288. ISSN 1471-2180.
- [180] O'BRIEN, Graham J., Stephen T. CHAMBERS, Barbara PEDDIE a Khris H. MAHANTY. The association between colicinogenicity and pathogenesis among uropathogenic isolates of *Escherichia coli*. *Microbial Pathogenesis*. 1996, roč. 20, č. 3, s. 185-190. ISSN 08824010.
- [181] ŠMARDA, J. a Z. VRBICKÁ. Colicins E7 and E8 degrade DNA in sensitive bacteria. *Folia Microbiologica*. 1990, roč. 35, č. 4, s. 348-352. ISSN 0015-5632.
- [182] AGARWAL, V., A. METLITSKAYA, K. SEVERINOV a S. K. NAIR. Structural Basis for Microcin C7 Inactivation by the MccE Acetyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*. 2011, roč. 286, č. 24, s. 21295-21303. ISSN 0021-9258.
- [183] ABRAHAM, S., J. CHIN, H. J. M. BROUWERS, B. TURNER, R. ZHANG a T. A. CHAPMAN. Green fluorescent protein-based biosensor to detect and quantify Stress Responses induced by DNA-degrading colicins. *Applied and Environmental Microbiology*. 2011, roč. 77, č. 18, s. 6691-6693. ISBN 1098-5336.
- [184] BRAUN, Volkmar, Silke I PATZER a Klaus HANTKE. Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution. *Biochimie*. 2002, roč. 84, č. 5-6, s. 365-380. ISSN 03009084.
- [185] MANKOVICH, John. A., Hsu CHI-HSIN. a Jordan KONISKY. DNA and Amino Acid Sequence Analysis of structural and Immunity genes of colicins Ia and Ib. *Journal of Bacteriology*. 1986, roč. 168, s. 228-236. ISSN 1098-5530.
- [186] JEZIOROWSKI, Anne a David M. GORDON. Evolution of microcin V and colicin Ia plasmids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* [online]. 2007, roč. 189, s. 7045- 7070. ISSN 1098-5530.
- [187] BUDIC, M., M. RIJAVEC, Z. PETROVSEK, D. ZGUR-BERTOK. *Escherichia coli* Bacteriocins: Antimicrobial Efficacy and Prevalence among Isolates from Patients with Bacteraemia. 2011. *PLoS ONE*. 2011, roč. 6, č. 12, e28769. ISSN 1932-6203.
- [188] DUQUESNE, Sophie, Delphine DESTOUMIEUX-GARZÓN, Jean PEDUZZI a Sylvie REBUFFAT. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Product Reports*. 2007, roč. 24, č. 4, 708. ISSN 0265-0568.

- [189] SCHAMBERGER, G. P., R. L. PHILLIPS, J. L. JACOBS a F. DIEZ-GONZALEZ. Reduction of *Escherichia coli* O157: H7 Populations in Cattle by Addition of Colicin E7-Producing *E. coli* to Feed. *Applied and Environmental Microbiology*. 2004, roč. 70, č. 10, s. 6053-6060. ISSN 0099-2240.
- [190] RILEY, M. A. a D. M. GORDON. A survey of Col plasmids in natural isolates of *Escherichia coli* and an investigation into the stability of Col-plasmid lineages. *Journal of General Microbiology*. 1992, č. 138, č. 7, s. 1345-1352. ISSN 0022-1287.
- [191] JOHNSON, James R. a Adam L. STELL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *The Journal of Infectious Diseases*. 2000, roč. 181, č. 1, s. 261-272. ISSN 0022-1899.
- [192] KERN, M. B. Susceptibility of Danish *Escherichia coli* strains isolated from urinary tract infections and bacteraemia, and distribution of sul genes conferring sulphonamide resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2000, roč. 50, č. 4, s. 513-516. ISSN 1462091.
- [193] PERRETEN, V. a P. BOERLIN. A New Sulfonamide Resistance Gene (*sul3*) in *Escherichia coli* Is Widespread in the Pig Population of Switzerland. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003, roč. 47, č. 3, s. 1169-1172. ISSN 0066-4804.
- [194] YAMANE, Kunikazu, Jun-ichi WACHINO, Satowa SUZUKI a Yoshichika ARAKAWA. Plasmid-Mediated *qepA* Gene among *Escherichia coli* Clinical Isolates from Japan. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008, roč. 52, č. 4, s. 1564-1566. ISSN 1098-6596.
- [195] CATTOIR, V., L. POIREL, V. ROTIMI, C. J. SOUSSY a P. NORDMANN. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated quinolone resistance *qnr* genes in ESBL-producing enterobacterial isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2007, roč. 60, č. 2, s. 394-397. ISSN 0305-7453.
- [196] GUILLAUME, Gilliane, Dirk VERBRUGGE, Marie-Louise CHASSEUR-LIBOTTE, William MOENS a Jean-Marc COLLARD. PCR typing of tetracycline resistance determinants (Tet A-E) in *Salmonella enterica* serotype Hadar and in the microbial community of activated sludges from hospital and urban wastewater treatment facilities in Belgium. *FEMS Microbiology Ecology*. 2000, roč. 32, č. 1, s. 77-85. ISSN 01686496.

- [197] CARATTOLI A., A. GARCIA-FRNANDEZ, P. VARESI, D. FORTINI, S. GERARDI, A. PENNI, C. MANCINI a Alessandra GIORDANO. Molecular Epidemiology of *Escherichia coli* Producing Extended-Spectrum-Lactamases Isolated in Rome, Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008, roč., 46, č. 1, s. 103-108. ISSN 1098-660X.

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

|        |  |
|--------|--|
| ADO    | Adonitol   |
| AMC    | Amoxycilin/klavulanová kyselina                            |
| AMP    | Ampicilin  |
| APEC   | Aviárně patogenní <i>E. coli</i>                           |
| ARG    | Arginin  |
| ART    | Arabitol   |
| ATM    | Aztreonam  |
| bXY    | β-xylosidáza   |
| BFP    | Bundle Forming Pili  |
| C      | Chloramfenikol   |
| CAZ    | Ceftazidim   |
| CEF    | Cefalotin  |
| CEL    | Cellobióza   |
| CIP    | Ciprofloxacín  |
| CN     | Gentamicin   |
| CTX    | Cefotaxim  |
| CXM    | Cefuroxim  |
| DAEC   | Difúzně adherentní <i>E. coli</i>                          |
| DNA    | Deoxyribonukleová kyselina                                 |
| DO     | Doxycyklin   |
| DUL    | Dulcitol   |
| EAEC   | Enteroagregativní <i>E. coli</i>                           |
| EHEC   | Enterohemoragická <i>E. coli</i>                           |
| EIEC   | Enteroinvazivní <i>E. coli</i>                             |
| EPEC   | Enteropatogenní <i>E. coli</i>                             |
| ESL    | Esculin  |
| ETEC   | Enterotoxigenní <i>E. coli</i>                             |
| EUCAST | European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing |
| FEP    | Cefepim  |

|                  |                                     |
|------------------|-------------------------------------|
| FS               | Fylogenetická skupina               |
| HUS              | Hemolyticko-uremický syndrom        |
| GLR              | $\beta$ -glukuronidáza              |
| H <sub>2</sub> S | Sirovodík                           |
| INO              | Inositol                            |
| IPM              | Imipenem                            |
| LAC              | Laktóza                             |
| LF               | Lékařská fakulta                    |
| LYS              | Lysin                               |
| MAL              | Malonát                             |
| MAN              | Mannitol                            |
| MHA              | Müeller Hinton Agar                 |
| MLB              | Melibióza                           |
| MU               | Masarykova univerzita               |
| MPA              | Masopeptonový agar                  |
| MPB              | Masopeptonový bujón                 |
| NMEC             | Neonatal meningitis <i>E. coli</i>  |
| NTEC             | Nekrotoxigenní <i>E. coli</i>       |
| ONP              | $\beta$ -galaktosidáza              |
| ORN              | Ornithin                            |
| PCA              | Plate Count Agar                    |
| PCR              | Polymerase Chain Reaction           |
| RAF              | Raffinóza                           |
| SCI              | Simmons citrát                      |
| S                | Streptomycin                        |
| SAL              | Salicin                             |
| SOR              | Sorbitol                            |
| STEC             | Shiga-like toxigenní <i>E. coli</i> |
| SUC              | Sacharóza                           |
| SXT              | Sulfametoxazol/trimetoprim          |
| TRE              | Trehalóza                           |



|      |                             |
|------|-----------------------------|
| TZP  | Piperacilin/tazobaktam      |
| UPEC | Uropatogenní <i>E. coli</i> |
| URE  | Ureáza                      |
| UTI  | Infekce močových cest       |

## 10. SEZNAM TABULEK

|          |  |    |
|----------|--|----|
| Tab. 1:  | Faktory virulence patogenních kmenů <i>Escherichia coli</i> .....  | 17 |
| Tab. 2:  | Seznam antibiotických disků (Oxoid Ltd.), koncentrací a průměrů inhibičních zón udávající MIC testovaného antibiotika.....         | 35 |
| Tab. 3:  | Faktory virulence determinující intestinální/extraintestinální kmeny.  | 41 |
| Tab. 4:  | Charakterizace kmenů izolovaných z volně žijící zvěře a kuřecího masa.....   | 50 |
| Tab. 5:  | Výskyt antibiotické rezistence u kmenů izolovaných z kuřecího masa a volně žijící zvěře.....                                       | 51 |
| Tab. 6:  | Výskyt antibiotické rezistence u jednotlivých fylogenetických skupin izolátů z kuřecího masa.....                                  | 57 |
| Tab. 7:  | Zastoupení jednotlivých faktorů virulence u kmenů <i>E. coli</i> izolovaných z kuřecího masa a volně žijící zvěře.....             | 61 |
| Tab. 8:  | Výskyt faktorů virulence u jednotlivých fylogenetických skupin kmenů izolovaných kuřecího masa a volně žijících zvířat (n = 105).. | 67 |
| Tab. 9:  | Prevalence antibiotické rezistence u biofilm-tvořících kmenů.....  | 75 |
| Tab. 10: | Prevalence faktorů virulence u biofilm-tvořících kmenů.....  | 76 |
| Tab. 11: | Výskyt biofilm-produkujících kmenů v jednotlivých fylogenetických skupinách.....   | 78 |
| Tab. 12: | Zastoupení jednotlivých bakteriocinů produkovaných kmeny <i>E. coli</i> .....  | 81 |
| Tab. 13: | Inhibiční účinek produkčních kmenů <i>E. coli</i> na kmeny rodu <i>Salmonella</i> .....  | 84 |

## 11. SEZNAM ILUSTRACÍ

|                 |   |           |
|-----------------|---|-----------|
| <i>Obr. 1:</i>  | <i>Stanovení schopnosti tvorby biofilmu v mikrotitračních destičkách...</i>   | <i>38</i> |
| <i>Obr. 2:</i>  | <i>Rozdělení kmenů E. coli do fylogenetických skupin podle dichotomického klíče [4] .....</i>                               | <i>40</i> |
| <i>Obr. 3:</i>  | <i>Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů z kuřat (n=70).....</i>   | <i>47</i> |
| <i>Obr. 4:</i>  | <i>Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů z volně žijící zvěře (n=35).....</i>                            | <i>48</i> |
| <i>Obr. 5:</i>  | <i>Zastoupení jednotlivých fylogenetických skupin u izolátů ze zeleniny (n=15).....</i>                                     | <i>49</i> |
| <i>Obr. 6:</i>  | <i>Porovnání antibiotické rezistence u izolátů z kuřat a volně žijící zvěře.....</i>  | <i>54</i> |
| <i>Obr. 7:</i>  | <i>Výskyt rezistence a multirezistence u kmenů E. coli z kuřat.....</i>   | <i>56</i> |
| <i>Obr. 8:</i>  | <i>Výskyt rezistence a multirezistence u kmenů E. coli z volně žijící zvěře.....</i>  | <i>56</i> |
| <i>Obr. 9:</i>  | <i>Výskyt genů rezistence u izolátů z volně žijící zvěře.....</i>   | <i>58</i> |
| <i>Obr. 10:</i> | <i>Výskyt genů rezistence kódujících produkci betalaktamáz u izolátů z volně žijící zvěře.....</i>                          | <i>59</i> |
| <i>Obr. 11:</i> | <i>Výskyt faktorů virulence u kmenů E. coli izolovaných z kuřecího masa.....</i>  | <i>63</i> |
| <i>Obr. 12:</i> | <i>Výskyt faktorů virulence u kmenů E. coli izolovaných z volně žijící zvěře.....</i>                                       | <i>64</i> |
| <i>Obr. 13:</i> | <i>Korelace mezi výskytem faktorů virulence a původem izolátů.....</i>  | <i>65</i> |
| <i>Obr. 14:</i> | <i>Výskyt antibiotické rezistence u izolátů E. coli ze zeleniny.....</i>  | <i>69</i> |
| <i>Obr. 15:</i> | <i>Prevalence genů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům u izolátů E. coli ze zeleniny.....</i>                         | <i>70</i> |
| <i>Obr. 16:</i> | <i>Prevalence genů rezistence u izolátů E. coli ze zeleniny.....</i>  | <i>71</i> |
| <i>Obr. 17:</i> | <i>Fylogenetický strom sestavený na základě výskytu antibiotické rezistence pomocí softwaru Bionumerics, verze 7.5.....</i> | <i>72</i> |
| <i>Obr. 18:</i> | <i>Tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z kuřat.....</i>   | <i>73</i> |
| <i>Obr. 19:</i> | <i>Tvorba biofilmu u kmenů izolovaných z volně žijících zvířat.....</i>   | <i>74</i> |
| <i>Obr. 20:</i> | <i>Výskyt faktorů virulence ExPEC spojených s tvorbou biofilmu u kmenů izolovaných z volně žijící zvěře.....</i>            | <i>78</i> |
| <i>Obr. 21:</i> | <i>Vpichový pokus.....</i>  | <i>86</i> |

## 12. SEZNAM PŘÍLOH

|  |     |
|--|-----|
| PŘÍLOHA 1. SEZNAM KMENŮ POUŽITÝCH V DIZERTAČNÍ PRÁCI...  | 131 |
| 1A Seznam kmenů izolovaných z kuřat.....   | 131 |
| 1B Seznam kmenů izolovaných ze zeleniny.....   | 133 |
| 1C Seznam kmenů izolovaných z volně žijící zvěře.....  | 133 |
| 1D Seznam kmenů <i>E. coli</i> použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů vpichovým pokusem..... | 134 |
| 1E Seznam indikátorových gramnegativních kmenů použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů.....   | 135 |
| 1F Seznam sbírkových kmenů použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů.....                       | 136 |
| PŘÍLOHA 2. SEZNAM PRIMERŮ.....   | 138 |
| 2A Seznam PCR primerů použitých pro detekci faktorů virulence.....   | 138 |
| 2B Seznam PCR primerů použitých pro zařazení kmenů do fylogenetických skupin.....                              | 139 |
| 2C Seznam PCR primerů použitých pro detekci faktorů virulence, spojených s tvorbou biofilmu.....               | 139 |
| 2D Seznam PCR primerů použitých pro detekci genů rezistence.....   | 140 |
| 2E Seznam PCR primerů použitých pro detekci genů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům.....                | 141 |
| 2F Seznam primerů použitých pro detekci kolicinů.....  | 141 |
| 2G Seznam primerů použitých pro detekci mikrocinů.....   | 143 |
| PŘÍLOHA 3. SEZNAM DRUHŮ ZELENINY POUŽITÉ PRO IZOLACI KMENŮ <i>E. COLI</i> .....                                | 144 |
| PŘÍLOHA 4. CHARAKTERIZACE KMENŮ <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH Z KUŘECÍHO MASA – SOUHRN VÝSLEDKŮ.....              | 145 |

|   |     |
|---|-----|
| PŘÍLOHA 5. CHARAKTERIZACE KMENŮ <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH Z VOLNĚ ŽIJÍCÍ ZVĚŘE – SOUHRN VÝSLEDKŮ.....    | 147 |
| PŘÍLOHA 6. CHARAKTERIZACE KMENŮ <i>E. COLI</i> IZOLOVANÝCH ZE ZELENINY – SOUHRN VÝSLEDKŮ.....             | 149 |
| PŘÍLOHA 7. FYLOGENETICKÝ STROM SESTAVENÝ PODLE CHARAKTERISTICKÝCH VLASTNOSTÍ KMENŮ <i>E. COLI</i> .....   | 150 |
| PŘÍLOHA 8. VÝSLEDKY VPICHOVÉHO POKUSU - TESTOVÁNÍ INHIBIČNÍHO VLIVU BAKTERIOCINŮ NA IZOLÁTY Z POTRAVIN... | 152 |

## 13. CURRICULUM VITAE

### Osobní údaje:

**Jméno a příjmení:** Ing. Mgr. Silvie Pavlíčková  
**Datum narození:** 02.07.1987  
**Kontaktní adresa:** Družba 1224, Hulín 768 24  
**E-mail:** silvie.pavlickova@seznam.cz

### Dosažené vzdělání:

2010 – 2012 *Prezenční navazující magisterské studium*  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Fakulta veterinární hygieny a ekologie  
Obor: Bezpečnost a kvalita potravin  
Získaný titul: Mgr.

2010 – 2012 *Kombinované navazující magisterské studium*  
Univerzita: Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Obor: Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin  
Získaný titul: Ing.

2007-2010 *Prezenční bakalářské studium*  
Veterinární a farmaceutická univerzita Brno  
Fakulta veterinární hygieny a ekologie  
Obor: Bezpečnost a kvalita potravin  
Získaný titul: Bc.

### Pracovní zkušenosti:

10-12/2014 Pracovní stáž – Department of Food Science and Technology,  
Biotechnical faculty, University of Ljubljana, Slovenia  
Téma: Výskyt antibiotické rezistence u verotoxigenních kmenů  
*E. coli* izolovaných z potravin; Schopnost tvorby biofilmu u  
kmenů *E. coli* izolovaných z potravin

9-12/2015 Pracovní stáž – Institut de Biologie en Santé, Centre Hospitalier  
Universitaire d'Angers, University of Angers, France  
Téma: Experimental murine model for the study of the  
*Acinetobacter baumannii* digestive tract colonization: description  
of two clinical strains.

### **Znalosti:**

#### **Jazykové znalosti:**

Angličtina – dosažená úroveň B2

**Počítačové znalosti – pokročilý uživatel:** MS Windows, Internet, MS Office,

**Řidičský průkaz:** sk. B

### **Odborná příprava a zkušenosti:**

Řešené projekty:

#### **IGA/FT/2013/013**

Nepříznivé látky a faktory v životním prostředí a v potravinách

#### **IGA/FT/2014/005**

Pokročilé chemické a biochemické metody v ochraně životního prostředí

#### **IGA/FT/2015/012**

Výzkum procesů ovlivňujících kvalitu potravin a stav životního prostředí

#### **IGA/FT/2016/012**

Výzkum procesů ke zlepšení stavu životního prostředí a kvality potravin

## 14. SEZNAM PUBLIKACÍ

### Příspěvky v mezinárodních časopisech s impakt faktorem

**Pavlickova, S.**, Dolezalova, M., Holko, I., 2015. Resistance and virulence factors of *Escherichia coli* isolated from chicken, *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 50, 1–5. DOI: 10.1080/03601234.2015.1011959

Holko, I., Dolezalova, M., **Pavlickova, S.**, Valenta, T., Gal, R., Holkova, T. The spread of antibiotic resistance in wild birds: evaluation of *E. coli* isolated from pheasants in the Czech Republic and Slovakia, *Veterinaria Italiana*, accepted.

**Pavlickova, S.** Klancnik, A., Dolezalova, M., Smole-Mozina, S., Holko, I. Antibiotic resistance, virulence factors and biofilm formation ability in *Escherichia coli* strains isolated from chicken meat and wild-life in Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*, submitted.

Coron, N., **Pavlickova, S.**, Godefroy, A., Pailhoriès, H., Kempf, M., Cassisa, V., Marsollier, L., Marion, E., Joly-Guillou, M. L., Eveillard, M. Colonization of the digestive tract with extensively drug-resistant *Acinetobacter baumannii* and subsequent infection: a comparison of two clinical strains in an experimental murine model, *Clinical Microbiology and Infection*, submitted.

Coron, N., **Pavlickova, S.**, Godefroy, A., Pailhoriès, H., Kempf, M., Cassisa, V., Marsollier, L., Marion, E., Joly-Guillou, M. L., Eveillard, M. From gut to lungs: a potential pathway for *Acinetobacter baumannii* pneumonia. *European Respiratory Journal*, submitted.

### Příspěvky ve sbornících z konferencí:

**Pavlickova, S.**, Dolezalova, M., Holko, I. 2013. Characterization of *Escherichia coli* strains isolated from food. In *The 4th International Scientific Conference Applied Natural Sciences, 2 - 5 October, 2013*. ISBN 978-80-8105-501-0.

Holko, I., Doležalová, M., **Pavličková, S.**, Gál, R., 2014. Resistance of *Escherichia coli* isolated from pheasants (*Phasianus colchicus*) in the region of eastern Moravia and Slovakia. *Animal Physiology 2014, Proceedings of International Conference, Prušánky, 21 – 22 May, 2014*, ISBN 978-80-7375-971-1.



**Pavlickova, S.**, Klancnik, A., Dolezalova M., Smole-Mozina, S., Holko, I. Correlation between antibiotic resistance and virulence factors in biofilm producing *Escherichia coli* strains. *XXV. Konference mladých mikrobiologů, Tomáškovy dny, Masarykova univerzita, Brno, 2. - 3. 6. 2016.* ISBN 978-80-210-8255-7.

Doležalová M., **Pavličková, S.**, Veverková, L., Holko, I. Genotypizace izolátů *Escherichia coli* z potravin. *27. Kongres Československé společnosti mikrobiologické „Mikroorganismy na prahu 21. století“, 7. – 9. 9. 2016.*

Coron, N., **Pavlickova, S.**, Godefroy, A., Pailhoriès, H., Kempf, M., Joly-Guillou, M., Eveillard, M. Implementation of a murine model of *Acinetobacter baumannii* digestive-tract colonization and preliminary information for future applications. *ECCMID 2016 scientific programme. 2016; -26th European Conference Clinical Microbiology Infectious Diseases; April 9-12, 2016; Amsterdam, The Netherlands.* Abstrakt dostupný z: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/)

## 15. PŘÍLOHY

### PŘÍLOHA 1. SEZNAM KMENŮ POUŽITÝCH V DIZERTAČNÍ PRÁCI

#### A. Seznam kmenů izolovaných z kuřat.

| <b>rok izolace</b> | <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| 2006               | 87W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 88W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 89W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 90W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 91W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 92W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 93W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 94W                   | kuřecí kůže  |
| 2006               | 95W                   | kuřecí kůže  |
| 2007               | 96W                   | kuřecí kůže  |
| 2007               | 97W                   | kuřecí kůže  |
| 2007               | 98W                   | kuřecí kůže  |
| 2007               | 100W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 101W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 102W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 103W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 104W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 105W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 106W                  | kuřecí kůže  |
| 2007               | 107W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 109W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 110W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 112W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 113W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 114W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 115W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 116W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 117W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 119W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 120W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 121W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 123W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 125W                  | kuřecí kůže  |
| 2009               | 126W                  | kuřecí kůže  |

**1A- pokračování**

| <b>rok izolace</b> | <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| 2010               | 231                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 232                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 233                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 234                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 235                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 236                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 237                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 238                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 239                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 240                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 241                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 242                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 243                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 244                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 245                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 246                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 247                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 248                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 249                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 250                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 251                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 252                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 253                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 254                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 255                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 256                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 257                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 258                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 259                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 260                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 261                   | kuřecí kůže  |
| 2010               | 262                   | kuřecí kůže  |
| 2011               | 271                   | kuřecí kůže  |
| 2011               | 273                   | kuřecí kůže  |
| 2011               | 285                   | kuřecí kůže  |

**B. Seznam kmenů izolovaných ze zeleniny.**

| <b>rok izolace</b> | <b>označení kmene</b> | <b>druh zeleniny</b> | <b>původ</b>    |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-----------------|
| 2015               | F10                   | mungo klíčky         | Itálie          |
| 2015               | F52                   | mungo klíčky         | Česká republika |
| 2015               | F53                   | mungo klíčky         | Česká republika |
| 2015               | F77                   | jarní cibule         | Německo         |
| 2015               | F78                   | rajčata              | Maroko          |
| 2015               | F81                   | salát little gem     | Holandsko       |
| 2015               | F84                   | baby karotka         | Holandsko       |
| 2015               | F87                   | mungo klíčky         | Česká republika |
| 2015               | F94                   | rajčata              | Maroko          |
| 2015               | F103                  | petržel              | Česká republika |
| 2015               | F104                  | ředkev               | Česká republika |
| 2015               | F105                  | mrkev                | Česká republika |
| 2015               | F106                  | ředkev               | Česká republika |
| 2015               | F107                  | jarní cibule         | Německo         |
| 2015               | F108                  | cuketa               | Španělsko       |

**C. Seznam kmenů izolovaných z volně žijící zvěře.**

| <b>rok izolace</b> | <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| 2010               | 1                     | bažant       |
| 2010               | 2                     | bažant       |
| 2010               | 3                     | bažant       |
| 2010               | 4                     | bažant       |
| 2010               | 5                     | bažant       |
| 2010               | 6                     | bažant       |
| 2010               | 8                     | bažant       |
| 2010               | 1C                    | kachna       |
| 2010               | 1D                    | kachna       |
| 2010               | 1E                    | kachna       |
| 2010               | 1F                    | kachna       |
| 2010               | 1G                    | kachna       |
| 2010               | 1I                    | kachna       |
| 2010               | 1J                    | kachna       |
| 2010               | 2C                    | kachna       |
| 2010               | 2D                    | kachna       |
| 2010               | 2E                    | kachna       |
| 2010               | 2F                    | kachna       |

### **1C- pokračování**

| <b>rok izolace</b> | <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> |
|--------------------|-----------------------|--------------|
| 2010               | 1/S                   | bažant       |
| 2010               | 2/S                   | bažant       |
| 2010               | 4/S                   | bažant       |
| 2010               | 7/S                   | bažant       |
| 2011               | ZO                    | bažant       |
| 2011               | ZP                    | bažant       |
| 2011               | BO1                   | bažant       |
| 2011               | BO2                   | bažant       |
| 2014               | 3                     | zajíc        |
| 2014               | 5                     | zajíc        |
| 2014               | A                     | zajíc        |
| 2014               | D                     | prase divoké |
| 2014               | 1F                    | bažant       |
| 2014               | 2F                    | bažant       |
| 2014               | 3F                    | bažant       |
| 2014               | 4F                    | bažant       |
| 2014               | 1M                    | bažant       |
| 2014               | 2M                    | bažant       |
| 2014               | 3M                    | bažant       |
| 2014               | 4M                    | bažant       |

### **D. Seznam kmenů *E. coli* použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů vpichovým pokusem.**

| <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> | <b>produkce bakteriocinů</b> |
|-----------------------|--------------|------------------------------|
| 93W                   | kuřecí kůže  | E8                           |
| 94W                   | kuřecí kůže  | E7, mc7                      |
| 96W                   | kuřecí kůže  | Ia                           |
| 97W                   | kuřecí kůže  | mC7                          |
| 98W                   | kuřecí kůže  | E7, E8                       |
| 101W                  | kuřecí kůže  | E5, mC7                      |
| 103W                  | kuřecí kůže  | mV                           |
| 105W                  | kuřecí kůže  | Ia                           |
| 107W                  | kuřecí kůže  | E5, E9, B, M, Y              |
| 17                    | kuřecí kůže  | Ia, mL                       |

**ID- pokračování**

| označení kmene | původ        | produkce bakteriocinů      |
|----------------|--------------|----------------------------|
| 59             | kuřecí kůže  | mV                         |
| 93             | kuřecí kůže  | E1, E2, E6, E7, E8, mV, mM |
| 94             | kuřecí kůže  | Ia                         |
| 222            | bažantí maso | B, M, Ia, Ib, mB17, mV     |
| 224            | bažantí maso | B, M, Ia, Ib, mB17, mV     |
| 225            | bažantí maso | E1, B, M, Ia, Ib, mB17     |
| 229            | bažantí maso | B, M, Ia, Ib, mB17         |
| 230            | bažantí maso | B, M, mB17                 |

**E. Seznam indikátorových gramnegativních kmenů použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů.**

|                                 | označení kmene | původ       |
|---------------------------------|----------------|-------------|
| <i>Aeromonas hydrophila</i>     | 28             | kuřecí kůže |
| <i>Aeromonas</i> sp.            | 32             | kuřecí kůže |
| <i>Aeromonas caviae</i>         | 55             | kuřecí kůže |
| <i>Citrobacter freundii</i>     | 217            | kuřecí kůže |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 118W           | kuřecí kůže |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 124W           | kuřecí kůže |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 212            | kuřecí kůže |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 213            | kuřecí kůže |
| <i>Enterobacter</i> sp.         | 214            | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>       | 2              | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella</i> sp.           | 69             | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella</i> sp.           | 98             | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>       | 210            | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>       | 215            | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella</i> sp.           | 216            | kuřecí kůže |
| <i>Klebsiella oxytoca</i>       | 218            | kuřecí kůže |
| <i>Leclercia adecarboxylata</i> | 40             | kuřecí kůže |
| <i>Moxarella</i>                | 78             | kuřecí kůže |
| <i>Pantoea agglomerans</i>      | 21             | kuřecí kůže |

**1E- pokračování**

|                                | <b>označení kmene</b> | <b>původ</b> |
|--------------------------------|-----------------------|--------------|
| <i>Proteus</i> sp.             | 100                   | kuřecí kůže  |
| <i>Pseudomonas fragi</i>       | 19                    | kuřecí kůže  |
| <i>Pseudomonas fragi</i>       | 74                    | kuřecí kůže  |
| <i>Pseudomonas putida</i>      | 23                    | kuřecí kůže  |
| <i>Serratia marcescens</i>     | 3                     | kuřecí kůže  |
| <i>Serratia liquefaciens</i>   | 24                    | kuřecí kůže  |
| <i>Serratia liquefaciens</i>   | 48                    | kuřecí kůže  |
| <i>Yersinia enterocolitica</i> | 88                    | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 119W                  | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 122W                  | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 123W                  | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 125W                  | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 235                   | kuřecí kůže  |
| <i>Escherichia coli</i>        | 248                   | kuřecí kůže  |

**F. Seznam sbírkových kmenů použitých pro stanovení biologické aktivity bakteriocinů.**

|  | <b>označení</b> | <b>zdroj</b>                         |
|--|-----------------|--------------------------------------|
| <i>Escherichia coli</i>  | K12 Row         | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Escherichia coli</i>  | B1              | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Escherichia coli</i>  | φ               | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Escherichia coli</i>  | P400            | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Escherichia coli</i>  | Sabina 40       | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Shigella sonnei</i>   | 17              | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Shigella boydii</i>   | 23WU8           | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Shigella flexneri</i>   | 25W             | Biologický ústav LF MU, Brno         |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Enteritidis | CCM 4420        | Česká sbírka mikroorganismů, MU Brno |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium | CCM 7205        | Česká sbírka mikroorganismů, MU Brno |
| <i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> ser. Typhimurium | 10W             | Biologický ústav LF MU, Brno         |

***1F- pokračování***

|                               | <b>označení</b> | <b>zdroj</b>                 |
|-------------------------------|-----------------|------------------------------|
| <i>Salmonella</i> sp.         | 20W 311/96      | Biologický ústav LF MU, Brno |
| <i>Salmonella</i> sp.         | 21W 569/99      | Biologický ústav LF MU, Brno |
| <i>Salmonella</i> sp.         | 22W 79/05       | Biologický ústav LF MU, Brno |
| <i>Enterobacter aerogenes</i> | 31W 1832        | Biologický ústav LF MU, Brno |



## PŘÍLOHA 2. SEZNAM PRIMERŮ

### A. Seznam PCR primerů použitých pro detekci faktorů virulence.

| primer  | sekvence (5' - 3')         | velikost (pb) | T <sub>A</sub> | reference |       |
|---------|----------------------------|---------------|----------------|-----------|-------|
| tsh-F   | ACTATTCTCTGCAGGAAGTC       | 824           | 58             | [108]     |       |
| tsh-R   | CTTCCGATGTTCTGAACGT        |               |                |           |       |
| CNF1-F  | GGCGACAAATGCAGTATTGCT      | 552           | 63             | [107]     |       |
| CNF1-R  | GACGTTGGTTGCGGTAATTTT      |               |                |           |       |
| CNF2-F  | GTGAGGCTCAACGAGATTATG      | 839           | 63             |           |       |
| CNF2-R  | CCACGCTTCTTCTTCAGTTGT      |               |                |           |       |
| papC-F  | TGATATCACGCAGTCAGTAGC      | 501           | 58             | [108]     |       |
| papC-R  | CCGGCCATATTCACATAAC        |               |                |           |       |
| neuC-F  | GGTGGTACATTCCGGGATGTC      | 670           | 58             |           |       |
| neuC-R  | AGGTGAAAAGCCTGGTAGTGT      |               |                |           |       |
| iss-F   | ATCACATAGGATTCTGCCG        | 309           | 58             |           |       |
| iss-R   | CAGCGGAGTATAGATCCCA        |               |                |           |       |
| iucD-F  | ACAAAAAGTTCTATCGCTTCC      | 714           | 58             |           |       |
| iucD-R  | CCTGATCCAGATGATCCTC        |               |                |           |       |
| EinV-F  | TTCTGATGCCTGATGGACCAG      | 140           | 63             |           | [107] |
| EinV-R  | TGGAAAAACTGAGTGCCTCTG      |               |                |           |       |
| Eagg-F  | AGACTCTGGCGAAAGACTGTA      | 194           | 63             |           |       |
| Eagg-R  | ATGGCTGTCTGTAATAGATGA      |               |                |           |       |
| eaeA-F  | TGAGCGGCTGGCATGAGTCAT      | 241           | 63             |           |       |
| eaeA-R  | TCGATCCCCATCGTCAACAGA      |               |                |           |       |
| vat-F   | TCCTGGGACATAATGGCTAG       | 981           | 63             |           |       |
| vat-R   | GTGTCAGAACGGAATTGTC        |               |                |           |       |
| VT1-F   | ACGTTACAGCGTGTTCRGGGATC    | 121           | 63             | [107]     |       |
| VT1-R   | TTGCCACAGACTGCGTCAGTRAGG   |               |                |           |       |
| VT2-F   | TGTGGCTGGTTCGTTAATACGGC    | 102           | 63             |           |       |
| VT2-R   | TCCGTTGTCATGGAAACCGTTGTC   |               |                |           |       |
| ST I-F  | TTTCCCCTCTTTTAGTCAGTCAACTG | 160           | 63             |           |       |
| ST I-R  | GGCAGGATTACAACAAAGTTCACAG  |               |                |           |       |
| ST II-F | CCCCCTCTCTTTTGCCTTCTTTCC   | 423           | 63             |           |       |
| ST II-R | TGCTCCAGCAGTACCATCTCTAACCC |               |                |           |       |
| LT I-F  | TGGTTCATCATGCACCACAAGG     | 360           | 63             |           |       |
| LT I-R  | CCATTTCTCTTTTGCCTGCCATC    |               |                |           |       |

T<sub>A</sub> – teplota annealingu

**B. Seznam PCR primerů použitých pro zařazení kmenů do fylogenetických skupin.**

| primer    | sekvence (5' - 3')    | velikost (pb) | T <sub>A</sub> | reference |
|-----------|-----------------------|---------------|----------------|-----------|
| ChuA1     | GACGAACCAACGGTCAGGAT  | 279           | 55             | [70]      |
| ChuA2     | TGCCGCCAGTACCAAAGACA  |               |                |           |
| YjaA1     | TGAAGTGTCAGGAGACGCTG  | 211           | 55             |           |
| YjaA2     | ATGGAGATTGCGTTCCTCACC |               |                |           |
| TspE4C2.1 | GAGTAATGTCGGGGCATTCA  | 152           | 55             |           |
| TspE4C2.2 | CGCGCCAACAAAGTATTACG  |               |                |           |

T<sub>A</sub> – teplota annealingu

**C. Seznam PCR primerů použitých pro detekci faktorů virulence, spojených s tvorbou biofilmu.**

| primer      | sekvence (5' - 3')        | velikost (pb) | T <sub>A</sub> | reference |       |
|-------------|---------------------------|---------------|----------------|-----------|-------|
| sfaS-R      | CCGCCAGCATTCCCTGTATTC     | 240           | 64             | [191]     |       |
| sfaS-F      | GTGGATACGACGATTACTGTG     |               |                |           |       |
| afa/draBC-R | CCCGTAACGCGCCAGCATCTC     | 559           | 63             |           |       |
| afa/draBC-F | GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC     |               |                |           |       |
| fimH-R      | GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA     | 508           | 57             |           |       |
| fimH-F      | TGCAGAACGGATAAGCCGTGG     |               |                |           |       |
| hlyA-R      | ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA | 1177          | 63             |           |       |
| hlyA-F      | AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT |               |                |           |       |
| iutA-R      | CGTCGGGAACGGGTAGAATCG     | 300           | 63             |           |       |
| iutA-F      | GGCTGGACATCATGGGAACTGG    |               |                |           |       |
| kpsMTIII-R  | AGGCGTATCCATCCCTCCTAAC    | 392           | 61             |           |       |
| kpsMTIII-F  | TCCTCTTGCTACTATTCCCCCT    |               |                |           |       |
| ibeA-R      | TGGTGCTCCGGCAAACCATGC     | 170           | 63             |           |       |
| ibeA-F      | AGGCAGGTGTGCGCCGCGTAC     |               |                |           |       |
| kpsMTII-R   | CATCCAGACGATAAGCATGAGCA   | 272           | 61             |           | [140] |
| kpsMTII-F   | GCGCATTTGCTGATACTGTTG     |               |                |           |       |
| hlyD-R      | GCCCTGATTACTGAAGCCTG      | 904           | 61             |           |       |
| hlyD-F      | CTCCGGTACGTGAAAAGGAC      |               |                |           |       |

T<sub>A</sub> – teplota annealingu

#### D. Seznam PCR primerů použitých pro detekci genů rezistence.

| primer        | sekvence (5' - 3')          | velikost (pb) | T <sub>A</sub> | reference |       |
|---------------|-----------------------------|---------------|----------------|-----------|-------|
| aaC6 IbC-F    | GATCTCATATCGTCGAGTGGTGG     | 435           | 58             | [112]     |       |
| aaC6 IbC-R    | GAACCATGTACACGGCTGGAC       |               |                |           |       |
| aph(3')-Ia-F  | ATGGGCTCGCGATAATGTC         | 600           | 50             |           |       |
| aph(3')-Ia-R  | CTCACCGAGGCAGTTCCAT         |               |                |           |       |
| aph(3')-IIa-F | GAACAAGATGGATTGCACGC        | 680           | 50             |           |       |
| aph(3')-IIa-R | GCTCTTCAGCAATATCACGG        |               |                |           |       |
| flor-F        | CACGTTGAGCCTCTATATGG        | 868           | 55             |           | [110] |
| flor-R        | ATGCAGAAGTAGAACGCGAC        |               |                |           |       |
| sul1-F        | CGGCGTGGGCTACCTGAACG        | 433           | 69             |           | [192] |
| sul1-R        | GCCGATCGCGTGAAGTTCCG        |               |                |           |       |
| sul2-F        | GCGCTCAAGGCAGATGGCATT       | 293           | 69             |           |       |
| sul2-R        | GCGTTTGATACCGGCACCCGT       |               |                |           |       |
| sul3-F        | GAGCAAGATTTTTGGAAT          | 880           | 63             | [193]     |       |
| sul3-R        | CATCTGCAGCTAACCTAGGGCTTTGGA |               |                |           |       |
| int1-F        | CACTCCGGCACCGCCAACTTT       | 483           | 62             | [111]     |       |
| int1-R        | GAACGGGCATGCGGATCAGTGAG     |               |                |           |       |
| int2-F        | CACGGATATGCGACAAAAAGGT      | 788           | 62             |           |       |
| int2-R        | GTAGCAAACGAGTGACGAAATG      |               |                |           |       |
| dhfrI-F       | AAGAATGGAGTTATCGGGAATG      | 391           | 50             | [109]     |       |
| dhfrI-R       | GGGTAAAACTGGCCTAAAATTG      |               |                |           |       |
| dhfrV-F       | CTGCAAAAGCGAAAAACGG         | 432           | 50             |           |       |
| dhfrV-R       | GCAATAGTTAATGTTTGAGCTAAAG   |               |                |           |       |
| QepA-F        | GCAGGTCCAGCAGCGGGTAG        | 199           | 60             | [194]     |       |
| QepA-R        | CTTCCTGCCCGAGTATCGTG        |               |                |           |       |
| qnrS-F        | ACGACATTCGTCAACTGCAA        | 600           | 58             | [195]     |       |
| qnrS-R        | TAAATTGGCACCCGTAGGC         |               |                |           |       |
| tetA-F        | GGCCTCAATTCCTGACG           | 372           | 55             | [196]     |       |
| tetA-R        | AAGCAGGATGTAGCCTGTGC        |               |                |           |       |
| tetB-F        | GAGACGCAATCGAATTCGG         | 228           | 55             |           |       |
| tetB-R        | TTTAGTGGCTATTCTTCCTGCC      |               |                |           |       |
| qac-F         | GCCCCTCCGCCGTTGTCATAATC     | 250           | 63             | [139]     |       |
| qac-R         | CGGCCTCCGCAGCGACTTCC        |               |                |           |       |

## 2D - pokračování

|        |                              |     |    |  |
|--------|------------------------------|-----|----|--|
| merA-F | GATCCGCGCCGCCCATATCGCCCATCTG | 250 | 60 |  |
| merA-R | CACGCGCTCGCCGCCGTCGTTGAGTT   |     |    |  |

$T_A$  – teplota annealingu

## E. Seznam PCR primerů použitých pro detekci genů rezistence k beta-laktamovým antibiotikům.

| primer       | sekvence (5' - 3')     | velikost (pb) | $T_A$ | reference |       |
|--------------|------------------------|---------------|-------|-----------|-------|
| blaTEM-F     | GAGTATTCAACATTTTCGT    | 857           | 50    | [109]     |       |
| blaTEM-R     | ACCAATGCTTAATCAGTGA    |               |       |           |       |
| blaSHV-F     | TCGCCTGTGTATTATCTCCC   | 768           | 50    |           |       |
| blaSHV-R     | CGCAGATAAATCACCACAATG  |               |       |           |       |
| blaOXA-1-F   | GCAGCGCCAGTGCATCAAC    | 198           | 50    |           |       |
| blaOXA-1-R   | CCGCATCAAATGCCATAAGTG  |               |       |           |       |
| blaOXA-7-F   | AGTTCTCTGCCGAAGCC      | 591           | 50    |           |       |
| blaOXA-7-R   | TCTCAACCCAACCAACCC     |               |       |           |       |
| blaPSE-4-F   | CTGCTCGTATAGGTGTTTCC   | 705           | 50    |           |       |
| blaPSE-4-R   | TCGCATCATTTGCTCTTC     |               |       |           |       |
| blaCTX-M-3-F | AATCACTGCGTCAGTTCAC    | 701           | 50    |           | [109] |
| blaCTX-M-3-R | TTTATCCCCACAACCCAG     |               |       |           |       |
| CTX-M-1g-F   | CCCATGGTTAAAAAATCACTGC | 58            | 58    | [197]     |       |
| CTX-M-1g-R   | CAGCGCTTTTGCCGTCTAAG   |               |       |           |       |

$T_A$  – teplota annealingu

## F. Seznam primerů použitých pro detekci kolicinů.

| kolicin | primer | sekvence 5' - 3'      | velikost (pb) | $T_A$ |
|---------|--------|-----------------------|---------------|-------|
| A       | ColA-F | CGTGGGGAAAAGTCATCATC  | 475           | 55    |
|         | ColA-R | GCTTTGCTCTTTCCTGATGC  |               |       |
| B       | ColB-F | AAGAAAATGACGAGAAGACG  | 492           | 55    |
|         | ColB-R | GAAAGACCAAAGGCTATAAGG |               |       |
| D       | ColD-F | CTGGACTGCTGCTGGTGATA  | 420           | 55    |
|         | ColD-R | GAAGGTGCGCTTACTACTGC  |               |       |

*1F – pokračování I*

| <b>kolicin</b> | <b>primer</b> | <b>sekvence 5' - 3'</b> | <b>velikost (pb)</b> | <b>T<sub>A</sub></b> |
|----------------|---------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| E1             | ColE1-F       | TGTGGCATCGGGCGAGAATA    | 649                  | 55                   |
|                | ColE1-R       | CTGCTTCCTGAAAAGCCTTTT   |                      |                      |
| E2             | ColE2-R       | TGATGCTGCTGCAAAAGAG     | 409                  | 55                   |
|                | ColE2-R       | TTCAAAGCGTTCCTACCAC     |                      |                      |
| E3             | ColE3-F       | TAAGCAGGCTGCATTTGATG    | 413                  | 55                   |
|                | ColE3-R       | TCGGATTCGGACCTTTCAAC    |                      |                      |
| E4             | ColE4-F       | GAAGGCTGCATTTGATGCT     | 409                  | 55                   |
|                | ColE4-R       | CGGATCCGGACCTTTAATTT    |                      |                      |
| E5             | ColE5-F       | TAAGCAGGCTGCATTTGATG    | 430                  | 55                   |
|                | ColE5-R       | TTGAATTCTCGAATCGTCCA    |                      |                      |
| E6             | ColE6-F       | ACCGAACGTCCAGGTGTT      | 399                  | 55                   |
|                | ColE6-R       | TTTAGCCTGTCGCTCCTGAT    |                      |                      |
| E7             | ColE7-F       | GCATTCTGCCATCTGAAAT     | 431                  | 55                   |
|                | ColE7-R       | CTTCTGCCACTTTCTTTTCG    |                      |                      |
| 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      | CAGGTTATCCCTCTCACCA     |                      |                      |
| M              | ColM-F        | GCTACCACTTCGCAAAACC     | 429                  | 55                   |
|                | ColM-R        | GAGCGACTCTCCGATAATGC    |                      |                      |
| N              | ColN-F        | AGCTTGGCGAGTATCTTGGA    | 401                  | 55                   |
|                | ColN-R        | CAACACAGCCCCGAATAAAC    |                      |                      |
| U              | ColU-F        | TGATTGCTGCGAGAAAAATG    | 485                  | 55                   |
|                | ColU-R        | TCTGACAGCCTCTCCCTGTT    |                      |                      |
| Y              | ColY-F        | GCAGGCAGAAAAGAACAAGG    | 477                  | 55                   |
|                | ColY-R        | CGGACGTTATTTGCCTTCAT    |                      |                      |
| Js             | ColJs-F       | TCAAAATGTTTGGGCTCCTC    | 254                  | 55                   |
|                | ColJs-R       | TAATCTGCCCTGTCCACTG     |                      |                      |
| 5              | Col5-F        | CATTGGCAAAGCGAAATTC     | 443                  | 55                   |
|                | Col5-R        | TGCAACTCTGGAAACAATCG    |                      |                      |

### 1F – pokračování II

| <b>kolicin</b> | <b>primer</b> | <b>sekvence 5' - 3'</b> | <b>velikost (pb)</b> | <b>T<sub>A</sub></b> |
|----------------|---------------|-------------------------|----------------------|----------------------|
| 10             | Col10-F       | GGTTACCGGATTCCTGGAT     | 448                  | 55                   |
|                | Col10-R       | TTCTGAATGCTTGGCCCACT    |                      |                      |
| S4             | ColS4-F       | TATATGGCCCAACTGCTGGT    | 456                  | 55                   |
|                | ColS4-R       | CGTAAGGACGGACACCTGTT    |                      |                      |
| cea2           | cea2-F        | GGTGGAAGTGGAGGTAGCAA    | 399                  | 55                   |
|                | cea2-R        | ACGTCGTTGTTGTTCTGCTT    |                      |                      |

T<sub>A</sub> – teplota annealingu

### G. Seznam primerů použitých pro detekci mikrocinů.

|      | <b>primer</b> | <b>sekvence (5' - 3')</b>      | <b>velikost (pb)</b> | <b>T<sub>A</sub></b> |
|------|---------------|--------------------------------|----------------------|----------------------|
| B17  | MccB17-F      | TCACGCCAGTCTCCATTAGGTGTTGGCATT | 135                  | 55                   |
|      | MccB17-R      | TTCCGCCGCTGCCACCGTTTCCACCACTAC |                      |                      |
| C7   | MccC7-F       | CGTTCAACTGTTGCAATGCT           | 134                  | 55                   |
|      | MccC7-R       | AGTTGAGGGGGCGTGTAAATTG         |                      |                      |
| J25  | MccJ25-F      | TCAGCCATAGAAAGATATAGGTGTACCAAT | 175                  | 55                   |
|      | MccJ25-R      | TGATTAAGCATTTTCATTTTAATAAAGTGT |                      |                      |
| H47  | MccH47-F      | CACTTTCATCCCTTCGGATTG          | 227                  | 55                   |
|      | MccH47-R      | AGCTGAAGTCGCTGGCGCACCTCC       |                      |                      |
| V    | MccV-F        | CACACACAAAACGGGAGCTGTT         | 680                  | 55                   |
|      | MccV-R        | CTTCCCGCAGCATAGTTCCAT          |                      |                      |
| L    | MccL-F        | GGTAAATGATATATGAGAGAAATAACGTTA | 233                  | 55                   |
|      | MccL-R        | TTTCGCTGAGTTGGAATTCCTGCTGCATC  |                      |                      |
| M    | MccM-F        | CGTTTATTATTTTATGAATA           | 456                  | 55                   |
|      | MccM-R        | AAACGGAAGAATGGATGATCTCGCAA     |                      |                      |
| E492 | MccE492-F     | GTCTCTCCTGCACCAAAAAGC          | 291                  | 55                   |
|      | MccE492-R     | TTTTCAGTCATGGCGTTCTG           |                      |                      |
| cea2 | cea2-F        | GGTGGAAGTGGAGGTAGCAA           | 399                  | 55                   |
|      | cea2-R        | ACGTCGTTGTTGTTCTGCTT           |                      |                      |

PŘÍLOHA 3. SEZNAM DRUHŮ ZELENINY POUŽITÉ PRO IZOLACI KMENŮ *E. COLI*

| <b>zelenina</b>  | <b>počet pozitivních vzorků/celkový počet vzorků</b> | <b>označení kmene/původ zeleniny</b> |
|------------------|--|--------------------------------------|
| mungo klíčky     | 4/12   | F10/IT, F52/ČR, F53/ČR, F87/ČR       |
| čočka klíčky     | 0/1  |                                      |
| vojtěška klíčky  | 0/1  |                                      |
| brokolice        | 0/4  |                                      |
| jahody           | 0/4  |                                      |
| mrkev            | 1/4  | F105/ČR                              |
| cuketa           | 1/3  | F8/SP                                |
| špenát           | 0/3  |                                      |
| ledový salat     | 0/3  |                                      |
| okurka           | 0/6  |                                      |
| směs salatu      | 0/9  |                                      |
| rajče            | 2/10   | F78/MAR, F94/ČR                      |
| lilek            | 0/3  |                                      |
| cizrna klíčky    | 0/1  |                                      |
| baby karotka     | 1/3  | F84/NDL                              |
| pórek            | 0/1  |                                      |
| ředkev           | 2/7  | F106/ČR, F104/ČR                     |
| jarní cibule     | 2/7  | F77/ČR, F107/ČR                      |
| paprika          | 0/2  |                                      |
| salát little gem | 1/2  | F81/IT                               |
| rukola           | 0/3  |                                      |
| salát dubový     | 0/1  |                                      |
| salát polníček   | 0/1  |                                      |
| čekanka          | 0/1  |                                      |
| celer řapíkatý   | 0/1  |                                      |
| žampiony         | 0/1  |                                      |
| petržel          | 1/2  | F103/ČR                              |
| avokado          | 0/1  |                                      |
| řepa             | 0/1  |                                      |
| tuřín            | 0/1  |                                      |
| květák           | 0/1  |                                      |
| fazolové lusky   | 0/1  |                                      |
| brambora         | 0/1  |                                      |

ČR- Česká republika, IT- Itálie, SP- Španělsko, NDL-Nizozemsko, MAR- Maroko.

PŘÍLOHA 4. CHARAKTERIZACE KMENŮ *E. COLI* IZOLOVANÝCH Z KUŘECÍHO MASA – SOUHRN VÝSLEDKŮ

| označení kmene | FS | biofilm | ATB rezistence          | faktory virulence          | bakteriocinotypizace |
|----------------|----|---------|-------------------------|----------------------------|----------------------|
| 87W            | A  | -       | -                       | -                          | E7, E8               |
| 88W            | A  | -       | -                       | <i>iss</i>                 | E7, E8               |
| 89W            | A  | -       | -                       | -                          | E1                   |
| 90W            | A  | -       | AMP                     | -                          | Y                    |
| 91W            | B2 | -       | CIP                     | <i>iss, iucD</i>           | Y                    |
| 92W            | A  | +++     | -                       | -                          | U, Y, E8             |
| 93W            | A  | -       | AMC                     | -                          | E8                   |
| 94W            | B1 | -       | -                       | -                          | E7, mC7              |
| 95W            | A  | +++     | FEP                     | <i>iss</i>                 | E1, E7, M            |
| 96W            | A  | ++      | -                       | <i>iucD</i>                | Ia                   |
| 97W            | A  | ++      | -                       | -                          | mC7                  |
| 98W            | A  | +++     | -                       | <i>iss</i>                 | E7, E8               |
| 100W           | A  | ++      | -                       | -                          | -                    |
| 101W           | A  | ++      | -                       | <i>iucD</i>                | E5, mC7              |
| 102W           | A  | ++      | -                       | <i>iucD</i>                | Ia, mC7, mV          |
| 103W           | B1 | ++      | AMP, CIP, DO, CEF       | <i>iss, papC, tsh, vat</i> | mV                   |
| 104W           | A  | +++     | -                       | <i>iucD</i>                | Ia                   |
| 105W           | B2 | ++      | -                       | <i>eaeA</i>                | Ia                   |
| 106W           | D  | ++      | CEF                     | <i>iss, papC, tsh, vat</i> | -                    |
| 107W           | B2 | +++     | -                       | <i>eaeA</i>                | E5, E9, B, M, Y      |
| 109W           | A  | +++     | -                       | -                          | E7, E8               |
| 110W           | A  | +++     | -                       | -                          | E7, E8               |
| 112W           | A  | +++     | AMP                     | -                          | E7, E8               |
| 113W           | A  | +++     | -                       | -                          | E7, E8               |
| 114W           | A  | ++      | -                       | -                          | E7, E8               |
| 115W           | B1 | -       | AMC, AMP, FEP, CN, SXT  | <i>iss, iucD</i>           | -                    |
| 116W           | A  | +       | AMP, C, SXT             | <i>iucD</i>                | Ib, E1, E2           |
| 117W           | A  | ++      | AMP, AMC, C, SXT        | <i>iucD</i>                | Ia, Ib, E1           |
| 119W           | D  | ++      | AMP, AMC, CEF, CXM, SXT | -                          | -                    |
| 120W           | A  | ++      | CIP, CN                 | <i>iss, iucD</i>           | B, M, E1             |
| 121W           | A  | -       | -                       | <i>iss, iucD</i>           | B, M, E1             |
| 122W           | D  | ++      | AMP                     | <i>iss</i>                 | -                    |
| 123W           | A  | ++      | CIP, CN                 | <i>iucD, neuC</i>          | -                    |
| 125W           | A  | +++     | AMP                     | -                          | -                    |
| 126W           | A  | -       | AMC                     | -                          | -                    |
| 231            | A  | +++     | -                       | <i>iucD, tsh</i>           | -                    |
| 232            | A  | +       | AMC                     | -                          | -                    |



| označení kmene | FS | biofilm | ATB rezistence                             | faktory virulence           | bakteriocinotypizace |
|----------------|----|---------|--|-----------------------------|----------------------|
| 233            | A  | ++      | AMC, AMP, CEF, CTX, CXM                    | -                           | -                    |
| 234            | A  | +       | AMP, CEF, FEP, CN                          | <i>iss, iucD, tsh</i>       | mV                   |
| 235            | A  | +       | AMP, CEF, FEP, CN, C, S                    | <i>iss, iucD, tsh, papC</i> | -                    |
| 236            | A  | +       | -  | <i>iss, iucD, tsh, papC</i> | mV                   |
| 237            | B1 | +++     | -  | <i>iss</i>                  | -                    |
| 238            | A  | +       | AMC  | <i>iucD, tsh</i>            | -                    |
| 239            | A  | +++     | AMP, AMC, CEF, FEP, CIP, CN                | <i>iucD, tsh</i>            | -                    |
| 240            | A  | +++     | AMP, CEF, CAZ, CIP, DO, CN, S              | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 241            | B1 | +       | AMP, AMC, CAZ, ATM, CIP, DO, SXT, S        | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 242            | B1 | +       | AMP, AMC, CEF, CAZ, DO, CN, C, ATM, SXT, S | <i>iucD</i>                 | E7, E8               |
| 243            | B1 | +       | AMP, AMC, DO, C, SXT                       | <i>iss, iucD</i>            | E2, E7, E8           |
| 244            | B1 | +       | AMC  | <i>iss, iucD, tsh</i>       | -                    |
| 245            | B1 | ++      | AMC  | <i>iss</i>                  | -                    |
| 246            | B1 | +       | AMC  | <i>iss</i>                  | -                    |
| 247            | A  | +++     | C  | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 248            | B1 | +++     | AMP, AMC                                   | <i>iss</i>                  | -                    |
| 249            | B1 | ++      | AMC, CEF                                   | <i>iss</i>                  | -                    |
| 250            | B1 | -       | AMC, AMP, CN, ATM                          | <i>iss</i>                  | -                    |
| 251            | B1 | +       | AMC, CEF, CN                               | -                           | -                    |
| 252            | A  | -       | AMP, AMC, CN                               | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 253            | A  | -       | -  | <i>iss</i>                  | -                    |
| 254            | B1 | ++      | AMP, AMC, C, SXT                           | <i>iss, iucD</i>            | E8, Ia, Ib, mV       |
| 255            | A  | -       | AMP, AMC, CAZ, DO, CN, ATM, S              | -                           | -                    |
| 256            | A  | -       | AMP, AMC                                   | -                           | -                    |
| 257            | A  | -       | AMP, AMC                                   | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 258            | A  | -       | -  | -                           | -                    |
| 259            | B2 | -       | AMP, CN                                    | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 260            | B2 | +       | AMP, AMC, CEF, CXM                         | -                           | -                    |
| 261            | A  | -       | -  | <i>iss, tsh</i>             | -                    |
| 262            | B1 | ++      | AMP  | -                           | -                    |
| 271            | B2 | +++     | AMC, AMP                                   | <i>tsh</i>                  | -                    |
| 273            | B2 | +++     | CAZ, DO, C, ATM, S                         | <i>iucD, tsh</i>            | B, M, Y, Ib, mV      |
| 285            | B2 | -       | CAZ, DO, CN, C, ATM, S                     | <i>iucD, tsh</i>            | B, M, Y, mV          |

+++ silně adherentní; ++ středně adherentní; + slabě adherentní;

FS– fylogenetické skupiny.

PŘÍLOHA 5. CHARAKTERIZACE KMENŮ *E. COLI* IZOLOVANÝCH Z VOLNĚ ŽIJÍCÍ ZVĚŘE – SOUHRN VÝSLEDKŮ

| označení kmene | FS | biofilm | ATB rezistence                   | geny rezistence                                      | faktory virulence  | bakteriocinotypizace                |
|----------------|----|---------|----------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| AZ             | B2 | +       | AMP, AMC, DO                     | <i>sull1, qnrS, aphA1</i>                            | <i>iss, iucD, CNF1, EinV, fimH, kpsMT II, ibeA</i>                   | -                                   |
| 2MB            | D  | +       | AMP, AMC, DO, SXT                | <i>sull1, qnrS, tetA, int, qac, mer, aphA1, sul2</i> | <i>iss, iucD, tsh, EinV, CNF1, fimH, kpsMT II, iutA</i>              | mB17, Y, E1, Ib, M                  |
| 4MB            | B1 | +       | AMP, CEF, CTX, CXM, CN, ATM, TZP | <i>qnrS</i>  | <i>iss, papC, neuC, CNF1, LT, tsh, EinV, fimH, kpsMT II</i>          | -                                   |
| 4FB            | B2 | -       | AMP, CTX                         | <i>qnrS, aphA1</i>                                   | <i>tsh, iss, iucD, CNF1, EinV, fimH, kpsMT II</i>                    | mB17, mC7, B, Y, E3, M              |
| 3MB            | D  | +       | AMP, CXM, TZP, S                 | <i>tetB, aphA1, blaOXA-7</i>                         | <i>ST1, ibeA, fimH, kpsMT II, iutA</i>                               | mB17, mC7, B, Y, E1, cea2, Ib, K, M |
| 3FB            | A  | -       | AMP, CN, DO, S                   | <i>qnrS</i>  | <i>tsh, papC, neuC, CNF1, EinV, fimH, kpsMT II</i>                   | mB17, B, Y, E1, M                   |
| 2FB            | A  | -       | AMP, FEP, CXM, CN                | <i>aphA1, CTX-M-1g</i>                               | <i>fimH</i>  | -                                   |
| D              | B2 | -       | AMP                              | <i>aphA1</i>   | <i>ibeA, fimH, kpsMT II</i>  | -                                   |
| 3Z             | B2 | +       | AMC, AMP, CEF, CXM, CN           | <i>aphA1, CTX-M-1g</i>                               | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                                   |
| 5Z             | B1 | +       | AMP                              | <i>CTX-M-1g</i>                                      | <i>fimH</i>  | -                                   |
| BO2            | D  | -       | -                                | <i>qnrS</i>  | <i>iss, iucD, CNF1, EinV, ibeA, HlyA, fimH, kpsMT II, sfaS, hlyD</i> | mC7, B, Y, U                        |
| 1/S            | A  | -       | DO                               | <i>qnrS, tetB, aphA1</i>                             | <i>iss, iucD, CNF1, EinV, fimH, kpsMT II, iutA</i>                   | mB17, Y, B, Ia, Ib, M               |
| 2/S            | D  | +++     | AMC, DO                          |  | <i>iss, iucD, CNF1, LT, EinV, fimH, kpsMT II</i>                     | -                                   |
| BO1            | A  | -       | -                                |  | <i>iss, iucD, CNF1, EinV, fimH, iutA</i>                             | B, Y, Ia, Ib, M                     |
| 1              | A  | +++     | DO                               | <i>qnrS, tetB, aphA1</i>                             | <i>iss, iucD, EinV, fimH, iutA, kpsMT II</i>                         | mB17, B, Y, Ia, Ib, M               |

| označení kmene | FS | biofilm | ATB rezistence    | geny rezistence              | faktory virulence  | bakteriocinotypizace |
|----------------|----|---------|-------------------|------------------------------|--|----------------------|
| 6              | D  | +       | -                 | <i>qnrS</i>                  | <i>tsh, iss, iucD, CNF1, EinV, fimH, kpsMT II, iutA</i>        | -                    |
| ZP             | A  | +       | -                 |                              | <i>tsh, papC, neuC, CNF1, EinV, ibeA, fimH, kpsMT II, sfaS</i> | -                    |
| 1F             | D  | -       | -                 |                              | <i>papC, neuC, CNF1, LT, EinV, fimH</i>                        | E1, cea2, Ia, Ib     |
| 2              | A  | -       | AMP, CEF          | <i>qnrS, blaTEM, aphA1</i>   | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| 3              | B1 | ++      | AMC               | <i>aphA1</i>                 | <i>fimH</i>  | -                    |
| 4              | D  | ++      | DO                |                              | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| 5              | B1 | -       | -                 | <i>qnrS</i>                  | <i>fimH</i>  | -                    |
| 8              | B1 | +++     | -                 |                              | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| 2E             | B1 | +       | -                 | <i>CTX-M-1g</i>              | <i>fimH</i>  | -                    |
| 2F             | A  | ++      | -                 |                              | <i>fimH</i>  | -                    |
| 1D             | D  | +++     | -                 | <i>aphA1</i>                 | <i>fimH, ibeA</i>  | -                    |
| 1C             | D  | -       | -                 | <i>aphA1</i>                 | <i>fimH</i>  | Y, M                 |
| 1E             | B1 | +       | AMP               | <i>qnrS</i>                  | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| 1G             | D  | -       | AMC, AMP, CEF, CN | <i>CTX-M-1g</i>              | <i>fimH</i>  | -                    |
| 4/S            | D  | +       | DO, CN            | <i>CTX-M-1g</i>              | <i>fimH, kpsMT II</i>  | mB17, B, Y, M        |
| 7/S            | D  | -       | -                 | <i>qnrS, aphA1, CTX-M-1g</i> | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| ZO             | B1 | +       | -                 | <i>blaOXA-7, aphA1</i>       | <i>fimH, kpsMT II</i>  | -                    |
| 1I             | B1 | +       | AMC               | <i>qnrS, aphA1</i>           | <i>fimH, kpsMT II</i>  | B, M, N              |
| 1J             | A  | +++     | -                 |                              | <i>fimH</i>  | -                    |
| 2C             | A  | -       | AMP               |                              | <i>fimH</i>  | -                    |

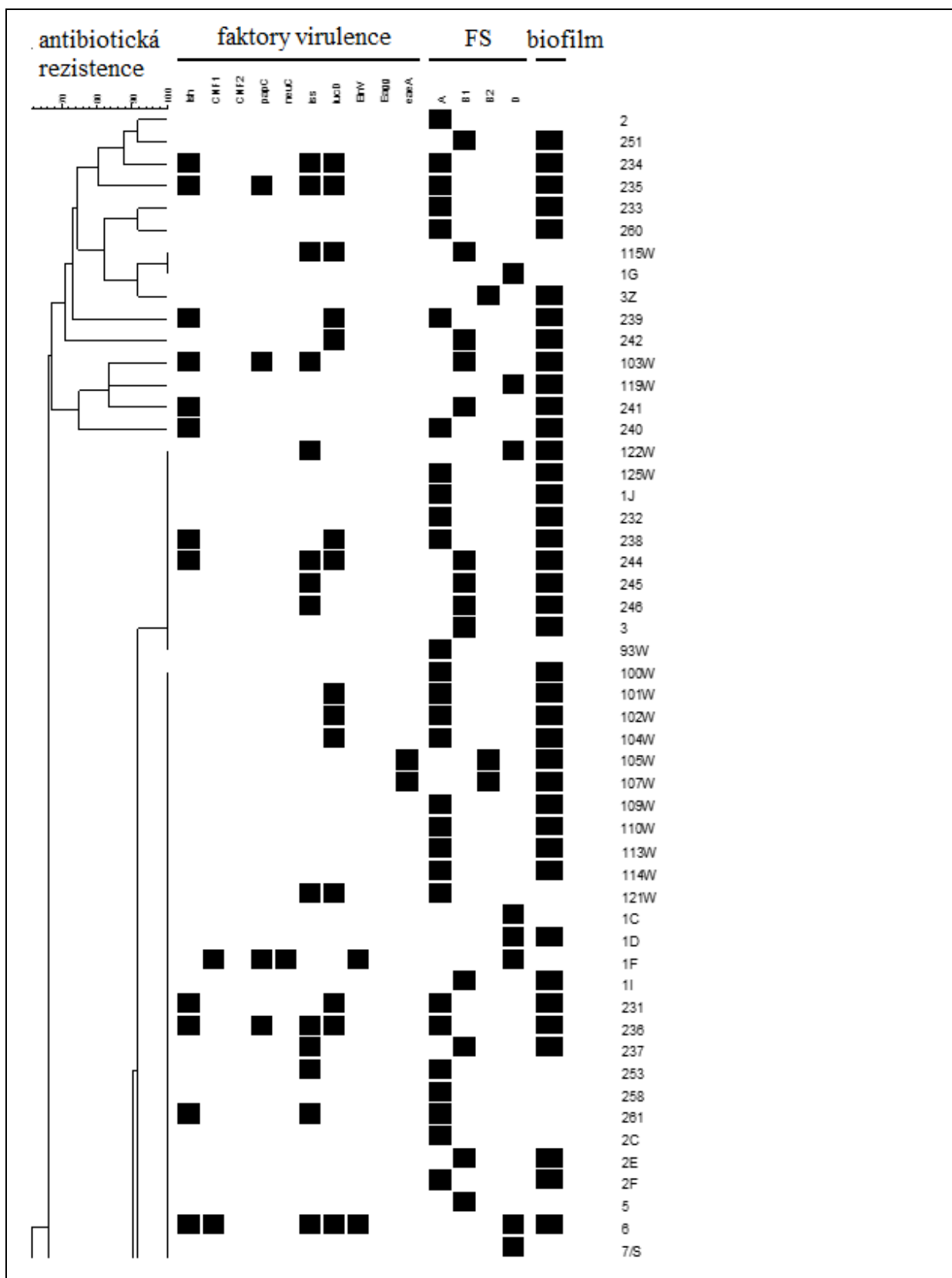
+++ silně adherentní; ++ středně adherentní; + slabě adherentní;

FS – fylogenetické skupiny

PŘÍLOHA 6. CHARAKTERIZACE KMENŮ *E. COLI* IZOLOVANÝCH ZE ZELENINY– SOUHRN VÝSLEDKŮ

| kmen        | FS | ATB rezistence  | geny rezistence                   | rezistence k $\beta$ -laktamům                        | faktory virulence       |
|-------------|----|-----------------|-----------------------------------|---|-------------------------|
| <b>F10</b>  | B2 | CAZ, AMP        | -                                 | <i>blaOXA-1</i>                                       | <i>EinV</i>             |
| <b>F52</b>  | B2 | S, CEF, AMP     | <i>qac</i>                        | <i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaPSE-4, blaCTX-M-3</i> | <i>CNF1, EinV</i>       |
| <b>F53</b>  | D  | CEF, AMP        | <i>qac</i>                        | <i>blaTEM, blaOXA-1</i>                               | <i>papC, EinV</i>       |
| <b>F77</b>  | B2 | CAZ,AMP         | <i>sul1</i>                       | <i>blaTEM</i>   | <i>EinV</i>             |
| <b>F78</b>  | B2 | CAZ,AMP         | -                                 | -   | <i>papC, EinV</i>       |
| <b>F81</b>  | B1 | AMP             | <i>tetA, int, sul1, sul3, mer</i> | <i>blaTEM</i>   | <i>EinV</i>             |
| <b>F84</b>  | B2 | CEF,AMP         | <i>qnrS, qac</i>                  | <i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaCTX-M-3</i>           | <i>papC, CNF1, EinV</i> |
| <b>F87</b>  | B2 | CAZ,CEF, AMP    | <i>qnrS, qac, mer</i>             | <i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaPSE-4, blaCTX-M-3</i> | <i>EinV</i>             |
| <b>F94</b>  | B2 | AMP             | <i>sul1</i>                       | -   | <i>CNF1, EinV</i>       |
| <b>F103</b> | B2 | AMP             | <i>qnrS, qac</i>                  | <i>blaOXA-1</i>                                       | <i>EinV</i>             |
| <b>F104</b> | B2 | CAZ,CEF, AMP    | <i>qnrS, qac</i>                  | <i>blaOXA-1</i>                                       | <i>papC, EinV</i>       |
| <b>F105</b> | B2 | AMP             | <i>tetB</i>                       | <i>blaTEM, blaCTX-M-3</i>                             | <i>EinV</i>             |
| <b>F106</b> | D  | CEF,CN          | <i>qac</i>                        | <i>blaOXA-1</i>                                       | <i>papC, CNF2, EinV</i> |
| <b>F107</b> | B2 | CAZ,CEF,AMP, CN | <i>tetB</i>                       | <i>blaTEM</i>   | <i>EinV</i>             |
| <b>F108</b> | B2 | CEF,AMP         | <i>qac</i>                        | <i>blaTEM, blaSHV, blaOXA-1, blaPSE-4, blaCTX-M-3</i> | <i>papC, CNF2</i>       |

PŘÍLOHA 7. FYLOGENETICKÝ STROM SESTAVENÝ PODLE CHARAKTERISTICKÝCH VLASTNOSTÍ KMENŮ *E. COLI*





PŘÍLOHA 8. VÝSLEDKY VPICHOVÉHO POKUSU - TESTOVÁNÍ  
INHIBIČNÍHO VLIVU BAKTERIOCINŮ NA IZOLÁTY Z POTRAVIN

|           |                      | indikátorový kmen |     |     |      |              |                        |     |     |             |             |      |     |     |     |
|-----------|----------------------|-------------------|-----|-----|------|--------------|------------------------|-----|-----|-------------|-------------|------|-----|-----|-----|
| producent | bakteriociny         | Row               | B1  | φ   | P400 | Sabina<br>40 | <i>S. sonnei</i><br>17 | 23W | 25W | CCM<br>7205 | CCM<br>4420 | 10 W | 20W | 21W | 22W |
| 93W       | E8                   | +                 | +   | ++  | +    | +            | -                      | -   | -   | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 94W       | E7, mC7              | -/+               | +   | +   | +    | -/+          | +                      | -   | +   | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 96W       | Ia                   | +++               | +++ | +++ | -    | +++          | +++                    | +   | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 97W       | mC7                  | +++               | +++ | +++ | -    | +++          | +++                    | ++  | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 98W       | E7,E8                | +                 | +   | +   | ++   | +            | +                      | -   | +   | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 101W      | E5,mC7               | ++                | ++  | +++ | ++   | ++           | +                      | -   | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 103W      | mV                   | -/+               | -/+ | ++  | -/+  | ++           | -                      | -   | ++  | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 105W      | Ia                   | -/+               | +++ | ++  | -    | ++           | ++                     | -   | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 107W      | E5,E9,B,M,Y          | ++                | ++  | ++  | ++   | ++           | ++                     | -   | +++ | -           | +           | -    | -   | -   | -   |
| 17        | Ia, mL               | +++               | +++ | +++ | +    | +++          | +++                    | -   | -   | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 59        | mV                   | +++               | +++ | +++ | -    | +++          | +++                    | -   | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 93        | E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM | +++               | +++ | +++ | +++  | +++          | +++                    | -   | +++ | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 94        | Ia                   | +                 | +   | +   | ++   | -/+          | +                      | -   | ++  | -           | -           | -    | -   | -   | -   |
| 222       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | +++               | +++ | +++ | ++   | +++          | +++                    | -   | +++ | -           | +           | -    | -   | -   | -/+ |
| 224       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | +++               | +++ | +++ | ++   | +++          | +++                    | -   | +++ | -           | ++          | -    | -   | -   | -/+ |
| 225       | E1, B,M,Ia/Ib,mB17   | +                 | +++ | +++ | ++   | +            | +++                    | +   | +++ | ++          | ++          | ++   | +   | -   | +   |
| 229       | B,M,Ia/Ib,mB17       | ++                | +++ | +++ | ++   | +++          | +++                    | -   | +++ | -           | ++          | -    | -   | -   | -/+ |
| 230       | B,M,mB17             | +                 | +++ | +++ | ++   | ++           | -                      | -   | +   | -           | +           | -    | -   | -   | -   |



|           |                      | indikátorový kmen |     |      |      |      |      |     |     |      |     |    |     |    |    |
|-----------|----------------------|-------------------|-----|------|------|------|------|-----|-----|------|-----|----|-----|----|----|
| producent | bakteriociny         | 232               | 248 | 119W | 122W | 123W | 125W | 212 | 213 | 118W | 217 | 40 | 2   | 69 | 98 |
| 93W       | E8                   | -                 | -   | -    | -    | -    | -/+  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 94W       | E7, mC7              | -                 | -   | -    | -    | -    | +    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 96W       | Ia                   | -                 | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 97W       | mC7                  | -                 | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 98W       | E7,E8                | -                 | -   | -    | -/+  | -    | ++   | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 101W      | E5,mC7               | -                 | -   | -    | -    | -    | ++   | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 103W      | mV                   | -                 | -   | -    | -    | -    | +    | -   | -   | -/+  | -   | -  | -   | -  | -  |
| 105W      | Ia                   | -                 | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 107W      | E5,E9,B,M,Y          | -                 | -   | -    | -    | -    | ++   | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 17        | Ia, mL               | -                 | -   | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 59        | mV                   | ++                | ++  | -    | -    | -    | -    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 93        | E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM | ++                | ++  | -    | -    | -    | +++  | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 94        | Ia                   | -                 | -   | -/+  | -/+  | -    | +    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 222       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | ++                | ++  | ++   | +    | +    | ++   | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 224       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | ++                | ++  | ++   | +    | +    | +    | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |
| 225       | E1, B,M,Ia/Ib,mB17   | +                 | -   | +++  | +++  | +++  | ++   | -/+ | +   | -    | ++  | +  | ++  | -  | -  |
| 229       | B,M,Ia/Ib,mB17       | +++               | ++  | ++   | ++   | +    | +    | -   | -   | -    | -   | -  | -/+ | -  | -  |
| 230       | B,M,mB17             | -                 | -   | +    | -/+  | -    | ++   | -   | -   | -    | -   | -  | -   | -  | -  |

|           |                      | indikátor |     |     |   |    |     |    |    |     |    |    |     |
|-----------|----------------------|-----------|-----|-----|---|----|-----|----|----|-----|----|----|-----|
| producent | bakteriociny         | 215       | 218 | 100 | 3 | 24 | 88  | 19 | 23 | 28  | 32 | 55 | 78  |
| 93W       | E8                   | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 94W       | E7, mC7              | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 96W       | Ia                   | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 97W       | mC7                  | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 98W       | E7,E8                | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 101W      | E5,mC7               | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 103W      | mV                   | -         | -   | -   | - | -  | -/+ | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 105W      | Ia                   | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 107W      | E5,E9,B,M,Y          | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 17        | Ia, mL               | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 59        | mV                   | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 93        | E1,E2,E6,E7,E8,mV,mM | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -/+ | -  | -  | -   |
| 94        | Ia                   | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |
| 222       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -/+ | -  | -  | -   |
| 224       | B, M, Ia/Ib,mB17,mV  | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | +   | -  | -  | -/+ |
| 225       | E1, B,M,Ia/Ib,mB17   | -         | -   | +   | - | -  | -/+ | -  | -  | ++  | -  | -  | ++  |
| 229       | B,M,Ia/Ib,mB17       | -         | -   | -   | - | -  | -/+ | -  | -  | +   | -  | -  | +   |
| 230       | B,M,mB17             | -         | -   | -   | - | -  | -   | -  | -  | -   | -  | -  | -   |