

Skríning antibiotické rezistence u bakterií čeledi Enterobacteriaceae izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu

Bc. Pavlína Píšová

Diplomová práce
2023



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2022/2023

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

| | |
|-------------------|--|
| Jméno a příjmení: | Bc. Pavlína Pišová |
| Osobní číslo: | T21460 |
| Studijní program: | N0721A210004 Technologie potravin |
| Forma studia: | Prezenční |
| Téma práce: | Skríning antibiotické rezistence u bakterií čeledi Enterobacteriaceae izolovaných z vodní drůbeže a z prostředí jejich chovu |

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

Vodní drůbež – charakteristika, chov a produkce.

Mechanismy a příčiny vzniku antibiotické rezistence.

Antibiotická rezistence enterobakterií izolovaných z potravin a nápojů.

II. Praktická část

Mikrobiologický rozbor vodní drůbeže – izolace enterobakterií.

Skríning antibiotické rezistence izolovaných enterobakterií.

Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

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

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

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

Termín odevzdání diplomové práce: **12. května 2023**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá charakteristikou, chovem a porážkou dvou druhů vodní drůbeže, příčinami a mechanismy vzniku antibiotické rezistence a antibiotickou rezistencí u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. V praktické části bylo sledováno druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* (identifikace pomocí MALDI-TOF a ENTEROTestu 24 N) a profil jejich rezistence k vybraným antibiotikům při diskové difuzní metodě. Byla pozorována přítomnost rezistentních, potažmo multirezistentních, kmenů, přestože při chovu nebyla podávána antibiotika.

Klíčová slova: *Enterobacteriaceae*, vodní drůbež, antibiotická rezistence, získaná rezistence, disková difuzní metoda

ABSTRACT

This diploma thesis deals with characteristics, breeding and slaughter of two species of waterfowl, causes and mechanisms of antibiotic resistance and antibiotic resistance in bacteria of the *Enterobacteriaceae* family. In the practical part, species representation of bacteria of the *Enterobacteriaceae* family (identification using MALDI-TOF and ENTEROTest 24 N) and their resistance profile to selected antibiotics using the disc diffusion method were monitored. The presence of resistant, or multi-resistant, strains was observed, even though antibiotics were not administered during breeding.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, waterfowl, antibiotic resistance, acquired resistance, disc diffusion method

Poděkování

Děkuji prof. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D. za odborné vedení práce, poskytování rad a materiálních podkladů.

Dále děkuji prof. Ing. Miroslavě Kačániové, PhD. a Výskumném centru AgroBioTech Slovenské poľnohospodárskej univerzity v Nitře za spolupráci na provedení MALDI-TOF analýzy.

OBSAH

| | |
|---|-----------|
| ÚVOD | 9 |
| I TEORETICKÁ ČÁST | 10 |
| 1 VODNÍ DRŮBEŽ | 11 |
| 1.1 CHARAKTERISTIKA A CHOV KACHEN..... | 11 |
| 1.2 CHARAKTERISTIKA A CHOV HUS..... | 14 |
| 1.3 PORÁŽKA DRŮBEŽE | 16 |
| 2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE | 21 |
| 2.1 PŘÍČINY VZNIKU | 22 |
| 2.1.1 Vznik antibiotické rezistence mimo potravinový řetězec | 22 |
| 2.1.2 Vznik antibiotické rezistence v rámci potravinového řetězce..... | 24 |
| 2.2 MECHANISMY VZNIKU..... | 26 |
| 3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE U ENTEROBAKTERIÍ | 30 |
| 3.1 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE U ENTEROBAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z KLINICKÝCH VZORKŮ | 31 |
| 3.2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE U ENTEROBAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ..... | 33 |
| 4 TEORETICKÉ PODKLADY PRO METODIKU PRÁCE | 36 |
| 4.1 ODBĚR VZORKŮ..... | 36 |
| 4.2 PŘEPRAVA VZORKŮ | 37 |
| 4.3 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR | 38 |
| 4.4 ZÍSKÁNÍ ČISTÉ KULTURY KŘÍŽOVÝM ROZTĚREM | 39 |
| 4.5 USKLADNĚNÍ IZOLÁTŮ A JEJICH IDENTIFIKACE | 41 |
| 4.6 DISKOVÁ DIFUZNÍ METODA | 43 |
| II PRAKTICKÁ ČÁST | 45 |
| 5 CÍL PRÁCE | 46 |
| 6 METODIKA | 47 |
| 6.1 PŮVOD VZORKŮ, JEJICH ODBĚR A PŘEPRAVA | 47 |
| 6.1.1 Chov v hospodářství poskytujícím vzorky..... | 47 |
| 6.1.2 Porážka v hospodářství poskytujícím vzorky | 47 |
| 6.1.3 Odběr vzorků v hospodářství | 48 |
| 6.1.4 Záznam průběhu přepravy vzorků | 49 |
| 6.2 MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR | 50 |
| 6.2.1 Celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů | 50 |
| 6.2.2 Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i> | 51 |
| 6.3 SKRÍNING ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE IZOLOVANÝCH ENTEROBAKTERIÍ | 53 |
| 6.3.1 Získání čisté kultury křížovým roztěrem | 53 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 6.3.2 | Identifikace izolovaných kultur bakterií | 55 |
| 6.3.3 | Zjištění antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou..... | 56 |
| 7 | VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE | 59 |
| 7.1 | MIKROBIOLOGICKÝ ROZBOR | 59 |
| 7.1.1 | Celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů | 59 |
| 7.1.2 | Čeď <i>Enterobacteriaceae</i> | 61 |
| 7.2 | SKRÍNING ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE IZOLOVANÝCH ENTEROBAKTERIÍ | 65 |
| 7.2.1 | Získání čisté kultury křížovým a identifikace izolátů | 65 |
| 7.2.2 | Citlivost k antibiotikům..... | 68 |
| | ZÁVĚR | 84 |
| | SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... | 85 |
| | SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK..... | 96 |
| | SEZNAM OBRÁZKŮ | 97 |
| | SEZNAM TABULEK..... | 98 |

ÚVOD

Objev penicilinu, ke kterému vedlo pozorování učiněné v roce 1928 Alexanderem Flemिंगem při práci v londýnské nemocnici St. Mary, a následné objevy dalších antibiotik znamenaly zvrát v léčbě řady infekčních onemocnění (Herold et al., 1957). Antibiotika jsou definována jako látky s bakteriostatickým nebo baktericidním účinkem. Jsou klasifikována do několika tříd dle jejich mechanismů účinku (inhibice syntézy bakteriální buněčné stěny nebo její porušení, inhibice syntézy nukleových kyselin nebo syntézy kyseliny listové), chemické struktury a spektra účinku. (Hochvaldová, 2022). Nicméně fenomén rozvoje antibiotické rezistence představuje významný problém ve vztahu k veřejnému zdraví (Galhano et al., 2021).

Tato práce navazuje na mou předchozí rešeršní práci na téma Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin, inspirací pro její sepsání bylo zjistit, zda dojde k záchytu rezistentních bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* v chovu bez administrace antibiotik. Tato práce v teoretické části pojednává o charakteristice a chovu kachen a hus, jejich porážce a antibiotické rezistenci, jejich příčinách a mechanismech vzniku. Dále byla rozebrána antibiotická rezistence u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. V praktické části byl sledován mikrobiální profil a druhové zastoupení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* za využití tradičních mikrobiologických metod a identifikace pomocí MALDI-TOF a ENTEROTestu 24 N. Dále byl zjišťován profil jejich rezistence ke dvaceti vybraným antibiotikům při diskové difuzní metodě.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 VODNÍ DRŮBEŽ

Pojem drůbež se vztahuje na kuřata, krůty, kachny, bažanty, husy, pštrosy, křepelky a další příbuzné druhy ptáků, které jsou využívány v masné produkci (Dikeman a Devine, 2014). Mezi vodní drůbež se řadí domestikované kachny a husy, někdy se mezi ně zařazují i labutě (Anonym, 2013; Song-Nichols a Konstantopoulos, 2023). Přestože mnoho plemen drůbeže existuje přirozeně v přírodě, v masné produkci jsou v současnosti hojně využívány hybridy pro větší efektivitu produkce (Dikeman a Devine, 2014). Maso a vejce vodní drůbeže mají vysoké nutriční hodnoty a mají významný obsah aminokyselin a mastných kyselin (Song-Nichols a Konstantopoulos, 2023). V České republice je trendem současné doby, vzhledem ke spotřebě masa, vzrůstající spotřeba drůbežího masa na úkor jiných druhů mas (Simeonovová, 1999). Nárůst je pozorován již od roku 2014 (Leiblová, 2021). Toto zvýšení se týká hlavně masa kuřecího a krůtího, zvýšení zájmu ovšem zaznamenalo i maso kachen nebo hus (Simeonovová, 1999). V roce 2020 produkce drůbežího masa v České republice dosáhla nejvyšší úrovně od roku 2010 (Leiblová, 2021). Důvody pro zvýšení poptávky po drůbežím masu zahrnují snadnou kuchyňskou úpravu, krátkou dobu výkrmu nebo relativně nízkou cenu (Simeonovová, 1999).

1.1 Charakteristika a chov kachen

Kachna divoká je všeobecně vnímána coby předek všech plemen domácích kachen (Dikeman a Devine, 2014), domestikována byla zhruba před 2000 lety (Rodenburg et al., 2005). V České republice jsou běžně k produkci masa chovány dva druhy kachen: pekingská kachna (*Anas platyrhincos*) a kachna pižmová (*Cairina moschata*) (Pipek, 1998; Simeonovová, 1999; Mead, 2004). Křížením kachny pižmové s kachnou pekingskou se získává sterilní hybrid, označovaný jako mulard (Mead, 2004). Mezi kachnou pekingskou a kachnou pižmovou je v komerční produkci častěji využívána kachna pekingská než kachna pižmová (Pipek, 1998; Simeonovová, 1999; Dikeman a Devine, 2014). Kachní maso je řazeno mezi červená masa, jehož nutriční hodnoty jsou obdobné jako u ostatních drůbežích mas, s výjimkou vyššího obsahu tuku u kachního masa zbaveného kůže, než tomu je u kuřecího nebo krůtího masa (taktéž bez kůže) (Dikeman a Devine, 2014).

Kachna pekingská (Obrázek 1) má svůj původ v Číně, dospívá rychle a má robustní stavbu těla (Dikeman a Devine, 2014). Je více náročná na přístup k vodě, zároveň si po kachně divoké zachovala řadu reakcí na nebezpečí, jako hlasité kvákání, útěk a vzpírání se, pokud jsou chyceny. Kachna pekingská je plašší než kachna pižmová (Rodenburg et al.,

2005). Kachna pekingská roste rychleji a má tak kratší dobu výkrmu než kachna pižmová (Simeonovová, 1999). Jako vhodné osazení chovného prostoru se u kachny pekingské uvádí 7 kusů na metr čtvereční, vyšší osazení má negativní vliv na produkci, poškození peří a kvalitu získaného produktu (Rodenburg et al., 2005). U kachny pekingské jsou rozlišovány dvě jateční zralosti, kdy první zralost je ve věku 50–80 dní a maso kachen je jemné a šťavnaté (Pipek, 1998), váha kachny je mezi 1,6–2,25 kilogramy (Dikeman a Devine, 2014). Rozdíl váhy mezi pohlavími je u kachny pekingské zanedbatelný (Mead, 2004). Druhá jatečná zralost nastává po přepelichání ve stáří 4–5 měsíců, kdy je již maso tučnější (s obsahem tuku 30–35 hmot. %) (Pipek, 1998). Kachny pekingské jsou v Číně ceněné právě kvůli bohatému podkožnímu tuku (Mead, 2004).



Obrázek 1 Kachna pekingská (Pokorný, 2013)

Kachna pižmová (Obrázek 2) pochází ze Střední a Jižní Ameriky, byla domestikována Indiány v Kolumbii a Peru a do Evropy dovezena Španěly a Portugalci v 16. století (Rodenburg et al., 2005). Je porážena ve věku dvanácti týdnů, kdy se váha kačera pohybuje kolem 4,5 kg, u kachen je možná porážka od desátého týdne přibližně ve váze 2,5 kg (Simeonovová, 1999; Mead, 2004). U kachny pižmové je značný rozdíl mezi pohlavími, váha kachny bývá pouze zhruba 60 % váhy kačera (Mead, 2004). Jako vhodné osazení chovného prostoru se u kachny pižmové uvádí 9 kusů na metr čtvereční, vyšší osazení má negativní vliv na produkci, poškození peří a kvalitu získaného produktu. U osazení až 11 kusů na metr čtvereční může docházet k oštipování peří a kanibalismu, vedoucímu k vážným zraněním kachen (Rodenburg et al., 2005). Kachna pižmová naklade za stejné období dvojnásobek vajec oproti kachně pekingské (Mead, 2004). Zejména samci jsou více agresivní než u kachny pekingské, zároveň jsou tišší, primárně vydávají zvuky obdobné syčení (Rodenburg et al., 2005).



Obrázek 2 Kachna pižmová s kachňaty (foto autora)

Obsah tuku v mase kachny pižmové je menší než u kachny pekingské, je obdobný jako u husího masa. Toto může být důvod, proč je maso kachny pižmové v Evropě oblíbenější než maso kachny pekingské (Simeonovová, 1999; Mead, 2004).

V Asii je chov kachen preferován nad kuřaty nebo krůtami, jsou používány na maso a pro produkci vajec (Mead, 2004). Dikeman a Devine (2014) označují Čínu za největšího producenta s produkcí přibližně 2,6 milionu tun, další jsou pak Francie, Thajsko a Vietnam (Dikeman a Devine, 2014). Kachny mohou být chovány v rýžových polích v obdobích mezi sklizní a počátkem nového vegetačního cyklu. Jako krmivo pro kachny se v tomto případě používá rýže, která vypadla na rýžovém poli během sklizně a transportu. Tato rýže činí přibližně 5 % z celkové úrody. Kachny jsou v daných intervalech v hejnech přeháněny z jednoho rýžového pole na druhé. Další možností je chování kachen v systému kachna–ryba, kdy jsou kachny chovány na rybnících současně využívaných pro produkci ryb nebo v systému kachna–ryba–rýže, kdy jsou v rýžových polích během produkce rýže zároveň chovány ryby a kachny (Huang a Lin, 2011).

V případě velkoprodukce je využíván chov v uzavřených prostorách s lišícím se stupněm uzavřenosti. Kachny jsou krmeny komerčními krmnými směsmi (Huang a Lin, 2011). Požadavky na krmivo jsou u obou druhů kachen obdobné. Výkrm lze rozdělit do několika fází:

- Rozkrmení, kdy je třeba zajistit příjem 2800 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 17,7 hmot. %.
- Výkrm, kdy je třeba zajistit příjem 2800 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 14 hmot. %.

- Závěrečné dokrmování, kdy je třeba zajistit příjem 2800 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 13 hmot. % (Mead, 2004).

Například na Taiwanu jsou kachny chovány v uzavřených prostorách s místy pro koupání (umělá struha) a odpočinek zvířat. Počet chovaných kusů se na těchto farmách pohybuje od 3 000–70 000 kusů. Na Filipínách je v uzavřených prostorách chováno přibližně 24 % kachen, ve Vietnamu pak 20–25 % chovaných kachen (Huang a Lin, 2011).

V ostatních částech světa je význam kachen omezený, neboť jsou zde využívány pouze pro maso. Proto také v Evropě a Severní Americe existují komerční plemena masných kachen, ale chybí zde odpovídající nosná plemena (Mead, 2004). Podle Dikemana a Devineho (2014) je ve Spojených státech amerických ročně vyprodukováno přibližně 24 milionů kusů kachen, se spotřebou na jednoho Američana pouze 0,15 kilogramu za rok (Dikeman a Devine, 2014).

1.2 Charakteristika a chov hus

Husy se chovají pro maso, jako potravinářská surovina se zpracovává i sádlo nebo drůbky. Husí maso má vyšší energetickou hodnotu než maso kuřat, hlavně kvůli vyššímu obsahu tuku (Pipek, 1998). Je řazeno mezi červená masa, jehož nutriční hodnoty jsou obdobné jako u ostatních drůbežích mas, s výjimkou vyššího obsahu tuku a železa u husího masa zbaveného kůže, než tomu je u kuřecího nebo krůtího masa (taktéž bez kůže) (Dikeman a Devine, 2014). Hlavními konzumenty husího masa jsou populace Číny, Ruska a států východní Evropy, ve zbytku vyspělých států je husí maso spíše minoritou (Mead, 2004; Dikeman a Devine, 2014). Počet chovaných hus v Evropě klesá od zavedení moderních technik velkochovu u drůbeže od začátku 20. století. Naopak k nárůstu chovaných kusů došlo v méně rozvinutých zemích, kde jsou husy chovány volně. Překážky, které zabraňují ve využití hus v intenzivní produkci, jsou poměrně špatná reprodukce a relativně pomalý růst v porovnání s ostatními druhy drůbeže (Dikeman a Devine, 2014).

Šlechtění plemen hus nenásledovalo stejnou cestu jako šlechtění kuřat nebo krůt vzhledem k menšímu objemu produkce, co se týče komerčních chovů (Dikeman a Devine, 2014). V chovu jsou používány dvě linie hus: východní plemena vycházející z divoké husy labutí (*Anser cygnoides*) a západní plemena vycházející z divoké husy velké (*Anser anser*) (Mead, 2004). Vzniklo jen omezené množství šlechtitelských programů pro vyšlechtění brojlerových plemen. Z často chovaných husích plemen lze jmenovat husu emdenskou,

tuluskou, africkou nebo husu čínskou (Dikeman a Devine, 2014). Tradičním plemenem v České republice je česká bílá husa (Obrázek 3) (Pipek, 1998).



Obrázek 3 Husy české bílé (foto autora)

Při intenzivním výkrmu mohou být husy poráženy ve dvanáctém týdnu věku, pokud jsou husy chovány extenzivně, jsou poráženy mezi 5. a 6. měsícem věku. Požadavky na krmivo pro husy lze rozdělit do několika fází:

- Rozkrmení, kdy je třeba zajistit příjem 2700 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 17 hmot. %.
- Výkrm, kdy je třeba zajistit příjem 2800 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 15 hmot. %.
- Závěrečné dokrmování, kdy je třeba zajistit příjem 2900 kcal/kg krmiva a obsah hrubého proteinu v krmivu 15 hmot. %.

Doporučuje se, aby byly husy přikrmovány čerstvou trávou, nebo aby jim byla umožněna pastva (Mead, 2004).

Husy je možné podškubávat za účelem zisku prachového peří, a to od 11. týdne věku, následně pak každých 6 týdnů. Každé podškubání vynesou 100–140 g peří (Mead, 2004). Prachové peří je vnitřní podsada tvořená jemným peřím vyrůstajícím z brku u vodních ptáků (hus, kachen). Vrstva tvořená prachovým peřím zadržuje vzduch a působí jako izolační vrstva. Prachové peří je typické lehkostí, měkkostí na dotek a výborným poměrem mezi zadrženým teplem k použité vrstvě peří. Je používáno pro plnění oblečení, lůžkovin a dalších výrobků sloužících jako ochrana před chladem (Mao, 2019).

1.3 Porážka drůbeže

Jatečné opracování zvířat je označováno za první výrobní fázi v masném průmyslu (Pipek, 1998). Porážení kusů z komerčních chovů probíhá na specializovaných porážkách, které splňují veškeré podmínky předepsané ve veterinárních předpisech pro schvalování potravinářských provozů, drůbežích jatek a přidružených provozů (Simeonovová, 1999). Porážení zvířat u chovatele probíhá ojediněle ve formě domácích nebo nutných porážek, porážky mohou být v určitých případech prováděny v extrémních podmínkách (polní jatky, porážky v obtížně dostupných oblastech). Technologické postupy jsou sestavovány tak, aby byla možnost kontaminace masa omezena na minimum (Pipek, 1998). Drůbež je dodávána na jatka s ohledem na jejich kapacitu, aby mohla probíhat porážka bez ustájení zvířat, doporučený interval mezi koncem přepravy a porážkou je přibližně 15 minut, během kterých dojde ke zklidnění zvířat (Simeonovová, 1999).

Během přejímky zvířat je kontrolován počet kusů, jejich hmotnost a věk (dle doprovodných listů). Zdravotní stav zvířat je doložen veterinárním osvědčením (Simeonovová, 1999). Přepravky obsahující drůbež jsou dopraveny k místu uzpůsobenému pro navěšování drůbeže za běháky, popř. za patní klouby, jedná se o podvěsný lanový nebo řetězový dopravník (Pipek, 1998). Navěšování je prováděno ručně v odděleném krytém prostoru. Rozteč háků na podvěsném dopravníku bývá mezi 15 a 50 centimetry v závislosti na hmotnosti porážené drůbeže. Od zavěšení do omráčení by nemělo uběhnout více než 60 sekund (Simeonovová, 1999).

Omračování drůbeže je předepsáno zákonem na ochranu zvířat proti týrání č. 246/1992 Sb., prováděným vyhláškou č. 418/2012 Sb. o ochraně zvířat při usmrcování (Anonym, 2012), výjimka je možná u domácích porážek drůbeže (Hrabě, 2007). Omráčení zvířete dále umožňuje snazší manipulaci, snazší vykrvení a snižuje nebezpečí úrazu pracovníků způsobeného zvířetem. Při omráčení nedojde k usmrcení zvířete (Pipek, 1998). K omračování je v provozech využíván elektrický proud nebo plyn, mechanické omračování je využíváno převážně u domácích porážek (Simeonovová, 1999; Hrabě, 2007). Mechanické omračování je nejstarší způsob omračování, kdy je bezvědomí dosaženo otřesem mozku zvířete, překrvením a krvácením v mozku, popř. poškozením mozku (Pipek, 1998).

U elektrického proudu je využíváno rozdílné napětí v závislosti na konstrukci zařízení, druhu drůbeže a její hmotnosti. Napětí se v České republice obvykle pohybuje od 50 V do

150 V, kdy doba omračování je 2–5 sekund (Simeonovová, 1999). Převládajícím způsobem provedení elektrického omračování je automatické kontinuální omračování, kdy je drůbeží po fixaci ponořena hlava do vodní lázně s přivedeným elektrickým proudem o regulovaném napětí (Hrabě, 2007). Princip elektrického omračování spočívá v průchodu elektrického proudu mozkem zvířete. Je tak vyvolán epileptický záchvat, při němž zvíře upadne do bezvědomí. Na průchod elektrického proudu reaguje i kosterní svalovina, kdy se nejdříve dostaví tonické křeče (ztuhlost) a následně klonické křeče (škubavé pohyby končetin) (Pipek, 1998).

Při omračování plynem je jako omračující plyn využíván oxid uhličitý (jeho zvýšený obsah v atmosférických plynech). Někdy je využíván v kombinaci s inertními plyny (např. argonem) pro zlepšení průběhu postmortálních procesů a jakosti masa (Simeonovová, 1999). Působením oxidu uhličitého je dosažen narkotizační efekt a hypoxie (Pipek, 1998). Při omračování plynem je u těl snížena četnost zlomenin a krevních výronů (Simeonovová, 1999).

Po omračení je bezprostředně provedeno vykrvení. U mechanického omračení je prováděno do 60 sekund od omračení, u elektrického omračení je prováděno do 20 sekund a u plynu do 30 sekund (Hrabě, 2007). Velmi krátká doba mezi omračením a počátkem vykrvování pomáhá dosáhnout dobrého stupně vykrvení a zároveň zamezí rozvádění stresových hormonů (adrenalin, noradrenalin) do těla zvířete (Pipek, 1998). Vykrvení se provádí přetnutím krční tepny a žíly. Nesmí dojít k přetnutí hltanu a hrtanu (Simeonovová, 1999). Při vykrvování dochází k usmrcení zvířete a zároveň se prodlužuje údržnost masa díky odstranění krve (Pipek, 1998). V provozech se vykrvování provádí pomocí automatického zařezávače, u domácích porážek je vykrvování prováděno ručně. Vykrvení kuřat trvá alespoň 2,5 minuty, u kachen trvá minimálně 3 minuty, u hus nebo krůt trvá 3,5 minuty, další úkony následují po vykrvení nejdříve 30 sekund po jeho ukončení (Simeonovová, 1999).

Operací následující vykrvení je paření, které slouží k usnadnění odstraňování peří díky koagulaci péřové pochvy. V provozech je paření nejčastěji prováděno v průběžných pařicích vanách s horkou vodou o regulované teplotě (s přesností 1 °C) (Simeonovová, 1999). Pro paření hrabavé drůbeže je běžně využívána voda o teplotě 50 až 58 °C. U vodní drůbeže se teplota vody pohybuje mezi 60 až 65 °C. Doba paření může dosáhnout až 4 minut (Hrabě, 2007). Paření vodní drůbeže je obtížnější z důvodu horšího pronikání horké vody k péřovým

pochvám (Pipek, 1998). U vodní drůbeže existuje varianta paření pomocí vodní páry, tato varianta je ovšem náročná na aplikaci. Během paření nesmí dojít k poškození kůže v důsledku přepaření příliš vysokou teplotou, což následně způsobuje trhání kůže, nebo klišovatění v důsledku nízké teploty a příliš dlouhého paření (Simeonovová, 1999).

Bezprostředně po paření následuje šhubání, aby se zabránilo opětovnému zvýšení odolnosti peří proti vytrhnutí. V provozech bývá šhubání prováděno pomocí válcových nebo diskových šhubáček za přívodu teplé vody (Hrabě, 2007). Sklon a vzdálenost sekcí šhubacích elementů se liší pro jednotlivé druhy drůbeže, kdy je třeba je nastavit tak, aby co nejlépe kopírovaly povrch těla. Dosáhne se tak maximálního šhubacího efektu s minimálním poškozením kůže a končetin drůbeže (Simeonovová, 1999). U vodní drůbeže může docházet k tání tuku, který pokrývá peří, a může tak docházet ke klouzání šhubacích elementů po povrchu těla a zhoršení efektivity šhubání (Pipek, 1998).

Po ošhubání je drůbež dočišťována. U vodní drůbeže je dočištění prováděno pomocí voskování, kdy se odstraňují zbytky nezralého peří (Hrabě, 2007; Pipek, 1998). Voskování je prováděno bezprostředně po šhubání ponořením nebo sprchováním roztavenou směsí parafínu, ceresinu a kalafuny (Hrabě, 2007). Voskování je prováděno buď jednorázově, 2 až 5 sekund při teplotě 56 °C, nebo dvojnásobně, a to při teplotách 70–75 °C po dobu 3 sekund a 56 °C po dobu 5 až 10 sekund. Nanesená vosková vrstva je zchlazena vodou o teplotě 5–10 °C po dobu 20 až 40 sekund, následně je snímána v průběžné šhubáčce za intenzivního sprchování studenou vodou (Simeonovová, 1999).

Jako další technologický krok následuje eviscerace (vyjmutí vnitřních orgánů), eviscerace se u drůbeže označuje jako kuchání (Pipek, 1998). Kuchání drůbeže je prováděno poté, co je plně zbavena peří a osprchována (Hrabě, 2007). Provádí se v nejkratším možném čase, aby nedošlo k rozšíření mikroorganismů z trávicího traktu do svaloviny (Pipek, 1998). Kuchání je možné provádět strojně nebo ručně, u strojního kuchání se může zařazení technologických operací v provozech lišit. Obecně zahrnuje tyto kroky: nařezání kůže krku a uvolnění kůže od krku, odtrhnutí hlavy a vytrhnutí volete, jícnu a průdušnice. Dále je provedeno odřezání běháků, nařezání stěny dutiny břišní, obřezání kloaky a vyjmutí orgánů trávicího traktu společně s plícemi. Po provedení veterinární prohlídky jatečného těla a vnitřností dojde k oddělení srdce a jater od trávicího traktu a žlučníku od jater (Simeonovová, 1999). Zároveň je oddělen svalnatý žaludek od střev a vyčištěn naříznutím, vypláchnutím obsahu vodou a stáhnutím nebo odříznutím žaludeční výstelky (Hrabě, 2007). Následuje

vyjmutí neodstraněných zbytků z dutiny břišní, odstranění krku drůbeže, kontrola kuchání a dočištění, sprchování vnitřního a vnějšího povrchu jatečného těla studenou vodou a praní a chlazení drobů (Simeonovová, 1999). Vyjmuté vnitřnosti se pohybují po lince společně s jatečnými těly až do místa veterinární prohlídky (Pipek, 1998).

Následuje operace chlazení, kdy se musí drůbeží maso i droby do 2 hodin zchladit na teplotu pod 4 °C (Hrabě, 2007; Simeonovová, 1999). Ochlazením dojde ke zpomalení enzymatických, chemických a mikrobiálních dějů v maso. Při nedostatečném nebo příliš pomalém ochlazení může dojít například k mikrobiálnímu rozkladu bílkovin, mikrobiální tvorbě peroxidu vodíku (vznik zelených derivátů hemových barviv) nebo zapaření (Pipek, 1998). Chlazení je možné provádět za použití ledu, ledové tříště, ledové vody, vzduchu nebo inertním plynem (CO₂). Obecněji lze rozlišit tři základní postupy chlazení, a to vzduchové, sprejové a ve vodní lázni. Chlazení vzduchem je z hlediska hygieny nejlepší, protože nedochází ke kontaktu jatečně opracovaných těl. Je nutné dosáhnout vysoké rychlosti chlazení, a tím docílit co nejnižší ztráty způsobené vysušováním (ztráty 0,5–0,9 hmot. %). Teplota vzduchu se pohybuje okolo 0 °C s rychlostí proudění 2–3 m/s. Relativní vlhkost je udržována na 85 % (Simeonovová, 1999; Hrabě, 2007). Při použití vysokých pařících teplot s následným použitím chlazení vzduchem může docházet k tvorbě barevných skvrn na kůži (Pipek, 1998).

Sprejové chlazení je kombinací vzduchového a vodního chlazení. Jatečně opracovaná těla jsou ve visu postříkována ledovou vodní mlhou. Zároveň kolem nich proudí ledový vzduch. U tohoto způsobu chlazení nedochází k vzájemnému kontaktu těl, ani k vysychání, může ovšem dojít k absorpci cizí vody (Simeonovová, 1999; Hrabě, 2007). Může se vyskytnout nebezpečí sekundární kontaminace z chladicí vody (Pipek, 1998). Maximální celkový obsah absorbované vody při chlazení vodou je 2 hmot. % (Anonym, 2008).

Při chlazení vodou se nejčastěji využívá dvoustupňového chlazení. Chlazení se provádí ponořením do vody s ledem, kdy jatečně opracovaná těla jsou posunována v protiproudu k ledové vodě. Jedná se o hygienicky rizikový systém, neboť těla jsou v kontaktu mezi sebou a zároveň v kontaktu s chladicí vodou. Po zchlazení by těla měla být znovu osprchována. Následně jsou jatečně opracovaná těla nechána odkapat po dobu 10–15 minut, aby obsah zadržené vody nepřesáhnul 1 hmot. % (Simeonovová, 1999; Hrabě, 2007). Maximální celkový obsah absorbované vody při chlazení vodou je 4,5 hmot. % (Anonym, 2008).

Chlazení drobů probíhá okamžitě po jejich očištění. Jsou chlazeny vodou, ledem, ledovou tříští nebo jiným vhodným chladivem. Jednotlivé droby se chladí zvláště maximálně 15 minut. Následně jsou baleny (Simeonovová, 1999).

Jatečně upravená těla jsou tříděna dle jejich jakosti, vážena a balena. Drůbeží maso a opracovaná drůbež musí být dokonale čistá a vykrvená, bez patrných otlaků, podlitin a pohmožděnin nebo vyčnívajících zlomených kostí. Nesmí vykazovat známky dehydratace nebo žluknutí, nesmí být patrná změněná chuť nebo zápach (ani po tepelné úpravě). Peří musí být dokonale odstraněno, je přípustný výskyt ojedinělých peříček nebo nezralého peří. Přípustné jsou zbytky plic a vnitřní plstní sádlo (Hrabě, 2007; Simeonovová, 1999).

2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

Objev antibiotik před 2. světovou válkou a jejich následné zavedení do praxe představuje mezník v léčbě bakteriálních infekcí (Hudson et al., 2017). Antibiotika, jak je známe, jsou tak používána již více než 75 let (Hochvaldová et al., 2022). Nicméně již od objevu antibiotik byl zjištěn fenomén antibiotické rezistence, Alexander Fleming před antibiotickou rezistencí varoval již v roce 1945 (Hudson et al., 2017). Zde je možné zmínit vývoj rezistence u *Staphylococcus aureus* v anglických nemocnicích krátce po zavedení penicilinu do klinické praxe. Před rokem 1944 byly izolované kmeny rezistentní jen zřídka, v roce 1946 bylo rezistentních 14,1 % izolovaných kmenů této bakterie, v roce 1947 38 % kmenů a v roce 1948 se již jednalo o 59 % rezistentních kmenů (Barber a Rozwadowska-Dowzenko, 1948).

Antibiotická rezistence u bakterií se dá definovat jako schopnost bakterií vzdorovat účinku konkrétního antibiotika o dané koncentraci. Je třeba rozlišit, zda se jedná o rezistenci u dané bakterie přirozenou nebo rezistenci získanou, kdy dříve citlivá bakterie přestává na antibiotikum odpovídat (Hochvaldová et al., 2022). Získaná antibiotická rezistence je v současnosti jedním z nejzávažnějších problémů moderní medicíny (Mazińska a Hryniewicz, 2020), neboť vznik antibiotické rezistence u klinicky významných bakterií pokračuje a zároveň se snižuje počet nově objevených antibiotik (Hudson et al., 2017). Byly objeveny rezistentní kmeny mezi všemi bakteriálními druhy a proti každé třídě antibiotik, stále více jsou zachycovány multirezistentní kmeny. Důsledkem této skutečnosti je výrazné omezení možností účinné léčby pomocí antibiotik (Mazińska a Hryniewicz, 2020). Není ovšem zcela známo, jakou mírou k tomuto problému přispívají jednotlivé zdroje vzniku antibiotické rezistence (Hudson et al., 2017).

Dle Mazińskiej a Hryniewiczové (2020) bylo v Evropské unii v roce 2015 zaznamenáno přibližně 33 000 úmrtí u pacientů v důsledku absence efektivní terapeutické možnosti pro léčbu infekcí vyvolaných multirezistentními mikroorganismy (Mazińska a Hryniewicz, 2020). Podle odhadů autorů zprávy připravené týmem britského ekonoma O'Neill a zemře celosvětově kvůli infekcím vyvolaným mikroorganismy rezistentními k antibiotikům přibližně 700 000 lidí, z nichž 200 000 představují novorozenci. Zpráva předvídá, že pokud nebudou včas přijata preventivní opatření, může se celosvětově počet úmrtí do roku 2050 zvýšit až na 10 milionů ročně v důsledku absence léčby. Nastala by tak obdobná situace jako před objevem antibiotik (O'Neill, 2016). Většina velkých farmaceutických společností zcela opustila vývoj nových antibiotik vzhledem k ekonomickým aspektům (vyšší výnos u léků

na jiná onemocnění, přísná pravidla pro schvalování léčiv) a k časové a technické náročnosti. Mezi nové možnosti patří například kombinace antibiotik s antibakteriálními látkami s nanostrukturou (například kovy – stříbro, zlato, selen nebo oxidy kovů – oxid zinečnatý, oxid titaničitý nebo oxid hořečnatý) (Hochvaldová et al., 2022).

2.1 Příčiny vzniku

Ke vzniku antibiotické rezistence vede nadměrné nebo nevhodné užívání antibiotik v humánní medicíně (Mazińska a Hryniewicz, 2020). Antibiotika jsou ve velké míře využívána také během produkce potravin, rezistentní mikroorganismy se tak mohou k lidem dostat skrze potravu nebo přírodní prostředí (Hudson et al., 2017). Využívání velkého objemu antibiotik, hlavně v živočišné produkci, jako profylaktik, terapeutik a stimulátorů růstu je předmětem zájmu, neboť tato skutečnost může vést k zvýšení výskytu antibiotické rezistence u zvířecích a lidských patogenů. Může docházet k přenosu bakterií rezistentních na antibiotika z produkčních zvířat na člověka. Riziko tohoto přenosu se zvyšuje s vyšší mírou užívání antibiotik, vyšší intenzitou produkce a rozšiřující se globalizací (Schrijver et al., 2018; Galhano et al., 2021). Je odhadováno, že ve Spojených státech jsou infekce způsobené rezistentními mikroorganismy příčinou 23 000 úmrtí ročně, z toho zhruba jedna pětina infekcí má původ u zvířat a potravin (Baquero et al., 2019). Význam zde má i běžná mikrobiota, která může sloužit jako přenašeč genů antibiotické rezistence (Hudson et al., 2017).

2.1.1 Vznik antibiotické rezistence mimo potravinový řetězec

Nadužívání antibiotik při léčbě je jedním ze zdrojů antibiotické rezistence (Hudson et al., 2017). Během posledních deseti let došlo celosvětově ke značnému nárůstu spotřeby antibiotik (Mazińska a Hryniewicz, 2020), mezi lety 2000–2015 se tato spotřeba antibiotik zvýšila o 65 %. V roce 2015 byly jako země s největší spotřebou antibiotik označeny Turecko, Tunisko, Alžírsko a Rumunsko (Klein et al., 2018). Bylo prokázáno, že existuje přímá souvislost mezi spotřebou antibiotik a vznikem antibiotické rezistence. Země, kde jsou antibiotika využívána ve velké míře, mají vyšší procento záchytu multirezistentních mikroorganismů, než tomu je u zemí s menší mírou užívání antibiotik (Mazińska a Hryniewicz, 2020), proto je často aplikované zbytečné nebo přílišné používání antibiotik nežádoucí z hlediska zhoršování vzniku antibiotické rezistence (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017). Dle Mazińskiej a Hryniewiczzké byl v Polsku hlášen nárůst používání antibiotik v ambulantní léčbě, výrazný nárůst spotřeby byl pozorován v obdobích zvýšeného výskytu

chřipky, což nepřímo může naznačovat jejich nesprávné použití (Mazińska a Hryniewicz, 2020). V rozvojových zemích je často pozorována praxe předepisování širokospektrých antibiotik bez jasné diagnózy (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017). Ve studii provedené v Libanonu bylo zjištěno, že v 52 % zkoumaných případů byla předepsána nevhodná dávka antibiotika a v 63,7 % případů byla předepsána špatná délka léčby (Saleh et al., 2015).

Vznik antibiotické rezistence může také být podporován chováním pacientů, ať už vědomím nebo nevědomím. Jedná se o pacienty, kteří užívají antibiotika v nevhodných intervalech, příliš krátce nebo proti pokynům lékaře, případně v rámci samoléčby antibiotiky (Mazińska a Hryniewicz, 2020; Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017). Krátké užívání antibiotik může být výsledkem vynechaných dávek antibiotika nebo jeho kompletním vynecháním při odeznění zjevných projevů infekce, může také dojít k projevu vedlejších účinků antibiotika, kdy pacient léčbu přeruší bez konzultace s lékařem (Okeke, Lamikanra a Edelman, 1999). Toto chování pak vede k vystavení mikroorganismu subterapeutickým dávkám antibiotika, což zvyšuje pravděpodobnost vzniku rezistence na toto antibiotikum (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017).

K nárůstu antibiotické rezistence přispívá umožnění volného prodeje antimikrobiálních léků (bez lékařského předpisu). Příkladem je volný prodej furazidinu v Polsku na léčbu nekomplikovaných bakteriálních infekcí močových cest (Mazińska a Hryniewicz, 2020). Výrazný je tento problém v rozvojových zemích, kde je získání antibiotik možné jak volným prodejem, tak skrz neregulované dodavatelské řetězce. Léky jsou k dostání u pouličních prodejců nebo v nelicencovaných lékárnách. Dalším problémem je kvalita těchto léků, které díky klimatickým podmínkám a špatnému skladování degradují a dávka účinné látky je tak menší, než je uváděno (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017). Na trhu jsou v těchto zemích také padělky. Studie z Kamerunu provedená na lécích od 132 prodejců odhalila, že 13 % sulfadoxinu/pyrimethaminu bylo pravděpodobně paděláno (Basco, 2004).

Dalším faktorem ovlivňujícím antibiotickou rezistenci je úroveň hygieny ve zdravotnických zařízeních. Šíření infekcí způsobených multirezistentními bakteriemi by měla zabránit účinná izolace infikovaných pacientů a funkce týmů pro kontrolu nozokominálních infekcí a týmů pro antibiotickou terapii (Mazińska a Hryniewicz, 2020).

Mezi faktory mimo humánní medicínu, které přispívají ke vzniku antibiotické rezistence, patří pohyb obyvatelstva, cestovní ruch (včetně zdravotní turistiky), nedodržování

hygienických pravidel v běžném životě, intenzivní obchod nebo klimatické změny (Mazińska a Hryniewicz, 2020). V rozvojových zemích dále mohou být zahrnuty špatné hygienické podmínky, nedostatečný přístup k tekoucí vodě nebo dezinfekčním prostředkům (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017; Mazińska a Hryniewicz, 2020). Hlavním faktorem vedoucím k nesprávnému používání antibiotik v rozvojových zemích je chudoba (Ayukekbong, Ntemgwa a Atabe, 2017).

2.1.2 Vznik antibiotické rezistence v rámci potravinového řetězce

Přenos mikroorganismů pomocí potravin byl pro lidské patogenní bakterie rozsáhle zmapován, nejčastější způsob přenosu je fekálně-orální cestou. Spouštěči alimentárních nemocnění mohou být kontaminované potraviny, oslabený/vnímovavý konzument nebo bakteriální patogeny schopné přežít a množit se v podmínkách potravin. V současnosti má většina lidských infekcí zoonotický původ, přibližně 75 % nových patogenů pochází od zvířat (Baquero et al., 2019). Antibiotika mohou být v potravinovém řetězci využívána v chovu zvířat, hlavně v rámci intenzivních chovů, jako léčebný prostředek u nemocných zvířat, k urychlení růstu, k léčbě skupiny zvířat, kdy je část z nich nemocná a přípravek je podáván všem kusům (u zdravých kusů jako prevence) nebo mohou být podávána v obdobích, kdy jsou zvířata náchylná k infekci (Hudson et al., 2017; Baquero et al., 2019).

Používání antibiotik jako stimulátorů růstu lze vysledovat do 50. let minulého století, kdy byla antibiotika přidávána do krmiva v subterapeutických dávkách. V roce 1975 byly provedeny první pokusy odhalující vznik rezistence u antibiotik používaných v živočišné produkci, ve stejné době bylo Evropským trhem zakázáno používání tetracyklinu jako stimulátoru růstu (Galhano et al., 2021). V Evropské unii bylo použití antibiotik ke stimulaci růstu zakázáno v roce 2006, zamezení jejich použití k tomuto účelu je často zmiňováno coby opatření ke stabilizaci nebo snížení výskytu antibiotické rezistence (Hudson et al., 2017). Antibiotika coby doplňkové látky v krmivech taktéž nejsou v Evropské unii povolena, s výjimkou kokcidostatik a histomonostatik, dle nařízení Evropského parlamentu a Rady (EU) č. 1831/2003 z roku 2003 o doplňkových látkách používaných ve výživě zvířat (Anonym, 2003).

K léčbě produkčních zvířat jsou ovšem antibiotika nezbytná. Odhaduje se, že poptávka po antibiotikách a jejich derivátech při živočišné produkci stoupne mezi lety 2010 a 2030 o 67 %, hlavně vlivem zintenzivnění produkce. V Brazílii, Číně a Indii je tento vzestup odhadován na 99 % (Hudson et al., 2017). Například v Číně bylo v roce 2012 použito při

produkcí vepřového a drůbežího masa přibližně 38,5 milionu kilogramů antibiotik (Krishnasamy, Otte a Silbergeld, 2015). Bylo prokázáno spojení mezi používáním antibiotik v živočišné produkci a výskytem antibiotické rezistence u komensální *Escherichia coli* izolované z prasat, drůbeže a skotu v 7 evropských zemích (Norsko, Švédsko, Dánsko, Rakousko, Švýcarsko, Nizozemí a Belgie) (Chantziaras et al., 2014). Antibiotika mohou být detekována v prostředí, kde jsou zvířata chována. Velká část podaných antibiotik může být vyloučena zvířaty nezmetabolizována. Při testování vzorků výměšků zvířat v Číně bylo zjištěno, že procentuální obsah nezmetabolizovaného antibiotika dosahoval až 82,1 % (Zhao, Dong a Wang, 2010). Existuje také obava, že používání pomocných antimikrobiálních látek při zpracovávání živočišné produkce, konkrétně drůbeže, může hrát roli v koselekcí bakterií rezistentních na antibiotika. Pomocné antimikrobiální látky jsou využívány během porážky, hlavně během chlazení, ke snížení rizika kontaminace produkce a tím snížení rizika pro konzumenty. Jedná se o biocidy, například acidifikovaný chlorid sodný, cetylpyridinium chlorid, ozon nebo kyselinu mléčnou či peroxyoctovou (Rhouma et al., 2021).

Využití antibiotik v rostlinné produkci je relativně nízké oproti produkci živočišné. Ve Spojených státech bylo v roce 2009 v sadech použito 16,465 kg antibiotik, což bylo 0,12 % objemu použitých antibiotik v živočišné produkci za stejný rok (Stockwell a Duffy, 2012). Antibiotika mohou být využita k léčbě onemocnění vysoce ceněného ovoce a zeleniny nebo se mohou do rostlinných produktů dostat díky použití hnoje kontaminovaného antibiotiky jako hnojiva pro zemědělskou půdu. Antibiotika se tak mohou dostat do půdy a vody, dochází tak k vytvoření větší škály způsobů, jak se mohou dostat k lidem (Hudson et al., 2017). V Číně bylo zkoumáno 18 vzorků říční vody, kdy pouze 1 byl bez obsahu detekovatelného množství antibiotik (Wei et al., 2011). Antibiotika jsou využívána i v akvakulturách, kdy se toto odvětví často spojuje se špatnou kontrolou a nadužíváním antibiotik kvůli špatným hygienickým podmínkám v produkčních lokalitách díky zvýšení produkce. Použití antibiotik se značně liší v různých produkčních lokalitách, antibiotika byla dle Rico (2013) použita u 100 % produkce ryby *Pangasius* ve Vietnamu, zatímco u krevet a garnátů v Bangladéši bylo použití antibiotik řídké. V případě dalšího růstu produkce se dá očekávat nárůst problémů s antibiotickou rezistencí, pokud by nedošlo ke změně v používání antibiotik (Rico et al., 2013). V Číně byla zaznamenána ve 36,7 % snížená citlivost k ciprofloxacinu u *Escherichia coli* izolované z ryb chovaných v akvakultuře (Baquero et al., 2019).

2.2 Mechanismy vzniku

Vývoj a šíření antibiotické rezistence je přirozený proces, kterému se nedá plně předejít nebo mu zabránit. Většina mechanismů rezistence se vyvinula ještě před použitím prvních moderních antibiotik, pravděpodobně díky skutečnosti, že většina antibiotik je odvozena z látek přirozeně produkovaných mikroorganismy. Při řešení otázky antibiotické rezistence se tedy zabýváme pouze ovlivněním tohoto procesu – ať pozitivním, tak negativním. (Hochvaldová et al., 2022). U patogenních i nepatogenních bakterií vznikají a přenášejí se mechanismy antibiotické rezistence díky selektivnímu tlaku vytvářenému antibiotikou (Gallo a Puglia, 2014). Bakterie mohou vykazovat antibiotickou rezistenci pomocí různých mechanismů, které jim umožňují rychle se adaptovat na přítomnost antibiotika v prostředí (Tenover, 2006). Znalost těchto mechanismů napomáhá vhodnému užití antibiotik v klinické praxi (Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017).

Bakterie mohou být přirozeně rezistentní k jednomu a více antibiotikům, kdy jsou k antibiotiku rezistentní všechny kmeny bakteriálního druhu, nebo může být tato rezistence získaná (Tenover, 2006). Bakterie mohou získat antibiotickou rezistenci dvěma způsoby, a to novou mutací a horizontálním přenosem, kdy je rezistence získána přenosem z jiných mikroorganismů (Martinez, 2014; Gallo a Puglia, 2014).

2.2.1 Vertikální přenos genů

K vertikálnímu přenosu genů dochází díky selekci kmenů bakterií nesoucích mutace vedoucí k antibiotické rezistenci. K selekci dochází během používání antibiotik, kdy jsou likvidovány citlivé kmeny, zatímco nově rezistentní díky mutaci působení antibiotika přežijí a následně se množí (Tenover, 2006; Gallo a Puglia, 2014). Často se jedná o spontánní mutace bakteriálního chromozomu (Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017). Mutační mechanismy antibiotické rezistence lze rozdělit na mechanismy modifikující cíl působení antibiotika nebo modifikující koncentraci antibiotika/antibiotikum jakou takové (Martinez, 2014).

Běžně nastávají čtyři mutace přispívající k antibiotické rezistenci, přičemž se nejedná o mutaci genů přímo způsobujících rezistenci. Může nastat mutace genů kódujících cíle působení antibiotika, mutace genů kódujících přenašeče antibiotik, mutace genů kódujících regulátory potlačující expresi přenašečů nebo mutace genů kódujících elementy odstraňující

antibiotikum z buňky (enzymy modifikující antibiotikum, efluxní pumpy) (Martinez, 2014; Wright, 2010).

Modifikace cíle působení může nastat díky mutaci cíle působení jako takového, např. rezistence k fluorochinolonům díky mutaci bakteriálních topoizomeráz (DNA gyrázy a topoizomerázy IV) (Wright, 2010; Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017), náhradě cíle působení, např. rezistence k beta-laktamům způsobená modifikací proteinů vázajících penicilin (penicillin binding proteins) u grampozitivních bakterií jako *Enterococcus faecium* nebo *Streptococcus pneumoniae* (Martinez, 2014; Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017), enzymatické modifikaci cíle, např. ribosomální metylace nebo rezistence na vankomycin díky reorganizaci buněčné stěny (Wright, 2010), nebo ochraně cíle, kdy jsou produkovány proteiny vážící se na cíl působení a zabraňující tak navázání antibiotika, např. protein QnrA chránící bakteriální topoizomerázy před inhibiční aktivitou chinolonů (Martinez, 2014; Wright, 2010).

Snížení koncentrace antibiotika lze dosáhnout ztížením průniku antibiotika do buňky nebo vylučováním antibiotika přes efluxní pumpy (Martinez, 2014). Ztížení průniku antibiotika do buňky může nastat u vnější membrány gramnegativních bakterií, kdy dochází se snížení počtu porinů v membráně, což vede k nižšímu průniku malých hydrofilních molekul beta-laktamových antibiotik a fluorochinolonů (Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017). Efluxní pumpy se nacházejí v cytoplazmatické membráně. Jsou tvořeny velkou skupinou proteinových pump vylučujících antibiotikum z vnitřního prostředí buňky dřív, než se antibiotikum dostane k cíli svého působení a udržujících jeho nízkou nitrobuněčnou koncentraci (Wright, 2010; Tenover, 2006; Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017). Efluxní pumpy mohou být substrátově specifické nebo mohou přenášet řadu chemicky nepříbuzných látek. U multirezistentních bakterií představují efluxní pumpy významnou část mechanismů jejich rezistence, část působí v synergii s dalšími mechanismy rezistence (Gallo a Puglia, 2014). Jako příklad mohou být uvedeny efluxní pumpy u *Staphylococcus aureus*, které způsobují rezistenci k fluorochinolonům (Tenover, 2006), k působení efluxních pump jsou citlivá antibiotika všech tříd s výjimkou polymyxinu (Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017). U snižování koncentrace antibiotika nedochází ke změně struktury antibiotika (Martinez, 2014).

Ke změně struktury antibiotika dochází při přítomnosti enzymů inaktivujících antibiotikum nebo při mutaci enzymu aktivujícího pre-antibiotikum (Martinez, 2014).

Celistvost chemické struktury antibiotika je nezbytná pro jeho aktivitu, proto jsou enzymy inaktivující antibiotikum specializované na štěpení chemických vazeb jeho struktury. Enzymy pro svou aktivitu vyžadují vodu, jsou bakterií vylučovány do prostředí, kde inaktivují antibiotikum (Gallo a Puglia, 2014). Například, beta-laktamázy hydrolyticky štěpí jádro beta-laktamového kruhu, který je nezbytný pro působení antibiotika, antibiotikum je tedy jeho rozštěpením inaktivováno (Wright, 2010; Tenover, 2006). Beta-laktamázy působí na peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy a karbapenemy, v současnosti je známo přibližně 300 beta-laktamáz. Dalším příkladem mohou být enzymy modifikující aminoglykosidy (fosforyltransferázy, nukleotidyltransferázy a adenyltransferázy) nebo chloramfenikoltransacetyláza acetyluje hydroxylové skupiny chloramfenikolu (Kapoor, Saigal a Elongavan, 2017).

Nedávné studie poukázaly na to, že na antibiotickou rezistenci mají vliv také prvky, které jsou součástí základního bakteriálního metabolismu. Prvky jsou schopné způsobovat drobné změny v souvislosti s minimální inhibiční koncentrací (Martinez, 2014).

2.2.2 Horizontální přenos genů

Geny v rámci horizontálního přenosu pocházejí z komenzálních bakterií gastrointestinálního traktu a bakterií z prostředí, které vykazují rezistenci a slouží tak jako rezervoár genů antibiotické rezistence (Martinez, 2014; Hudson et al., 2017). Pro rezervoár genů antibiotické rezistence bývá používáno označení rezistom, kdy se navíc pod toto označení zařazují protorezistentní geny, které mají potenciál vyvinout se v geny rezistence (Gallo a Puglia, 2014). Horizontální přenos genů může probíhat mezi kmeny stejných druhů nebo mezi různými (nepříbuznými) bakteriálními kmeny a druhy. Bakterie tímto způsobem mohou získat rezistenci k vícero třídám antibiotik (Tenover, 2006; Schrijver et al., 2018). Například, bylo zjištěno, že gen QnrA, který je zodpovědný za rezistenci k chinolonům, pochází ze *Shewanella algae* (Poirel et al., 2005), která je rozšířená v prostředí, její výskyt je nejběžněji spojován se sladkovodními nebo mořskými vodními plochami (Srinivas et al., 2015).

K horizontálnímu přenosu genů může docházet pomocí transformace, konjugace nebo transdukce nebo jejich kombinací. Přenos a začlenění genů do genomu nebo plazmidů hostitele může být ve všech procesech zprostředkován transpozony coby přenosnými elementy (Tenover, 2006; Gallo a Puglia, 2014). Při konjugaci gramnegativní bakterie je přesunut plazmid obsahující geny kódující antibiotickou rezistenci do recipientní buňky

prostřednictvím pilu, který ji spojuje s donorovou buňkou (Tenover, 2006). U gram pozitivních bakterií je výměna DNA během konjugace započata shlukováním donorové a recipientní buňky vyvolaným sex feromony (Gallo a Puglia, 2014). U transdukce jsou geny kódující antibiotickou rezistenci přenášeny pomocí bakteriofágů. Jedná se o poměrně vzácný úkaz. Transformace je proces, kdy bakterie získá a začlení do své genetické informace DNA segmenty, které byly uvolněny do prostředí po lýzi jiné bakterie (Tenover, 2006; Gallo a Puglia, 2014).

Bylo popsáno několik překážek, které ztěžují horizontální přenos genů k lidským patogenům. První z těchto překážek je ekologická konektivita, kdy gen kódující rezistenci může být přenesen pouze pokud existuje kontakt mezi příjemcem a dárce nebo jeho DNA. Není zde třeba přímý kontakt, je ovšem nutná přítomnost přenosového řetězce a elementu přenášejícího gen. Druhou překážkou je zakládající efekt, kdy, pokud je již přítomen determinant rezistence, je nepravděpodobné, že by byl získán jiný determinant zajišťující podobný fenotyp. Překážky dále mohou ovlivňovat rozšíření, pravděpodobnost mutace a její fixaci (Martinez, 2014).

3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE U ENTEROBAKTERIÍ

Velký počet infekcí má za původce mikroorganismy patřící do čeledi *Enterobacteriaceae* (Kaushik et al., 2018). Jedná se o gramnegativní, nesporulující fakultativní anaeroby fermentující glukózu a další cukry, redukující dusičnan na dusitan, produkující katalázu (vyjma *Plesiomonas*) a neprodukující oxidázu (Donnenberg, 2015). Bakterie patřící do této čeledi se přirozeně nacházejí v intestinálním traktu lidí a zvířat (Kaushik et al., 2018), dají se ovšem najít v téměř jakémkoliv prostředí. Získaly si pověst nejčastěji zpracovávaných mikroorganismů v mikrobiologii (Corry, Curtis a Baird, 2012), patří mezi ně například *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Citrobacter* a *Klebsiella*. Některé *Enterobacteriaceae* jsou původci onemocnění v ojedinělých případech, jiné jsou častými lidskými patogeny způsobujícími intestinální, urogenitální a cévní infekce (Kaushik et al., 2018, Rock a Donnenberg, 2014). Tyto infekce mohou postihnout jinak zdravé hostitele nebo hostitele s již existujícím jiným onemocněním. Laboratorní izoláty této čeledi tvoří většinu u izolátů získaných z močových cest, krve, dutiny břišní a dýchacích cest. Byly izolovány také z mozkomíšního moku, synoviální tekutiny nebo abscesů (Donnenberg, 2015).

Lidská a veterinární medicína spoléhá na intenzivní aplikaci antibiotik k léčbě infekcí způsobených bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*, což mělo za následek rychlý rozvoj multirezistentních mikroorganismů, hlavně mezi střevními bakteriemi (Kaushik et al., 2018). Procento multirezistentních izolátů, včetně izolátů produkujících beta-laktamázy s rozšířenou působností, karbapenamázy a rezistentních k fluorochinolonom, vzrostlo do té míry, že většina izolátů získaných z nemocnic a běžné populace je rezistentní k několika třídám antibiotik (Donnenberg, 2015). Vývoj rezistence pro různé třídy antibiotik u *Enterobacteriaceae*, zejména u *Klebsiella*, významně ztěžuje léčbu infekcí jimi způsobených (např. průjemová onemocnění dětí v rozvojových zemích) (Rock a Donnenberg, 2014). *Enterobacteriaceae* produkující beta-laktamázy s rozšířenou působností jsou rezistentní k téměř všem beta-laktamovým antibiotikům, což je nejčastěji předepisovaná třída antibiotik. Jsou často také rezistentní k antibiotikům předepisovaným jako alternativa k beta-laktamovým antibiotikům (fluorochinolony, aminoglykosidy nebo tetracyklin). U vážných infekcí způsobených *Enterobacteriaceae* jsou využívány karbapenemy, se vzrůstem jejich spotřeby během posledních 10 let se objevila rezistence k nim vlivem karbapenemáz. To zanechává jen omezené množství antibiotik vhodných k léčbě jako kolistin a tigecyklin, bylo ovšem zjištěno, že mechanismus rezistence by mohl být v rámci *Enterobacteriaceae* uzpůsoben ke kolistinu (Armand-Lefèvre, Andremont a Ruppé, 2018).

3.1 Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z klinických vzorků

Infekce způsobené bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae* se mohou vyskytovat sporadicky nebo jako plošnější nákazy (Donnenberg, 2015). *Escherichia coli* je běžný původce infekcí močových cest a bakteriemi. Často vykazuje rezistenci k aminopenicilinům (např. amoxicilin nebo ampicilin) a úzkospektrým cefalosporinům v důsledku zisku plazmidově kódovaných beta-laktamáz. Některé kmeny jsou rezistentní k třetí generaci cefalosporinů a monobaktamům (např. aztreonamu) díky přítomnosti beta-laktamáz s rozšířenou působností. Tyto beta-laktamázy nemají působnost k cefamycinům (např. cefoxitinu, cefotetanu), rezistence na ně může být způsobena v důsledku změn porinů vnější membrány (Tenover, 2006). U žen používajících membránovou nebo spermicidní antikoncepci a žen po menopauze byla pozorována vyšší náchylnost k vaginální kolonizaci *Escherichia coli* a dalšími bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Je to významný faktor pro následný rozvoj extraintestinální infekce. Určitá skupina lidí, včetně alkoholiků a pacientů trpících cukrovkou, je vysoce náchylná ke kolonizaci ústní části hltanu (*oropharynx*) bakteriemi čeledi *Enterobacteriaceae*. Kolonizace ústní části hltanu hrozí i u hospitalizovaných pacientů bez ohledu na to, zda jsou jim podávána antibiotika (Donnenberg, 2015). Sherwani zmiňuje studii multirezistentních *Enterobacteriaceae* u pacientů po transplantaci solidních orgánů, kdy byly tyto bakterie rezistentní k cefalosporinům u téměř poloviny pacientů v důsledku nadměrné exprese chromozomální beta-laktamázy (Sherwani et al., 2013). Rezistence ke karbapenemům u pediatrických pacientů v posledních letech výrazně roste, u hospitalizovaných pacientů s cévní infekcí způsobenou *Enterobacteriaceae* rezistentními ke karbapenemům dosáhla úmrtnost až 50 %. Nárůst rezistence ke karbapenemům byl zdůrazněn u *Enterobacter* spp., kdy mezi lety 2000 a 2012 dosáhl z 0 % na 4,5 % (Romandini et al., 2021).

Mechanismus rezistence je možno ilustrovat na případu čtyřleté dívky hospitalizované v Atlantě s aplastickou anémií a bakteriemi. Izoláty *Escherichia coli* získané z krve byly rezistentní k ampicilinu a úzkospektrým cefalosporinům, byly citlivé k cefalosporinům 3. generace. Během 3 týdnů byla dívce podávána antibiotika účinná na *Escherichia coli* a další možné původce onemocnění, jednalo se o peniciliny (tikarcilin, oxacilin, a mezlocilin), aminoglykosidy (gentamicin), cefalosporiny 3. generace (cefotaxim a ceftazidim), vankomycin a klindamycin. Během 4. týdne (vývoj celkem trval 2 měsíce) hospitalizace

vykazovaly izoláty *Escherichia coli* vzrůstající rezistenci k cefalosporinům 3. generace (zejména ceftazidimu) a aztreonamu, některé izoláty začaly vykazovat rezistenci k cefamycinům (cefoxitin a cefotetan), pravděpodobně díky získání dalšího mechanismu rezistence vyjma beta-laktamázy (snížení počtu porinů buněčné stěny). Ze studie typizace přítomného kmene bylo zjištěno, že byl přítomen pouze 1 kmen *Escherichia coli*, který získal novou rezistenci během průběhu léčby infekce (Tenover, 2006).

V rámci rozsáhlé studie provedené v Pákistánu mezi lety 2001 a 2006 ze vzorků krve odebraných ve velkých městech byla zjišťována rezistence u *Salmonella* Typhi a *Salmonella* Paratyphi A. Většina izolátů byla získána od dětí mladších 15 let, u *S. Typhi* se jednalo o 79,3 %, u *S. Paratyphi A* pak o 59,9 %. Během sledovaného období stoupla rezistence na kotrimoxazol, chloramfenikol a ampicilin (multirezistence) u *S. Typhi* z 34,2 % na 48,5 %. U *S. Paratyphi A* se hodnota snížila z 44,5 % na 8,6 %. U obou bylo zaznamenáno zvýšení rezistence na fluorochinolony (Hasan et al., 2008). Ve studii prováděné u pacientů v Dháce (Bangladěš) bylo 67 % izolovaných kmenů *S. Typhi* multirezistentních, konkrétně k chloramfenikolu, ampicilinu, trimethoprimu, streptomycinu, sulfamethoxazolu a tetracyklinu (Sherwani et al., 2013).

U studie provedené v Nepálu mezi lety 2002 a 2004 zaměřené na izolaci *Shigella* spp. a její antibiotickou rezistenci u pacientů s akutní gastroenteritidou v západním Nepálu byla u 80,7 % izolátů zjištěna rezistence a u 74,7 % byla zjištěna rezistence ke 2 a více antibiotikům. Nejvyšší rezistence byla zjištěna u kotrimoxazolu (80,7 %), dále pak následovali tetracyklin (74,7 %), gentamicin (55,4 %), ampicilin (53 %), chloramfenikol (39,7 %) a kyselina nalidixová (31,3 %) (Wilson et al., 2006). Studie provedená v centrálním Izraeli zaměřená na rezistenci u izolátů *Shigella* spp. získaných z lidské stolice zjistila významné zvýšení výskytu rezistence k tetracyklinu, a to z 23 % na 87 %, a vysokou rezistenci na trimethoprim–sulfamethoxazol (94 %) a ampicilin (85 %) (Ashkenazi, 2003).

Značný rozvoj mezinárodního cestování také přispěl k přenosu multirezistentních *Enterobacteriaceae* do zemí s jejich nízkým výskytem. Několik studií uvedlo, že 21–51 % zdravých cestovatelů se nakazilo multirezistentními kmeny *Enterobacteriaceae* během cest v závislosti na regionu, do kterého cestovali. V jižní části Asie byl risk největší (až 85 %), v Africe a na Blízkém východě se risk pohyboval mezi 13–44 %. Hlavní druhy multirezistentních *Enterobacteriaceae* byly *Escherichia coli* (88–100 %) a *Klebsiella pneumoniae* (0–8 %) (Armand-Lefèvre, Andreumont a Ruppé, 2018).

3.2 Antibiotická rezistence u enterobakterií izolovaných z potravin a nápojů

Dalo by se očekávat, že rozšíření mikroorganismů rezistentních k antibiotikům bude klesat s postupujícími kroky potravinového řetězce společně se zlepšením standardů v hygieně potravin, přesto jsou známy případy onemocnění z potravin způsobené patogeny rezistentními k antibiotikům (Hudson et al., 2017). Jako příklad je možno uvést 25 kultivačně potvrzených případů onemocnění v Dánsku roku 1998 způsobeném multirezistentní *Salmonella* Typhimurium DT 104 (rezistence ke kyselině nalidixové a snížená citlivost k fluorochinolonům), přičemž do roku 1997 *S. Typhimurium* DT 104 byla původcem méně než 1 % všech lidských infekcí salmonelou. Jako zdroj této nákazy bylo uvedeno dánské stádo prasat (Mølbak et al., 1999). V Itálii byla zkoumána přítomnost rezistentních *Enterobacteriaceae* v rektálních výtěrech prasat a v mletém vepřovém mase. Zatímco u výtěrů byly rezistentní *Enterobacteriaceae* přítomné v 52,2 %, u mletého masa byly přítomny u 3 % izolátů (Hudson et al., 2017).

V Jižní Koreji a Číně byly provedeny studie dokumentující vysoký výskyt *Salmonella* spp. v drůbežím mase rezistentních k fluorochinolonům (22,5 % a více k ciprofloxacinu) a cefalosporinům (12,5–23,4 % a více k ceftriaxonu a 26,6 % k ceftazidimu) (Baquero et al., 2019). Studie prováděná ve Velké Británii mezi lety 2006 a 2009 na vzorcích brojlerových kuřat a krůt došla k závěru, že *Escherichia coli* s rozšířeným spektrem beta-laktamáz se lišila od izolátů způsobujících onemocnění lidí, ovšem nebyl vyloučen přenos antibiotické rezistence mezi nimi (Randall et al., 2010). V roce 2016 Evropská agentura pro bezpečnost potravin uvedla běžnou schopnost detekce *Salmonella* spp. rezistentních k běžným antibiotikům u izolátů od lidí a drůbeže. U sérotypů, jejichž výskyt je spojován s drůbeží (*S. Enteritidis*, *S. Infantis*, a *S. enterica* sérovar Kentucky), byla rezistence na ciprofloxacin výrazně vyšší. Byl zároveň popsán vysoký výskyt multirezistentních izolátů *Salmonella* v drůbežím mase, u kuřecího masa se jednalo o 24,8 % multirezistentních, u krůtího masa pak 30,5 % (Baquero et al., 2019).

V USA bylo provedeno srovnání vegetariánů s čerstvě hospitalizovanými pacienty se zaměřením na kolonizaci *Escherichia coli* rezistentní k antibiotikům. Kontakt a konzumace drůbežího masa se v této studii nedal vyvodit jako prediktivní, u vegetariánů byl častý záchyt *Escherichia coli* rezistentní k antibiotikům, kdy jako rizikový faktor bylo vyhodnoceno cestování (Hudson et al., 2017). V zemích s nízkými a středními příjmy je míra antibiotické

rezistence vyšší než u zemí s vysokými příjmy, kdy produkce potravin je uváděna jako potenciální zdroj, hlavně v důsledku neregulovaného použití antibiotik a větší míře jejich aplikace. Tyto země jsou významnými exportéry potravin do jiných částí světa, je zvažováno, že mezinárodní obchod s chovnými zvířaty, krmivem a masem/masnými výrobky kontaminovanými patogeny rezistentními k antibiotikům přispívá k rychlému šíření těchto patogenů (Baquero et al., 2019).

V USA bylo také při sledování *E. coli* a *Salmonella enterica* rezistentních k antibiotikům zjišťováno, zda jsou přítomny v produkčním prostředí skotu a zda se mohou dostat do finálního produktu (hovězího masa). *Salmonella* byla detekována na úrovni 7,6 % na kůžích (z toho pouze v 1 vzorku byla přítomna rezistentní *S. enterica*), nebyla zjištěna na jatečně upravených tělech, ani na nízkém roštenci. *E. coli* byla zjištěna u 100 % zpracovávaných kůží, na jatečně upravených tělech byl záchyt 0,5 % a na nízkém roštenci nebyla *E. coli* zachycena vůbec (Schmidt et al., 2015).

Hudson et al. (2017) zmiňuje finskou studii, kde se enterobakterie izolované ze zeleniny lišily svými profily antibiotické rezistence od těch, které se nacházely v lidské střevní mikrobiotě. Studie shledala, že tyto mikroorganismy podstatně nepřispívají k vysokým hodnotám antibiotické rezistence lidské střevní mikroflóry. Ze studie, která se zabývala hromaděním antibiotik v zelenině, bylo zjištěno, že antibiotika se nejvíce hromadí v listech rostlin. Bylo také zjištěno, že zdrojem analyzovaných antibiotik bylo s nejvyšší pravděpodobností použité organické hnojivo (Hudson et al., 2017).

Povrchy, které se dostávají do kontaktu s potravinami, mohou být také kontaminované rezistentními mikroorganismy (Hudson et al., 2017). V Selangoru (Malajsie) byla provedena studie zaměřená na maloobchod s drůbežím masem. Bylo zjištěno, že 38,8 % povrchů drůbežářských provozů bylo kontaminováno *Escherichia coli* s rozšířenou působností beta-laktamáz, u masa byl její záchyt 53,8 %. Byly identifikovány rizikové faktory, dle kterých se dala předvídat kontaminace mikroorganismy u drůbeže, konkrétně sanitace prodejního místa a materiál pultu, zdroj vody k čištění a materiál prkének pro porcování masa. (Aliyu et al., 2016)

Některé kmeny *S. enterica*, které byly vystaveny působení nižším než inhibičním koncentracím pomocných antimikrobiálních látek při zpracování drůbeže, vykazovaly sníženou citlivost k antibiotikům (např. streptomycinu, neomycinu, rifampicinu, erythromycinu a kyselině nalidixové). Kmen *Salmonella* Heidelberg adaptovaný na chlor

vykazoval snížení citlivosti k fluorochinolonům, aminoglykosidům, penicilinu a tetracyklinu (Rhouma et al., 2021). Ve studii od Fernández Márquezové et al. (2017) byla popsána korelace mezi antibiotickou rezistencí kmenů *Salmonella* izolovaných ze skořápek slepičích vajec a jejich fenotypickou tolerancí k biocidům, vzájemně mezi antibiotiky a biocidy. Ve studii bylo navrženo, že zobecněné používání biocidů může působit koselektivně na antibiotickou rezistenci mikroorganismů (Fernández Márquez et al., 2017). Snížení citlivosti *Salmonella enterica* bylo zdůvodňováno nespecifickými mechanismy rezistence. U *Escherichia coli* ATCC 12806 byla popsána adaptace na chlornan sodný v souvislosti se zvyšující se tvorbou biofilmu, zároveň byla pozorována snížená citlivost na spektinomycin, kyselina nalidixovou a ampicilin-sulbaktam (Rhouma et al., 2021).

4 TEORETICKÉ PODKLADY PRO METODIKU PRÁCE

V této kapitole jsou popsány teoretické úvody a principy metod použitých v praktické části k získání a přepravě vzorků, kultivaci a izolaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a skríníngu antibiotické rezistence za použití diskové difuzní metody.

Postupy se řadí do tradičních metod detekce antibiotické rezistence. Tradiční metody se zaměřují na identifikaci a kvantifikaci bakterií, jsou založeny na zkoumání morfologických a biochemických vlastností kolonií, je využívána analýza fenotypu, mikroskopie, enzymatická charakterizace a testy citlivosti k antibiotikům v podobě určení minimální inhibiční koncentrace nebo využití diskové difuzní metody (Galhano et al., 2021).

4.1 Odběr vzorků

Obecný postup odběru vzorků daný normou je popsán takto: do označené vzorkovnice se vhodným nástrojem odebere vzorek (výrobek, jeho část). Jako vzorkovnici je možno využít sáček nebo krabici pro pevné vzorky, lahev nebo zkumavku pro kapalný vzorek. V závislosti na účelu zkoušení mohou být vzorkovnice sterilní či nesterilní, vzorkovnice musí být suché čisté a nepropustné. Vzorkovnice se bezpečně uzavře a umístí se do chladicího boxu, chladničky nebo izolovaného boxu (Anonym, 2017).

Vzorky jsou baleny tak, aby nedošlo ke křížové kontaminaci, úniku nebo ztrátě vlhkosti (Anonym2, 2013). Techniky odběru nesmí měnit vlastní mikrobiotu odebraného vzorku (Anonym, 2017).

Vzorky musí být označeny minimálně informacemi o povaze matrice, její identifikací, jménem osoby zodpovědné za odběr vzorků, datem, časem a místem odběru vzorků. Dále se zaznamenávají informace o povaze, počtu a identitě vzorků, teplota vzorku a jeho uchování, účel odběru vzorků a mikroorganismy, které se mají zjišťovat (Anonym2, 2013). Musí být zaznamenány všechny informace dostatečné pro úplnou sledovatelnost vzorků a pro umožnění interpretace výsledků analýzy (Anonym, 2017).

Vybavení a pomůcky k odběru vzorků musí být čisté, v závislosti na cíli zkoušení je vyžadována jejich sterilita (Anonym, 2017). Dezinfekční prostředek použitý k dekontaminaci obalů, nástrojů a povrchů je ethanol (70 obj. %) (Anonym2, 2013). Dále je možno použít kousky tkaniny/polštářky smočené v etanolu (70 obj. %). Jako alternativa k etanolu je možné využít jiné baktericidní činidlo (Anonym, 2017). Pro odběr vzorků prvovýroby je vhodné použít plastové pomůcky na jedno použití uchované v uzavřených

obalech. Pro každý případ odběru vzorků by se mělo použít nové balení pomůcek, během odběru vzorků je třeba zabránit kontaminaci pomůcek zbylých v balení (Anonym2, 2013).

4.2 Přeprava vzorků

Dle norem je přeprava vzorků do laboratoře popsána takto: doba mezi odběrem vzorků a zkoušením má být co nejkratší (Anonym2, 2013), nemá přesáhnout 24 hodin. Přeprava musí probíhat za řízených teplotních podmínek. Chlazené výrobky se přepravují při teplotě pod 8 °C, zmrazené výrobky při teplotě pod -15 °C (Anonym, 2017). Vzorky mají být umístěny do izolovaných transportních nádob, chladicího zařízení nebo boxu s chladicími vložkami (Anonym2, 2013). Chladicí jednotka musí být uvedena do provozu dostatečně dlouho před jejím použitím, aby v době jejího použití bylo dosaženo požadované teploty (Anonym, 2017). Vzorky přepravované při okolní teplotě mají být vyšetřeny do 24 hodin. Vzorky zchlazené v průběhu přepravy mají být vyšetřeny do 72 hodin. Vzorky, které nelze zkoušet v den jejich dodání, se musí uchovávat až do zkoušení v chladu (Anonym2, 2013). Tampony se stěry a vzorky užitkové vody mohou být nepříznivě ovlivněny prodlouženými dobami přepravy (více než 24 hodin). Vzorky, které nebyly před odběrem zmrazené, by se neměly po odběru zmrazit. Je-li zmrazení vzorků nezbytné kvůli vysokým okolním teplotám nebo prodlouženým časům přepravy, musí to být zaznamenáno (Anonym, 2017).

Chlazené výrobky se přepravují při teplotě pod 8 °C, přičemž vzorkovnice by neměly být v přímém kontaktu se zmrazenými plochami (chladicími vložkami), aby nedošlo k ovlivnění mikrobioty vzorku. Zmrazené výrobky se přepravují při teplotě pod -15 °C. Pro záznam teploty je využíván teploměr nebo teplotní sonda schopný měření teplot od -20 °C do 10 °C s nejistotou měření ± 1 °C. Když není využit záznamník teplot, je teplota zaznamenávána těsně před uzavřením, znovu je zaznamenána těsně po příjezdu do laboratoře. Zaznamená se čas přepravy. Při překročení požadované teploty/doby přepravy musí být maximální teplota a doba přepravy zaznamenána v protokolu o zkoušení. Před zkoušením se vzorky označí štítky a uchovávají se za vhodných podmínek (Anonym, 2017).

V protokolu o přepravě by mělo být uvedeno trvání přepravy, povaha vzorků, teplota a způsob záznamu teplot, obal vzorku a sekundární ochrana integrity vzorku a uspořádání v přepravních boxech (Anonym, 2017).

4.3 Mikrobiologický rozbor

Metoda počítání kolonií je používána ke kvantifikaci bakteriální populace větší než 250 CFU/ml (kolonie tvořící jednotka/ml vzorku) u kapalných vzorků a větší než 2 500 CFU/ml u ředěných homogenizovaných pevných vzorků. Ředění vzorků jsou následně nanesena na agarové médium (Matthews, Kniel a Montville, 2017), inokulaci je možné provádět přelivem nebo rozetřením na zatuhlém médium (Corry, Curtis a Baird, 2012). Následuje kultivace přizpůsobená mikroorganismům, jejichž počet se stanovuje. Po kultivaci je spočítán průměrný počet kolonií a dle příslušného ředění je dopočítán počet mikroorganismů (vyjádřen jako CFU) v původním vzorku (Matthews, Kniel a Montville, 2017). Pro metodu počítání kolonií je využíván Plate count agar, který je relativně bohatý na živiny. Obsahuje trypton, kvasničný extrakt, glukózu, agar a destilovanou vodu (Corry, Curtis a Baird, 2012).

Selektivní médium obsahuje ingredience podporující růst cílových mikroorganismů (např. vhodný sacharid), může také obsahovat ingredience inhibující růst kompetitivních mikroorganismů (např. antibiotika, soli, povrchově aktivní látky) (Matthews, Kniel a Montville, 2017). Většina selektivních médií pro *Enterobacteriaceae* se skládá z fermentovatelného sacharidu a pH indikátoru, žlučové soli, siřičitanu sodného, barviva nebo jejich kombinací, tyto látky jsou obsažené v mnoha selektivních médiích jako prostředky k inhibici grampozitivních bakterií (de Boer, 2000). Byly ovšem popsány případy toxicity těchto selektivních médií k nestresovaným *Enterobacteriaceae*. Tomu se lze vyhnout vhodným výběrem používané krystalové violeti a žlučových solí (Corry, Curtis a Baird, 2012). První médium vhodné pro koliformní bakterie náležící k enterobakteriím připravil MacConkey, toto médium obsahovalo laktózu a směs kyseliny glykolové a kyseliny taurocholové (de Boer, 2000; Smith, 2019). Jako příklad běžně využívaného agarového média pro koliformy, včetně *E. coli*, je možné uvést agar s krystalovou violetí a žlučovými solemi (VRBA, Violet Red Bile Agar). Jedná se o modifikaci původního MacConkeyho média přidáním krystalové violeti ke žlučovým solím jako inhibičního prostředku a přidáním neutrální červeně jako indikátoru (de Boer, 2000; Aryal, 2022). U agaru s krystalovou violetí, žlučovými solemi a laktózou (VRBL, Violet Red Bile Lactose Agar) inhibují krystalová violet a žlučové soli růst grampozitivních bakterií, fermentace laktózy má za následek snížení pH a tím barevnou změnu média v důsledku okyselení a změny zbarvení pH indikátoru, případně precipitaci žlučových solí v okolí kolonií. Laktózapozitivní bakterie na této kultivační půdě jsou popisovány ve formě růžovofialových kolonií, které mohou být obklopeny precipitační zónou. Laktózanegativní bakterie rostou

jako světlé kolonie (Corry, Curtis a Baird, 2012). Jako alternativa je používán agar s krystalovou violetí, žlučovými solemi a glukózou (VRBG, Violet Red Bile Glucose Agar), který se od VRBL liší nahrazením laktózy glukózou (de Boer, 2000).

U Endova agaru je jako indikátor použit fuchsin, díky kterému jsou kolonie laktóza pozitivních bakterií zbarveny červeně. Kvůli obsahu fuchsinu, coby potenciálního karcinogenu, se toto médium využívá omezeně (de Boer, 2000). U *E.coli* dochází v důsledku růstu ke krystalizaci fuchsinu, což má za následek charakteristický nazelenalý kovový lesk kolonií (Corry, Curtis a Baird, 2012). Pro konečnou identifikaci suspektních kolonií, které narostly na selektivním médiu, jsou využívány biochemické nebo genetické metody v důsledku možného nárůstu jiných bakterií než *Enterobacteriaceae* (Matthews, Kniel a Montville, 2017). Suspektní kolonie musí u *Enterobacteriaceae* vykazovat negativní reakci u oxidázy a zároveň fermentovat glukózu (de Boer, 2000).

4.4 Získání čisté kultury křížovým roztěrem

Selekce kolonií pro izolaci čisté kultury je časově nejnáročnější a nejsubjektivnější část izolace (Goodfellow, 2010). Slouží k získání dostatku buněčného materiálu k provedení biochemických a molekulárně biologických analýz potřebných k identifikaci a jejich dalšímu studiu (Wolfaardt, Korber a Lawrence, 2007). Kolonie na agarových plotnách mohou být vybrány náhodně nebo na základě zvolených kritérií (Goodfellow, 2010). Teoreticky jsou čisté kultury získány izolací jednotlivých bakteriálních buněk v ředících zkumavkách nebo na agarových plotnách (Wolfaardt, Korber a Lawrence, 2007). První ztužené plotny začal k tomuto účelu využívat Robert Koch z důvodu obtížnosti izolace mikroorganismů za použití bujónu. Koch použil masový extrakt s přidanou želatinou (Sandle, 2016). K izolaci čisté kultury je vhodné použít neselektivní médium, na kterém by měl být patrný nárůst kontaminantů (jiných než izolovaných mikroorganismů), a je tak možno odhalit jejich přítomnost v kultuře (Teske et al., 2007).

Běžně je využívána metoda křížového roztěru jako nejpraktičtější varianta získání izolovaných kolonií. Za použití sterilní kličky je na agarovou plotnu nanášena kultura mikroorganismu v jednotlivých tazích sloužících k postupnému zředění kultury k získání jednotlivých izolovaných kolonií (Bhattacharyya a Banerjee, 2007). Je možné použít metodu přelivu nebo sérií ředění na hlubokém agaru (Teske et al., 2007). Často dochází k situaci, kdy je za použití postupu izolace jednotlivých kolonií směsná kultura zaměněna za kulturu

čistou. Tato situace může nastat v případě, kdy kolonie nevznikla z jediné bakteriální buňky, ale byla vytvořena z agregátu buněk. Například u slizotvorných bakterií jsou mikroorganismy navzájem tak úzce spojeny slizovou vrstvou, že je obtížné docílit jejich pomnožení jako čistých kolonií (Wolfaardt, Korber a Lawrence, 2007; Teske et al., 2007).

Je možno uvést dva předběžné postupy využívané k určení, zda byla získána čistá kultura. Jednou z nich je, že je z agarových ploten získán jeden typ kolonie (kolonie se jeví při pozorování stejné), druhý postup spočívá v použití mikroskopie za využití Gramova barvení, kdy je možno pozorovat, zda se jedná o grampozitivní nebo gramnegativní bakterii a zda jsou přítomné bakteriální buňky vzhledově a velikostně obdobné (Wolfaardt, Korber a Lawrence, 2007; Beveridge, Lawrence a Murray, 2007). Při použití selektivního média, lze předběžně identifikovat cílové mikroorganismy na základě morfologie kolonie. Pomocnou roli hrají chromogenní/fluorogenní látky obsažené v selektivním médiu indikující přítomnost určitých enzymů produkovaných mikroorganismem (Goodfellow, 2010).

Gramovo barvení původně použil Christian Gram v roce 1884, jeho současná podoba byla zavedena v roce 1921 spolu s dalšími modifikacemi (Garcia, 2010). Jedná se o jednu z nejdůležitějších rozlišovacích technik u bakterií (Beveridge, Lawrence a Murray, 2007). Při využití Gramova barvení dochází k rozlišení bakterií na základě jejich rozdílné stavby buněčné stěny (Garcia, 2010). U grampozitivních bakterií je buněčná stěna složená ze silné vrstvy peptidoglykanu a teikoových kyselin, po navázání prvního barviva (komplex krystalová violet' a jód) nedochází k jeho vymytí alkoholem, bakterie tak zůstávají zbarvené tmavě fialově (Galperin, 2016; Garcia, 2010; Beveridge, Lawrence a Murray, 2007). Gramnegativní bakterie mají slabší peptidoglykanovou vrstvu s asymetricky připojenou liposacharidovo-fosfolipidovou dvojvrstvou tvořící vnější membránu. Po navázání prvního barviva dochází k jeho vymytí alkoholem v důsledku poškození vnější membrány, je tak umožněno navázání druhého barviva (karbofuchsin, safranin). Bakterie jsou tak zbarveny růžovočerveně (Beveridge, Lawrence a Murray, 2007; Garcia, 2010). Teoreticky by se měly vyskytovat pouze tyto dvě skupiny, v praxi se lze setkat i s gramvariabilními bakteriemi (Beveridge, Lawrence a Murray, 2007). Gramvariabilní bakterie se po obarvení vyznačují směsnou barevnou reakcí, kdy jsou přítomné buňky zbarvené jak tmavě fialově, tak růžovočerveně. Jako gramvariabilní se mohou projevit některé grampozitivní bakterie (například *Propionibacterium*, *Corynebacterium* nebo *Arthobacter*), které mají buněčnou stěnu náchylnou k poškození. Poškozené buňky se jeví jako gramnegativní. Dalším důvodem pro gramvariabilní reakci u grampozitivních bakterií může být zeslabení vrstvy

peptidoglykanu během růstu (například u bakterií *Bacillus* nebo *Clostridium*) (Sandle, 2016).

4.5 Uskladnění izolátů a jejich identifikace

Získání čisté bakteriální nebo buněčné kultury představuje velkou časovou a finanční investici, je tak třeba zabránit ztrátě těchto kultur vhodnými technikami uchování. Neexistuje univerzální metoda uchování použitelná pro všechny mikroorganismy, úspěšnost uchování závisí na použitém růstovém médiu, způsobu kultivace a stáří kultury v době uchování (Gherna, 2010). Krátkodobě mohou být čisté kultury po jejich izolaci a subkultivaci na agarových plotnách nebo na šikmých agaroch uchovány v lednici při teplotě 4–12 °C. Pevná média jsou upřednostňována před tekutými v důsledku snazšího odhalení kontaminace. Je třeba, aby kultura byla pravidelně subkultivována na čerstvém médiu (Bhattacharyya a Banerjee, 2007; Boekhout a Robert, 2003). Doba mezi subkultivací se liší dle mikroorganismu a použitého média, u velké části bakterií se jedná o 3–5 měsíců. Vzhledem k nutnosti pravidelné subkultivace je tento způsob uchování časově a finančně náročný, kultury jsou náchylné kontaminaci, chybě při označování nebo selekci variant kmene (Gherna, 2010).

Při zamrazování kultur se nedoporučuje rozmezí teplot 0° C až -20 °C, kdy může dojít k poškození buněk kultury tvorbou ledových krystalů (Gherna, 2010). Kultury mohou být dlouhodobě uchovány po rychlém zmrazení v glycerolu při teplotě -40 °C (Bhattacharyya a Banerjee, 2007). Kultura také může být hluboce zamrazena při teplotách mezi -80 °C a -135 °C, k uložení kultury je možné použít kapalný dusík při teplotě -196 °C nebo lyofilizaci (následně možné skladovat při teplotách 2–8 °C) (Bhattacharyya a Banerjee, 2007; Boekhout a Robert, 2003; Gherna, 2010). Aby se zabránilo poškození kultury tvorbou ledových krystalů během procesu zamrazování, jsou využívány kryoprotektivní látky (glycerol, dimethylsulfoxid, případně další), které jsou přidávány k suspenzi buněk (Bhattacharyya a Banerjee, 2007). Kryoprotektivní látky jsou pro buňky netoxické, může se jednat o látky dobře pronikající do buňky vážící buď elektrolyty, nebo molekuly vody, a tím zpomalující mrznutí (glycerol, dimethylsulfoxid), chránící buňky jak extracelulárně, tak intracelulárně. Dále je možné použít kryoprotektanty působící extracelulárně (například dextran, glukózu nebo polyglykol), jsou ovšem méně účinné než první skupina (Gherna, 2010).

K charakterizaci nových izolátů je možno využít komerčně dostupných souprav, zaměřených především na klinicky významné mikroorganismy. Tyto soupravy mají výhodu oproti běžné mikrobiální identifikaci v poměrně dlouhé skladovací době a malým nárokům na skladovací prostory. Není u nich třeba příprava velkého množství čerstvého média a chemikálií určených k testování. Soupravy mají snadné použití a velké databáze, jejich použití zajišťuje velkou přesnost a reprodukovatelnost. Nevýhodou je obtížná identifikace kultivačně náročných a pomalu rostoucích mikroorganismů, chybná identifikace může nastat u mikroorganismů, které nejsou zavedeny v databázi (Evangelista, Truant a Bourbeau, 2002).

K charakterizaci nových izolátů může být také využita metoda MALDI-TOF (Chovanec, Basu a Stolz, 2011). Využití hmotnostní spektrometrie k charakterizaci a identifikaci je studováno již více než 3 desetiletí, včetně metod jako plynová chromatografie/hmotnostní spektrometrie, pyrolýzní hmotnostní spektrometrie nebo kapalinová chromatografie/hmotnostní spektrometrie (Allen, Emery a Sider, 2002). MALDI je zkratka pro matricí asistovanou laserovou desorpci/ionizaci (matrix-assisted laser desorption/ionization), TOF je zkratka pro detektor doby letu (time-of-flight detector), který je řazen po MALDI (Dealy, Read a Larson, 2018). Při MALDI-TOF je vyhodnocováno hmotnostní spektrum, které je odvislé od profilu proteinů buňky. Tyto profily jsou unikátní pro každý druh mikroorganismu. Pro identifikaci touto metodou je třeba minimálně 10^3 – 10^6 buněk (Siegrist et al., 2015), MALDI-TOF je možné použít jako prostředek pro rychlou identifikaci mikroorganismů, včetně pomalu rostoucích a anaerobních mikroorganismů (Allen, Emery a Sider, 2002). Po kultivaci na agarové plotně je odebrána kolonie (buňky) nebo proteiny z nich extrahované. Extrakce je provedena suspendováním kolonie v 80% (obj. %) ethanolu a následnou dvouminutovou centrifugací. Pelet je následně resuspendován v 70% (obj. %) kyselině mravenčí a stejném objemu acetonitrilu a je znovu provedena centrifugace po dobu 2 minut. 1 μ l supernatantu je nanesen na speciální sklíčko a překryt nasyceným roztokem α -kyano-4-hydroxyskořicovou kyselinou (matrix) a ponechány zaschnout. Sklíčko je následně vloženo do MALDI přístroje, kde jsou zaschlé kapky ostřelovány laserem (impulzy 1–5 nanosekund). Matrix pohlcuje záření laseru, dochází tak k desorpci a ionizaci molekul vzorku, nesmí dojít k poničení proteinu (Dealy, Read a Larson, 2018). To má za následek odlet pozitivně nabitých proteinů k elektrodě. Od síly náboje a váhy molekuly se odvíjí rychlost letu molekul, ta je měřena detektorem doby letu a přepočítána na hmotu. Získaný profil je porovnán s databází referenčních spekter (Siegrist et al., 2015). Jako databázi je

možné uvést Systém integrovaného mikrobiálního genomu a mikrobiomu od Joint Genome Institute, který obsahuje informace o genomu 116 439 bakterií, 3190 archaeí a 1069 eukaryot (Chen et al., 2023). Pokud nejsou známy informace o genomu, může být hmotnostní spektrometrie využita v proteomice k identifikaci proteinů, kdy jsou získávány informace o enzymech zapojených v metabolických drahách (Chovanec, Basu a Stolz, 2011).

4.6 Disková difuzní metoda

Disková difuzní metoda je jednou z klasických mikrobiologických technik, která je stále rozšířeně využívána při stanovování antibiotické rezistence vzhledem k jejímu jednoduchému provedení, účinnosti a nízkým nákladům, jelikož disková difuzní metoda nevyžaduje speciální vybavení (Sandle, 2016). Disková difuzní metoda začíná přípravou suspenze z čerstvé kultury (18–24 hodin) kultivované na neselektivním médiu a bujónu nebo 0,9 hmot. % roztoku NaCl. Kultura je buď ponechána narůst po dobu 2–8 hodin do dané standardní hodnoty jednotky McFarlanda (zpravidla 0,5 McFarlanda), nebo je přímo připravena suspenze o dané hodnotě (Garcia, 2010). Následně je tato suspenze do 15 minut od získání její dané standardní hodnoty jednotky McFarlanda rozetřena na agarovou plotnu (z vhodného média o pokojové teplotě), je jí například MH agar (Müller-Hinton agar) (Sandle, 2016; Garcia, 2010).

Při diskové difuzní metodě jsou použity 6-ti milimetrové disky z filtračního papíru napuštěné antibiotiky o předem stanovených koncentracích. Tyto disky jsou následně poklady na povrch agaru v rozmezí 3–15 minut od inokulace agaru (Garcia, 2010; O'Bryan et al., 2015). Pro správnou difuzi antibiotika během diskové difuzní metody je důležité používané médium, síla agarové vrstvy a její vlhkost, podmínky inkubace, hustota suspenze a umístění disků do kontaktu s agarem. Měly by být využívány disky pocházející od výrobce schopného zaručit plnou kontrolu jejich kvality, aby byla zajištěna reprodukovatelnost a spolehlivost (Sandle, 2016). Antibiotikum difunduje z disku do agaru, koncentrace antibiotika je nejvyšší v těsném okolí disku, s narůstající vzdáleností od disku se koncentrace antibiotika snižuje. Je-li bakterie citlivá k jisté koncentraci antibiotika, nedojde k nárůstu v oblastech s touto a vyšší koncentrací antibiotika. Dojde tak k vytvoření inhibiční zóny (O'Bryan et al., 2015). Po inkubaci jsou změřeny inhibiční zóny kolem disků k nejbližšímu milimetru (Sandle, 2016). Dle velikosti inhibiční zón je vyhodnocena efektivita působení antibiotika na základě referenčních tabulek, zda se jedná o

mikroorganismus k antibiotiku citlivý, přechodně citlivý nebo rezistentní. (Garcia, 2010; O'Bryan et al., 2015).

II. PRAKTICKÁ ČÁST

5 CÍL PRÁCE

Hlavním cílem diplomové práce bylo provést skríníng výskytu antibiotické rezistence u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, které byly izolovány z vodní drůbeže (kachního masa, chladičí vody z porážky a peří živých zvířat) a z prostředí jejich chovu, konkrétně napájecí vody. Pro splnění tohoto hlavního cíle bylo třeba splnit tyto dílčí cíle: v rámci teoretické části práce provést literární rešerši týkající se charakteristiky a chovu kachen a hus, jejich porážky, dále pak antibiotické rezistence, jejich příčin a mechanismů vzniku a antibiotické rezistence u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. V rámci praktické části práce byly plněny tyto dílčí cíle: odebrání a převoz vzorků, jejich mikrobiologický rozbor, izolace enterobakterií, získání jejich čisté kultury a jejich identifikace pomocí MALDI-TOF a ENTEROTestu 24 N. Dále byl zjišťován profil rezistence izolátů ke dvaceti vybraným antibiotikům při diskové difuzní metodě.

6 METODIKA

V této kapitole jsou popsány jednotlivé postupy praktické části diplomové práce, konkrétně získání a přeprava vzorků, kultivace a izolace bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a skríníng antibiotické rezistence za použití diskové difuzní metody.

6.1 Původ vzorků, jejich odběr a přeprava

Zdrojem vzorků byl rodinný malochoch na Pardubicku s počtem chované vodní drůbeže přibližně 80-ti kusů. Vzorky byly odebírány z kachny pižmové, v hospodářství jsou dále chovány husy domácí, indičtí běžci, kachny ruánské a kur domácí.

Vzorky byly odebrány z poražených zvířat, chladicí vody z porážky, napájecí vody, která je zvířatům k dispozici, a z peří živých zvířat.

6.1.1 Chov v hospodářství poskytujícím vzorky

Kachna pižmová je chována v hejnech o počtu 10-20 kusů. Jsou chovány ve volném výběhu s přístupem k pastvě. Kachny jsou zároveň krmeny pšenicí (suchou či vařenou, popřípadě pšeničným šrotem), kukuřičným šrotem, vařenými bramborami nebo namočeným pečivem.

Přístup k vodě je řešen v podobě napájecích bazénků, ve kterých je voda pravidelně obměňována z vodovodního řadu. Bazénky jsou čištěny pouze mechanicky vydrhnutím a oplachem vodou z vodovodního řadu každý den, popřípadě každý druhý den, dle momentálního znečištění. Na noc jsou kachny zaháněny do hospodářské budovy, kde je jako podestýlka využívána řezaná sláma.

K vzorkování byla použita zvířata 10 měsíců stará, nebyla nikdy ošetřována antibiotiky nebo přípravky, které by antibiotika obsahovaly. Antibiotika byla v chovu naposledy použita v květnu roku 2019 k léčení respiračního onemocnění v chovu v rámci rodičovské linie, bylo použit přípravek Doxygal. Léčivou látkou přípravku je 50 mg Doxycylini hylas, což odpovídá 43,35 mg antibiotika doxycyklinu.

6.1.2 Porážka v hospodářství poskytujícím vzorky

Kachna pižmová určená k porážce je naposledy krmena 24 hodin před porážkou, přístup k vodě je jim zachován. Kachny jsou na porážku převáženy v přepravkách určených pro přepravu drůbeže, porážka neprobíhá v malochovu, opracovaná a zchlazená těla jsou následně přepravena zpět.

Po příjezdu na porážku jsou kachny mechanicky omráčeny, jsou vloženy so trychtýře na vykrvování a zaříznuty řezem na temeni tak, aby došlo k přerušení tepen v krku. Kachny se nechají vykrvit, následně je oddělena hlava.

Těla jsou vložena do kotle s pitnou vodou o teplotě v rozmezí 63-65 °C na 2 minuty, kde se spaří. Následně jsou vložena do bubnové škubačky, kde jsou zbavena horní vrstvy peří. Spaření a škubání se následně znovu opakuje, aby došlo k odstranění i vrstvy prachového peří.

Očištěná těla jsou vykuchána. Proveďte se řez od hrudní kosti směrem ke kloace, kterým se otevře dutina břišní. Jsou vyjmuty vnitřnosti a vyříznuta kloaka. Krk je rozříznut, řezem je vytaženo vole, jícen a hrtan. Z jater je vyříznut žlučník a žlučovody, žaludek je rozříznut, vyčištěn a zbaven vnitřní sliznice, je vyříznuto srdce. Játra, srdce a žaludek jsou zchlazeny v studené pitné vodě. Jsou odříznuty běháky a vykuchané kachny jsou důkladně opláchnuty proudem studené pitné vody. Opracovaná těla jsou následně uložena do vany naplněné studenou vodou pro důkladné zchlazení na 2–4 hodiny, následně jsou zamrazena.

6.1.3 Odběr vzorků v hospodářství

Vzorky masa poražených zvířat

Vzorky byly odebrány z 10 opracovaných kusů kachen těsně před jejich uložením do mrazničky. Z každého kusu byl odebrán jeden vzorek. Vzorek byl odebírána z prsního svalu kachny v celém průřezu od kůže až po dutinu hrudní, dále pak ze stehna kachny v průřezu od kůže po stehenní kost. U každého vzorku bylo celkem odebráno 100 g materiálu (masa) asepticky v rukavicích u lihového kahanu za použití nerezového nože a vidličky, které byly po umytí namočený v etanolu a těsně před použitím opáleny nad plamenem. Vzorky byly ukládány do plastových sáčků určených k zamražení. Každý vzorek byl řádně označen.

Vzorky chladicí vody při porážce zvířat

Vzorky byly odebrány z různých částí vany s chladicí vodou při porážce, celkem bylo asepticky odebráno 5 vzorků chladicí vody v rukavicích za použití lihového kahanu a nerezové naběračky, která byla po umytí namočená v etanolu a těsně před odběrem opálena nad plamenem. U každého vzorku bylo celkem odebráno 250 g materiálu (chladicí vody), vzorky byly ukládány do plastových sáčků určených k zamražení. Každý vzorek byl řádně označen.

Vzorky napájecí vody

Vzorky byly odebrány z napájecích bazénků, celkem byl odebráno 5 vzorků, každý z jiného bazénku. Vzorek byl nabrán z různých částí bazénku včetně sedimentu v rukavicích za použití lihového kahanu a nerezové naběračky, která byla po umytí namočená v etanolu a těsně před odběrem opálána nad plamenem. U každého vzorku bylo celkem odebráno 250 g materiálu (napájecí vody a sedimentu), vzorky byly ukládány do plastových sáčků určených k zamražení. Každý vzorek byl řádně označen.

Stěry z peří

Vzorky byly odebrány z 10 kusů živých kachen, vzorky byly odebrány v rukavicích pomocí sterilní gázy. Jeden stěr byl proveden vždy z jednoho zvířete. Sterilní gáza byla navlhčena destilovanou vodou, znehybněné kachně byl proveden stěr z břicha a okolí kloaky. Gáza byla následně uložena do plastových sáčků určených k zamražení. Každý vzorek byl řádně označen.

6.1.4 Záznam průběhu přepravy vzorků

Vzorky masa poražených zvířat a vzorky chladicí vody při porážce zvířat byly odebrány 29.7.2022. Vzorky byly následně zamrazeny a uchovány při teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu jedenácti dní, z důvodu nemožnosti okamžité přepravy do laboratoře. V den přepravy byly vzorky uloženy do mrazícího boxu s chladicími vložkami a přepraveny do laboratoře. Teplota vzorků při uzavření boxu byla $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dodání do laboratoře byla teplota $2\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba přepravy byla 5 hodin. Vzorky byly následně uloženy do mrazáku o teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 24 hodin, následně byly vzorky masa přeneseny do lednice ($11\text{ }^{\circ}\text{C}$) k rozmrazení na dobu 24 hodin, následně byly zpracovány. Chladicí voda byla ponechána k rozmrazení v lednici ($11\text{ }^{\circ}\text{C}$) po dobu 48 hodin, následně byla zpracována.

Vzorky napájecí vody a stěry peří byly odebrány 10.7.2022. Vzorky byly následně zchlazeny na teplotu $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ po dobu 9 hodin, uloženy do chladicího boxu s chladicími vložkami a přepraveny do laboratoře. Teplota vzorků při uzavření boxu byla $8\text{ }^{\circ}\text{C}$, po dodání do laboratoře byla teplota $12\text{ }^{\circ}\text{C}$. Doba přepravy byla 5 hodin. Vzorky byly následně uloženy do mrazáku o teplotě $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 24 hodin, následně byly vzorky napájecí vody přeneseny do lednice ($11\text{ }^{\circ}\text{C}$) k rozmrazení na dobu 48 hodin, následně byly zpracovány. Stěry peří byly přeloženy do termostatu o teplotě $55\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 2 hodiny, následně byly zpracovány.

6.2 Mikrobiologický rozbor

Prováděný mikrobiologický rozbor byl zaměřen na zjištění celkového počtu fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů, přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a koliformních bakterií v jednotlivých vzorcích. Nárůst byl vypočten dle vzorce:

$$\text{CFU}/g, ml = \frac{\Sigma C}{V \cdot (n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

Kde:

ΣC je součet kolonií všech agarových ploten vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředění,

V je objem očkovaného inokula na plotnu v ml,

n_1 je počet ploten vybraných k nižšího zvoleného ředění,

n_2 je počet ploten vybraných k výpočtu z vyššího zvoleného ředění,

d je ředící faktor nižšího pro výpočet zvoleného ředění (Tylšová, Hásková a Bursová, 2017).

6.2.1 Celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů

Určení celkového počtu fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů bylo provedeno na Plate count agaru. Plate count agar byl připraven z práškového média od společnosti HiMedia Laboratories (Plate Count Agar M091), kdy ve 400 ml destilované vody bylo rozpuštěno 7 g práškového média. Suspenze byla protřepána a sterilizována v autoklávu 15 minut při 121 °C. Po vychladnutí na manipulovatelnou teplotu (45–50 °C) bylo médium rozlito do připravených plastových Petriho misek o průměru 90 mm od společnosti GAMA. Rozlití bylo provedeno v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI.

U vzorků masa bylo připraveno ředění 10^{-1} odvážením 5 g vzorku a 45 g fyziologického roztoku, směs byla 5 minut homogenizována. Pro určení celkového počtu mikroorganismů byla připravena ředění 10^{-3} , 10^{-4} . Byla ředěna vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Plate count agarem bylo očkováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

U stěrů peří bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 5 ml fyziologického roztoku do sáčku obsahujícího gázu, kterou byl stěr proveden, směs byla 5 minut homogenizována. Pro určení celkového počtu mikroorganismů byla připravena ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Byla ředěna vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Plate count agarem bylo inokulováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

U chladicí vody bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 500 μ l promíchaného vzorku do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Následující ředění (10^{-2} , 10^{-3}) byla připravena vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Plate count agarem bylo očkováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

U napájecí vody bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 500 μ l promíchaného vzorku do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Pro určení celkového počtu mikroorganismů byla připravena ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Byla ředěna vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Plate count agarem bylo očkováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 30 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

6.2.2 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Izolace bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* byla provedena na Endo agaru. Endo agar byl připraven z práškového média od společnosti HiMedia Laboratories (Endo Agar M029), kdy ve 400 ml destilované vody bylo rozpuštěno 16,6 g práškového média. Suspense byla protřepána a sterilizována v autoklávu 15 minut při 121 °C. Po vychladnutí na manipulovatelnou teplotu (45–50 °C) bylo médium rozlito do připravených plastových Petriho misek o průměru 90 mm od společnosti GAMA. Rozliti bylo provedeno v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI.

U vzorků masa bylo připraveno ředění 10^{-1} odvážením 5 g vzorku a 45 g fyziologického roztoku, směs byla 5 minut homogenizována. Následující ředění (10^{-2} , 10^{-3}) byla připravena vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Endo agarem bylo inokulováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

U stěrů peří bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 5 ml fyziologického roztoku do sáčku obsahujícího gázu, kterou byl stěr proveden, směs byla 5 minut homogenizována. Následující ředění (10^{-2} , 10^{-3}) byla připravena vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Endo agarem bylo očkováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

U chladicí vody bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 500 μ l promíchaného vzorku do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Následující ředění (10^{-2} , 10^{-3}) byla připravena vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Endo agarem bylo inokulováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

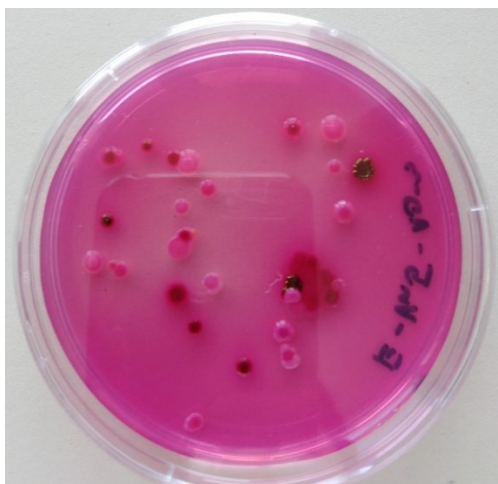
U napájecí vody bylo připraveno ředění 10^{-1} pipetováním 500 μ l promíchaného vzorku do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Pro izolaci čeledi *Enterobacteriaceae* byla připravena ředění 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} . Byla ředěna vždy tak, že bylo z předcházejícího ředění pipetováno 500 μ l do uzavíratelné zkumavky se 4,5 ml fyziologického roztoku. Na Petriho misky s Endo agarem bylo pipetováno 100 μ l příslušného ředění, suspenze byla rozetřena vyžíhanou skleněnou hokejkou. Misky byly dány inkubovat do termostatu o teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly přendány do lednice a uchovány o teplotě 11 °C.

6.3 Skríníng antibiotické rezistence izolovaných enterobakterií

Pro provedení skríníngu antibiotické rezistence bylo nutné získat čisté kultury bakterií, které narostly na Endo agaru. Toho bylo docíleno pomocí křížových roztěrů s následnou mikroskopickou kontrolou čistoty při Gramově barvení.

6.3.1 Získání čisté kultury křížovým roztěrem

Z každého vzorku bylo vybráno jedno ředění očkované na Endo agar (očekávaná čeleď *Enterobacteriaceae*, Obrázek 4), z tohoto ředění bylo křížovým roztěrem přeočkováno 5 různých kolonií. Celkem tak bylo získáno 150 izolátů.

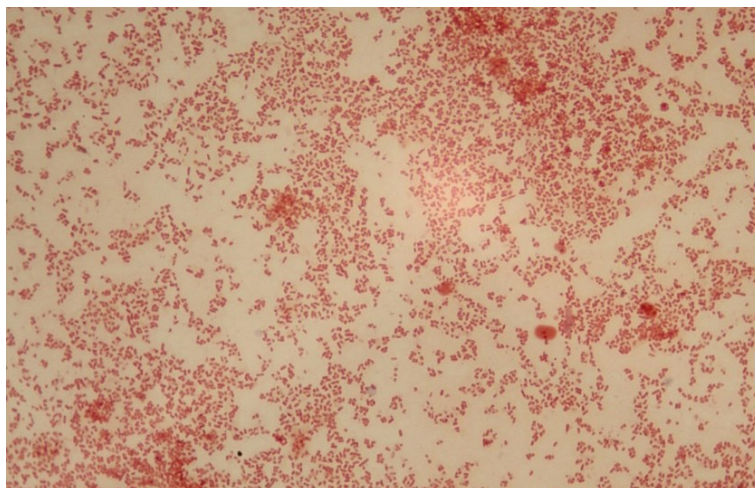


Obrázek 4 Příklad Endo agaru s nárůstem kolonií před jejich odebráním (foto autora)

Křížový roztěr byl prováděn v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI za pomoci kovových kliček vyžíhaných nad kahanem. Pro roztěr byla použita půda Plate count agar (HiMedia Laboratories, Plate Count Agar M091). Misky s křížovými roztěry byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24–72 hodin v závislosti na nárůstu na jednotlivých miskách. Misky byly následně uloženy do lednice a skladovány při teplotě 11 °C.

Kontrola čistoty provedeného křížového roztěru byla uskutečněna mikroskopicky za použití Gramova barvení. Gramovo barvení bylo provedeno tak, že na čisté podložní sklíčko byla asepticky vyžíhanou kličkou přenesena kolonie bakterie z daného křížového roztěru do 30 μ l sterilního fyziologického roztoku. Kolonie byla kličkou rozetřena po sklíčku a ponechána uschnout, následně byl preparát fixován plamenem. Preparát byl převrstven krystalovou violetí, která byla ponechána působit 60 sekund a následně slita a převrstvena Lugolovým roztokem, opět po dobu 60 sekund. Preparát byl následně opláchnut

destilovanou vodou, omyt acetonem (s maximální délkou omývání 20 sekund) a znovu opláchnut destilovanou vodou. Preparát byl následně převrstven safraninem po dobu 60 sekund a opět opláchnut destilovanou vodou. Preparát byl ponechán uschnout. Následně bylo provedeno mikroskopování imerzním objektivem (celkové zvětšení mikroskopu 1000x – zvětšení objektivu 100x, zvětšení okuláru 10x) a pořízen snímek preparátu pomocí digitálního fotoaparátu a počítačového programu QuickPHOTO MICRO (Obrázek 5).



Obrázek 5 Příklad preparátu při kontrole čistoty za použití Gramova barvení (foto autora)

U kultur, které nebyly čisté, nebyly jednoznačné nebo vykazovaly odchylky od očekávání byly provedeny nové křížové roztěry. Opět byla použita půda Plate count agar (HiMedia Laboratories, Plate Count Agar M091). Křížový roztěr byl prováděn v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI za pomoci kovových kliček vyžíhaných na kahanem. Misky s křížovými roztěry byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24–48 hodin v závislosti na nárůstu na jednotlivých miskách. Misky byly následně uloženy do lednice a skladovány při teplotě 11 °C. Následně byla opět provedena kontrola čistoty (mikroskopicky, Gramovo barvení).

U kultur, které stále nebyly čisté, byl proveden křížový roztěr znovu. Ke třetímu roztěru byla použity půdy Endo agar (HiMedia Laboratories, Endo Agar M029) a VRBA (Violet Red Bile Agar) v závislosti na momentálně dostupných plotnách s půdou v laboratoři. VRBA byl připraven z práškového média od společnosti HiMedia Laboratories (Violet Red Bile Agar M049-500G), kdy ve 400 ml destilované vody bylo rozpuštěno 16,6 g práškového média. Suspenze byla protřepána a zahřívána do rozpuštění média za občasného míchání. Po vychladnutí na manipulovatelnou teplotu (45–50 °C) bylo médium rozlito do připravených plastových Petriho misek o průměru 90 mm od společnosti GAMA. Rozliti bylo provedeno

v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI. Křížový roztěr byl prováděn v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI za pomoci kovových kliček vyžíhaných na kahanem. Misky s křížovými roztěry byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24–48 hodin v závislosti na nárůstu na jednotlivých miskách. Misky byly následně uloženy do lednice a skladovány při teplotě 11 °C. Následně byla opět provedena kontrola čistoty (mikroskopicky, Gramovo barvení).

Vzhledem k rozšířenému výskytu dlouhých vláknitých tyčinek v některých roztěrech bylo třeba tyto roztěry vyřadit a provést nový roztěr z původních misek očkovaných na Endo agar (ředění vzorku). Postup roztěru a izolace byl stejný jako u prvního odběru. Pokud byl obsah dlouhých vláknitých tyčinek malý, byl proveden čtvrtý roztěr, kdy byla použita půda VRBA (HiMedia Laboratories, Violet Red Bile Agar M049-500G). Křížový roztěr byl prováděn v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI za pomoci kovových kliček vyžíhaných na kahanem. Misky s křížovými roztěry byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24–72 hodin v závislosti na nárůstu na jednotlivých miskách. Misky byly následně uloženy do lednice a skladovány při teplotě 11 °C. Následně byla opět provedena kontrola čistoty (mikroskopicky, Gramovo barvení).

6.3.2 Identifikace izolovaných kultur bakterií

Po získání čisté kultury byly všechny vzorky znovu přeočkovány na plastové Petriho misky o průměru 60 mm od společnosti GAMA obsahující Plate count agar (HiMedia Laboratories, Plate Count Agar M091). Očkování bylo provedeno pomocí křížového roztěru, který byl prováděn v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI za pomoci kovových kliček vyžíhaných na kahanem. Misky s křížovými roztěry byly inkubovány v termostatu při 37 °C po dobu 24–72 hodin v závislosti na nárůstu na jednotlivých miskách. Od každé čisté kultury byly připraveny 2 misky. Jedna miska od každého izolátu byla po inkubaci uložena do lednice a skladována při teplotě 11 °C. Od každého izolátu byly připraveny 3 mikrozkušavky Eppendorf obsahující hustou suspenzi bakteriálních buněk ve 100% (obj %) glycerolu (určeny k uskladnění zamražením) a 2 mikrozkušavky Eppendorf obsahující suspenzi bakteriálních buněk v 450 µl 96% (obj. %) etanolu a 150 µl sterilní destilované vody (určeny po identifikaci pomocí MALDI-TOF). Mikrozkušavky určené k uskladnění zamražením byly uloženy do mrazáku při teplotě -80 °C. Mikrozkušavky určené identifikaci pomocí MALDI-TOF byly zamraženy a uchovány při teplotě -18 °C. Mikrozkušavky určené pro identifikaci pomocí MALDI-TOF byly následně odeslány na

Slovenskou poľnohospodárskou univerzitou v Nitre, kde samotná identifikace proběhla ve Výskumném centru AgroBioTech ve spolupráci s prof. Ing. Kačániovou, PhD. Data byla následně odeslána zpět ke zpracování, kdy byly vyčleněny identifikované izoláty čeledi *Enterobacteriaceae*.

U vybraných nejednoznačně identifikovaných izolátů byla provedena další identifikace pomocí ENTEROTestu 24 N od výrobce Erba Lachema s.r.o., kdy byla připravena čerstvá kultura křížovým roztěrem na Plate count agaru (HiMedia Laboratories, Plate Count Agar M091), která se nechala 24 hodin kultivovat při 37 °C. Následně byla v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI připravena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku o hustotě 1 stupně McFarlanda, hustota byla kontrolována na přístroji Densi-La-Meter od společnosti Erba Lachema s.r.o. Suspenze byla homogenizována na přístroji Vortex mixer od společnosti Labnet International. V mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI byla souprava na ENTEROTest 24 N vyjmuta z hliníkového obalu, byla sejmuta krycí hliníková fólie a do příslušných jamek (celkem 24) inokulováno 100 µl homogenizované suspenze. Jamky D až H v 1. řadě byly zakápnuty 2 kapkami sterilního parafínového oleje, po ukončení inokulace byla destička vložena do sáčku, aby se zabránilo vyschnutí a byla inkubována při 37 °C po dobu 24 hodin. Poté byly odečteny výsledky dle přiloženého barevného schématu a následně identifikovány v programu TNW ProAuto 7.0. Zároveň byla na Slovenské poľnohospodárskej univerzite v Nitre provedena další identifikace pomocí MALDI-TOF, při zpracování dat byly vyčleněny identifikované izoláty čeledi *Enterobacteriaceae*.

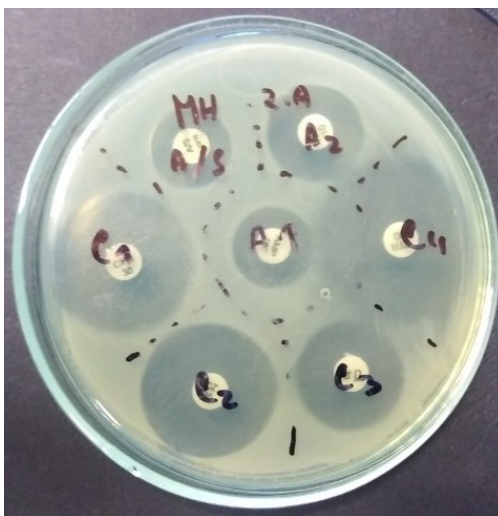
6.3.3 Zjištění antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou

Byla připravena čerstvá kultura izolátů křížovým roztěrem na Plate count agaru (HiMedia Laboratories, Plate Count Agar M091), která se nechala 24 hodin kultivovat při 37 °C. Následně byla v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI připravena suspenze buněk ve fyziologickém roztoku o hustotě 0,5 dle McFarlandovy stupnice, hustota byla kontrolována na přístroji Densi-La-Meter od společnosti Erba Lachema s.r.o. Suspenze byla homogenizována na přístroji Vortex mixer od společnosti Labnet International.

Byla připravena půda MH agar, a to za použití práškových Müller-Hinton Broth (M391-500G) a Agar Agar, Type I (GRM666-500G) od společnosti HiMedia Laboratories, kdy bylo odváženo a v 500 ml destilované vody rozpuštěno 10,5 g práškového média HM Broth a 7,5 g agaru. Suspenze byla protřepána a sterilizována v autoklávu 15 minut při 121 °C. Po

vychladnutí na manipulovatelnou teplotu (45–50 °C) bylo médium rozlito do připravených plastových Petriho misek o průměru 90 mm od společnosti GAMA. Rozliti bylo taktéž provedeno v mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI.

V mikrobiologickém laminárním boxu od společnosti MERCI bylo vždy 1 ml homogenizované suspenze bakterií očkováno na 1 misku s MH agarem, suspenze byla pohybem misky rozvrstvena po celé ploše MH agaru a ponechána zaschnout. Následně byly na misku položeny papírové disky napuštěné antibiotiky (HiMedia Laboratories), u 1 izolátu byla vždy zjišťována rezistence k 20 antibiotikům náležících do 10 tříd (Tabulka 1). V izolátech získaných z masa bylo použito antibiotikum ampicilin (s výjimkou izolátů z druhé identifikace MALDI-TOF, u nich použit piperacilin-tazobaktam), u izolátů u ostatních vzorků bylo použito antibiotikum piperacilin-tazobaktam. Po umístění disků byly misky kultivovány dnem vzhůru při 37 °C po dobu 24 hodin. Následně byly proti černému pozadí (Obrázek 6) pomocí pravítka odečteny průměry inhibičních zón kolem disků, byly-li přítomny.



Obrázek 6 Příklad nárůstu při diskové difuzní metodě (foto autora)

Tabulka 1 Antibiotika použita při diskové difuzní metodě

| Název antibiotika | Kód antibiotika u výrobce | Obsah antibiotika v disku | Hodnoty pro inhibiční zóny [mm] |
|---------------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| Třída: Peniciliny | | | |
| Ampicilin | SD002 | 10 µg | $S \geq 17, R \leq 13^1$ |
| Piperacilin-tazobaktam | SD210 | 100 µg /10 µg | $S \geq 21, R \leq 17^1$ |
| Ampicilin/sulbaktam | SD112 | 10 µg /10 µg | $S \geq 15, R \leq 11^1$ |
| Amoxicilin | SD001 | 10 µg | $S \geq 18, R \leq 13^{1,2}$ |
| Třída: Cefalosporiny | | | |
| Cefuroxim | SD061 | 30 µg | $S \geq 18, R \leq 14^1$ |
| Cefazolin | SD047 | 30 µg | $S \geq 23, R \leq 19^1$ |
| Cefoxitin | SD041 | 30 µg | $S \geq 18, R \leq 14^1$ |
| Ceftriaxon | SD065 | 30 µg | $S \geq 23, R \leq 19^1$ |
| Cefalotin | SD050 | 30 µg | $S \geq 18, R \leq 14^3$ |
| Ceftazidim | SD062 | 30 µg | $S \geq 21, R \leq 17^1$ |
| Třída: Aminoglykosidy | | | |
| Amikacin | SD035 | 30 µg | $S \geq 17, R \leq 14^1$ |
| Gentamicin | SD195 | 120 µg | $S \geq 15, R \leq 12^1$ |
| Třída: Chinolony | | | |
| Ciprofloxacin | SD060 | 5 µg | $S \geq 26, R \leq 21^1$ |
| Levofloxacin | SD216 | 5 µg | $S \geq 21, R \leq 16^1$ |
| Třída: Karbapenemy | | | |
| Imipenem | SD073 | 10 µg | $S \geq 23, R \leq 19^1$ |
| Třída: Tetracykliny | | | |
| Tetracyklin | SD133 | 10 µg | $S \geq 15, R \leq 11^1$ |
| Doxycyclinehydrochlorid | SD012 | 30 µg | $S \geq 14, R \leq 10^1$ |
| Třída: Linkosamidy | | | |
| Klindamycin | SD051 | 2 µg | $S \geq 17^4$ |
| Třída: Makrolidy | | | |
| Azithromycin | SD204 | 15 µg | $S \geq 13, R \leq 12^1$ |
| Třída: Amfenikoly | | | |
| Chloramfenikol | SD006 | 30 µg | $S \geq 18, R \leq 12^1$ |
| Třída: Polypepidová antibiotika | | | |
| Kolistin | SD009 | 10 µg | $S \geq 11^5$ |

Pozn: S – citlivost, R – rezistence

Horní index (zdroje hodnot): 1 – (Anonym, 2019), 2 – (Reynolds, 2021),

3 – (Anonym, 2022), 4 – (Card et al., 2015; Callihan a Nolte, 1985),

5 – (Uwizeyimana et al., 2020)

7 VYHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUZE

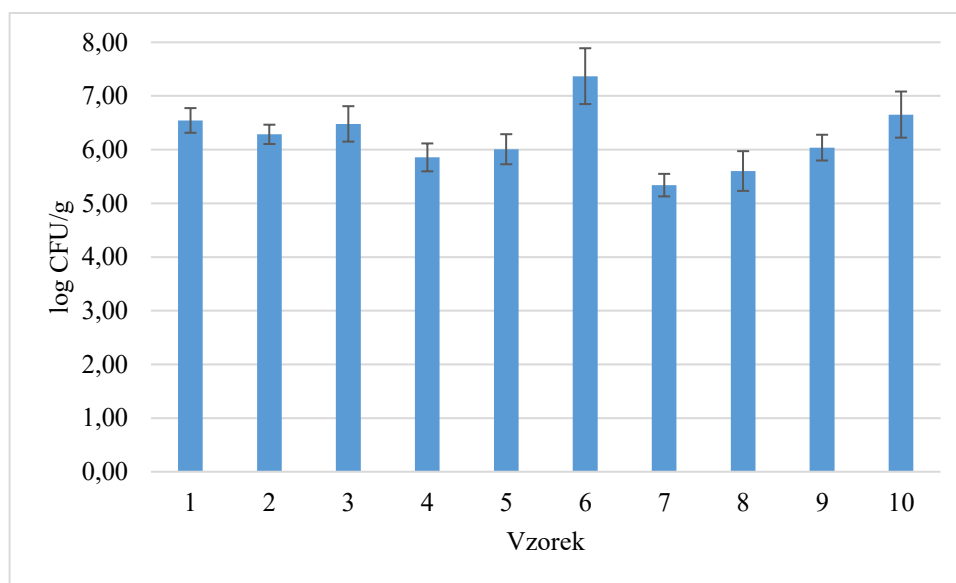
V této kapitole jsou okomentovány výsledky získané při mikrobiologickém rozboru vzorků, izolaci a identifikaci bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a skrínungu antibiotické rezistence za použití diskové difuzní metody.

7.1 Mikrobiologický rozbor

Mikrobiologický rozbor byl zaměřen na zjištění celkového počtu fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů v jednotlivých vzorcích a přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, potažmo koliformních bakterií.

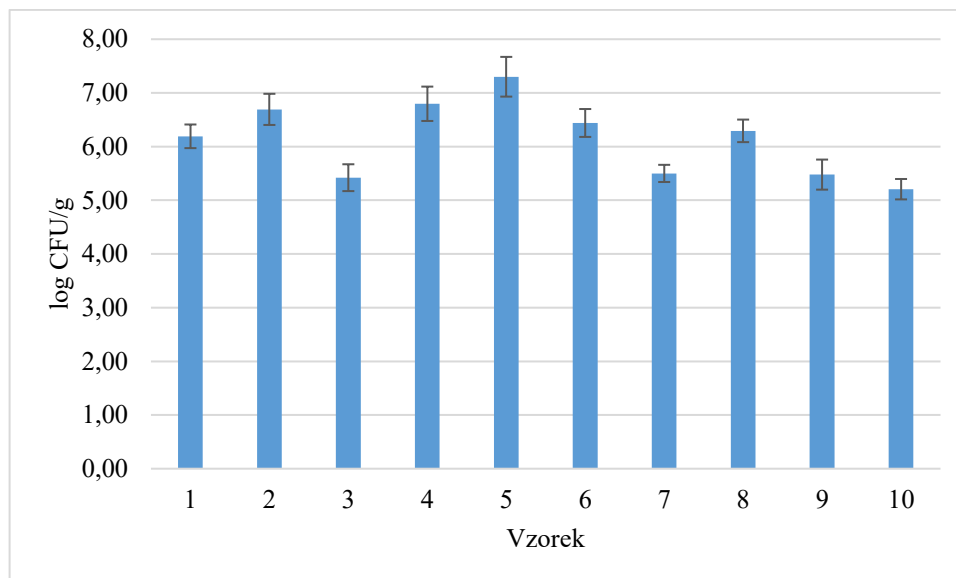
7.1.1 Celkový počet fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů

V rámci mikrobiologického rozboru bylo provedeno stanovení celkového počtu fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů z jednotlivých vzorků aerobní kultivací na Plate count agaru.



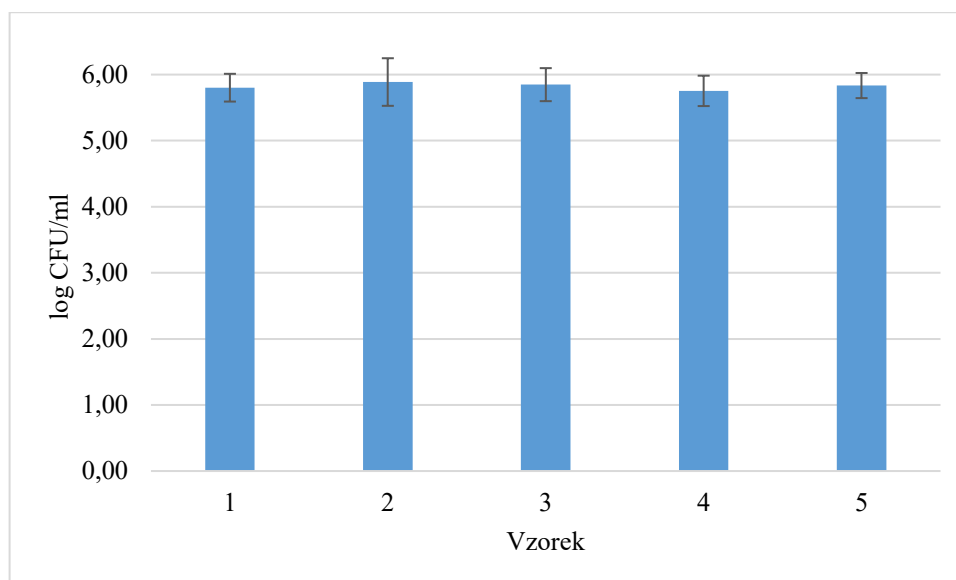
Obrázek 7 Celkový počet mikroorganismů u vzorků kachního masa

Celkový počet mikroorganismů byl u kachního masa (Obrázek 7) nejnižší u vzorků 4, 7 a 8, kdy se pohyboval mezi $(5,34 \pm 0,21)$ a $(5,86 \pm 0,26)$ log CFU/g vzorku. U vzorku 6 byl nárůst nejvyšší a představoval $(7,37 \pm 0,52)$ log CFU/g vzorku. U zbylých 6 vzorků se nárůst pohyboval mezi $(6,01 \pm 0,28)$ a $(6,65 \pm 0,43)$ log CFU/g vzorku.



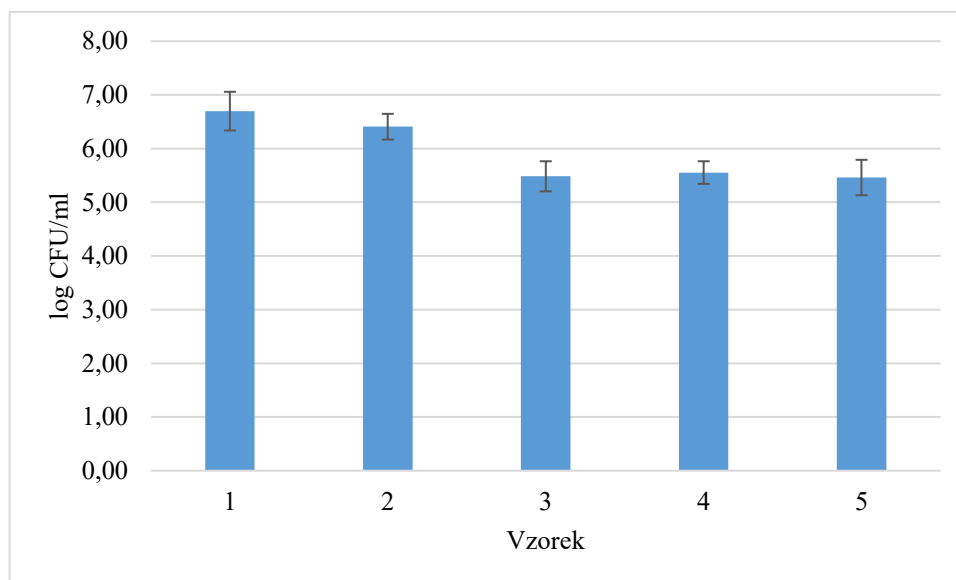
Obrázek 8 Celkový počet mikroorganismů u stěrů z peří

Celkový počet mikroorganismů získaný ze stěrů peří (Obrázek 8) byl nejnižší u vzorků 3, 7, 9 a 10, kdy se pohyboval mezi $(5,21 \pm 0,19)$ a $(5,50 \pm 0,16)$ log CFU/g vzorku. U vzorku 5 byl nárůst nejvyšší a představoval $(7,30 \pm 0,37)$ log CFU/g vzorku. U zbylých 5 vzorků se nárůst pohyboval mezi $(6,19 \pm 0,22)$ a $(6,80 \pm 0,32)$ log CFU/g vzorku.



Obrázek 9 Celkový počet mikroorganismů u vzorků chladicí vody

Celkový počet mikroorganismů stanovený u vzorků chladicí vody (Obrázek 9) byl vyrovnaný, a to mezi $(5,75 \pm 0,23)$ a $(5,89 \pm 0,36)$ log CFU/ml vzorku. Nárůst byl nejnižší u vzorku 4 $(5,75 \pm 0,23)$ log CFU/ml) a nejvyšší pak u vzorku 2 $(5,89 \pm 0,36)$ log CFU/ml).



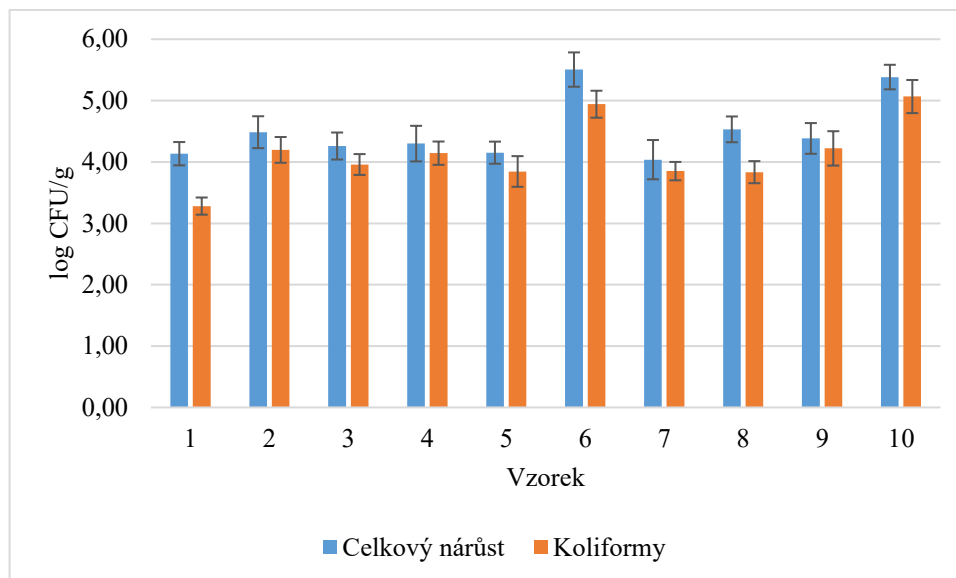
Obrázek 10 Celkový počet mikroorganismů u vzorků napájecí vody

Celkový počet mikroorganismů stanovený u vzorků napájecí vody (Obrázek 10) byl vyrovnaný u vzorků 3–5, a to mezi $(5,48 \pm 0,28)$ a $(5,55 \pm 0,21)$ log CFU/ml vzorku. Nárůst byl vyšší u vzorků 1 a 2, u vzorku 1 se jednalo o $(6,70 \pm 0,36)$ log CFU/ml a u vzorku 2 o $(6,41 \pm 0,24)$ log CFU/ml.

Celkový počet mikroorganismů není u masa (vyjma mletých mas, u kterých je povolena přítomnost nejvýše $5 \cdot 10^6$ CFU/g ($6,7$ log CFU/g) u 2 z 5 vzorků, jinak je povoleno $5 \cdot 10^5$ CFU/g ($5,7$ log CFU/g)) uveden ani v jedné z norem: ČSN 56 9609 a nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 (Anonym2, 2008; Anonym, 2005). Z výsledků stanovení celkových počtů fakultativně anaerobních mezofilních mikroorganismů u vzorků kachního masa a stěrů z peří stanovených v rámci této práce byla patrná spojitost mezi touto hodnotou a hodnotou počtu kolonií získaných při kultivaci na Endo agaru. Limitace metody počítání kolonie spočívá v předpokladu, že jedna bakteriální buňka vytvoří jednu kolonii. Schopnost buňky vytvořit kolonii makroskopických rozměrů závisí na mnoha faktorech (fyziologický stav buňky, médium použité ke kultivaci nebo teplota inkubace) (Matthews, Kniel a Montville, 2017).

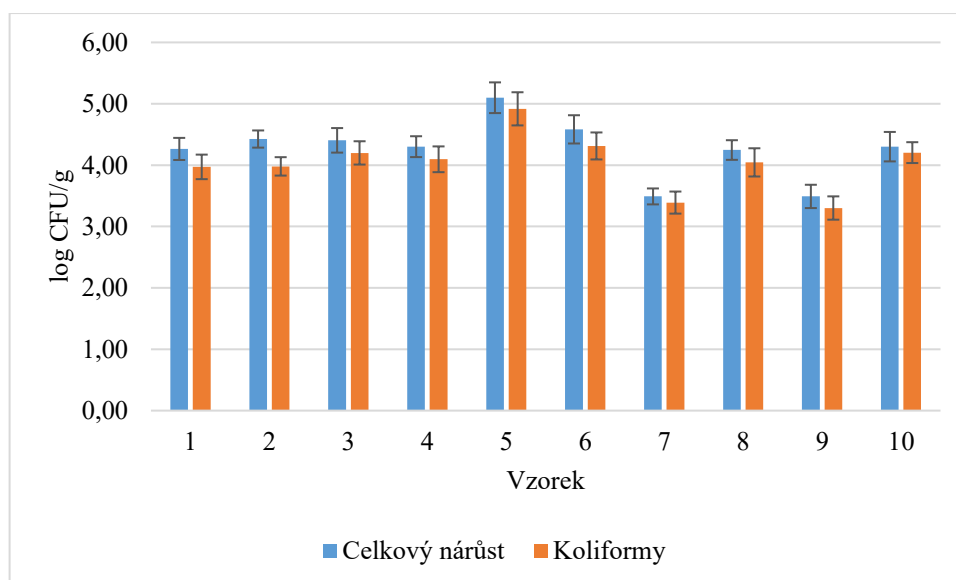
7.1.2 Čeleď *Enterobacteriaceae*

Byla zjišťována přítomnost bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* ve vzorcích, ovšem vzhledem k možnosti nárůstu jiných gramnegativních bakterií na Endo agaru (za předpokladu hodnocení pouze nárůstu), byly výsledky vyhodnocovány jako celkový nárůst kolonií na Endo agaru. Z této hodnoty byly vyčleněny kolonie vykazující barevnou reakci typickou pro koliformní bakterie (růžovofialové kolonie, u *E. coli* s metalickým leskem).



Obrázek 11 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků kachního masa

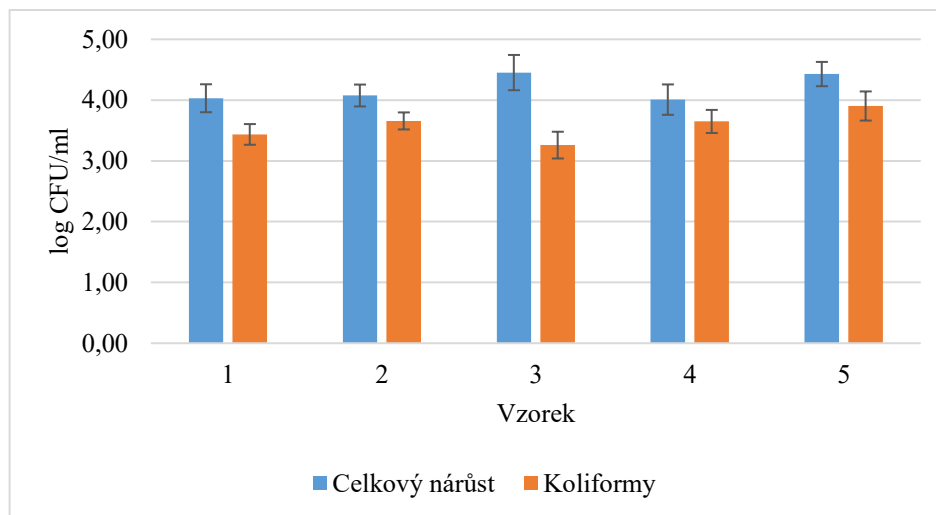
Celkový nárůst na Endo agaru ze vzorků kachního masa (Obrázek 11) se u 8 z 10 vzorků pohyboval mezi $(4,04 \pm 0,32)$ a $(4,53 \pm 0,21)$ log CFU/g vzorku. U vzorků 6 a 10 byly zjištěné výsledky vyšší, u vzorku 6 se jednalo o $(5,51 \pm 0,28)$ log CFU/g a u vzorku 10 o $(5,38 \pm 0,20)$ log CFU/g. Zastoupení koliformních bakterií bylo nejnižší u vzorku 1, kdy se jednalo o 79,3 % z celkového nárůstu na Endo agaru. Nejvyšší zastoupení koliformních bakterií z celkového nárůstu bylo zaznamenáno u vzorků 4 (96,4 %) a 9 (96,3 %).



Obrázek 12 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u stěrů z peří

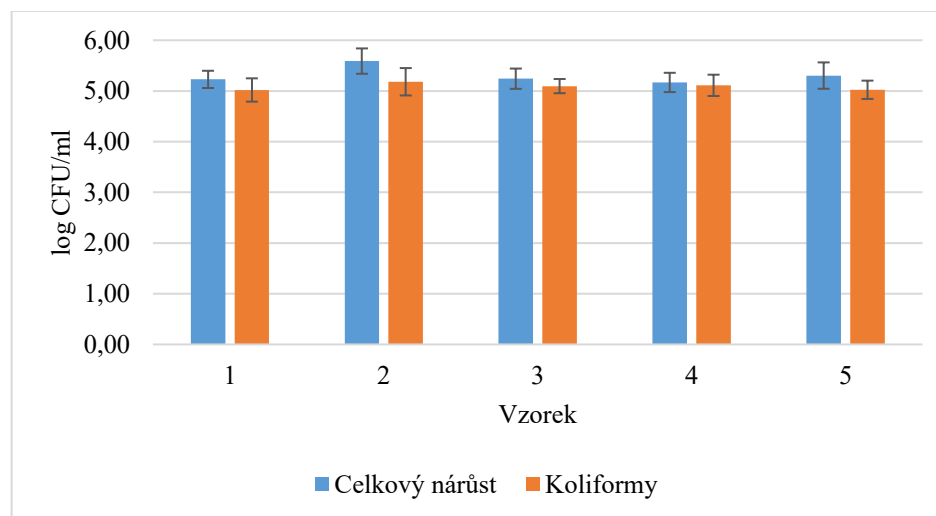
Celkový nárůst na Endo agaru ze stěrů z peří (Obrázek 12) byl stejný u vzorků 7 a 9 (vzorek 7 $(3,49 \pm 0,13)$ a vzorek 9 $(3,49 \pm 0,19)$ log CFU/g vzorku). U vzorku 5 byl nárůst

nejvyšší a představoval $(5,10 \pm 0,25)$ log CFU/g vzorku. U zbylých 7 vzorků se nárůst pohyboval mezi $(4,25 \pm 0,16)$ a $(4,58 \pm 0,23)$ log CFU/g vzorku. Zastoupení koliformních bakterií z celkového nárůstu na Endo agaru bylo nejnižší u vzorku 2 (89,9 %). Nejvyšší zastoupení koliformních bakterií z celkového nárůstu bylo zaznamenáno u vzorku 10 (97,7 %).



Obrázek 13 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků chladicí vody

Celkový nárůst na Endo agaru ze vzorků chladicí vody (Obrázek 13) byl u vzorků 1, 2 a 4 mezi $(4,01 \pm 0,25)$ a $(4,08 \pm 0,18)$ log CFU/ml vzorku. Nárůst byl vyšší u vzorků 3 ($(4,45 \pm 0,29)$ log CFU/ml) a 5 ($(4,43 \pm 0,20)$ log CFU/ml). Zastoupení koliformních bakterií z celkového nárůstu na Endo agaru bylo nejnižší ve vzorku 3 (73,2 %), nejvyšší pak bylo u vzorku 4 (91,0 %).



Obrázek 14 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků napájecí vody

Celkový nárůst na Endo agaru ze vzorků napájecí vody (Obrázek 14) byl u vzorků 1, 3 a 4 mezi $(5,17 \pm 0,19)$ a $(5,24 \pm 0,20)$ log CFU/ml vzorku. Nárůst byl vyšší u vzorku 5 $((5,30 \pm 0,26)$ log CFU/ml), nejvyšší pak u vzorku 2 $((5,59 \pm 0,25)$ log CFU/ml). Zastoupení koliformních bakterií z celkového nárůstu na Endo agaru bylo nejnižší ve vzorku 2 (92,7 %), nejvyšší pak bylo u vzorku 4 (98,9 %).

Pro hodnocení mikrobiologické jakosti potravin jsou běžně v České republice využívány ČSN 56 9609 a nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. U ČSN 56 9609 je u masa v rámci čeledi *Enterobacteriaceae* stanovována přítomnost *Escherichia coli* a *Salmonella* spp., kdy u *Escherichia coli* je povolena přítomnost nejvýše $5 \cdot 10^2$ CFU/g (2,7 log CFU/g) u 2 z 5 vzorků, jinak by neměla být prokazatelná při roztěru 0,2 ml ředění 10^{-1} vzorku. U *Salmonella* spp. není povolen žádný výskyt v 10 g vzorku (Anonym2, 2008). U nařízení Komise (ES) č. 2073/2005 je u masa drůbeže určována pouze *Salmonella* spp., kdy není povolen žádný výskyt v 25 g vzorku (Anonym, 2005).

U vzorků nebylo prováděno stanovení výlučně na tyto dvě bakterie, ovšem vzhledem k vysokým nárůstům koliformních bakterií se dal předpokládat výskyt *Escherichia coli* (byl následně potvrzen při identifikaci izolátů) a bylo by vhodné provést stanovení zaměřené přímo na ní. *Salmonella* spp. se mezi identifikovanými izoláty nevyskytovala, dala by se tedy předpokládat její absence.

Pro porovnání získaných hodnot je možné uvést studii Haščíka et al. (2008) zaměřenou na kontrolu mikrobiologické kvality během zrání masa kachny divoké (*Anas platyrhynchos*) a lysky černé (*Fulica atra*). U celkového počtu mikroorganismů u kachny divoké těsně po porážce nebyl zjištěn žádný nárůst, u lysky černé se celkový počet mikroorganismů pohyboval mezi 5,18 a 6,25 log CFU/g. Po porážení nebyla zjištěna přítomnost koliformních bakterií (Haščík et al., 2008). Studie, kterou provedli Berrang, Meinersmann a Knapp (2020) na kachním mase, uvádí hodnoty počtů celkových aerobních bakterií, koliformních bakterií a *E. coli*. Tyto hodnoty byly nejvyšší ve vzorcích jatečně upravených kachních těl před chlazením, a to u počtu celkových aerobních bakterií $(4,1 \pm 0,1)$ log CFU/ml, koliformních bakterií $(2,3 \pm 0,2)$ log CFU/ml a *E. coli* $(2,0 \pm 0,2)$ log CFU/ml. *Salmonella* spp. byla detekována pouze zřídka, nebyla tak v této studii podrobněji zkoumána (Berrang, Meinersmann a Knapp, 2020). Studie zaměřená na *Enterobacteriaceae* v mase kuřat a krůt z roku 2008 uváděla průměrné hodnoty 3,81 log CFU/g u kuřecího masa z bioprodukce,

2,66 log CFU/g u kuřecího masa z konvenčních chovů a 1,44 log CFU/g u krůtího masa z konvenčních chovů (Miranda et al., 2008).

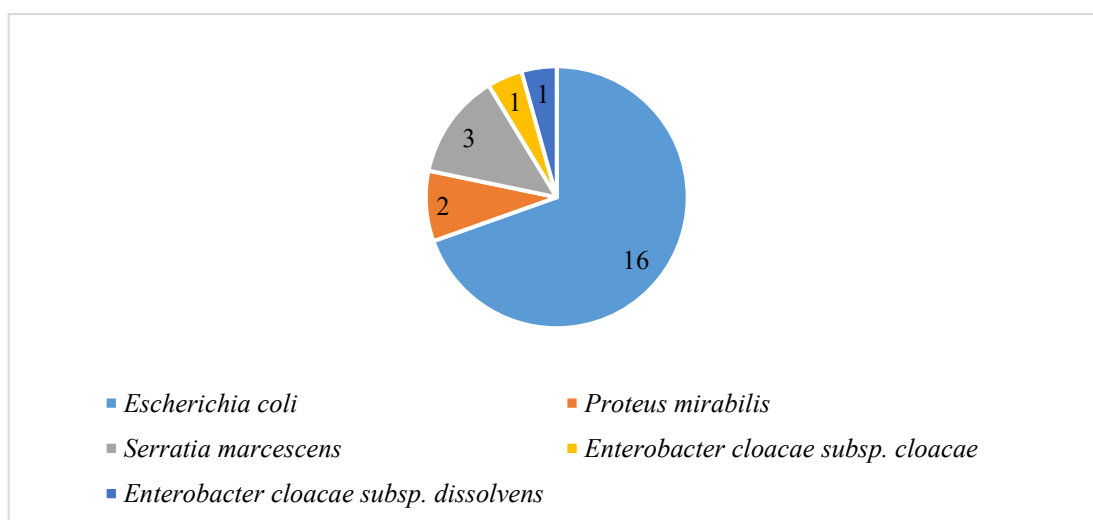
U všech těchto studií byly dosažené výsledky nižší (vyjma celkového počtu mikroorganismů u lysky černé ve studii Haščíka et al.) než výsledky, které byly získány v rámci této práce. To by se dalo vysvětlit povahou vzorku, 3 ze 4 druhů (vzorky peří, chladicí a napájecí vody) byly vzorky prostředí, kde byl vysoký nárůst předpokládán. U vzorků masa je pak vyšší hodnoty možné zdůvodnit kontaminací během procesu porážky nebo převozu zpět po porážce do hospodářství.

7.2 Skríníng antibiotické rezistence izolovaných enterobakterií

V rámci kapitoly skríníng antibiotické rezistence izolovaných enterobakterií byl vyhodnocen zisk a identifikace čistých kultur izolátů ze skupin jednotlivých vzorků (maso, peří, chladicí a napájecí voda). Následně byla provedena a vyhodnocena disková difuzní metoda.

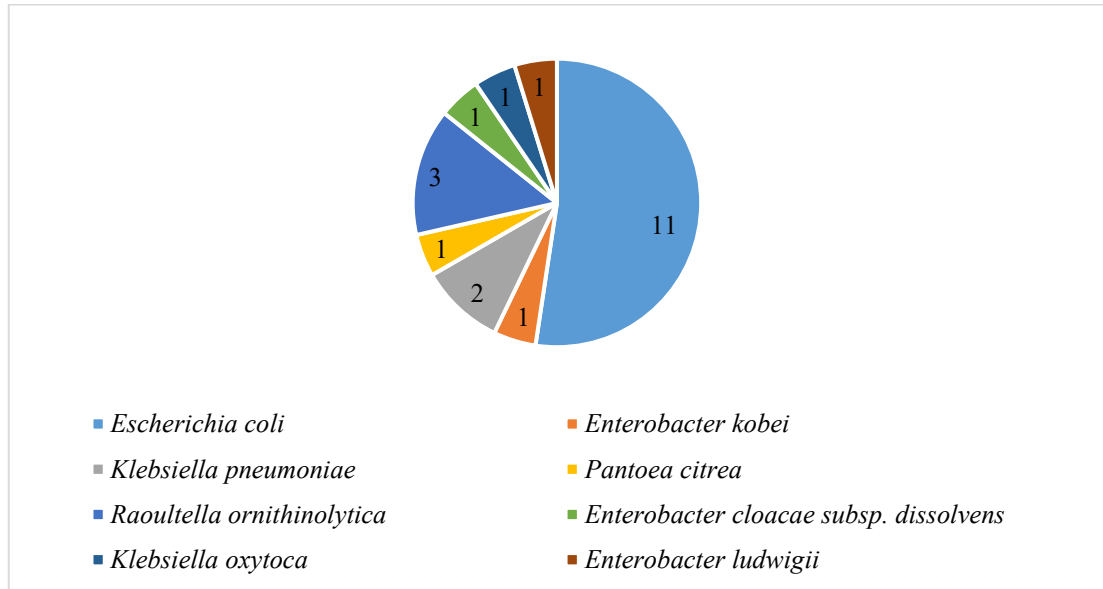
7.2.1 Získání čisté kultury křížovým a identifikace izolátů

Po provedení rozboru byly z Endo agaru odebrány kolonie za účelem získání čisté kultury bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Byly odebrány jak suspektní kolonie koliformních bakterií, tak i ostatní kolonie přítomné na agaru ve snaze podchytit co největší spektrum přítomných enterobakterií.



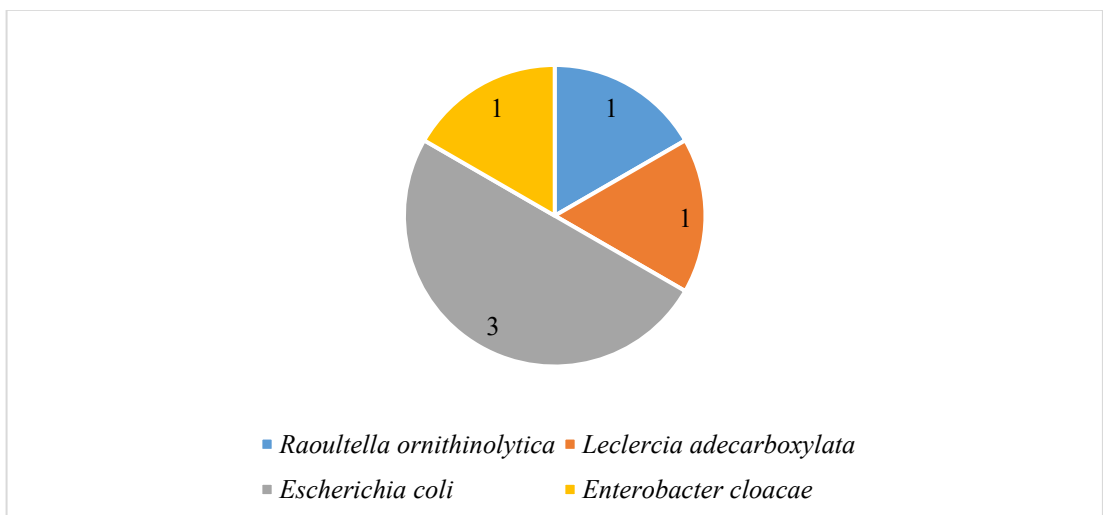
Obrázek 15 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků masa

U vzorků masa se podařilo identifikovat 23 izolátů (Obrázek 15), z nichž 16 činila *Escherichia coli*, 3 *Serratia marcescens*, 2 *Proteus mirabilis* a po 1 *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* a *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*.



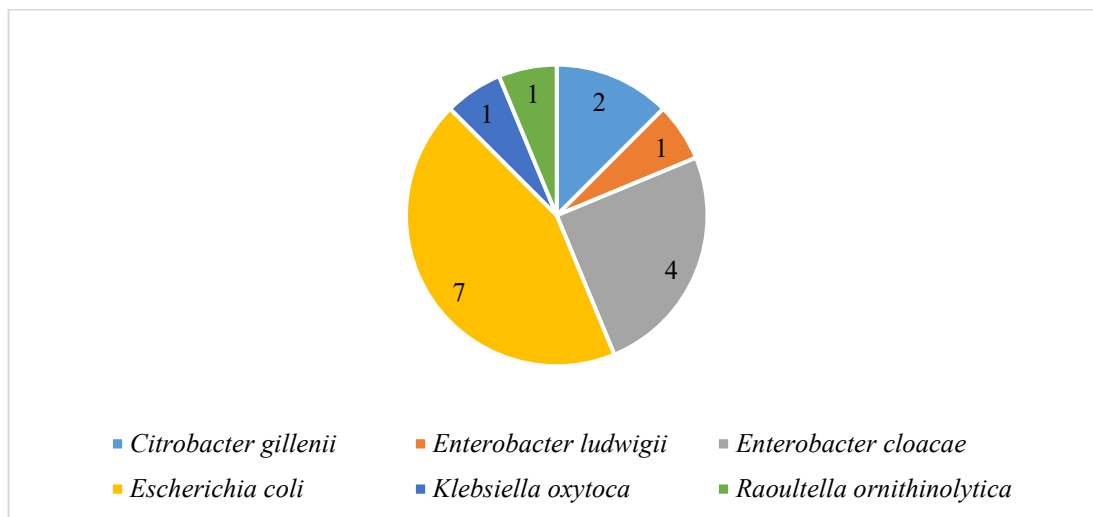
Obrázek 16 Zastoupení izolovaných bakterií ze stěrů peří

U stěrů peří se podařilo identifikovat 21 izolátů (Obrázek 16), z nichž 11 tvořila *Escherichia coli*, 3 *Raoultella ornithinolytica*, 2 *Klebsiella pneumoniae* a po 1 *Enterobacter kobei*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella oxytoca* a *Pantoea citrea*.



Obrázek 17 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků napájecí vody

U vzorků chladicí vody se podařilo identifikovat 6 izolátů (Obrázek 17), z nichž 3 činila *Escherichia coli* a po 1 *Enterobacter cloacae*, *Leclercia adecarboxylata* a *Raoultella ornithinolytica*.



Obrázek 18 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků napájecí vody

U vzorků napájecí vody se podařilo identifikovat 16 izolátů (Obrázek 18), z nichž 7 činila *Escherichia coli*, 4 *Enterobacter cloacae*, 2 *Citrobacter gillenii* a po 1 *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella oxytoca* a *Raoultella ornithinolytica*.

Identifikace byla provedena u 150 izolátů, celkem se podařilo identifikovat 66 izolátů za využití metod MALDI-TOF a ENTEROTestu 24 N. Poměrně nízké procento úspěšné identifikace je možné vysvětlit získáním směsné kultury dvou gramnegativních bakterií, kdy je nebylo možné dostupnými metodami morfologicky rozlišit při nárůstu na agarové plotně i mikroskopicky, pravděpodobně v důsledku těsné provázanosti obou bakterií v rámci kultury a jejich neoddělení v rámci křížového roztěru. Další možné vysvětlení spočívá v tom, že knihovny pro identifikaci mikroorganismů metodou MALDI-TOF jsou primárně konstruovány pro klinické izoláty, a i když jsou doplňovány i o další mikroorganismy izolované z prostředí, tak námi izolovaný mikroorganismus nemusí být součástí knihovny a izolát je tak vyhodnocen jako neidentifikovaný.

Druhové zastoupení získaných enterobakterií přibližně odpovídá profilům zjištěným u studií od Miranda et al., Ojer-Usoz et al. a Uzeh, Adewumi a Odumosu. Miranda et al. ve své studii uvádí izolaci zástupců čeledi *Enterobacteriaceae* z každé testované skupiny takto: *Serratia* spp., *Enterobacter* spp. a *Klebsiella* spp. (Miranda et al., 2008). U španělské studie přítomnosti enterobakterií produkujících beta-laktamázy s rozšířenou působností u masných výrobků byla zaznamenána vysoká přítomnost *Escherichia coli* (71,3 %) a *Serratia fonticola*

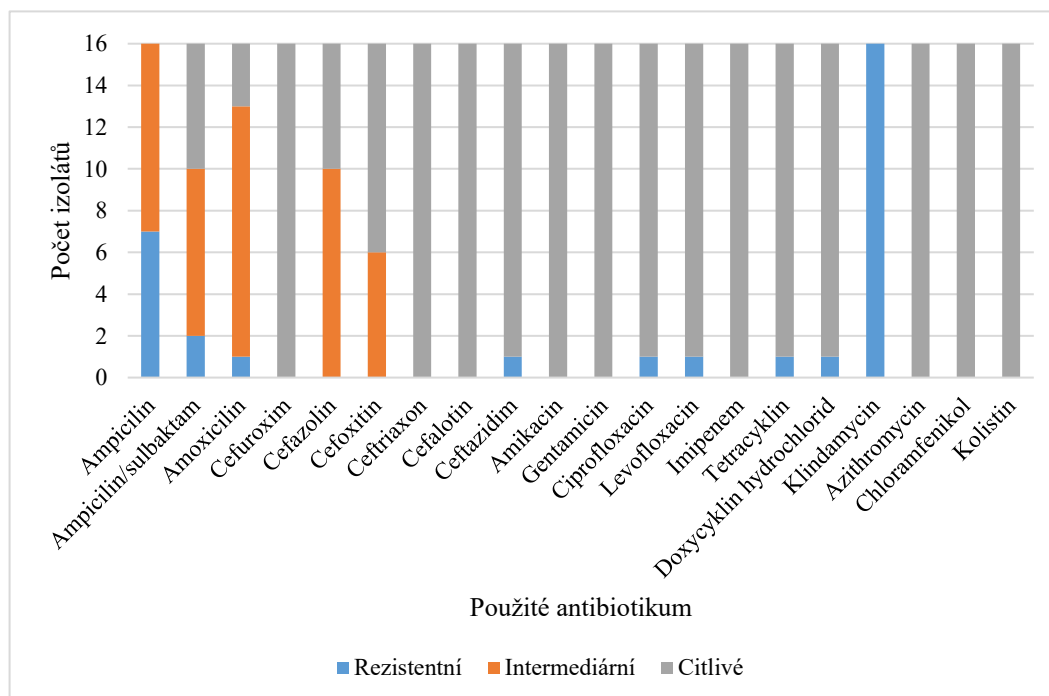
(13,9 %). Dále byla zjištěna přítomnost *Proteus vulgaris*, *Citrobacter koseri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus penneri*, *Proteus mirabilis*, *Hafnia alvei* a *Rahnella aquatilis* (Ojer-Usoz et al., 2013). U poslední jmenované studie bylo ze vzorků masa získáno celkem 110 izolátů zástupců čeledi *Enterobacteriaceae*, jednalo se o *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae*, *Citrobacter freundii*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumonia*, *K. planticola*, *Salmonella* spp., *E. coli* a *Serratia odorifera* (Uzeh, Adewumi a Odumosu, 2021).

7.2.2 Citlivost k antibiotikům

Antibiotická rezistence byla vyhodnocena na základě hodnot uvedených v Tabulce 1, izoláty byly rozděleny na rezistentní (R), intermediární (I) a citlivé (S).

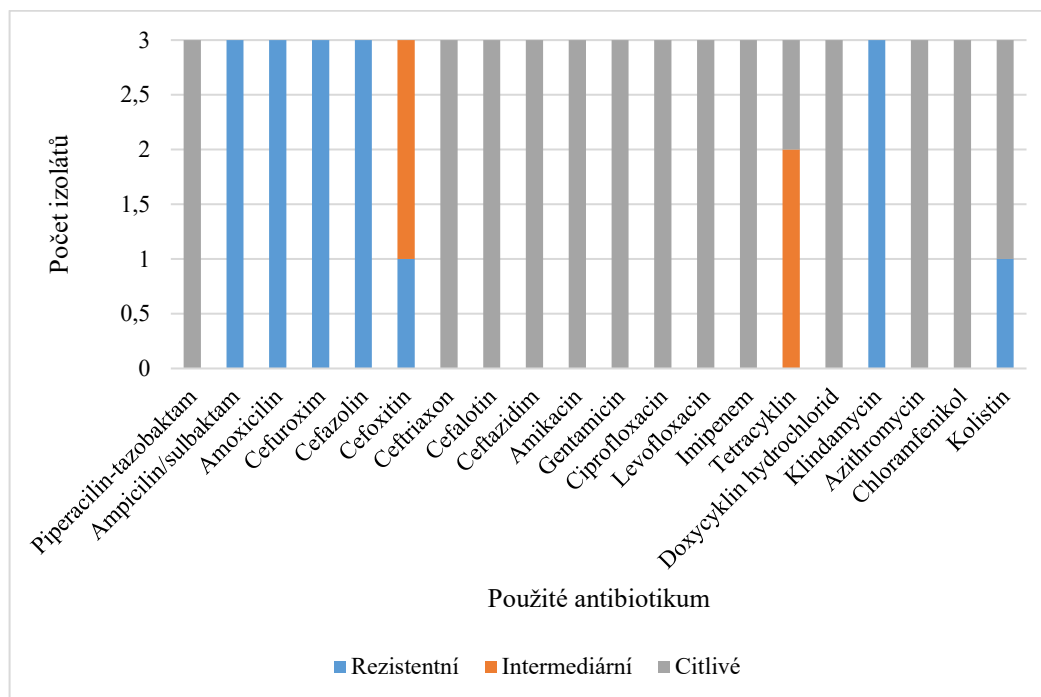
7.2.2.1 Izoláty ze vzorků kachního masa

U *Escherichia coli* (Obrázek 19) bylo získáno 16 izolátů. U ceftazidimu, chinolonů (ciprofloxacinu, levofloxacinu) a tetracyklinů (tetracyklin, doxycyklin hydrochlorid) byl rezistentní 1 izolát. U penicilinů byla rezistence značně různorodá: u ampicilinu 7 rezistentních, u ampicilinu/sulbaktamu 2 rezistentní a u amoxicilinu 1 rezistentní kmen. U zbylých antibiotik byly získány pouze intermediární a citlivé izoláty.



Obrázek 19 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Escherichia coli* izolovaných ze vzorků kachního masa

Dále byly získány 3 izoláty *Serratia marcescens* (Obrázek 20). Izoláty vykazovaly rezistence k penicilinovým antibiotikům ampicilin/sulbaktam, amoxicilin, 2 cefalosporinovým antibiotikům – cefuroximu a cefazolinu. U cefoxitinu a colistinu byl 1 rezistentní izolát.



Obrázek 20 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Serratia marcescens* izolovaných ze vzorků kachního masa

Tabulka 2 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Proteus mirabilis* izolovaných ze vzorků kachního masa

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 1 | 1 | 0 | Levofloxacin | 1 | 1 | 0 |
| Ampicilin/sulbaktam | 2 | 0 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 2 |
| Amoxicilin | 2 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 2 |
| Cefuroxim | 2 | 0 | 0 | Tetracyclin | 2 | 0 | 0 |
| Cefazolin | 2 | 0 | 0 | Doxycyclin hydrochlorid | 2 | 0 | 0 |
| Cefoxitin | 1 | 1 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 2 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 2 | Klindamycin | 2 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 2 | Azithromycin | 1 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 0 | 1 | 1 | Kolistin | 2 | 0 | 0 |
| Ciprofloxacín | 2 | 0 | 0 | Chloramfenikol | 0 | 1 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Ze vzorků kachního masa byly také získány 2 izoláty *Proteus mirabilis* (Tabulka 2). Oba izoláty vykazovaly rezistence k penicilinovým antibiotikům ampicilin/sulbaktam,

amoxicilin, 2 cefalosporinovým antibiotikům – cefuroximu a cefazolinu, tetracyklinům (tetracyklin, doxycyklic hydrochlorid), k ciprofloxacinu a kolistinu. U piperacilin-tazobaktamu, cefoxitinu, levofloxacinu a azithromycinu byl rezistentní jeden izolát. Ze vzorků kachního masa bylo dále získáno po 1 izolátu *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* a *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*. Oba vyhazovaly stejný profil rezistence, a to ke všem zkoušeným penicilinovým antibiotikům (ampicilin, ampicilin/sulbaktam, amoxicilin), 2 cefalosporinovým antibiotikům – cefazolinu a cefoxitinu (Tabulka 3). Všechny izoláty získané z kachního masa byly rezistentní ke klindamycinu.

Tabulka 3 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* a *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* izolovaných ze vzorků kachního masa

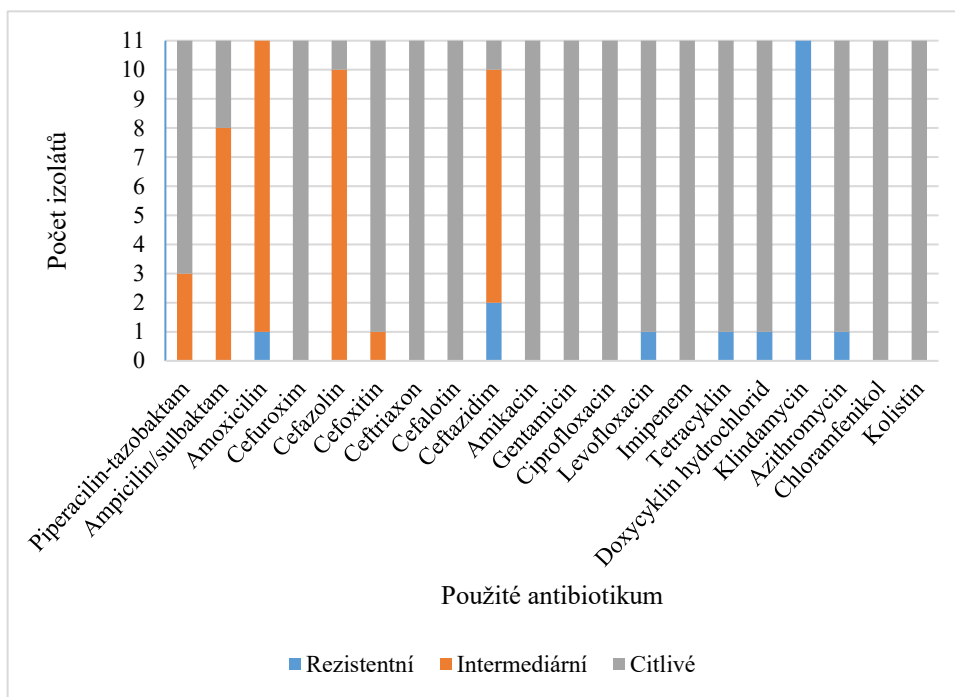
| Použité antibiotikum | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | |
|--------------------------------|---|--------------------------|---|---|--|--------------------------|---|---|
| | | R | I | S | | R | I | S |
| Ampicilin | <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> | 1 | 0 | 0 | <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> | 1 | 0 | 0 |
| Ampicilin/sulbaktam | | 1 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Amoxicilin | | 1 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefuroxim | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | | 1 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefoxitin | | 1 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Ceftriaxon | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Cefalotin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacín | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Levofloxacín | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Amikacin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Gentamicin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Tetracyklin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Doxycyklin hydrochlorid | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Imipenem | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Klindamycin | | 1 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Azithromycin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Kolistin | | 0 | 0 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | | |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

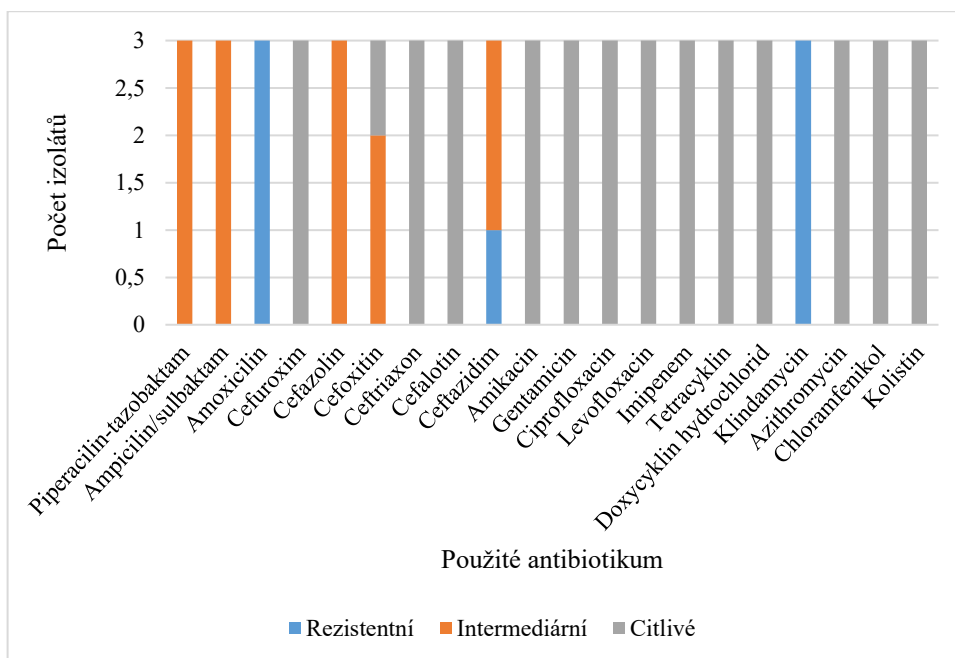
7.2.2.2 Izoláty ze stěrů peří

Ze vzorků stěrů z peří bylo získáno 11 izolátů *Escherichia coli* (Obrázek 21). U amoxicilinu, levofloxacinu, tetracyklinů (tetracyklin, doxycyklin hydrochlorid), azithromycinu byl vždy zjištěn pouze 1 rezistentní izolát. U ceftazidimu byly 2 izoláty rezistentní. U zbylých antibiotik byly získány pouze intermediární a citlivé izoláty. Ze vzorků stěrů z peří byly také získány 3 izoláty *Raoultella ornithinolytica* (Obrázek 22).

Všechny izoláty vykazovaly rezistenci k amoxicilinu. U ceftazidimu byl rezistentní jeden izolát.



Obrázek 21 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Escherichia coli* izolovaných ze vzorků peří



Obrázek 22 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Raoultella ornithinolytica* izolovaných ze vzorků peří

Tabulka 4 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Enterobacter ludwigii*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens* a *Enterobacter kobei* izolovaných ze vzorků peří

| Bakteriální druh: <i>Enterobacter ludwigii</i> | | | | | | | |
|--|--------------------------|---|---|-------------------------|--------------------------|---|---|
| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 1 | 0 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 1 | 0 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 1 | 0 |
| Cefazolin | 1 | 0 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 1 | 0 |
| Cefoxitin | 1 | 0 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 1 | 0 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |
| Bakteriální druh: <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> | | | | | | | |
| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 0 | 1 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 1 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 1 | 0 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 1 | 0 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 0 | 1 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |
| Bakteriální druh: <i>Enterobacter kobei</i> | | | | | | | |
| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 0 | 1 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 0 | 1 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 0 | 1 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 0 | 1 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 0 | 1 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Ze vzorků stěrů z peří byl získán 1 izolát *Enterobacter ludwigii*, který vykazoval rezistenci k ampicilin/sulbaktamu, amoxicilinu, 3 cefalosporinovým antibiotikům – cefazolinu, cefoxitinu a ceftazidimu. Bylo také získáno po 1 izolátu *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, který vykazoval rezistenci k amoxicilinu a 2 cefalosporinovým antibiotikům – cefazolinu a cefoxitinu a *Enterobacter kobei*, který vykazoval rezistenci k amoxicilinu (Tabulka 4).

Tabulka 5 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Klebsiella pneumoniae* a *Klebsiella oxytoca* izolovaných ze vzorků peří

| Použité antibiotikum | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | |
|--------------------------------|------------------------------|--------------------------|---|---|---------------------------|--------------------------|---|---|
| | | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | <i>Klebsiella pneumoniae</i> | 0 | 0 | 2 | <i>Klebsiella oxytoca</i> | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | | 0 | 2 | 0 | | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | | 2 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefuroxim | | 2 | 0 | 0 | | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | | 0 | 1 | 1 | | 0 | 1 | 0 |
| Cefoxitin | | 0 | 1 | 1 | | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Cefalotin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 1 | 0 |
| Ciprofloxacín | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Levofloxacín | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Amikacin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Gentamicin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Tetracyklin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Doxycyklin hydrochlorid | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Imipenem | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Klindamycin | | 2 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Azithromycin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Kolistin | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |
| Chloramfenikol | | 0 | 0 | 2 | | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

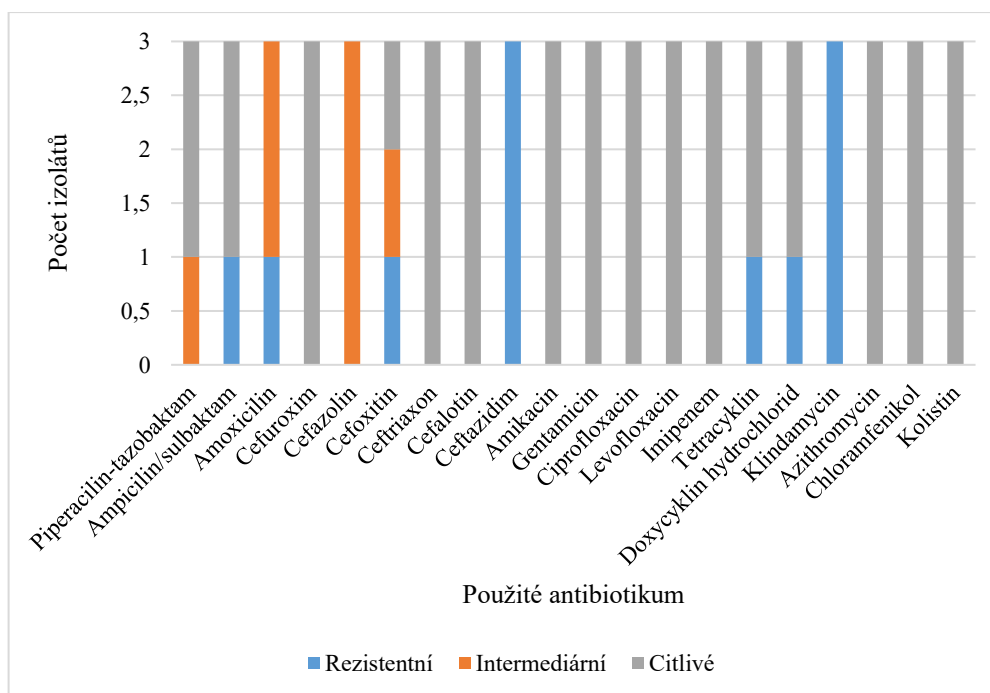
Dále byl získán 1 izolát *Klebsiella oxytoca*, který vykazoval rezistenci k amoxicilinu, 2 izoláty *Klebsiella pneumoniae*, které vykazovaly rezistenci k amoxicilinu a cefuroximu (Tabulka 5), a také 1 izolát *Pantoea citrea* (Tabulka 6), který vykazoval rezistenci k ceftazidimu. Ve všech případech byly izoláty získané ze stěrů peří rezistentní na klindamycin.

Tabulka 6 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Pantoea citrea* izolovaných ze vzorků peří

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 0 | 1 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 0 | 1 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 0 | 1 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 0 | 1 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 0 | 1 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 1 | 0 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacín | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

7.2.2.3 Izoláty ze vzorků chladicí vody



Obrázek 23 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Escherichia coli* izolovaných ze vzorků chladicí vody

Ze vzorků chladicí vody byly získány 3 izoláty *Escherichia coli* (Obrázek 23). Všechny 3 vykazovaly rezistenci k ceftazidimu, 1 rezistentní izolát byl u ampicilin/sulbaktamu, amoxicilinu, cefoxitinu a tetracyklinům (tetracyklinu, doxycyklin hydrochloridu). Byl také získán 1 izolát *Enterobacter cloacae* (Tabulka 7), který vykazoval rezistenci

k ampicilin/sulbaktamu, amoxicilinu, 3 cefalosporinovým antibiotikům – cefazolinu, cefoxitinu a ceftazidimu.

Tabulka 7 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Enterobacter cloacae* izolovaných ze vzorků chladicí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 0 | 1 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 1 | 0 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 1 | 0 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 1 | 0 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 1 | 0 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Tabulka 8 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Leclercia adecarboxylata* izolovaných ze vzorků chladicí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 1 | 0 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 1 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 0 | 1 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 0 | 1 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 1 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 0 | 1 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Ze vzorků chladicí vody bylo dále získáno po 1 izolátu *Leclercia adecarboxylata* (Tabulka 8) a *Raoultella ornithinolytica* (Tabulka 9). U *Leclercia adecarboxylata* nebyla zjištěna jiná rezistence než ke klindamycinu. U izolátu *Raoultella ornithinolytica* byla zjištěna rezistence u penicilinových antibiotik ampicilin/sulbatam a amoxicilinu a u 3

cefalosporinových antibiotik cefuroximu, cefazolinu a ceftazidimu. Všechny izoláty získané ze vzorků chladicí vody byly rezistentní ke klindamycinu.

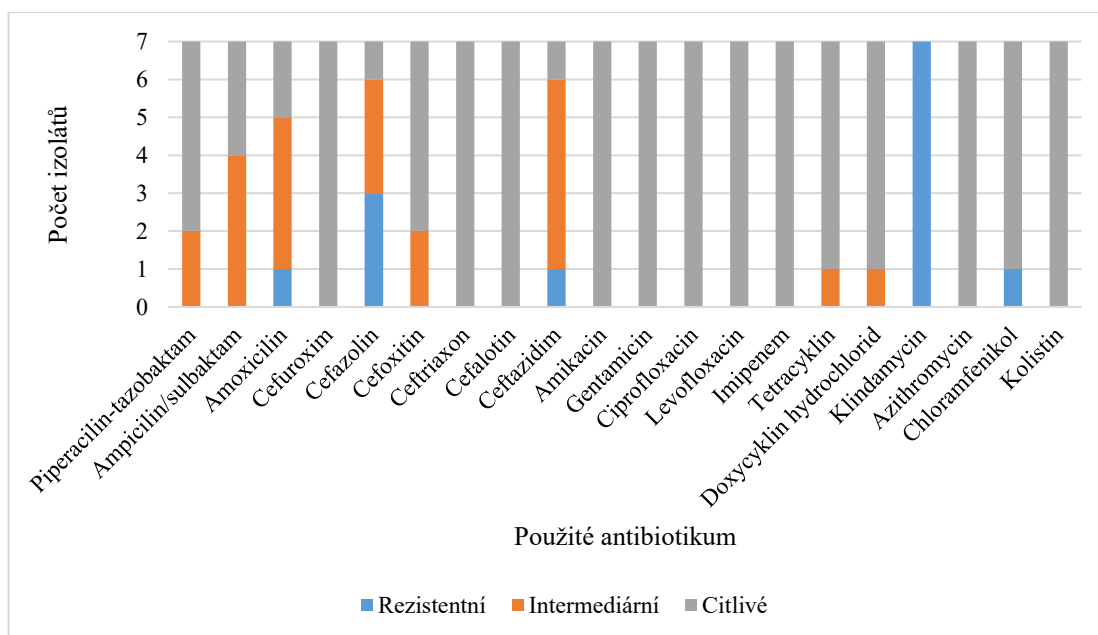
Tabulka 9 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Raoultella ornithinolytica* izolovaných ze vzorků chladicí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 1 | 0 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 1 | 0 | 0 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 1 | 0 | 0 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 1 | 0 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 1 | 0 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 1 | 0 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

7.2.2.4 Izoláty ze vzorků napájecí vody

Ze vzorků napájecí vody bylo získáno 7 izolátů *Escherichia coli* (Obrázek 24), ze kterých byly 3 rezistentní k cefazolinu a po 1 izolátu rezistentním k amoxicilinu, ceftazidimu a chloramfenikolu.



Obrázek 24 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Escherichia coli* izolovaných ze vzorků napájecí vody

Ze vzorků napájecí vody byly získány 2 izoláty *Citrobacter gillenii* (Tabulka 10), oba vykazovaly rezistenci k cefuroximu, 1 izolát byl rezistentní k amoxicilinu.

Tabulka 10 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Citrobacter gillenii* izolovaných ze vzorků napájecí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|------------------------|--------------------------|---|---|-------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 2 | 0 | Levofloxacin | 0 | 0 | 2 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 0 | 2 | Amikacin | 0 | 0 | 2 |
| Amoxicilin | 1 | 1 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 2 |
| Cefuroxim | 2 | 0 | 0 | Tetracyklin | 0 | 0 | 2 |
| Cefazolin | 0 | 2 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 2 |
| Cefoxitin | 0 | 0 | 2 | Imipenem | 0 | 0 | 2 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 2 | Klindamycin | 2 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 2 | Azithromycin | 0 | 0 | 2 |
| Ceftazidim | 0 | 2 | 0 | Kolistin | 0 | 0 | 2 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 2 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 2 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Tabulka 11 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Enterobacter cloacae* a *Enterobacter ludwigii* izolovaných ze vzorků napájecí vody

| Použité antibiotikum | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | | Bakteriální druh | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------|-----------------------------|--------------------------|---|---|------------------------------|--------------------------|---|---|
| | | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | <i>Enterobacter cloacae</i> | 0 | 3 | 1 | <i>Enterobacter ludwigii</i> | 0 | 1 | 0 |
| Ampicilin/sulbaktam | | 2 | 2 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Amoxicilin | | 3 | 1 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefuroxim | | 0 | 0 | 4 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefazolin | | 4 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Cefoxitin | | 4 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Ceftriaxon | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Cefalotin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | | 3 | 1 | 0 | | 0 | 1 | 0 |
| Ciprofloxacin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Levofloxacin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Amikacin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Gentamicin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Tetracyklin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Doxycyklin hydrochlorid | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Imipenem | | 0 | 1 | 3 | | 0 | 1 | 0 |
| Klindamycin | | 4 | 0 | 0 | | 1 | 0 | 0 |
| Azithromycin | | 0 | 0 | 4 | | 0 | 0 | 1 |
| Kolistin | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | | |
| Chloramfenikol | 0 | 0 | 4 | 0 | 0 | 1 | | |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Byly také získány 4 izoláty *Enterobacter cloacae* a 1 izolát *Enterobacter ludwigii* (Tabulka 11). Všechny izoláty *Enterobacter cloacae* vykazovaly rezistenci k cefazolinu a cefoxitinu. 3 ze 4 izolátů byly rezistentní k amoxicilinu a ceftazidimu a 2 rezistentní izoláty byly zjištěny u ampicilin/sulbaktamu. *Enterobacter ludwigii* vykazoval rezistenci k ampicilin/sulbaktamu, amoxicilinu, 3 cefalosporinovým antibiotikům – cefroximu, cefazolinu a cefoxitinu.

Tabulka 12 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Klebsiella oxytoca* izolovaných ze vzorků napájecí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 0 | 1 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 0 | 1 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 1 | 0 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 0 | 1 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 0 | 0 | 1 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 1 | 0 | 0 |
| Ceftazidim | 0 | 0 | 1 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Tabulka 13 Citlivost k testovaným antibiotikům u *Raoultella ornithinolytica* izolovaných ze vzorků napájecí vody

| Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | | Použité antibiotikum | Citlivost k antibiotiku* | | |
|-------------------------------|--------------------------|---|---|--------------------------------|--------------------------|---|---|
| | R | I | S | | R | I | S |
| Piperacilin-tazobaktam | 0 | 1 | 0 | Levofloxacin | 0 | 0 | 1 |
| Ampicilin/sulbaktam | 0 | 0 | 1 | Amikacin | 0 | 0 | 1 |
| Amoxicilin | 1 | 0 | 0 | Gentamicin | 0 | 0 | 1 |
| Cefuroxim | 0 | 0 | 1 | Tetracyklin | 0 | 0 | 1 |
| Cefazolin | 0 | 1 | 0 | Doxycyklin hydrochlorid | 0 | 0 | 1 |
| Cefoxitin | 0 | 0 | 1 | Imipenem | 0 | 0 | 1 |
| Ceftriaxon | 0 | 0 | 1 | Klindamycin | 1 | 0 | 0 |
| Cefalotin | 0 | 0 | 1 | Azithromycin | 0 | 0 | 1 |
| Ceftazidim | 0 | 0 | 1 | Kolistin | 0 | 0 | 1 |
| Ciprofloxacin | 0 | 0 | 1 | Chloramfenikol | 0 | 0 | 1 |

Pozn: * – Uveden počet izolátů s odpovídající citlivostí k antibiotiku

Ze vzorků napájecí vody bylo také získáno po 1 izolátu *Klebsiella oxytoca* (Tabulka 12), který vykazoval rezistenci k amoxicilinu a cefazolinu a *Raoultella ornithinolytica* (Tabulka 13), který vykazoval rezistenci k amoxicilinu. Všechny izoláty získané ze vzorků napájecí vody byly rezistentní ke klindamycinu.

Výsledky získané u *Escherichia coli* z masa naznačují možnou přítomnost 1 multirezistentního kmene (rezistentního k penicilinům, cefalosporinům (ceftazidim), chinolonům a tetracyklinům), stejně tak tomu bylo i izolátů získaných z peří (1 izolát, rezistentní k penicilinům (amoxicilin), cefalosporinům (ceftazidim), chinolonům (levofloxacin), tetracyklinům a makrolidovému antibiotiku azithromycinu), chladicí (1 izolát, rezistentní k penicilinům (ampicilin/sulbaktam, amoxicilin), cefalosporinům (cefoxitin, ceftazidim) a tetracyklinům) a napájecí vody (1 izolát, rezistentní k penicilinům (amoxicilin), cefalosporinům (cefazolin, ceftazidim) a amfenikolovému antibiotiku chloramfenikolu). Pro porovnání, zachycení multirezistentních izolátů u *Escherichia coli* uvedla také studie od Mazurek et al. (2013), kdy u vzorků stolice prasat bylo zachyceno 81,0 % multirezistentních izolátů (rezistentních k 3 a více antibiotikům) a u vzorků stolice dobytka se pak jednalo o 14,6 % (Mazurek et al., 2013).

Stejně tak vykazovaly multirezistenci oba zachycené kmeny *Proteus mirabilis* izolované z kachního masa (rezistentních k penicilinům (ampicilin/sulbaktam, amoxicilin), cefalosporinům (cefuroxim, cefazolin, cefoxitin (1 kmen)), chinolonům (ciprofloxacin), tetracyklinům, makrolidovému antibiotiku azithromycinu (1 kmen) a polypepidovému antibiotiku kolistinu). U *Serratia marcescens* izolované z kachního masa byla potenciální přítomnost 1 multirezistentního kmene (rezistentního k penicilinům (ampicilin/sulbaktam, amoxicilin), cefalosporinům (cefuroxim, cefazolin, cefoxitin) a polypepidovému antibiotiku kolistinu). Téměř u všech izolátů byla zjištěna rezistence k jednomu nebo více antibiotikům patřícím mezi peniciliny (*Enterobacter kobei*, *Klebsiella oxytoca* izolovaných ze vzorků peří a *Raoultella ornithinolytica* izolovaných z napájecí vody) nebo cefalosporiny (*Pantoea citera* izolovaných ze vzorků peří), případně kombinace obou tříd (*Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* a *Serratia marcescens* izolovaných ze vzorků kachního masa, *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae* subsp. *dissolvens*, *Enterobacter ludwigii*, *Klebsiella pneumoniae* a *Raoultella ornithinolytica* izolovaných ze vzorků peří, *Enterobacter cloacae*, *Escherichia coli* a *Raoultella ornithinolytica* izolovaných z chladicí vody a *Citrobacter gillenii*, *Enterobacter*

cloacae, *Enterobacter ludwigii*, *Escherichia coli* a *Klebsiella oxytoca* izolovaných z napájecí vody).

Všechny izoláty byly rezistentní ke klindamycinu, který byl použit jako kontrola, vzhledem ke skutečnosti, že bakterie čeledi *Enterobacteriaceae* jsou k němu přirozeně rezistentní díky neschopnosti klindamycinu proniknout do jejich buňky. Klindamycin působí na množství aerobních grampozitivních koků a anaerobní grampozitivní a gramnegativní bakterie. Rezistence k němu může být vyvolána mutací genu 23S rRNA, změnou efluxu nebo geny kódujícími metylázy způsobující rezistenci k erythromycinu (Card et al., 2015).

Rezistentní, případně multirezistentní, izoláty byly zachyceny i přesto, že při chovu nebyla podávána antibiotika. To by naznačovalo, že se tyto rezistentní bakterie nacházely v prostředí chovu bez ohledu na aktivní použití antibiotik. Tento výsledek by odpovídal pozorování studie provedené ve 2 chovech v Austrálii publikované v roce 2020. Ani jeden z chovů nevyužíval antibiotika, výsledky tedy poskytly informace o výskytu genů antibiotické rezistence bez existence přímého selekčního tlaku antibiotik. V rámci studie byly zachyceny geny nesoucí antibiotickou rezistenci, zejména k tetracyklinům (*tetM*), streptomycinu (*strB*) a sulfonamidům (*sul2*). Tato skutečnost byla vysvětlována buď jejich přenosem bakteriálními druhy přirozeně přítomnými v kuřecí fekální mikrobiotě, nebo jako výsledek jejich širokého rozšíření v prostředí (Liu et al., 2020). K obdobnému výsledku došla studie provedená v Indii (západní Bengálsko) zabývající se antibiotickou rezistencí u *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. a *Klebsiella pneumoniae* v chovech kachen plemen Deshi a Khaki Campbell a případnými rozdíly v zjištěné antibiotické rezistenci vzhledem k odlišným podmínkám chovu těchto 2 plemen. Kachny plemena Deshi jsou zpravidla chovány v menších domácích chovech semiintenzivně, zatímco Khaki Campbell jsou chovány ve větší míře v uzavřených prostorách. 79,81 % *Escherichia coli*, 69,23 % *Salmonella* spp. a 50 % *Klebsiella pneumoniae* byly identifikovány jako producenti beta-laktamázy. Celkově byla vyšší prevalence izolátů produkujících beta-laktamázy s rozšířenou působností zjištěna u kachen Deshi ve srovnání s Khaki Campbell, přestože u kachen Deshi nebyla známa žádná historie užívání antibiotik. Studie uvedla předpoklad, že se kachny Deshi dostaly do kontaktu s rezistentními bakteriemi nebo zbytkovými koncentracemi antibiotik používaných v akvakultuře a zemědělství díky volnějšímu způsobu jejich chovu (Banerjee a Acharyya, 2021). Úvahu, zda má omezení používání antibiotik v chovu drůbeže očekávaný vliv na snížení rezistence, také uvedla studie provedená v centrální Itálii (region Abruzzi). V rámci této studie byla zkoumána přítomnost genů rezistence k antibiotikům

běžně používaným ve veterinární praxi (tetracykliny, aminoglykosidy, linkomycin) a některým antibiotikům určeným výhradně pro lidskou spotřebu (chloramfenikol, kolistin, vankomycin, karbapenemy), a to u vzorků steliva z konvenčních hejn (antibiotika povolena pro terapeutické účely) a farem zcela nevyužívajících antibiotika. Byla zjištěna přítomnost několika genů rezistence v obou typech chovu (u všech vzorků minimálně jeden typ genů antibiotické rezistence), ovšem pozornost vzbudil záchyt genů způsobujících rezistenci k tetracyklinům, který byl vyšší u farem zcela nevyužívajících antibiotika (Farooq et al., 2022).

Dalo by se předpokládat, že při použití antibiotik v chovu by byl záchyt rezistentních a multirezistentních izolátů vyšší, neboť absence používání antibiotik v chovu je jedním z hypotetických způsobů, jak omezit šíření antibiotické rezistence díky absenci selekčního tlaku antibiotik (Salerno et al., 2022). Nárůst záchytu antibiotické rezistence naznačují studie od Dohmena et al. nebo Ghoshe a LaPara. Ve studii od Dohmena et al. se během trvání studie (2011–2013) na nizozemských prasečích farmách s podáním cefalosporinů výrazně zvýšila pravděpodobnost výskytu *Escherichia coli* produkující beta-laktamázy s rozšířenou působností (Dohmen et al., 2017). U studie Ghoshe a LaPara byla zkoumána rezistence u půdních bakterií na farmách používajících antibiotika pro neterapeutické a veterinární účely s cílem rozpoznat dopad užívání antibiotik. Zvýšené úrovně rezistence na chlortetracyklin byly kvantifikovány v půdách na některých z farem, které používaly antibiotika pro neveterinární účely. Byly zde také pozorovány významné posuny v typech bakterií rezistentních na chlortetracyklin a také v typech genů, které kódují rezistenci v těchto organismech (Ghosh a LaPara, 2007). Tyto příklady se dají uvést jako kauzální důkazy, že použití antibiotik vede k výskytu rezistence k nim (Dohmen et al., 2017). Významnou pozitivní korelaci mezi využitím antibiotik a četností záchytu genů antibiotické rezistence zmiňuje také Peng et al. a zabývá se zjištěním přítomnosti reziduí antibiotik u vzorků hnoje produkovaného potravinovými zvířaty v regionu Ningxia. U chovů brojlerů zmiňuje nejvyšší záchyt fluorochinolonů ze všech zkoumaných druhů potravinových zvířat, celkově byly nejvyšší hodnoty reziduí zjištěny u tetracyklinů. U genů antibiotické rezistence byl jejich vyšší záchyt v hnoji z chovů prasat a brojlerů než u dobytka a ovcí, studie uváděla, že použití hnoje od prasat a brojlerů jako hnojiva nese větší riziko rozšiřování genů antibiotické rezistence do prostředí (Peng et al., 2022). Ve studiích zabývajících se antibiotickou rezistencí je problém s nedostatkem souvislých dat a používáním různých kritérií pro definování rezistence izolátů. Většina hlášení přítomnosti bakterií rezistentních

k antibiotikům v potravinách neuvádí rozšíření nebo koncentraci konkrétních typů rezistentních bakterií, běžně je uveden poměr izolátů rezistentních k panelu zvolených antibiotik. (Hudson et al., 2017).

Obecně je třeba brát v potaz, že kachny sdílí prostor a vodu s lidmi a dalšími zvířaty/ptáky. Díky tomuto společnému přístupu k půdě a vodním plochám jsou kachny často vystaveny různým mikroorganismům, které mohou nést rezistenci k antibiotikům. Exponovaní ptáci mohou tyto mikroorganismy přechovávat ve svém střevním traktu, aniž by sami měli klinické příznaky nákazy, a vylučovat tyto organismy do životního prostředí. Mohou tedy působit jako potenciální přenašeči těchto mikroorganismů na člověka a ostatní zvířata (Banerjee a Acharyya, 2021). Největší problém představují producenti beta-laktamáz s rozšířenou působností rezistentní k cefalosporinům 3. generace (Fashae et al., 2021). Komenzální izoláty *Escherichia coli* z kachen jsou důležitým rezervoárem genů pro produkci beta-laktamáz s rozšířenou působností. Například v Číně v roce 2006 byla ve více než 50 % vzorků kachního trusu přítomna *Escherichia coli* produkující beta-laktamázy s rozšířenou působností. Roli rezervoáru a vektoru přenosu může hrát také divoké ptactvo. To je antibiotikům vystaveno nepřímo prostřednictvím kontaminovaného životního prostředí (Fashae et al., 2021). Wang et al. (2017) zmiňuje první hlášení antibiotické rezistence u japonského divokého ptactva z roku 1978, které odhalilo rezistenci na chloramfenikol u *Escherichia coli*. Do roku 2017 bylo zjištěno, že minimálně 80 druhů divoké zvěře, z nichž většina byla divoké ptactvo, bylo nosiči bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* produkujících beta-laktamázy s rozšířenou působností (nejčastěji se jednalo o *E. coli* a *Klebsiella pneumoniae*) (Wang et al., 2017). Rezistentní bakterie nebo geny antibiotické rezistence mohou být přenášeny na člověka prostřednictvím potravinového řetězce a posilovat lidskou klinickou rezistenci (Ma et al., 2012; Fashae et al., 2021).

Fenomén antibiotické rezistence je výzvou zahrnující zdraví lidí, zvířat (divokých, hospodářských i domácích mazlíčků) a životního prostředí (Fashae et al., 2021). Salerno zmiňuje zprávu vydanou ESVAC (European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption) v listopadu 2021, která uvádí, že objem prodeje antimikrobiálních látek určených pro potravinová zvířata klesl v Evropě mezi lety 2011 a 2020 o více než 43 % (Salerno et al., 2022). Přesto je třeba do budoucna vytvořit ještě efektivnější komunikaci s producenty potravin a zaměřit se na chybějící znalosti v oblasti působení antibiotik společně s motivy k preventivnímu užívání antibiotik (Hudson et al., 2017). Toto je význačné z velké míry pro rozvojové země, pro ilustraci lze uvést studii užívání antibiotik

při produkci z Kambodži z roku 2016 pokrývající 16 farem, 9 veterinářů a 4 prodejce krmiv. Rozsáhlé používání antibiotik bylo zjištěno na všech farmách, a to na základě 4 faktorů: přesvědčení, že použití antibiotik je nezbytné pro chov, omezených vědomostí o antibiotikách (omezených na pouhou znalost názvu), neomezený přístup k nim a slabé systémy monitoringu a kontroly. Zjištěná používaná antibiotika patřila do široké škály tříd včetně beta-laktamových antibiotik, fluorochinolonů, tetracyklinů, kolistinu a linkosamidů (Om a McLaws, 2016). Efektivní komunikaci a doplnění znalostí je třeba propojit s welfare zvířat v chovu, zejména v oblasti předcházení šíření onemocnění, a společenským tlakem představujícím hnací sílu na používání a předepisování antibiotik (Hudson et al., 2017). Zároveň je potřeba brát v potaz, že antibiotická rezistence je součástí přirozené bakteriální evoluce. Tato bakteriální evoluce je ovšem značně zrychlená rozšířeným, často nesprávným, používáním antibiotik a usnadněná mezinárodním obchodem a cestováním (Wang et al., 2017).

ZÁVĚR

Tato práce se zabývala skríníngem výskytu antibiotické rezistence u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, které byly izolovány z vodní drůbeže (kachního masa, chladicí vody z porážky a peří živých zvířat) a z prostředí jejich chovu, konkrétně napájecí vody. Skríníng byl prováděn diskovou difuzní metodou, kdy byla testována citlivost na dvacet vybraných antibiotik: ampicilin nebo piperacilin-tazobaktam, dále ampicilin/sulbaktam, amoxicilin, cefuroxim, cefazolin, cefoxitin, ceftriaxon, cefalotin, ceftazidim, ciprofloxacín, levofloxacín, amikacin, gentamicin, tetracyklin, doxycyklin hydrochlorid, imipenem, klindamycin, azithromycin, kolistin a chloramfenikol.

V rámci této práce byla zjištěna přítomnost rezistentních, případně multirezistentních, izolátů bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*. Jednalo se o rezistentní kmeny *Citrobacter gillienii*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter kobei*, *Enterobacter ludwigii*, *Escherichia coli*, *Klebsiella oxytoca*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pantoea citera*, *Proteus mirabilis*, *Raoultella ornithinolytica* a *Serratia marcescens*. Výsledky získané u *Escherichia coli* z masa naznačují možnou přítomnost multirezistentních kmenů, stejně tak jako zachycené kmeny *Proteus mirabilis* a *Serratia marcescens*. Rezistentní kmeny byly zachyceny i přesto, že při chovu nebyla podávána antibiotika, což by naznačovalo přítomnost rezistentních bakterií v prostředí chovu bez ohledu na aktivní použití antibiotik. Nejčastěji byla zachycena rezistence k beta-laktamovým antibiotikům, konkrétně penicilinům a cefalosporinům.

Bylo by vhodné, aby v práci bylo pokračováno a byla provedena sekvenace bakteriální DNA ke zjištění přítomných genů nesoucích antibiotickou rezistenci pro získání ucelenějšího obrazu rezistence u získaného souboru izolátů a jejich příčin. Zároveň bylo zajímavé provést rozsáhlejší studii týkající se porovnání zachytu antibiotické rezistence mezi konvenčními chovy drůbeže a chovy nevyužívajícími antibiotika, vzhledem k omezeným datům, která jsou v tomto ohledu prozatím k dispozici.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

ALIYU, A. B. et al., 2016. Risk factors and spatial distribution of extended spectrum β -lactamase-producing- *Escherichia coli* at retail poultry meat markets in Malaysia: a cross-sectional study. *BMC Public Health* [online]. **16**(1) [cit. 2023-04-05]. ISSN 1471-2458. Dostupné z: doi:10.1186/s12889-016-3377-2

ALLEN, Stephen D., Christopher L. EMERY a Jean A. SIDER, 2002. MALDI-TOF-MS. In: TRUANT, Allan L., ed. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology* [online]. Washington: American Society for Microbiology, s. 76-78 [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-1-55581-189-1. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00900W71/manual-commercial-methods/maldi-tof-ms>

ANONYM, 2003. Nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1831/2003. *Zákony pro lidi* [online]. Zlín: AION CS [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/pravo/eu/dokument?celex=32003R1831&date=20210327>

ANONYM, 2005. Nařízení Komise (ES) č. 2073/2005. *EUR-Lex* [online]. Lucemburk: Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 2023-04-16]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:02005R2073-20130701&from=EN>

ANONYM, 2008. Nařízení Komise (ES) č. 543/2008. *EUR-Lex* [online]. Lucemburk: Úřad pro publikace Evropské unie [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R0543&from=MT>

ANONYM, 2012. Vyhláška č. 418/2012 Sb.: Vyhláška o ochraně zvířat při usmrcování. *Zákony pro lidi* [online]. Zlín: AION CS [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: <https://www.zakonyprolidi.cz/cs/2012-418/zneni-20191209>

ANONYM, 2013. Waterfowl. *Encyclopedia Britannica* [online]. Chicago: Britannica [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <https://www.britannica.com/animal/waterfowl-bird>

ANONYM, 2017. ČSN P CEN ISO/TS 17728 (560100): *Mikrobiologie potravinového řetězce - Techniky odběru vzorků pro mikrobiologické zkoušení potravin a krmiv* [online]. Praha: Český normalizační institut [cit. 2023-04-05].

ANONYM, 2019. CLSI M100-ED29: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 29th Edition. *CLSI* [online]. Berwyn: Clinical and Laboratory Standards Institute [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <http://em100.edaptivedocs.net/PubSearch.aspx?text=Enterobacteriaceae>

ANONYM, 2022. Technical Data Sheet: Cephalothin. *HIMEDIA: for life is precious* [online]. Einhausen: HiMedia Laboratories [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: <https://www.himedialabs.com/eu/sd050-cephalothin-sd050.html>

ANONYM2, 2008. ČSN 56 9609: *Pravidla správné hygienické a výrobní praxe - Mikrobiologická kritéria pro potraviny. Principy stanovení a aplikace*. Praha: Český normalizační institut.

ANONYM2, 2013. ČSN EN ISO 13307 (560101): Mikrobiologie potravin a krmiv - Prvovýroba - Techniky odběru vzorků [online]. Praha: Česká agentura pro standardizaci [cit. 2023-04-05].

ARMAND-LEFÈVRE, L., A. ANDREMONT a E. RUPPÉ, 2018. Travel and acquisition of multidrug-resistant Enterobacteriaceae. *Médecine et Maladies Infectieuses* [online]. **48**(7), 431-441 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0399077X. Dostupné z: doi:10.1016/j.medmal.2018.02.005

ARYAL, Sagar, 2022. VRBA- Composition, Principle, Preparation, Results, Uses. *Microbenotes.com* [online]. Kathmandu: Microbe Notes [cit. 2023-05-01]. Dostupné z: <https://microbenotes.com/violet-red-bile-agar-vrba/>

ASHKENAZI, S., 2003. Growing antimicrobial resistance of Shigella isolates. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **51**(2), 427-429 [cit. 2023-04-05]. ISSN 14602091. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkg080

AYUKEKBONG, James A., Michel NTEMGWA a Andrew N. ATABE, 2017. The threat of antimicrobial resistance in developing countries: causes and control strategies. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* [online]. **6**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2047-2994. Dostupné z: doi:10.1186/s13756-017-0208-x

BANERJEE, Aparna a Surajit ACHARYYA, 2021. Prevalence of antibiotic resistance genes in Indian ducks: a comparative study between Deshi and Khaki Campbell ducks. *Exploratory Animal and Medical Research* [online]. **11**(1), 30-37 [cit. 2023-04-18]. ISSN 2319-247X. Dostupné z: doi:10.52635/EAMR/11.1.30-37

BAQUERO, Fernando et al., 2019. *Microbial Transmission* [online]. Washington: American Society for Microbiology [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-1-55581-973-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpMT000021/microbial-transmission/microbial-transmission>

BARBER, Mary a Mary ROZWADOWSKA-DOWZENKO, 1948. INFECTION BY PENICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCI. *The Lancet* [online]. **252**(6530), 641-644 [cit. 2023-04-04]. ISSN 01406736. Dostupné z: doi:10.1016/S0140-6736(48)92166-7

BASCO, Leonardo K., 2004. MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF MALARIA IN CAMEROON. XIX. QUALITY OF ANTIMALARIAL DRUGS USED FOR SELF-MEDICATION. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* [online]. **70**(3), 245-250 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0002-9637. Dostupné z: doi:10.4269/ajtmh.2004.70.245

BERRANG, M.E., R.J. MEINERSMANN a S.W. KNAPP, 2020. Presence of Bacterial Pathogens and Levels of Indicator Bacteria Associated with Duck Carcasses in a Commercial Processing Facility. *Journal of Food Protection* [online]. **83**(4), 605-608 [cit. 2023-05-05]. ISSN 0362028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X.JFP-19-397

BEVERIDGE, Terry J., John R. LAWRENCE a Robert G. E. MURRAY, 2007. Gram Staining. In: REDDY, C. A. et al., ed. *Methods for General and Molecular Microbiology* [online]. 3rd Edition. Washington: American Society for Microbiology, s. 25-27 [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-1-55581-223-2. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0090JFI8/methods-general-molecular/gram-staining>

BHATTACHARYYA, Bimal C. a Rintu BANERJEE, 2007. *Environmental Biotechnology* [online]. Oxford: Oxford University Press [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-0-19-568782-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEB000003/environmental-biotechnology/environmental-biotechnology>

BOEKHOUT, T. a V. ROBERT, ed., 2003. Maintenance and Storage of Cultures. In: *Yeasts in Food - Beneficial and Detrimental Aspects* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 92 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-85573-706-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C7JR22/yeasts-in-food-beneficial/maintenance-storage-cultures>

CALLIHAN, Donald R. a Frederick S. NOLTE, 1985. Disc diffusion method to screen for high-level resistance to clindamycin and erythromycin in the *Bacteroides fragilis* group. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* [online]. **3**(2), 131-137 [cit. 2023-04-15]. ISSN 07328893. Dostupné z: [doi:10.1016/0732-8893\(85\)90022-7](https://doi.org/10.1016/0732-8893(85)90022-7)

CARD, Roderick M. et al., 2015. Impact of Ciprofloxacin and Clindamycin Administration on Gram-Negative Bacteria Isolated from Healthy Volunteers and Characterization of the Resistance Genes They Harbor. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **59**(8), 4410-4416 [cit. 2023-04-15]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: [doi:10.1128/AAC.00068-15](https://doi.org/10.1128/AAC.00068-15)

CORRY, Janet E. L., Gordon D. W. CURTIS a Rosamund M. BAIRD, ed., 2012. *Handbook of Culture Media for Food and Water Microbiology* [online]. 3rd Edition. Cambridge: Royal Society of Chemistry [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-1-84755-916-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpHCMFWME3/handbook-culture-media/handbook-culture-media>

DE BOER, Enne, 2000. Classical and Modern Methods for Detection/Enumeration. In: ROBINSON, Richard K., ed. *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 610-616 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-0-12-227070-3. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051K661/encyclopedia-food-microbiology/classical-modern-methods>

DEALY, John M., Daniel J. READ a Ronald G. LARSON, 2018. Mass Spectrometry (MALDI-TOF). In: *Structure and Rheology of Molten Polymers - From Structure to Flow Behavior and Back Again* [online]. 2nd Edition. Munich: Hanser Publishers, s. 50-51 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-56990-611-8. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011I4EK3/structure-rheology-molten/mass-spectrometry-maldi>

DIKEMAN, Michael a Carrick DEVINE, 2014. *Encyclopedia of Meat Sciences* [online]. 2nd Edition. Amsterdam: Elsevier [cit. 2023-04-03]. ISBN 978-0-12-384731-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpEMSE0003/encyclopedia-meat-sciences/encyclopedia-meat-sciences>

DOHMEN, Wietske et al., 2017. Risk factors for ESBL-producing *Escherichia coli* on pig farms: A longitudinal study in the context of reduced use of antimicrobials. *PLOS ONE* [online]. **12**(3) [cit. 2023-04-18]. ISSN 1932-6203. Dostupné z: [doi:10.1371/journal.pone.0174094](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174094)

DONNENBERG, Michael S., 2015. Enterobacteriaceae. In: *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases* [online]. Eighth Edition. Amsterdam: Elsevier, 2503-2517.e5 [cit. 2023-04-04]. ISBN 9781455748013. Dostupné z: doi:10.1016/B978-1-4557-4801-3.00220-4

EVANGELISTA, Alan T., Allan L. TRUANT a Paul P. BOURBEAU, 2002. SELECTED MEMBERS OF THE FAMILY ENTEROBACTERIACEAE - Commercial Identification Methods for Escherichia coli. In: TRUANT, Allan L., ed. *Manual of Commercial Methods in Clinical Microbiology* [online]. Washington: American Society for Microbiology, s. 33-37 [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-1-55581-189-1. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00900UL1/manual-commercial-methods/rapid-systems-commercial-2>

FAROOQ, Muhammad et al., 2022. Antibiotic Resistance Genes Occurrence in Conventional and Antibiotic-Free Poultry Farming, Italy. *Animals* [online]. **12**(18) [cit. 2023-05-02]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani12182310

FASHAE, Kayode et al., 2021. Molecular characterisation of extended-spectrum β -lactamase producing Escherichia coli in wild birds and cattle, Ibadan, Nigeria. *BMC Veterinary Research* [online]. **17**(1) [cit. 2023-05-02]. ISSN 1746-6148. Dostupné z: doi:10.1186/s12917-020-02734-4

FERNÁNDEZ MÁRQUEZ, Maria Luisa et al., 2017. Biocide Tolerance and Antibiotic Resistance in Salmonella Isolates from Hen Eggshells. *Foodborne Pathogens and Disease* [online]. **14**(2), 89-95 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1535-3141. Dostupné z: doi:10.1089/fpd.2016.2182

GALHANO, Beatriz S. P. et al., 2021. Antimicrobial Resistance Gene Detection Methods for Bacteria in Animal-Based Foods: A Brief Review of Highlights and Advantages. *Microorganisms* [online]. **9**(5) [cit. 2023-04-09]. ISSN 2076-2607. Dostupné z: doi:10.3390/microorganisms9050923

GALLO, Giuseppe a Anna Maria PUGLIA, 2014. Antibiotics and Resistance: A Fatal Attraction. In: GUALERZI, Claudio O. et al. *Antibiotics: Targets, Mechanisms and Resistance*. Weinheim: Wiley-VCH, s. 73-101. ISBN 978-3-527-33305-9.

GARCIA, Lynne S., ed., 2010. *Clinical Microbiology Procedures Handbook, Volumes 1-3* [online]. 3rd Edition. Washington: American Society for Microbiology [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-55581-527-1. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpCMPHVE03/clinical-microbiology/clinical-microbiology>

GHERNA, Robert L., 2010. Culture Preservation. In: FLICKINGER, Michael C., ed. *Encyclopedia of Industrial Biotechnology, Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology, Volumes 1-7* [online]. Hoboken: Wiley, s. 1827-1831 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-0-471-79930-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0087OBHA/encyclopedia-industrial/culture-preservation>

GHOSH, Sudeshna a Timothy M LAPARA, 2007. The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* [online]. **1**(3), 191-203 [cit. 2023-04-18]. ISSN 1751-7362. Dostupné z: doi:10.1038/ismej.2007.31

GOODFELLOW, Michael, 2010. Selective isolation of Actinobacteria - Selection of Colonies. In: BALTZ, Richard H., Julian E. DAVIES a Arnold L. DEMAIN, ed. *Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology* [online]. 3rd Edition. Washington: American Society for Microbiology, s. 17-18 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-1-55581-512-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00907QX1/manual-industrial-microbiology/selection-colonies>

HASAN, Rumina et al., 2008. Antibiotic resistance among Salmonella enterica serovars Typhi and Paratyphi A in Pakistan (2001-2006). *The Journal of Infection in Developing Countries* [online]. **2**(04), 289-294 [cit. 2023-04-05]. ISSN 1972-2680. Dostupné z: doi:10.3855/jidc.224

HAŠČÍK, P. et al., 2008. Microbiological quality of the Anas platyrhynchos and the Fulica atra meat. *Slovak Journal of Animal Science* [online]. **41**(4), 190 - 194 [cit. 2023-05-06]. ISSN 1337-9984. Dostupné z: http://www.cvzv.sk/slju/08_4/Hascik.pdf

HAYES, Joshua R. et al., 2004. Multiple-Antibiotic Resistance of Enterococcus spp. Isolated from Commercial Poultry Production Environments. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **70**(10), 6005-6011 [cit. 2023-04-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.70.10.6005-6011.2004

HEROLD, Miloš et al., 1957. *Antibiotika*. Praha: Československá akademie věd.

HOCHVALDOVÁ, Lucie et al., 2022. Antibacterial nanomaterials: Upcoming hope to overcome antibiotic resistance crisis. *Nanotechnology Reviews* [online]. De Gruyter, **11**(1), 1115-1142 [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: doi:10.1515/ntrev-2022-0059

HRABĚ, Jan, 2007. *Technologie výroby potravin živočišného původu pro kombinované studium*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. ISBN 9788073185213.

HUANG, J.F. a C.C. LIN, 2011. Production, composition, and quality of duck eggs. In: NYS, Yves, Maureen BAIN a Filip Van IMMERSEEL, ed. *Improving the Safety and Quality of Eggs and Egg Products: Egg Chemistry: Egg Chemistry, Production and Consumption* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 487-491 [cit. 2023-04-03]. ISBN 978-1-84569-754-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010XQFB6/improving-safety-quality/production-introduction>

HUDSON, John A. et al., 2017. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. *Trends in Food Science & Technology* [online]. **69**(Part A), 131-147 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0924-2244. Dostupné z: doi:10.1016/j.tifs.2017.09.007

CHANTZIARAS, I. et al., 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **69**(3), 827-834 [cit. 2023-04-04]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkt443

CHEN, I-Min A et al., 2023. The IMG/M data management and analysis system v.7: content updates and new features. *Nucleic Acids Research* [online]. **51**(D1), D723-D732 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0305-1048. Dostupné z: doi:10.1093/nar/gkac976

CHOVANEC, Peter, Partha BASU a John F. STOLZ, 2011. Isolation, Characterization, and Proteomic Studies on Pure Cultures. In: STOLZ, John F. a Ronald S. OREMLAND, ed. *Microbial Metal and Metalloid Metabolism - Advances and Applications* [online]. Washington: American Society for Microbiology, s. 252-253 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-55581-536-3. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0097N4B5/microbial-metal-metalloid/isolation-characterization>

KAPOOR, Garima, Saurabh SAIGAL a Ashok ELONGAVAN, 2017. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology* [online]. **33**(3) [cit. 2023-04-04]. ISSN 0970-9185. Dostupné z: doi:10.4103/joacp.JOACP_349_15

KAUSHIK, Megha et al., 2018. Integrons in Enterobacteriaceae: diversity, distribution and epidemiology. *International Journal of Antimicrobial Agents* [online]. **51**(2), 167-176 [cit. 2023-04-04]. ISSN 09248579. Dostupné z: doi:10.1016/j.ijantimicag.2017.10.004

KLEIN, Eili Y. et al., 2018. Global increase and geographic convergence in antibiotic consumption between 2000 and 2015. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. **115**(15), e3463–e3470 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.1717295115

KRISHNASAMY, Vikram, Joachim OTTE a Ellen SILBERGELD, 2015. Antimicrobial use in Chinese swine and broiler poultry production. *Antimicrobial Resistance and Infection Control* [online]. **4**(1) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2047-2994. Dostupné z: doi:10.1186/s13756-015-0050-y

LEIBLOVÁ, Jitka, 2021. Drůbež – drůbeží maso a vejce. *Situační a výhledová zpráva* [online]. **5** [cit. 2023-04-03]. ISSN 1211-7692. Dostupné z: https://www.akcr.cz/data_ak/21/k/DaV/DaV_SVZ_2021.pdf

LIU, Yuhong et al., 2020. Antibiotic Resistance Genes in Antibiotic-Free Chicken Farms. *Antibiotics* [online]. **9**(3) [cit. 2023-05-02]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics9030120

MA, Junying et al., 2012. Characterization of Extended-Spectrum β -Lactamase Genes Found among *Escherichia coli* Isolates from Duck and Environmental Samples Obtained on a Duck Farm. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **78**(10), 3668-3673 [cit. 2023-04-18]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.07507-11

MAO, Ningtao, 2019. Feather and Down Fibres. In: ROSHAN, Paul, ed. *High Performance Technical Textiles* [online]. Hoboken: Wiley, s. 116-118 [cit. 2023-04-04]. ISBN 978-1-11932-5-017. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0125KXR4/high-performance-technical/feather-down-fibres>

MARTINEZ, Jose L., 2014. General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discovery Today: Technologies* [online]. **11**, 33-39 [cit. 2023-04-04]. ISSN 17406749. Dostupné z: doi:10.1016/j.ddtec.2014.02.001

MATTHEWS, Karl, Kalmia E. KNIEL a Thomas J. MONTVILLE, 2017. Microbial Growth, Survival, and Death in Foods. In: *Food microbiology: an introduction* [online]. Fourth edition. Washington, DC: American Society for Microbiology, s. 13-48 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-1-55-581938-5. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011EDJB2/food-microbiology-an/microbial--introduction>

MAZIŃSKA, Beata a Waleria HRYNIEWICZ, 2020. Antimicrobial Resistance: Causes And Consequences. *Postępy Mikrobiologii - Advancements of Microbiology* [online]. **59**(3), 249-257 [cit. 2023-04-04]. ISSN 2545-3149. Dostupné z: doi:10.21307/PM-2020.59.3.18

MAZUREK, Justyna et al., 2013. The Phenotypic and Genotypic Characteristics of Antibiotic Resistance in Escherichia coli Populations Isolated from Farm Animals with Different Exposure to Antimicrobial Agents. *Polish Journal of Microbiology* [online]. **62**(2), 173–179 [cit. 2023-05-03]. Dostupné z: <http://www.pjmonline.org/wp-content/uploads/archive/vol6222013173.pdf>

MEAD, G.C., 2004. *Poultry Meat Processing and Quality* [online]. Sawston: Woodhead Publishing [cit. 2023-04-03]. ISBN 978-1-85573-727-3. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPMPQ0007/poultry-meat-processing/poultry-meat-processing>

MIRANDA, J.M. et al., 2008. Antimicrobial resistance in Enterobacteriaceae strains isolated from organic chicken, conventional chicken and conventional turkey meat: A comparative survey. *Food Control* [online]. **19**(4), 412-416 [cit. 2023-05-06]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2007.05.002

MØLBAK, Kåre et al., 1999. An Outbreak of Multidrug-Resistant, Quinolone-Resistant Salmonella enterica Serotype Typhimurium DT104. *New England Journal of Medicine* [online]. **341**(19), 1420-1425 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0028-4793. Dostupné z: doi:10.1056/NEJM199911043411902

O'BRYAN, C.A. et al., 2015. Agar Well Diffusion Assay. In: TAYLOR, T. M., ed. *Handbook of Natural Antimicrobials for Food Safety and Quality* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 139 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-78242-034-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00U8RG52/handbook-natural-antimicrobials/agar-well-diffusion-assay>

O'NEILL, Jim, 2016. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations. *The Review on Antimicrobial Resistance* [online]. London: The Review on Antimicrobial Resistance [cit. 2023-04-04]. Dostupné z: https://amr-review.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf

OJER-USOZ, Elena et al., 2013. Prevalence of extended-spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat Science* [online]. **93**(2), 316-321 [cit. 2023-05-06]. ISSN 03091740. Dostupné z: doi:10.1016/j.meatsci.2012.09.009

OKEKE, Iruka N., Adebayo LAMIKANRA a Robert EDELMAN, 1999. Socioeconomic and Behavioral Factors Leading to Acquired Bacterial Resistance to Antibiotics in Developing Countries. *Emerging Infectious Diseases* [online]. **5**(1), 18-27 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1080-6040. Dostupné z: doi:10.3201/eid0501.990103

- OM, Chhorvoin a Mary-Louise MCLAWS, 2016. Antibiotics: practice and opinions of Cambodian commercial farmers, animal feed retailers and veterinarians. *Antimicrobial Resistance & Infection Control* [online]. **5**(1) [cit. 2023-05-02]. ISSN 2047-2994. Dostupné z: doi:10.1186/s13756-016-0147-y
- PENG, Shuang et al., 2022. Distribution of antibiotic, heavy metals and antibiotic resistance genes in livestock and poultry feces from different scale of farms in Ningxia, China. *Journal of Hazardous Materials* [online]. **440** [cit. 2023-05-03]. ISSN 03043894. Dostupné z: doi:10.1016/j.jhazmat.2022.129719
- PIPEK, Petr. *Základy technologie masa*. Vyškov: VVŠ PV Vyškov, 1998. ISBN 80-7231-010-0.
- POIREL, Laurent et al., 2005. Origin of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance Determinant QnrA. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* [online]. **49**(8), 3523-3525 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0066-4804. Dostupné z: doi:10.1128/AAC.49.8.3523-3525.2005
- POKORNÝ, Zbyněk, 2013. Kachna pekingská. In: *Chovzvirat.cz* [online]. [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: <http://www.chovzvirat.cz/zvire/812-kachna-pekingska/>
- RANDALL, L. P. et al., 2010. Prevalence of Escherichia coli carrying extended-spectrum - lactamases (CTX-M and TEM-52) from broiler chickens and turkeys in Great Britain between 2006 and 2009. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* [online]. **66**(1), 86-95 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0305-7453. Dostupné z: doi:10.1093/jac/dkq396
- REYNOLDS, Jackie, 2021. Kirby-Bauer: Antibiotic Sensitivity. *LibreTexts: Biology* [online]. San Diego: NICE CXone Expert [cit. 2023-04-15]. Dostupné z: [https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/09%3AKirby-Bauer_\(Antibiotic_Sensitivity\)#title](https://bio.libretexts.org/Learning_Objects/Laboratory_Experiments/Microbiology_Labs/Microbiology_Labs_I/09%3AKirby-Bauer_(Antibiotic_Sensitivity)#title)
- RHOUMA, Mohamed et al., 2021. Antimicrobial resistance associated with the use of antimicrobial processing aids during poultry processing operations: cause for concern?. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. **61**(19), 3279-3296 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1798345
- ROCK, C. a M.S. DONNENBERG, 2014. Human Pathogenic Enterobacteriaceae. *Reference Module in Biomedical Sciences* [online]. Amsterdam: Elsevier [cit. 2023-04-04]. ISBN 9780128012383. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-801238-3.00136-7
- RODENBURG, Teunis Bastiaan et al., 2005. Welfare of ducks in European duck husbandry systems. *World's Poultry Science Journal* [online]. **61**(4), 633-646 [cit. 2023-04-03]. Dostupné z: doi:10.1079/WPS200575
- ROMANDINI, Alessandra et al., 2021. Antibiotic Resistance in Pediatric Infections: Global Emerging Threats, Predicting the Near Future. *Antibiotics* [online]. **10**(4) [cit. 2023-04-05]. ISSN 2079-6382. Dostupné z: doi:10.3390/antibiotics10040393
- SALEH, Nadine et al., 2015. Evaluation of antibiotic prescription in the Lebanese community: a pilot study. *Infection Ecology & Epidemiology* [online]. **5**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 2000-8686. Dostupné z: doi:10.3402/iee.v5.27094

SALERNO, Barbara et al., 2022. Antibiotic resistance genes load in an antibiotic free organic broiler farm. *Poultry Science* [online]. **101**(3) [cit. 2023-05-02]. ISSN 00325791. Dostupné z: doi:10.1016/j.psj.2021.101675

SANDLE, Tim, 2016. *Pharmaceutical Microbiology - Essentials for Quality Assurance and Quality Control* [online]. Amsterdam: Elsevier [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-0-08-100022-9. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/toc/id:kpPMEQAQC3/pharmaceutical-microbiology/pharmaceutical-microbiology>

SHERWANI, Sikandar Khan et al., 2013. Antibiotic resistance issues in Clinical Pathogens: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* [online]. **4**(5), 1725-1729 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0975-8232. Dostupné z: https://www.academia.edu/3588970/Antibiotic_resistance_issues_in_clinical_pathogens_A_Review

SCHMIDT, John W. et al., 2015. Occurrence of Antimicrobial-Resistant Escherichia coli and Salmonella enterica in the Beef Cattle Production and Processing Continuum. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. **81**(2), 713-725 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0099-2240. Dostupné z: doi:10.1128/AEM.03079-14

SCHRIJVER, R. et al., 2018. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. *Clinical Microbiology and Infection* [online]. **24**(6), 577-590 [cit. 2023-04-04]. ISSN 1198743X. Dostupné z: doi:10.1016/j.cmi.2017.09.013

SIEGRIST, J. et al., 2015. MALDI-TOF Mass Spectroscopy. In: HILL, Annie E., ed. *Brewing Microbiology - Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* [online]. Amsterdam: Elsevier, s. 311-312 [cit. 2023-04-07]. ISBN 978-1-78242-331-7. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00ULXM51/brewing-microbiology/maldi-tof-mass-spectroscopy>

SIMEONOVÁ, Jana. *Technologie drůbeže, vajec a minoritních živočišných produktů*. Brno: Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 1999. ISBN 80-7157-405-8.

SMITH, Kenneth, 2019. The Origin of MacConkey Agar. *American Society for Microbiology* [online]. Washington: American society for microbiology [cit. 2023-04-30]. Dostupné z: <https://asm.org/Articles/2019/October/The-Origin-of-MacConkey-Agar>

SONG-NICHOLS, Koby a Katie KONSTANTOPOULOS, 2023. Duck & diaspora: eating dialectically in a settler-colonial food system. *Food Culture & Society* [online]. 1-19 [cit. 2023-04-03]. ISSN 1552-8014. Dostupné z: doi:10.1080/15528014.2023.2169503

SRINIVAS, Jampala et al., 2015. Skin and Soft Tissue Infections due to Shewanella algae – An Emerging Pathogen. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. **9**(2), 16-20 [cit. 2023-04-04]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2015/12152.5585.

STOCKWELL, V.O. a B. DUFFY, 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE* [online]. **31**(1), 199-210 [cit. 2023-04-05]. ISSN 0253-1933. Dostupné z: doi:10.20506/rst.31.1.2104

TENOVER, Fred C., 2006. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* [online]. **119**(6), S3-S10 [cit. 2023-04-04]. ISSN 00029343. Dostupné z: doi:10.1016/j.amjmed.2006.03.011

TESKE, Andreas et al., 2007. ISOLATION. In: REDDY, C. A. et al., ed. *Methods for General and Molecular Microbiology* [online]. 3rd Edition. Washington: American Society for Microbiology, s. 238-246 [cit. 2023-04-08]. ISBN 978-1-55581-223-2. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0090JTQ1/methods-general-molecular/isolation-microcolony>

TYLŠOVÁ, Petra, Karolína HÁSKOVÁ a Šárka BURSOVÁ, 2017. *Vyhodnocení výsledků plotnových metod* [online]. Brno: Veterinární a farmaceutická univerzita [cit. 2023-04-24]. Dostupné z: https://www.vfu.cz/files/2340_54_01_vyhodnoceni-vysledku-plotnovych-metod_text.pdf

UWIZEYIMANA, Jean Damascene et al., 2020. Determination of Colistin Resistance by Simple Disk Diffusion Test Using Modified Mueller-Hinton Agar. *Annals of Laboratory Medicine* [online]. **40**(4), 306-311 [cit. 2023-04-15]. ISSN 2234-3806. Dostupné z: doi:10.3343/alm.2020.40.4.306

UZEH, Roseline Ekiomado, Fadekemisola ADEWUMI a Bamidele Tolulope ODUMOSU, 2021. Antibiotic resistance and plasmid analysis of Enterobacteriaceae isolated from retail meat in Lagos Nigeria. *One Health Outlook* [online]. **3**(1) [cit. 2023-05-06]. ISSN 2524-4655. Dostupné z: doi:10.1186/s42522-021-00042-x

WANG, Jing et al., 2017. The role of wildlife (wild birds) in the global transmission of antimicrobial resistance genes. *Zoological research* [online]. **38**(2), 55-80 [cit. 2023-05-02]. ISSN 2095-8137. Dostupné z: doi:10.24272/j.issn.2095-8137.2017.003

WEI, Ruicheng et al., 2011. Occurrence of veterinary antibiotics in animal wastewater and surface water around farms in Jiangsu Province, China. *Chemosphere* [online]. **82**(10), 1408-1414 [cit. 2023-04-05]. ISSN 00456535. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemosphere.2010.11.067

WILSON, Godwin et al., 2006. Isolation & antimicrobial susceptibility of Shigella from patients with acute gastroenteritis in western Nepal. *Indian Journal of Medical Research* [online]. **123**(2), 145-150 [cit. 2023-04-05]. Dostupné z: https://www.academia.edu/63254763/Isolation_and_antimicrobial_susceptibility_of_Shigella_from_patients_with_acute_gastroenteritis_in_Western_Nepal

WOLFAARDT, Gideon M., Darren R. KORBER a John R. LAWRENCE, 2007. Cultivation of Microbial Consortia and Communities. In: HURST, Christon J. et al., ed. *Manual of Environmental Microbiology* [online]. 3rd Edition. Washington: American Society for Microbiology, s. 101-103 [cit. 2023-04-05]. ISBN 978-1-55581-379-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0090WAY2/manual-environmental/pure-cultures>

WRIGHT, Gerard D, 2010. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it?. *BMC Biology* [online]. **8**(1) [cit. 2023-04-04]. ISSN 1741-7007. Dostupné z: doi:10.1186/1741-7007-8-123

ZHAO, Ling, Yuan Hua DONG a Hui WANG, 2010. Residues of veterinary antibiotics in manures from feedlot livestock in eight provinces of China. *Science of The Total Environment* [online]. **408**(5), 1069-1075 [cit. 2023-04-05]. ISSN 00489697. Dostupné z: doi:10.1016/j.scitotenv.2009.11.014

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

| | |
|-----------|--|
| CFU | Kolonie tvořící jednotka |
| ESVAC | European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption |
| I | Intermediární |
| MALDI-TOF | Matricí asistovaná laserová desorpce/ionizace s detektorem doby letu |
| MH agar | Müller-Hinton agar |
| R | Rezistentní |
| S | Citlivé |
| VRBA | Violet Red Bile Agar |
| VRBG | Violet Red Bile Glucose Agar |
| VRBL | Violet Red Bile Lactose Agar |

SEZNAM OBRÁZKŮ

| | |
|---|----|
| Obrázek 1 Kachna pekingská (Pokorný, 2013) | 12 |
| Obrázek 2 Kachna pižmová s kachňaty (foto autora)..... | 13 |
| Obrázek 3 Husy české bílé (foto autora) | 15 |
| Obrázek 4 Příklad Endo agaru s nárůstem kolonií před jejich odebráním (foto autora) | 53 |
| Obrázek 5 Příklad preparátu při kontrole čistoty za použití Gramova barvení (foto autora) | 54 |
| Obrázek 6 Příklad nárůstu při diskové difuzní metodě (foto autora) | 57 |
| Obrázek 7 Celkový počet mikroorganismů u vzorků kachního masa | 59 |
| Obrázek 8 Celkový počet mikroorganismů u stěrů z peří | 60 |
| Obrázek 9 Celkový počet mikroorganismů u vzorků chladicí vody | 60 |
| Obrázek 10 Celkový počet mikroorganismů u vzorků napájecí vody..... | 61 |
| Obrázek 11 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků kachního masa | 62 |
| Obrázek 12 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u stěrů z peří | 62 |
| Obrázek 13 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků chladicí vody | 63 |
| Obrázek 14 Nárůst všech mikroorganismů a koliformů na Endo agaru u vzorků napájecí vody | 63 |
| Obrázek 15 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků masa | 65 |
| Obrázek 16 Zastoupení izolovaných bakterií ze stěrů peří..... | 66 |
| Obrázek 17 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků napájecí vody | 66 |
| Obrázek 18 Zastoupení izolovaných bakterií ze vzorků napájecí vody | 67 |
| Obrázek 19 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Escherichia coli</i> izolovaných ze vzorků kachního masa..... | 68 |
| Obrázek 20 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Serratia marcescens</i> izolovaných ze vzorků kachního masa | 69 |
| Obrázek 21 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Escherichia coli</i> izolovaných ze vzorků peří | 71 |
| Obrázek 22 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Raoultella ornithinolytica</i> izolovaných ze vzorků peří | 71 |
| Obrázek 23 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Escherichia coli</i> izolovaných ze vzorků chladicí vody..... | 74 |
| Obrázek 24 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Escherichia coli</i> izolovaných ze vzorků napájecí vody | 76 |

SEZNAM TABULEK

| | |
|--|----|
| Tabulka 1 Antibiotika použitá při diskové difuzní metodě | 58 |
| Tabulka 2 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Proteus mirabilis</i> izolovaných ze vzorků kachního masa..... | 69 |
| Tabulka 3 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>cloacae</i> a <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> izolovaných ze vzorků kachního masa | 70 |
| Tabulka 4 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Enterobacter ludwigii</i> , <i>Enterobacter cloacae</i> subsp. <i>dissolvens</i> a <i>Enterobacter kobei</i> izolovaných ze vzorků peří | 72 |
| Tabulka 5 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Klebsiella pneumoniae</i> a <i>Klebsiella oxytoca</i> izolovaných ze vzorků peří | 73 |
| Tabulka 6 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Pantoea citrea</i> izolovaných ze vzorků peří | 74 |
| Tabulka 7 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Enterobacter cloacae</i> izolovaných ze vzorků chladicí vody..... | 75 |
| Tabulka 8 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Leclercia adecarboxylata</i> izolovaných ze vzorků chladicí vody..... | 75 |
| Tabulka 9 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Raoultella ornithinolytica</i> izolovaných ze vzorků chladicí vody..... | 76 |
| Tabulka 10 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Citrobacter gillenbergii</i> izolovaných ze vzorků napájecí vody | 77 |
| Tabulka 11 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Enterobacter cloacae</i> a <i>Enterobacter ludwigii</i> izolovaných ze vzorků napájecí vody..... | 77 |
| Tabulka 12 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Klebsiella oxytoca</i> izolovaných ze vzorků napájecí vody | 78 |
| Tabulka 13 Citlivost k testovaným antibiotikům u <i>Raoultella ornithinolytica</i> izolovaných ze vzorků napájecí vody | 78 |

