

JIHOČESKÁ UNIVERZITA V ČESKÝCH BUDĚJOVICÍCH
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA



**Šíření bakteriální rezistence k tetracyklinovým
antibiotikům z chovu hospodářských zvířat do půdního
prostředí**

Bakalářská práce

Petra Havlíčková

Vedoucí práce: RNDr. Dana Elhottová, PhD.

Konzultantka práce: Mgr. Martina Kyselková, PhD.

České Budějovice 2011

Havlíčková, P., 2011: Šíření bakteriální rezistence k tetracyklinovým antibiotikům z chovu hospodářských zvířat do půdního prostředí [Dissemination of bacterial resistance to tetracycline antibiotics from animal husbandry to the soil. Bc thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Předkládaná práce se zabývá výskytem tetracyklin rezistenčních genů v půdním prostředí ovlivněném odpady z živočišné výroby. V experimentální části práce byl sledován přenos tetracyklin rezistenčních genů z exkrementů mléčného skotu do půdy.

Annotation:

This bachaleor thesis is dedicated to occurence of tetracycline resistance genes in the soil environment influenced by wastes from livestock production. In the experimental part, the transfer of tetracycline resistance genes from the excrements of a dairy cattle to the soils was studied.

Prohlašuji, že jsem vypracovala svoji bakalářskou práci samostatně, pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne 13.12. 2011

.....
Petra Havlíčková

Poděkování:

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svojí školitelce RNDr. Daně Elhottové Ph.D. za možnost práce na zajímavém tématu, za šanci prezentovat svoje výsledky na vědeckých konferencích, za poskytnutí cenných rad, za její podporu, trpělivost, ochotu a čas. Velký dík patří také Mgr. Martině Kyselkové Ph.D. za odborné vedení při práci v laboratoři, za přátelský přístup a trpělivost. Tímto také děkuji ostatním pracovníkům Ústavu půdní biologie, kteří mi během práce v laboratoři ochotně pomáhali. V neposlední řadě děkuji své rodině a přátelům za morální a psychickou podporu. Bakalářská práce byla finančně podporována projektem Grantové agentury GAČR P504/10/2077 s názvem *Charakteristika a hodnocení rizik spojených s rezervoáry antibiotické rezistence v půdě*, a z části také grantem MŠMT ČR (LC06066) *Centra environmentální mikrobiologie*.

OBSAH

1. Úvod a cíle práce.....	1
2. Literární rešerše	
2.1. Antimikrobiální látky a tetracyklinová antibiotika.....	2
2.2. Antibiotická rezistence.....	5
2.3. Mechanismy tetracyklinové rezistence.....	7
2.4. Šíření tetracyklinové rezistence.....	12
2.5. Rezervoáry tetracyklinové rezistence v prostředí.....	13
2.6. Geny způsobující rezistenci k tetracyklinu v intestinálním traktu zvířat, v živočišných odpadech, v půdě ovlivněné člověkem.....	14
2.7. Metody detekce genů způsobujících rezistenci k tetracyklinu.....	24
3. Experimentální část	
3.1. Uspořádání pokusu a pokusný materiál.....	25
3.2. Polymerázová řetězová reakce.....	27
3.3. Elektroforéza.....	33
3.4. Gelová elektroforéza.....	33
4. Výsledky.....	35
5. Diskuse.....	38
6. Závěr.....	40
7. Seznam použité literatury.....	41

Seznam zkratk:

AMK řetězec	Aminokyselinový řetězec
AT pár	Komplementární pár adenin-thymin
ATB	Antibiotika
<i>atb-r</i> geny	Rezistenční geny k různým antibiotikům
ATB-rezistence	Antibiotiková rezistence
BSA	Hovězí sérový albumin (Bovine Serum Albumine)
dATP	Deoxyadenosintrifosfát
dCTP	Deoxycytidintrifosfát
dGTP	Deoxyguanosintrifosfát
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
dTTP	Deoxythimidintrifosfát
EDTA	Kyselina ethylendiamintetraoctová
GC pár	Komplementární pár bází guanin-cytosin
HGP	Horizontální genový přenos
IT	Intestinální trakt zvířat
<i>otr</i> -geny	Tetracyklin rezistenční geny přirozených producentů antibiotik
PRP	Proteiny ribozomální protekce
Rezistom	Skupina rezistenčních genů v určitém prostředí
RNA	Ribonukleová kyselina
TAE pufr	40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0
Taq-polymeráza	Termostabilní DNA polymeráza bakterie <i>Thermus aquaticus</i>
TET-r	Rezistence (odolnost) k tetracyklinovým antibiotikům
<i>tet-r</i>	Tetracyklinová rezistence na úrovni genů
<i>tet-r</i> geny	Tetracyklin rezistenční geny
Tet-proteiny	Efluxní pumpy, proteiny ribozomální protekce, enzymy inaktivující tetracyklinová antibiotika
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Triton X-100	$C_{14}H_{22}O(C_2H_4O)_n$
ŽO	Živočišné odpady

1. Úvod a cíle práce

Zabránění šíření antibiotické rezistence (ATB-rezistence) potravním řetězcem patří mezi současné priority, k jejichž řešení je nezbytný také intenzivní ekologický výzkum. Mezi rizika šíření bakteriální rezistence nepochybně patří vstupy ATB-rezistentních mikroorganismů do prostředí formou živočišných odpadů. V běžné praxi nedochází k separaci exkrementů zvířat ošetřených antibiotiky (ATB) od ostatních. Je otázkou, jak nestrávená ATB ovlivňují fekální mikroflóru a následně i půdní mikroflóru, pokud se živočišné odpady dostanou formou hnojení do půd. Předkládaná práce se soustředí na bakteriální rezistence k tetracyklinovým antibiotikům (TET-r), jejichž aplikace je spojená s více než padesátiletou praxí v živočišné výrobě.

Cílem práce bylo (i) získání a zhodnocení literárních dat týkajících se problematiky výskytu a šíření tetracyklin rezistenčních genů (*tet-r* genů) v prostředí, zejména v půdách hnojených odpady z živočišné výroby; (ii) osvojení metodiky detekce *tet-r* genů ve vzorcích půdy a živočišných exkrementech a (iii) detekce *tet-r* genů v modelovém pokusu sledujícím přenos a perzistenci *tet-r* genů z exkrementu skotu léčeného tetracyklinovými antibiotiky do půdy.

Pracovní hypotéza:

Množství i pestrost (diverzita) *tet-r* genů v prostředí se bude zvyšovat v závislosti na selekčním vlivu tetracyklinových antibiotik a na diverzitě bakteriálního společenstva prostředí schopného sdílet, co nejpestřejší *tet-r* rezistom. Fekální bakteriální společenstvo je zdrojem *tet-r* genů obohacující rezistom bakteriálního společenstva půd.

2. Literární rešerše

2.1. Antimikrobiální látky a tetracyklinová antibiotika

Antimikrobiální látky jsou přírodní nebo synteticky vyrobené chemické sloučeniny, které zabíjí nebo zamezují růstu mikroorganismů. ATB jsou podskupinou antimikrobiálních látek původně považovanou za přírodní preparáty. Strategie vývoje ATB je charakterizována přechodem od izolace ATB z kultur nejrůznějších druhů mikroorganismů přes biosyntézu až po jejich chemickou syntézu. Některé druhy ATB jsou tedy vyráběny zcela synteticky (Bednář *et al.*, 1996). Přesné rozdělení antimikrobiálních látek je zobrazeno v tabulce I.

Tab.I: Antimikrobiální látky (Madigan *et* Martinko, 2006).

Antimikrobiální látky	Pro vnější použití	syntetické prostředky	Sterilanty a dezinfekční prostředky
	Pro vnitřní použití	syntetické léky	Analogy růstových faktorů a chinolony
		přírodní a syntetické léky	Antibiotika

Za objevitele prvního ATB, je považován skotský bakteriolog Alexander Fleming, který v roce 1928 popsal antimikrobiální účinky plísně *Penicillium notatum* na bakteriální kulturu *Staphylococcus aureus*. Stal se tedy objevitelem penicilinu, který však vstoupil do klinické praxe až o 14 let později (Geddes *et al.*, 2008).

ATB mají různou strukturu, působí pouze na několika místech bakteriální buňky, takže způsobů účinku je omezený počet. Příklady působení ATB v bakteriální buňce jsou uvedeny v tabulce II.

Tab. II: Příklady působení ATB v bakteriální buňce (Madigan *et* Martinko, 2006).

Působení antibiotik v bakteriální buňce	Příklady antibiotik
Inhibice syntézy buněčné stěny	Cykloserin, Bacitracin, Vankomycin, Beta-laktamová ATB (Peniciliny, Cefalosporiny, Monobaktamy)
Inhibice proteosyntézy	Aminoglykosidy (Streptomycin), Tetracykliny (Doxycyklin), Chloramfenikol, Makrolidy (Erytromycin), Spectinomycin
Inhibice syntézy nukleových kyselin (DNA, RNA)	Inhibitory RNA polymerázy (Rifampicin), Chinolony (Ciprofloxacín)
Inhibice metabolismu kyseliny listové	Sulfonamidy, Trimethoprim

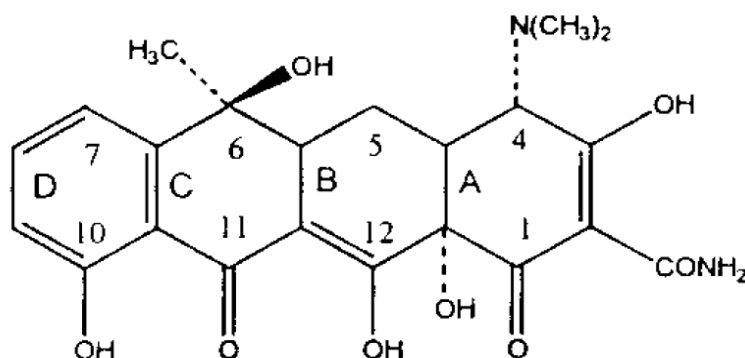
Tetracyklinová ATB se řadí mezi další významné objevy ATB nedlouho po objevu penicilinů. Mezi prvními byl objeven chlortetracyklin a oxytetracyklin (tabulka III), které jsou produkovány mikroorganismy *Streptomyces aureofaciens* a *Streptomyces rimosus*. Mezi tetracyklinová ATB přirozeně produkováná patří dále tetracyklin (*S.aureofaciens*, *S. rimosus* a *S.viridofaciens*) a demethylchlortetracyklin (*S.aureofaciens*), mezi vyráběná polysynteticky patří methacyklin, doxycyklin a minocyklin (Chopra, 1994). Rolitetracykliny a limecykliny byly syntetizované později pro lepší rozpustnost ve vodě a pro lepší vstřebávání v těle. Nedávno objevenou skupinou tetracyklinů byly glycylycykliny (Chopra *et* Roberts, 2001). Přehled všech generací tetracyklinů se nachází v tabulce III.

Tab.III: Zařazení jednotlivých tetracyklinových ATB do příslušné generace (Chopra *et* Roberts, 2001).

Generace	Antibiotikum	Rok objevení
1.generace	Chlortetracyklin	1948
	Oxytetracyklin	1948
	Tetracyklin	1953
	Demethylchlortetracyklin	1957
	Rolitetracyklin	1958
	Limecyklin	1961
	Clomocyklin	1963
2.generace	Methacyklin	1965
	Doxycyklin	1967
	Minocyklin	1972
3.generace	Tigecyklin	1993

Tetracykliny jsou širokospektrální ATB vykazující aktivitu proti grampozitivním i gramnegativním bakteriím, chlamydiím, mycoplasmatům a parazitickým prvokům. Příznivé antimikrobiální vlastnosti a absence některých vedlejších účinků vedly k intenzivnímu terapeutickému využívání těchto látek při léčbě lidských i zvířecích infekcí. Tetracykliny jsou také užívány např. jako prevence proti malárii a v některých státech, včetně USA, jsou přidávány v subterapeutických dávkách do krmiva zvířatům jako růstové stimulanty (Chopra *et* Roberts, 2001).

Obecná struktura tetracyklinových antibiotik je zobrazena na obrázku 1. Zahrnuje vysoce stabilní tetracyklické jádro, ke kterému jsou připojeny funkční skupiny. Vlastnosti důležité pro antimikrobiální aktivitu tetracyklinů jsou: zachování lineárního tetracyklického jádra, přirozeně se vyskytující α – stereochemická konfigurace v polohách 4A, 12A, dimethylaminoskupina v pozici 4 a konzervace keto-enol systému (11, 12, 12a) v blízkosti fenolického D kruhu (Chopra *et Roberts*, 2001).



Obr.1: Struktura tetracyklinu (Chopra *et Roberts*, 2001).

Tetracyklinové ATB působí bakteriostaticky, jako blokátor translace. Do buňky proniká přes buněčnou stěnu a cytoplazmatickou membránu aktivním transportem. Uvnitř mikroorganismu se váže na malou ribozomální podjednotku (30 S), kde brání vazbě tRNA k ribozomálnímu akceptoru – A místu. Nemůže tedy dojít k přidání aminokyselin (AMK) do vznikajícího polypeptidového řetězce, dochází k zastavení proteosyntézy a dalšího růstu bakterie (Manavathu *et al.*, 1990).

2.2. Antibiotická rezistence

Rezistenci (odolnost) bakterií k ATB lze definovat, jako schopnost bakteriální populace přežít účinek inhibiční koncentrace příslušného ATB (Levy *et al.*, 1998).

Minimální inhibiční koncentrace je nejmenší koncentrace ATB v živné půdě, která zabrání viditelnému růstu naočkované kultury (Bednář *et al.*, 1996).

Rezistenci k tetracyklinu (TET-r) a dalším ATB můžeme rozdělit do dvou typů, jako přirozenou nebo získanou (Bednář *et al.*, 1996).

Přirozená rezistence je typická pro mikroorganismy, kterým chybí cílové místo účinku ATB, například mycoplasmata nemají buněčnou stěnu a jsou tudíž přirozeně rezistentní k penicilinu (<http://en.wikipedia.org/wiki/Mycoplasma>). Přirozeně rezistentní jsou také mikroorganismy produkující ATB, u nich zodpovídají za rezistenci proteiny kódované příslušnými geny. Mezi geny zodpovědnými za přirozenou *tet-r* patří *otr(A)* a *otr(B)*, které jsou přítomny u rodu *Streptomyces*, producentů tetracyklinu a oxytetracyklinu (Alonso *et al.*, 2001; Roberts *et al.*, 2005). Oba geny *otr(B)* i *otr(A)* jsou nesené chromozomální DNA (Alonso *et al.*, 2001). Produktem genu *otr(A)* jsou proteiny sloužící k aktivnímu vypuzování ATB, tzv. efluxní proteiny, umožňují snížení koncentrace ATB v buňce. Produktem genu *otr(B)* jsou proteiny sloužící k ochraně ribozomu před působením ATB, tzv. proteiny ribozomální protekce (PRP), modifikují cílové místo účinku ATB. Genů zodpovědných za získané typy *tet-r* je mnoho, mezi jejich produkty patří enzymy způsobující inaktivaci ATB, PRP, efluxní pumpy (Hogan *et al.*, 2002). Detaily uvádí následující kapitola.

Nové genové determinanty ATB-rezistence buňka získá mutací vlastní DNA nebo přijetím cizorodé DNA. Trieber *et al.* (2002) identifikovali mutaci v 16S rRNA genu z izolátu *Helicobacter pylori*, která způsobuje TET-r změnou vazného místa pro ATB. Mutace v regulátorech a regulačních oblastech mohou přispět k ATB-rezistenci vedoucí k nadprodukcii rezistenčních determinant, jako jsou efluxní pumpy (Beinlich *et al.*, 2001). Mikroorganismus může získat DNA nesoucí geny rezistence pomocí procesu bakteriální konjugace, transdukce nebo transformace (Chee-Sanford *et al.*, 2009). Tento přenos genů se nazývá horizontální a může probíhat na mezidruhové i mezirodové úrovni, na rozdíl od vertikálního přenosu probíhajícího v rámci jednoho druhu mezi buňkou mateřskou a dceřinou (Smalla *et al.*, 2000).

Tetracyklinové rezistence se u většiny bakterií vyskytují díky získání nových genů. Tyto geny jsou často sdruženy s tzv. mobilními genetickými elementy, mezi které patří např. transpozony, integrony a plazmidy. Tyto mobilní elementy bývají často nositelem ATB-rezistence a usnadňují šíření této rezistence pomocí horizontálního genetického přenosu (Smalla *et al.*, 2000). Podrobnější informace poskytuje kapitola 2.4.

Rezistence k tetracyklinu je jednou z nejběžnějších ATB-rezistencí. Poprvé byla identifikována již v roce 1959 u bakterie *Shigella dysenteriae* (Roberts *et al.*, 1996).

2.3. Mechanismy tetracyklinové rezistence

Existují tři nejvýznamnější typy mechanismů tetracyklinové rezistence (*tet-r*): efluxní proteiny, PRP a enzymatická inaktivace ATB. Tyto mechanismy jsou kódovány specifickými geny, které jsou zobrazeny v tabulce IV. Z těchto genů vznikají procesem transkripce a translace proteiny, které způsobují danou rezistenci.

Tab. IV: Přehled genů zodpovědných za rezistenci k tetracyklinovým antibiotikům a jejich výskyt v bakteriálních rodech a rozdělení podle mechanismu rezistence. (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>, Roberts 2011), pozn. *Tučně zvýrazněny grampozitivní rody.*

EFLUXNÍ PROTEINY	
<i>tet(A)</i>	<i>Acinetobacter, Aeromonas, Alcaligenes, Bordetella, Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Flavobacterium, Chryseobacterium, Klebsiella, Laribacter, Plesiomonas, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Serratia, Shigella, Variovorax, Veillonella, Vibrio</i>
<i>tet(B)</i>	<i>Acinetobacter, Actinobacillus, Aeromonas, Aggregatibacter, Brevundimonas, Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Gallibacterium, Haemophilus, Klebsiella, Mannheimia, Moraxella, Neisseria, Pantoea, Pasteurella, Photobacterium, Plesiomonas, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Roseobacter, Salmonella, Shigella, Serratia, Treponema, Vibrio, Yersinia</i>
<i>tet(C)</i>	<i>Aeromonas, Bordetella, Citrobacter, Enterobacter, Escherichia, Francisella, Halomonas, Chlamydia, Klebsiella, Proteus, Pseudomonas, Roseobacter, Salmonella, Serratia, Shigella, Vibrio</i>
<i>tet(D)</i>	<i>Aeromonas, Alteromonas, Citrobacter, Edwardsiella, Enterobacter, Escherichia, Halomonas, Klebsiella, Morganella, Pasteurella, Photobacterium, Plesiomonas, Salmonella, Shewanella, Shigella, Vibrio, Yersinia</i>
<i>tet(E)</i>	<i>Aeromonas, Alcaligenes, Escherichia, Flavobacterium, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Roseobacter, Serratia, Vibrio</i>
<i>tet(G)</i>	<i>Acinetobacter, Brevundimonas, Enterobacter, Escherichia, Fusobacterium, Mannheimia, Ochrobactrum, Pasteurella, Proteus, Providencia, Pseudomonas, Roseobacter, Salmonella, Shewanella, Vibrio</i>
<i>tet(H)</i>	<i>Acinetobacter, Actinobacillus, Gallibacterium, Histophilus, Mannheimia, Moraxella, Pasteurella, Psychrobacter, Pasteurella</i>
<i>tet(J)</i>	<i>Escherichia, Morganella, Proteus</i>
<i>tet(K)</i>	<i>Bacillus, Clostridium, Enterococcus, Eubacterium, Gallibacterium, Haemophilus, Lactobacillus, Listeria, Mycobacterium, Nocardia, Peptostreptococcus, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces</i>
<i>tet(L)</i>	<i>Acinetobacter, Actinobacillus, Actinomyces, Bacillus, Bifidobacterium, Citrobacter, Clostridium,</i>

	<i>Enterobacter, Enterococcus, Escherichia, Flavobacterium, Fusobacterium, Gallibacterium, Geobacillus, Kurthia, Lactobacillus, Listeria, Mannheimia, Morganella, Mycobacterium, Nocardia, Oceanobacillus, Ochrobactrum, Paenibacillus, Pasteurella, Pediococcus, Peptostreptococcus, Pseudomonas, Rahnella, Salmonella, Sporosarcins, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces Vagococcus, Variovorax, Veillonella, Virgibacillus</i>
<i>tet(V)</i>	<i>Mycobacterium</i>
<i>tet(Y)</i>	<i>Aeromonas, Escherichia, Photobacterium</i>
<i>tet(Z)</i>	<i>Corynebacterium, Lactobacillus,</i>
<i>tetA(P)</i>	<i>Clostridium</i>
<i>tcr</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>otr(C)</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>otr(B)</i>	<i>Mycobacterium, Streptomyces</i>
<i>tet(30)</i>	<i>Agrobacterium</i>
<i>tet(31)</i>	<i>Aeromonas, Gallibacterium</i>
<i>tet(33)</i>	<i>Arthrobacter, Corynebacterium</i>
<i>tet(35)</i>	<i>Stenotrophomonas, Vibrio</i>
<i>tet(38)</i>	<i>Staphylococcus</i>
<i>tet(39)</i>	<i>Acinetobacter, Alcaligenes, Bacillus, Brevundimonas, Cellulosimicrobium, Enterobacter, Lysinibacillus, Providencia, Stenotrophomonas</i>
<i>tet(40)</i>	<i>Clostridium</i>
<i>tet(41)</i>	<i>Serratia</i>
<i>tet(42)</i>	<i>Bacillus, Microbacterium, Micrococcus, Paenibacillus, Paenibacillus, Pseudomonas, Staphylococcus</i>
PROTEINY RIBOZOMÁLNÍ PROTEKCE (PRP)	
<i>tet(M)</i>	<i>Acinetobacter, Actinomyces, Abiotrophia, Aerococcus, Aeromonas, Afipia, Amycolatopsis, Anaerococcus, Arthrobacter, Bacillus, Bacterionema, Bacteroides, Bifidobacterium, Brachybacterium, Catenibacterium, Citrobacter, Clostridium, Corynebacterium, Edwardsiella, Eikenella, Enterobacter, Enterococcus, Erysipelothrix, Escherichia, Eubacterium, Finegoldia, Flavobacterium, Fusobacterium, Gardnerella, Gemella, Granulicatella, Haemophilus, Hafnia, Kingella, Klebsiella, Kurthia, Lactobacillus, Lactococcus, Lawsonia, Listeria, Microbacterium, Mycobacterium, Mycoplasma, Neisseria, Paenibacillus, Paenibacillus, Pantoea, Pasteurella, Peptostreptococcus, Photobacterium, Prevotellal, Proteus, Providencia, Pseudoalteromonas, Pseudomonas, Psychrobacter, Ralstonia, Rhanella, Selenomonas, Serratia, Shewanella, Shigella, Sporosarcina, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Ureaplasma, Veillonella, Vibrio</i>
<i>tet(O)</i>	<i>Actinobacillus, Aerococcus, Anaerovibrio, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Campylobacter, Citrobacter, Clostridium, Eubacterium, Enterococcus, Fusobacterium, Gemella, Granulicatella, Lactobacillus, Megasphaera, Mobiluncus, Neisseria, Pasteurella, Peptostreptococcus, Psychrobacter, Staphylococcus, Streptococcus</i>

<i>tet(S)</i>	<i>Citrobacter, Enterococcus, Klebsiella, Lactobacillus, Lactococcus, Listeria, Staphylococcus, Veillonella</i>
<i>tet(W)</i>	<i>Acidaminococcus, Actinomyces, Arcanobacterium, Bacillus, Bacteroides, Bifidobacterium, Butyrivibrio, Citrobacter, Clostridium, Escherichia, Fusobacterium, Klebsiella, Lactobacillus, Megasphaera, Mitsuokella, Neisseria, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Staphylococcus, Streptococcus, Streptomyces, Subdoligranulum, Veillonella</i>
<i>tet(Q)</i>	<i>Anaerovibrio, Bacteroides, Capnocytophaga, Clostridium, Eubacterium, Fusobacterium, Gardnerella, Lactobacillus, Mitsuokella, Mobiluncus, Neisseria, Peptostreptococcus, Porphyromonas, Prevotella, Selenomonas, Streptococcus, Subdoligranulum, Ruminococcus, Veillonella</i>
<i>tet(T)</i>	<i>Enterococcus, Streptococcus</i>
<i>tetB(P)</i>	<i>Clostridium</i>
<i>otr(A)</i>	<i>Bacillus, Mycobacterium, Streptomyces</i>
<i>tet</i>	<i>Streptomyces</i>
<i>tet(32)</i>	<i>Eubacterium, Streptococcus</i>
<i>tet(36)</i>	<i>Bacteroides, Clostridium, Lactobacillus</i>
<i>tet(44)</i>	<i>Campylobacter, Clostridium</i>
ENZYMATICKÁ INAKTIVACE ATB	
<i>tet(X)</i>	<i>Bacteroides, Spingobacterium</i>
<i>tet(34)</i>	<i>Aeromonas, Pseudomonas, Serratia, Vibrio</i>
NEZNÁMÉ	
<i>tet(U)</i>	<i>Enterococcus, Staphylococcus, Streptococcus</i>

Genová diverzita *tet-r* je vysoká, dnes je známo 38 *tet* genů, 3 *otr* geny a 1 *tcr* gen (<http://faculty.washington.edu/marilynr/>, Roberts 2011). Dva geny patří do jedné třídy, pokud se sekvence AMK v proteinech podobá aspoň v 80 %, jinak je považujeme za nepřibuzné (Levy *et al.*, 1999).

Otr geny byly poprvé identifikované u oxytetracyklin-produkujících organismů rodu *Mycobacterium* a *Streptomyces* (Roberts *et al.*, 2005).

Efluxní pumpy neboli efluxní proteiny jsou nejlépe prostudované Tet-proteiny. Kódují geny patřící do skupiny „major facilitator superfamily“, jejíž produkty zahrnují více než 300 jednotlivých proteinů. Všechny geny pro efluxní pumpy kódují proteiny spojené s membránou, které exportují tetracyklin z buňky. Tyto proteiny vyměňují proton za tetracyklin-kationtový komplex proti koncentračnímu gradientu (Paulsen *et al.*, 1996).

Export tetracyklinu pomocí efluxních pump snižuje koncentraci ATB uvnitř buňky až na koncentraci netoxickou pro buňku, tím dochází k ochraně ribozomů před působením ATB. Tyto efluxní proteiny byly nalezeny u grampozitivních i gramnegativních bakterií (Chopra *et Roberts*, 2001).

Efluxní pumpy mohou být řízené proton motivní silou nebo pomocí ABC – systému (ATP Binding Cassete). Analýzy genomových sekvencí ukázaly, že mnoho bakterií disponuje efluxními pumpami známými jako „multi-drug transportéry“.

Tyto pumpy jsou schopné exportovat z buňky široké spektrum nepříbuzných ATB. Většina multi-drug transportérů nacházejících se u gramnegativních bakterií patří do skupiny RND (Resistance – Nodulation-Division) nebo do skupiny SMR (Small Multi-drug Resistance) (Hogan *et Kolter*, 2002).

Efluxní proteiny byly rozděleny do šesti skupin na základě homologie jejich AMK sekvencí (Chopra *et Roberts*, 2001).

První skupina zahrnuje proteiny, jako jsou Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(Z), Tet(30). Tato skupina proteinů má z 41-78% shodnou sekvenci AMK. Pouze protein Tet(Z) byl nalezen u grampozitivních druhů (Tauch *et al.*, 2000). Efluxní geny u gramnegativních druhů jsou široce rozšířené a nacházejí se na velkých plazmidech, většina z těchto plazmidů jsou dobře konjugovatelné a často nesou další ATB-rezistence. Schopnost předávat si tyto plazmidy v procesu bakteriální konjugace vedl k dramatickému zvýšení multirezistencí u bakterií během posledních 40 let (Chopra *et Roberts*, 2001).

Druhá skupina zahrnuje proteiny Tet(K) a Tet(L) s 59% shodou sekvence AMK, byly primárně nalezeny u grampozitivních bakterií. Tyto proteiny umožňující rezistenci k tetracyklinu a chlortetracyklinu. Geny pro tyto proteiny se nacházejí hlavně na malých přenosných plazmidech, které se mohou inkorporovat např. do chromozomu stafylokoků (Chopra *et Roberts*, 2001).

Třetí skupina zahrnuje proteiny Otr(B) a Tcr, oba nalezené u *Streptomyces* (Chopra *et Roberts*, 2001).

Čtvrtá skupina zahrnuje protein TetA(P) nalezený u *Clostridium*. Pátá skupina zahrnuje jeden protein Tet(V) z *Mycobacterium smegmatis*. Šestá skupina zahrnuje protein Tet(33) z *Corynebacterium striatum* a jeden protein, který preferuje jako zdroj energie ATP než-li protonový gradient (Chopra *et* Roberts, 2001).

PRP (proteiny ribozomální protekce) jsou cytoplazmatické proteiny, které chrání ribozomy před působením tetracyklinu, deoxycyklinu a minocyklinu. PRP vykazují homologii k elongačním faktorům EF-Tu a EF-G. Tato skupina zahrnuje proteiny Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), Tet(Q), Tet(T), Otr(A), TetB(P), Tet(32), Tet(36) (Chopra *et* Roberts, 2001).

Proteiny Tet(M), Tet(O) a Otr(A) snižují citlivost ribozomu na tetracyklin. Tet(M) protein dovoluje aminoacyl-tRNA navázat se na akceptorové místo ribozomu i při takové koncentraci tetracyklinu v buňce, která inhibuje proteosyntézu. Geny *tet(M)* a *tet(Q)* se často nacházejí na velkých konjugativních transpozonech (Chopra *et* Roberts, 2001).

PRP můžeme rozdělit do třech skupin podle porovnání sekvence AMK. První skupina zahrnuje proteiny Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), druhá TetB(P) a Otr(A), třetí Tet(Q) a Tet(T) (Chopra *et* Roberts, 2001).

Enzymatickou aktivitu nalezneme pouze u proteinů (enzymů) kódovaných geny *tet(X)*, *tet(34)* a *tet(37)* (Roberts, 2005). Protein Tet(X) je cytoplazmatický protein, který chemickou modifikací zajišťuje inaktivaci tetracyklinu. Gen *tet(X)* byl nalezen na transpozonu dvou blízce příbuzných anaerobních bakterií rodu *Bacteroides* (Chopra *et* Roberts, 2001).

2.4. Šíření tetracyklinové rezistence

Jak již bylo zmíněno v kapitole 2.2. tzv. mobilní genetické elementy jsou významným faktorem usnadňujícím šíření rezistenčních genů. Mezi geneticky mobilní elementy patří plazmidy, transpozony a integrony. Plazmidy jsou malé cyklické molekuly DNA, existující nezávisle na bakteriálním chromozómu, dovedou se samostatně replikovat (Votava *et al.*, 2005). Transpozony jsou úseky DNA, které se mohou replikovat a být vloženy na nová místa v genomu, někdy se jim říká pohybliví genomoví parazité (Roberts *et al.*, 2005). Integrony jsou genetické mobilní elementy, které mohou nést jeden nebo více genů kódujících rezistenci ve formě genových kazet. Kazety jsou mobilní genetické elementy, které se mohou pomocí integrázy začlenit do integronu. Integrony mají mimořádnou schopnost inkorporovat geny rezistence, které mohou být exprimovány a přenášeny horizontálním přenosem genů jako jeden celek (D'Costa *et al.*, 2007).

Od objevu plazmidu, který nesl ATB-rezistenci u rodu *Shigella* v roce 1959 (Watanabe, 1963), je známo, že mobilní genetické elementy jsou důležité pro přenos ATB-rezistenčních determinant mezi bakteriemi. Tyto faktory umožňují rozšíření rezistenčních genů, které bakteriím udělují ATB-rezistenci ať už ve vnějším prostředí nebo v nemocnicích (Nwosu, 2001). Integrony, které mohou obsahovat až osm rezistenčních kazet, byly nalezeny u multirezistentních klinických izolátů. (Naas *et al.*, 2001). Dále superintegrony, kódující desítky různých funkcí, byly nalezeny u rodu *Vibrio* (Rowe-Magnus *et al.*, 2002) a u nepatologických divokých kmenů rodu *Pseudomonas* (Vaisvila *et al.*, 2001). Tyto poznatky zdůrazňují důležitou roli, kterou integrony můžou hrát v získávání genů u gramnegativních bakterií.

2.5. Rezervoáry tetracyklinové rezistence v prostředí

Objev a klinické používání ATB snížilo lidské utrpení a redukovalo počet úmrtí v důsledku bakteriálních infekcí. Nicméně masivní užívání ATB ať už z terapeutických nebo subterapeutických důvodů (Cromwell, 2001), vedlo k rozšíření výskytu rezistentních bakterií. Klinický výzkum ukazuje zvyšující se počet patogenních mikroorganismů nesoucí rezistenci k několika různým typům ATB tzv. multirezistenci (http://search.who.int/search?q=antibiotic+multiresistance&ie=utf8&site=default_collection&client=_en&proxystylesheet=_en&output=xml_no_dtd&oe=utf8).

Pro pochopení ekologie těchto mikroorganismů a jejich šíření se současný výzkum zaměřuje také na výskyt bakteriálních rezistencí v prostředí (Aminov, 2010; Nwosu, 2001). Studie autorů Ghosh *et al.* (2007) a Schmitt *et al.* (2006) prokazují, že existuje značné množství *atb-r* genů (včetně *tet-r* genů) v půdě hnojené kejdou nebo hnojem (tj. odpady z živočišné výroby, ŽO). Příčina spočívá v masivní aplikaci veterinárních ATB v živočišné výrobě nejen z léčebných důvodů, ale také z důvodů profylaxe a za účelem zvýšení výnosů masa a zvýšení rychlosti růstu jatečných zvířat (Cohen, 1998; Jindal *et al.*, 2006; Ghosh *et al.*, 2007). Je odhadováno, že až 75% ATB podávaného zvířeti, se v těle nevstřebává a je vylučováno v exkrementech (Andermont, 2003).

Jestliže ATB nejsou účinně degradována, jejich rezidua (zbytky) mohou napomáhat k udržování a rozvoji rezistentních bakteriálních populací. Opakované aplikace živočišných odpadů na téže půdě mohou vyústit v rezervoár rezistentních bakterií (Witte, 1998). Navíc živočišné odpady neobsahují pouze nestrávená ATB, ale také fekální bakterie nesoucí rezistenční geny např. na mobilních genetických elementech. Ty mohou být následně přeneseny pomocí horizontálního genového přenosu (HGP) do půdních bakterií (Götz *et al.*, 1997). Navíc lze předpokládat, že bakterie v prostředí (Mindlin *et al.*, 2008), zejména producenti ATB, jako rody *Bacillus* a *Streptomyces* (Thomashow *et al.*, 1997), se mohou podílet na šíření rezistence mezi patogeními bakteriemi a přirozenou půdní mikroflórou (Davies, 1994; Nwosu, 2001).

V půdě ošetřované živočišnými odpady se může vyvíjet rezervoár ATB-rezistentních bakterií a *atb-r* genů (Schmitt *et al.*, 2006). Jaké podmínky jsou klíčové pro šíření ATB-rezistence v hnojených půdách a zda-li to má nepříznivý vliv na člověka a ekosystém zatím není dobře prostudováno.

2.6. Geny způsobující rezistenci k tetracyklinu v intestinálním traktu zvířat, v živočišných odpadech, v půdě ovlivněné člověkem

Rezistence na tetracyklin se vyskytla brzy po jeho objevu zhruba před 60 lety (Roberts *et al.*, 1996). Intenzivní používání této skupiny ATB, vedle klinické aplikace zejména v živočišné výrobě, vedlo k selekci velké skupiny rezistenčních determinant, dohromady nazývané tetracyklinový rezistom (Thaker *et al.*, 2009). Tato kapitola shrnuje dostupné údaje o jejich výskytu v prostředí intestinálního traktu živočichů (kromě člověka), v živočišných odpadech a v půdě, které shrnují tabulky V, VI a VII, rozdělené na základě funkce genových produktů na efluxní pumpy, proteiny ribozomální protekce a enzymy inaktivující ATB.

Do skupiny genů **intestinálního traktu** (IT) jsem zahrнула *tet-r* geny vyskytující se ve střevech zvířat a *tet-r* geny detekované v čerstvém exkrementu. O výskytu těchto genů v IT informovala rozsáhlá studie Patterson *et al.* (2007), která porovnávala výskyt *tet-r* genů u různých hospodářských zvířat. Zaměřovala se hlavně na prasata, která v severských zemích mají nižší výskyt *tet-r* genů, než v ostatních evropských zemích hlavně z důvodu nižšího užívání ATB. Práce Alexandera *et al.* (2011) se týkala pouze výskytu *tet-r* genů v čerstvých kravských exkrementech. Studie autorů Literák *et al.* (2009) charakterizovala intestinální mikroflóru pěti druhů divoce žijících zvířat.

Na základě výše uvedených prací se jedná o celkem 15 *tet-r* genů: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tetA(P)*, *tet(30)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(32)*, *tet(X)*.

U prasat se vyskytovalo celkem 14 různých *tet-r* genů: *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tetA(P)*, *tet(30)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(32)*, *tet(X)* (Patterson *et al.*, 2007). U krav bylo nalezeno 7 *tet-r* genů *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(W)* (Patterson *et al.*, 2007; Alexander *et al.*, 2011). U ovcí byly nalezeny také *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(X)* (Patterson *et al.*, 2007). U divokých zvířat byly nalezeny geny *tet(A)*, *tet(B)* (Literák *et al.*, 2009). U normíka rudého a jelena lesního z národního parku byl objeven *tet(A)*, zatímco *tet(B)* u myši a lišky obecné.

Z přehledu vyplývá, že v IT byla zaznamenána vyšší diverzita detekovaných genů pro efluxní pumpy než pro proteiny ribozomální protekce. Studie Patterson *et al.* (2007) pomocí qPCR doplnila, že translatované PRP převažovaly nad efluxními pumpami.

V IT všech sledovaných hospodářských zvířat tj. krav, prasat, ovcí se vyskytoval gen *tet(W)*. Dále frekventované byly geny *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(Z)* vyskytující se u krav a prasat a *tet(O)* detekovaný u prasat a ovcí, u kterých byl navíc objeven gen pro enzymatickou inaktivaci ATB *tet(X)*.

Tab. V: Distribuce tetracyklin rezistenčních genů pro efluxní pumpy v intestinálním traktu živočichů, živočišných odpadech a půdách.

Gen	Výskyt genů v prostředí (intestinální trakt, exkrement, půda)	Bakteriální Izoláty / izolace DNA	Metoda detekce	Citace
<i>tet(A)</i>	exkrementy prasat, krav	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	intestinální trakt normíka rudého (<i>Clethrionomys glareolus</i>), les	izoláty <i>E.coli</i>	PCR	Literák <i>et al.</i> , 2009
	intestinální trakt jelena lesního (<i>Cervus elaphus</i>), národní park	izoláty <i>E.coli</i>	PCR	Literák <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy malých savců žijících na prasečích farmách, skládkách a ve městech	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Salmonella enterica</i>	PCR	Allen <i>et al.</i> , 2011
	exkrementy prasat, slepic	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>tet(B)</i>	exkrementy krav	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	intestinální trakt lišky obecné (<i>Vulpes vulpes</i>), národní park	izoláty <i>E.coli</i>	PCR	Literák <i>et al.</i> , 2009
	intestinální trakt myši křovinné (<i>A. sylvaticus</i>), les	izoláty <i>E.coli</i>	PCR	Literák <i>et al.</i> , 2009
	gastrointestinální trakt myšice temnopásé (<i>Apodemus agrarius</i>), urbanizované prostředí)	izoláty <i>E.coli</i>	PCR	Literák <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy krav (jedinci s podávaným ATB, i kontrolní jedinci bez ATB)	DNA izolace	qPCR	Alexander <i>et al.</i> , 2011
	kejda prasečí	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	qPCR	Hölzel <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy malých savců žijících na prasečích farmách, skládkách a ve městech	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Salmonella enterica</i>	PCR	Allen <i>et al.</i> , 2011
	exkrementy prasat, slepic, chlévská mrva prasečí	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená prasečími exkrementy, půda hnojená slepičími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	zemědělská půda před hnojením i po hnojení hnojným kalem	DNA izolace	qPCR	Walsh <i>et al.</i> , 2011
exkrementy prasat	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006	
<i>tet(C)</i>	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy krav (jedinci s podávaným ATB, i kontrolní jedinci bez ATB)	DNA izolace	qPCR	Alexander <i>et al.</i> , 2011

	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	exkrementy malých savců žijících na prasečích farmách, skládkách a ve městech	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Salmonella enterica</i>	PCR	Allen <i>et al.</i> , 2011
	exkrementy prasat, slepic	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(D)	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat, krav	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
tet(E)	exkrementy prasat	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(G)	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená slepičími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(H)	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat, slepic	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda dlouhodobě hnojená kravským hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
tet(J)	exkrementy prasat, slepic, chlévská mrva prasečí	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená prasečími exkrementy, půda hnojená slepičími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
tet(K)	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(L)	kejda prasečí	izoláty <i>Enterococcus faecalis</i>	PCR	Schwaiger <i>et al.</i> , 2009
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(Y)	exkremnty prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006

	půda dlouhodobě hnojená kravským hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
tet(Z)	exkrementy prasat, krav	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená slepičími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená kravským hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
tetA(P)	exkremnty prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(30)	půda ze zahrad	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007

Dostupné literární údaje pro skupinu genů v **živočišných odpadech (ŽO)** jsou založeny na výskytu *tet-r* genů v prasečí kejdě a drůbežím hnoji. Obsáhlá práce Kobashi *et al.* (2007) se zabývala studiem *tet-r* genů v bakteriálních izolátech z exkrementů prasat a slepic. Hölzel *et al.* (2009) zkoumali vztah mezi nestrávenými zbytky ATB a mikrobiální rezistencí v prasečí kejdě. Studie autorů Schmitt *et al.* (2006) se zabývala studiem diverzity *tet-r* genů v prasečí kejdě. Práce Schwaigera *et al.* (2009) byla zaměřená na měření koncentrace tetracyklinu v prasečí kejdě a detekci *tet-r* genů v izolátech *Enterococcus faecalis* izolovaných z kejdy. Peak *et al.* (2007) studovali kvantifikaci vybraných *tet-r* genů v jímkách živočišných odpadů. Allen *et al.* (2011) se zabývali ATB-rezistencí a rezistenčními geny v izolátech *Escherichia coli* a *Salmonella enterica*, které byly izolovány z exkrementů savců žijících na prasečích farmách, ve městech, na polích a v přírodě.

Na základně výše uvedených prací se jedná celkem o 16 *tet-r* genů: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(L)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*.

V prasečích exkrementech a prasečí kejdě bylo nalezeno 16 *tet-r* genů: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(E)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(L)*, *tet(Y)*, *tet(30)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)* (Kobashi *et al.*, 2007; Hölzel *et al.*, 2009; Schmitt *et al.*, 2006; Schwaiger *et al.*, 2009; Peak *et al.*, 2007). V slepičích exkrementech byly identifikovány geny *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, tj. 8 *tet-r* genů (Kobashi *et al.*, 2007). V exkrementech malých savců žijících na prasečích farmách se vyskytovaly geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)* (Allen *et al.*, 2011).

Geny *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)* byly nalezeny jak v prasečích odpadech, tak i ve výkalech slepic.

Tab. VI: Distribuce tetracyklin rezistenčních genů pro proteiny ribozomální protekce v intestinálním traktu živočichů, živočišných odpadech a půdách.

Gen	Výskyt genů v prostředí (intestinální trakt, exkrement, půda)	Bakteriální Izoláty / DNA izolace	Metoda detekce	Citace
<i>tet(M)</i>	kejda prasečí	izoláty <i>Enterococcus faecalis</i>	PCR	Schwaiger <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy krav (jedinci s podávaným ATB, i kontrolní jedinci bez ATB)	DNA izolace	qPCR	Alexander <i>et al.</i> , 2011
	kejda prasečí	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	qPCR	Hölzel <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy prasat, slepic, chlévská mrva prasečí	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	nehnojená půda	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasečí	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrementy v jímkách	DNA izolace	qPCR	Peak <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	lesní půda	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	zemědělská půda před hnojením i po hnojení hnojným kalem	DNA izolace	qPCR	Walsh <i>et al.</i> , 2011
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	qPCR/PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
<i>tet(O)</i>	kejda prasečí	izoláty <i>Enterococcus faecalis</i>	PCR	Schwaiger <i>et al.</i> , 2009
	kejda prasečí	izoláty <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	qPCR	Hölzel <i>et al.</i> , 2009
	exkrementy prasečí	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrementy v jímkách	DNA izolace	qPCR	Peak <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy slepic	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007

	lesní půda	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat, ovcí	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	qPCR/PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(S)	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	chlévková mrva prasečí	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda z farmy, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	lesní půda	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	kejda prasečí	izoláty <i>Enterococcus faecalis</i>	PCR	Schwaiger <i>et al.</i> , 2009
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(W)	půda dlouhodobě hnojená kravím hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	exkrementy krav (jedinci s podávaným ATB, i kontrolní jedinci bez ATB)	DNA izolace	qPCR	Alexander <i>et al.</i> , 2011
	exkrementy prasat, slepic, chlévková mrva prasečí	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená prasečími exkrementy, půda hnojená slepičími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat, krav, ovcí	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z farem, kde byly krávám podávány ATB z léčebných i profylaktických důvodů	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	lesní půda	izoláty <i>Enterobacteriaceae</i>	PCR	Srinivasan <i>et al.</i> , 2007
	prasečí exkrementy v jímkách	DNA izolace	qPCR	Peak <i>et al.</i> , 2007
	zemědělská půda před hnojením i po hnojení hnojným kalem	DNA izolace	qPCR	Walsh <i>et al.</i> , 2011
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	qPCR/PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(Q)	půda dlouhodobě hnojená kravím hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006

	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	exkrementy prasat, slepic	izoláty např. <i>E.coli</i> , <i>Enterococcus</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	půda hnojená slepičími exkrementy	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	prasečí exkrementy v jímkách	DNA izolace	qPCR	Peak <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	qPCR/PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(T)	půda dlouhodobě hnojená kravím hnojem, gen nalezen před hnojením i 212 dnů po hnojení	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda dlouhodobě hnojená prasečí kejdou, gen nalezen před i po hnojení, i v samotném prasečím hnoji	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	prasečí exkrement smíchaný s močí, půda smíchaná s prasečím exkrementem, půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu a tetracyklinu (microkosmos, inkubace 8 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda smíchaná s prasečím exkrementem a různými koncentracemi oxytetracyklinu (microkosmos, inkubace 14 dnů)	DNA izolace	PCR	Schmitt <i>et al.</i> , 2006
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	qPCR/PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
tet(B(P))	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010
otr(A)	půda hnojená prasečími exkrementy, nehnojená půda	izoláty např. <i>Burgholderia</i> , <i>Afipia</i>	PCR	Kobashi <i>et al.</i> , 2007
tet(32)	exkrementy prasat	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007

Do skupiny genů detekovaných v **půdě** jsem zahrнула *tet-r* geny vyskytující se v půdě ovlivněné člověkem tj. v zemědělské půdě hnojené (prasečí, kravské, slepičí exkrementy), v zemědělské půdě nehnojené, v zahradní půdě a lesní půdě.

O výskytu *tet-r* genů v půdě informuje studie Patterson *et al.* (2007), která se také zabývala testováním přítomnosti *tet-r* genů v půdě ze zahrad z několika různých evropských zemí, není udáno, zda a jak byly tyto půdy hnojeny. Studie Srinivasan *et al.* (2007) vyhodnocovala přítomnost *tet-r* genů v izolátech *Enterobacteriaceae* z půdy, která byla obohacována exkrementy krav, a z lesní půdy s neznámou historií. Těmto krávám byl podáván tetracyklin a streptomycin z léčebných i preventivních důvodů. Wu *et al.* (2010), publikovali rozsáhlou studii zabývající se množstvím a diverzitou *tet-r* genů v asijských půdách v blízkosti prasečích chovů. Další už výše zmíněná studie Kobashi *et al.* (2007) testovala přítomnost *tet-r* genů v půdách ošetřených prasečí kejdou a slepičími exkrementy a dále v půdách nehnojených žádným organickým materiálem, historii těchto půd publikace neuvádí. Skupina autorů Walsh *et al.* (2011) kvantifikovala vybrané *tet-r* geny v půdě ošetřované organickými hnojivy, o jaký typ hnojení se jednalo publikace neuvádí. Podrobná a již výše zmíněná studie kolektivu Schmitt *et al.* (2006) také prověřovala výskyt *tet-r* genů

in situ v půdách hnojených prasečími exkrementy a kravským hnojem, dále v laboratorním inkubačním experimentu (mikrokosmos) po přidání prasečích exkrementů do půdy.

Dle výše uvedených prací se v půdě vyskytovalo celkem 23 *tet-r* genů: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tetA(P)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, *otr(A)*, *tetB(P)*, *tet(X)*.

V zemědělské půdě hnojené (prasečí, kravské, slepičí exkrementy) i nehnojené se vyskytovalo celkem 21 *tet-r* genů.

V půdě ošetřované prasečími exkrementy byly objeveny všechny výše jmenované geny s výjimkou genu *tet(D)* a *tet(30)*, tj. 21 *tet-r* genů (Wu *et al.*, 2010; Kobashi *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2006). V půdě ošetřované kravským hnojem byly identifikovány geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(T)*, tj. 12 *tet-r* genů (Srinivasan *et al.*, 2007; Schmitt *et al.*, 2006). V půdě hnojené slepičími exkrementy byly detekovány *tet(B)*, *tet(G)*, *tet(J)*, *tet(Z)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, tj. 6 *tet-r* genů (Kobashi *et al.*, 2007).

V půdách ošetřovaných exkrementy hospodářských zvířat tj, krav, prasat a slepic byly detekovány geny *tet(B)*, *tet(G)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(Q)*. V půdě hnojené prasečími exkrementy byl dokonce objeven i gen pro enzymatickou inaktivaci ATB *tet(X)*. Pro půdy ošetřované prasečími nebo kravskými odpady bylo společné široké spektrum *tet-r* genů pro efluxní pumpy i pro proteiny ribozomální protekce: *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(G)*, *tet(H)*, *tet(Y)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(Q)*, *tet(S)*, *tet(W)*, *tet(T)*.

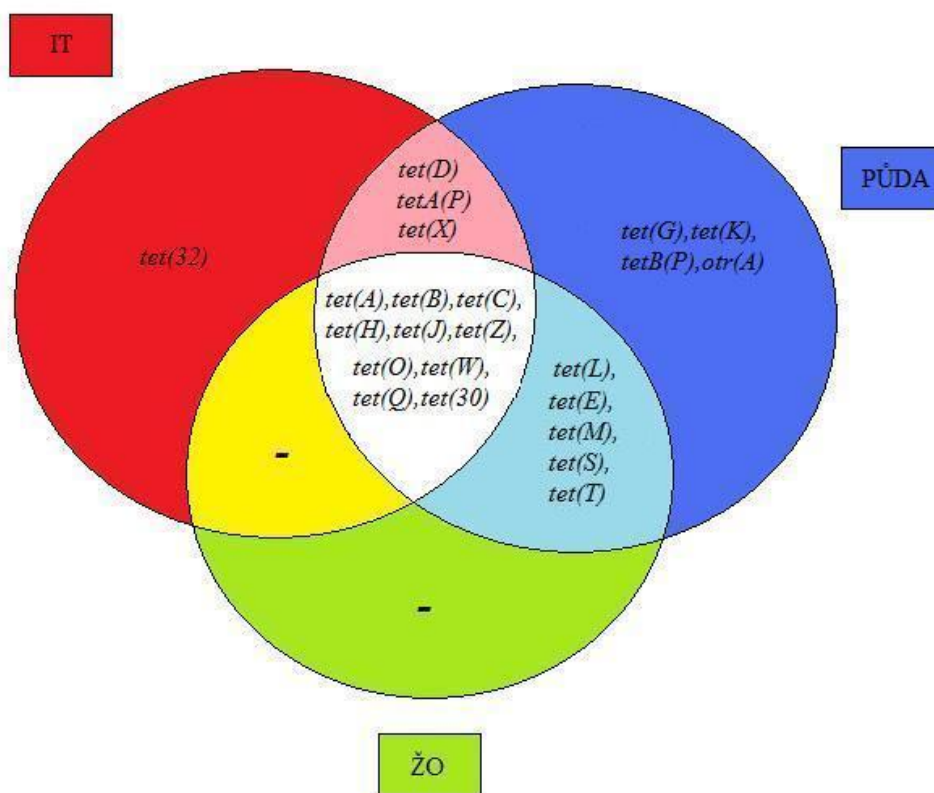
V zemědělské půdě nehnojené byly nalezeny geny *tet(B)*, *tet(G)*, *tet(J)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(W)*, *otr(A)* tj. 7 *tet-r* genů (Kobashi *et al.*, 2007).

V zahradní půdě byly detekovány geny *tet(A)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(G)*, *tet(Z)*, *tet(30)*, tj. 6 *tet-r* genů (Patterson *et al.*, 2007). Geny *tet(M)*, *tet(O)*, *tet(S)*, *tet(W)* (Srinivasan *et al.*, 2007) byly objeveny i v lesní půdě. Geny *tet(M)* a *tet(W)*, typické pro IT, ŽO i hnojené půdy, byly nalezeny také v nehnojené zemědělské i lesní půdě.

Tab. VII: Distribuce tetracyklin rezistenčního genu pro enzymatickou inaktivaci ATB v gastrointestinálním traktu živočichů, živočišných odpadech a půdách.

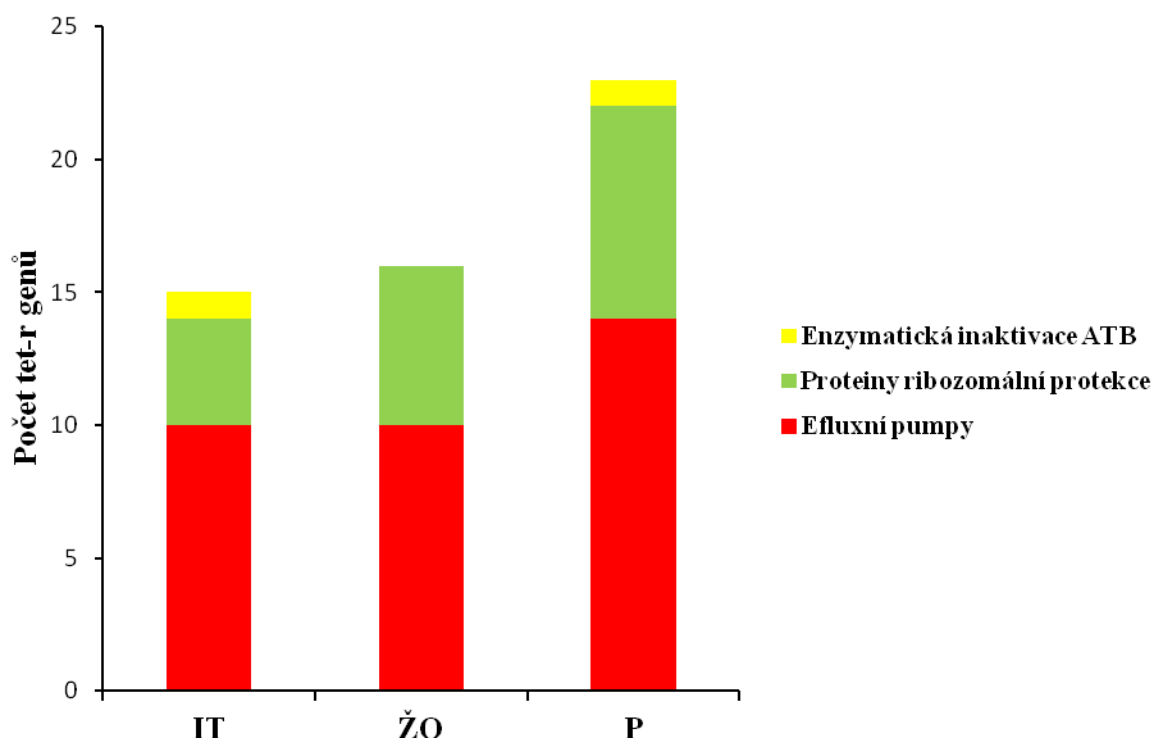
Gen	Výskyt genů v prostředí (intestinální trakt, exkrement, půda)	Bakteriální Izoláty / izolace DNA	Metoda detekce	Citace
<i>tet(X)</i>	exkrementy prasat, ovcí	bakteriální izoláty	PCR	Patterson <i>et al.</i> , 2007
	půda z okolí prasečích farem	DNA izolace	PCR	Wu <i>et al.</i> , 2010

Z literárních dat vyplynulo, že skladba *tet*-r genů se lišila ve všech třech typech prostředí. V intestinálním traktu zvířat (IT) se vyskytovaly geny *tet(D)*, *tetA(P)*, *tet(32)*, *tet(X)*, které nebyly nalezeny v živočišných odpadech (ŽO), kde naopak byly detekovány geny *tet(L)*, *tet(E)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(T)*, jak ukazuje obrázek 2. Gen *tet(32)* je unikátní pro IT, nevyskytoval se nikde jinde. Dále také existuje skupina genů společná pro půdu, IT a ŽO. Jednalo se o geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(H)*, *tet(J)*, *tet(Z)*, *tet(O)*, *tet(W)*, *tet(Q)*, *tet(30)* (obrázek 2). Výskyt genů *otr(A)*, *tet(K)*, *tetB(P)* a *tet(G)* byl popsán pouze v půdě. Výskyt genů *otr(A)*, *tet(K)* přísluší rodu *Streptomyces*, typickému představiteli producentů ATB. Z obrázku 2 je dále patrné, že pro půdu a IT byly společné geny *tet(D)*, *tetA(P)*, *tet(X)* a pro půdu a ŽO geny *tet(L)*, *tet(E)*, *tet(M)*, *tet(S)*, *tet(T)*.



Obr. 2: Výskyt genů tetracyklinové rezistence v různých prostředích (intestinálním traktu zvířat, živočišných odpadech a půdě).

Jak vyplynulo z literární rešerše, a jak shrnuje obrázek 3, největší pestrost tetracyklinového rezistomu byla zaznamenána v půdě, celkem z 23 detekovaných *tet-r* genů. Rozdíl v počtu detekovaných genů v živočišných odpadech (ŽO, 16 genů) a intestinálním traktu (IT, 15 genů) byl zanedbatelný, po kvalitativní stránce se však obě prostředí lišila skladbou genů kódující efluxní pumpy a v ŽO byla zaznamenána větší variabilita genů kódující PRP.



Obr. 3: Počet tetracyklin rezistenčních genů v různých prostředích (intestinálním traktu zvířat, živočišných odpadech a půdě).

Literární data naznačila, že půda hnojená ŽO poskytuje nejbohatší rezervoár *tet-r* genů. Je však stále nedostatek prací, které by současně a za použití téže metodiky sledovaly výskyt *tet-r* genů ve všech typech prostředí našeho zájmu a napomáhaly vysvětlit, které faktory ve vytváření rezervoárů ATB-rezistence a šíření rezistenčních genů v prostředí hrají významnou roli.

Experimentální část předkládané práce, sledující výskyt vybraných *tet-r* genů v exkrementu léčeného a neléčeného skotu tetracyklinovými antibiotiky, v nehnojených půdách a v půdách obohacených těmito exkrementy, je takovým příspěvkem. Jejím cílem bylo ověřit zda *tet-r* geny fekálního bakteriálního společenstva budou obohacovat rezistom bakteriálního společenstva půd.

2.7. Metody detekce genů způsobujících rezistenci k tetracyklinu

Nejpoužívanější metodou pro detekci *tet-r* genů v prostředí je polymerázová řetězová reakce (PCR). K provedení vlastní PCR je třeba vyzolovaná DNA z toho prostředí. Pomocí této metody můžeme určit přítomnost nebo nepřítomnost (na určité hladině detekce) genu ve vzorku (Walsh *et al.*, 2011).

Další metodou detekce je qPCR (kvantitativní PCR) neboli real-time PCR, je založena na sledování průběhu PCR přímo během reakce pomocí fluorescenčních sond či barviv, které detekují množství PCR produktu během reakce zvýšením své fluorescenční aktivity. Její výhodou oproti konvenční PCR je možnost přesného stanovení výchozího počtu kopií cílové templátové sekvence DNA, čili schopnost kvantifikace např. kvantifikace *tet-r* genu v prostředí (Walsh *et al.*, 2011).

Multiplexní PCR je další metodou sloužící k detekce *tet-r* genů. Vyznačuje se amplifikací více odlišných úseků DNA současně v jedné reakční kyvetě. Metoda používá několik párů primerů s odlišnou specifitou v jedné reakci. Umožňuje detekci několika úseků nukleových kyselin - např. detekci více typů *tet-r* genů najednou. Multiplexní aplikace jsou výhodné z hlediska úspory času a nákladů pro analýzu (Ng *et al.*, 2001).

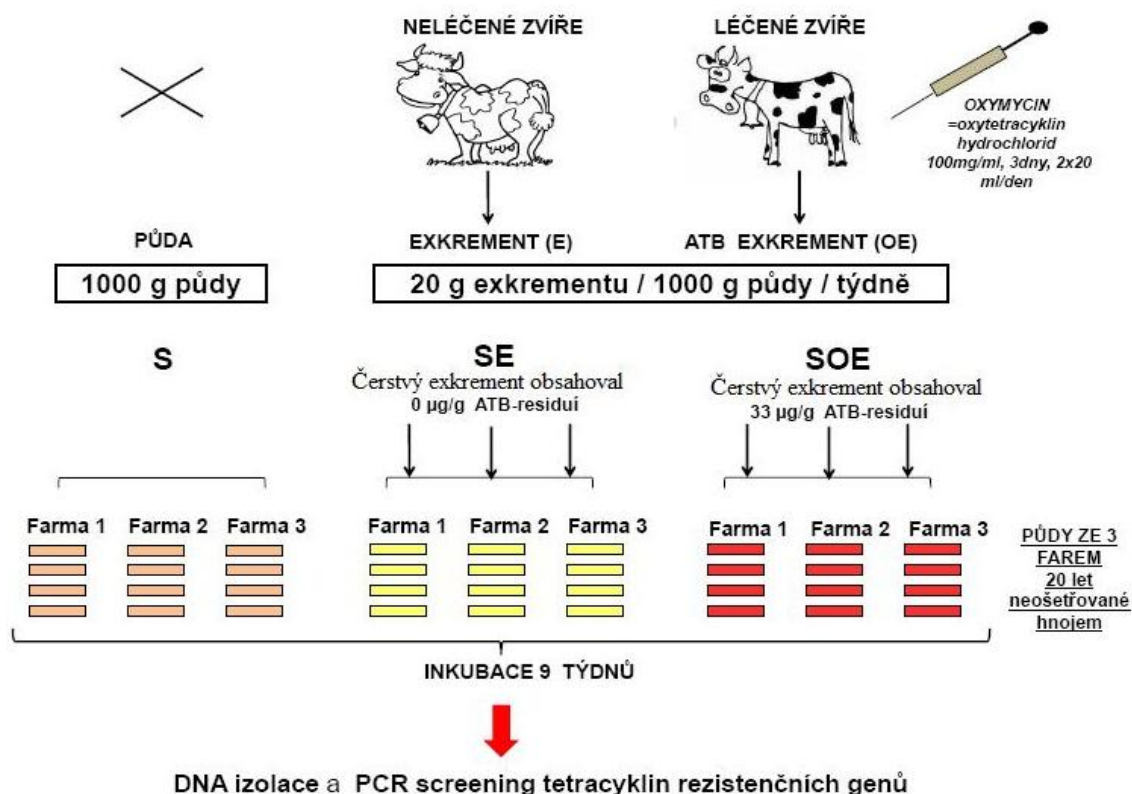
Hybridizace DNA vychází ze schopnosti DNA denaturovat při vysoké teplotě nebo v silně alkalickém prostředí, kdy se separují obě vlákna DNA. Za příznivých podmínek (stačí teplota 65°C) řetězce mohou opět reasociovat tzv. renaturace DNA = hybridizace. Jsou-li řetězce komplementární, mohou se spojit, i když jsou z různých zdrojů (DNA-RNA). Těmito technikami je možno zjistit příbuznost DNA molekul, detekovat přítomnost hledaných úseků DNA pomocí komplementárních nukleotidových sekvencí (značenými sondami), identifikovat nebo izolovat geny. Hybridizace může probíhat na membráně nebo pomocí DNA čipu (Patterson *et al.*, 2007).

3. Experimentální část

V experimentální části práce jsem se zabývala detekcí vybraných *tet-r* genů, typických pro různé skupiny bakterií, ve vzorcích DNA extrahované ze vzorků půd a exkrementů. Vzorky pocházely z modelového pokusu sledujícího přenos *tet-r* genů z exkrementu skotu léčeného/neléčeného tetracyklinovými ATB do půdy. Pokus byl uspořádán v roce 2009 na kanadském pracovišti (University of Sherbrooke, Department of Biology, Sherbrooke, Québec, Canada) v rámci projektu OECD (JA00054767).

3.1. Uspořádání pokusu a pokusný materiál

Pro testování hypotézy, že exkrementy zvířat jsou zdrojem *tet-r* genů, obohacujících rezistom půdního bakteriálního společenstva, byl uspořádán střednědobý mikrokosmový experiment. Uspořádání pokusu schématicky zobrazuje obrázek 4.



Obr. 4: Uspořádání mikrokosmového experimentu.

Byly použity exkrementy skotu léčeného oxytetracyklinovými antibiotiky (OE) a exkrementy kontrolního neléčeného zvířete (E) z téže farmy (Dairy and Swine Research and Development Centre, Lennoxville, QC, Canada). Léčebná dávka antibiotika (oxytetracyclin hydrochlorid, 100mg/ml) byla aplikována léčenému zvířeti injekčně dvakrát denně (2x20 ml/den) po dobu 3 dnů. Během této doby byly shromažďovány exkremety od léčeného i neléčeného zvířete a následně byly použity k inkubaci s půdou. Před zahájením pokusu byly oba vzorky důkladným promícháním homogenizovány a část vzorků zamražena (-20°C). Vzorek E neobsahoval žádná rezidua oxytetracyclinu, ve vzorku OE bylo detekováno množství 33 µg/g č.h. (nepublikovaná data poskytnutá v rámci projektu P504/10/2077). Půdní vzorky (S) byly odebrány v červenci na třech soukromých farmách v oblasti Québec, vzdálených od farmy v Lennoxville cca 60 km. Všechny půdy pocházely z půdy oseté kukuřicí. Na všech třech farmách nebylo více jak 20 let používáno hnojení živočišnými odpady. Doprovodné základní charakteristiky analyzovaných půdních vzorků shrnuje tabulka VIII. Půdní vzorky byly následně homogenizovány za semisterilních podmínek (vydesinfikované nerezové síto; $r_{oka} = 50$ mm). Každá ze tří půd byla rozdělena po 1000 g do 12 plastových boxů, z nichž 1/3 půdních vzorků zůstala neošetřena (varianta S), 1/3 byla obohacována exkrementem od neléčeného zvířete (varianta SE) a 1/3 byla obohacována exkrementem od léčeného zvířete (varianta SOE). Byly tedy 4 technická opakování od každé půdy.

Tab. VIII: Základní charakteristika inkubovaných půd.

	Vlhkost (%)	pH (1 M KCl)	Corg (%)	Ntot (%)
Farma 1	17,94 ± 0,27	5,95 ± 0,08	3,71 ± 0,67	0,24 ± 0,05
Farma 2	23,45 ± 0,16	7,03 ± 0,04	2,43 ± 0,41	0,19 ± 0,04
Farma 3	21,00 ± 0,28	5,39 ± 0,02	2,03 ± 0,24	0,15 ± 0,02

Data byla poskytnuta v rámci projektu P504/10/2077.

Exkrementy (20 g) byly do mikrokosmu přidávány každý týden a po důkladném promíchání byly mikrokosmy inkubovány ve tmě při 15°C. Tři týdny před ukončením inkubace k půdě již nebyly přidávány žádné exkrementy. V této době byly exkrementy zamraženy (-20°C). Po ukončení inkubace byly vzorky půd i přidávaných exkrementů zamraženy (-20°C) a zamražené transportovány z Kanady do ČR, kde byl posléze proveden genový screening vybraných *tet-r* genů.

Genový screening se u obou exkrementů prováděl ze vzorků odebraných na začátku experimentu a na konci experimentu, aby byly zachyceny případné změny ve složení *tet-r* genů během skladování exkrementů.

3.3. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci DNA bez jejího předchozího klonování ve vektorech. Princip PCR je založen na replikaci nukleových kyselin, která je základním molekulárním procesem všech živých organismů. Podstatou PCR je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA ve směru 5'→3' prostřednictvím DNA-polymerázy. Studovaný úsek nukleotidové sekvence je vymezen připojením dvou primerů, které se vážou na protilehlé řetězce DNA tak, že jejich 3'-konce směřují proti sobě (Šmarda *et al.*, 2005).

Primery jsou jednovláknové krátké úseky DNA nasedající na DNA v místě s komplementární sekvencí. Pokud známe sekvenci, můžeme navrhnout primer, který bude za určité teploty (annealingové teploty) specificky nasedat na určité místo v templátové DNA. Specifitu reakce zajišťuje vedle správné annealingové teploty také dostatečná délka primeru (okolo 20 nukleotidů). Takto můžeme DNA dependentní DNA-polymeráze určit, od kterého místa a kterým směrem má začít syntetizovat nové vlákno. Sekvence primerů musí být unikátní, navržená tak, aby se v cílové DNA jejich sekvence vyskytovala pouze jednou.

Pro nasednutí primerů na templátové vlákno DNA, je nutná počáteční denaturace DNA. Při teplotě cca 95°C se DNA rozestoupí na dvě komplementární vlákna, která poté budou přístupná pro nasednutí primerů. Denurací dvoušroubovice vzniknou dvě vlákna DNA, proto jsou k syntéze daného úseku potřeba dva primery (*forward* a *reverse*), z nichž každý bude nasedat na jedno vlákno. Řetězové vytváření produktu umožňuje především cyklické střídání teplot. Vzdálenost mezi místy nasednutí primerů udává délku amplifikovaného úseku.

Při navrhování primerů se dbá na to, aby oba měly přibližně stejnou teplotu tání (annealingovou teplotu), která závisí na jejich délce (čím delší je molekula, tím více vodíkových můstků se v ní nachází a tím je potřeba více energie k denuraci) a na jejich sekvenci, především na poměru GC párů a AT párů (čím více GC párů se třemi vodíkovými

můstky, tím vyšší teplota tání). Pro navrhování primerů se dnes používají počítačové programy (Sambroock *et Russel*, 2001).

Po přidání DNA polymerázy a nukleotidů pak probíhá syntéza nových vláken na obou matricových řetězcích protisměrně. K syntéze DNA se používají termostabilní polymerázy izolované z termofilních mikroorganismů, např. *Taq* DNA-polymeráza z *Thermus aquaticus* odolávající teplotám, při nichž DNA denaturuje. To umožňuje, aby syntéza DNA probíhala opakovaně formou cyklů, kde se pravidelně střídají tři kroky, během nichž probíhají tři odlišné děje s odlišnými nároky na teplotu:

- denaturace dvouřetězcových molekul DNA (94-95°C)
- nasednutí primerů na komplementární místa oddělených řetězců (30-65°C)
- syntéza nových řetězců DNA prostřednictvím DNA-polymerázy (65-75°C)

Výsledným produktem PCR jsou amplikony – úseky DNA definované délky v mnoha kopiích o velikosti obvykle desítky až tisíce bp, jejichž přítomnost se v reakční směsi prokazuje stanovením jejich velikosti elektroforézou v agarózovém nebo polyakrylamidovém gelu nebo kvantitativním měřením množství produktu v reálném čase.

Reakce se provádějí v zařízení nazývaném termocykler, v němž se teplota mění automaticky v naprogramovaných časových intervalech. Postupným opakováním tohoto procesu se exponenciálně vytváří až miliarda kopií vybraného úseku cílové molekuly. Jelikož výsledkem PCR je mnohonásobné zmnožení vybraného úseku DNA, lze ji označit za způsob klonování DNA (Šmarda *et al.*, 2005).

Složky reakční směsi:

- ultračistá voda
- pufr s obsahem Mg^{2+} , které potřebují všechny termostabilní polymerázy pro svou aktivitu, jednomocné kationty (standardní PCR pufr obsahuje 50mM KCl), Tris-Cl (ve standardních PCR reakcích používán o koncentraci 10mM). Pufr tedy zajišťuje vhodné podmínky pro působení polymerázy
- dvojice vhodných primerů
- deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTPs) sloužící k syntéze polynukleotidového řetězce, mezi které patří dATP, dTTP, dCTP a dGTP

- termostabilní DNA-dependentní DNA - polymeráza (*Taq* polymeráza)
- templátová DNA (vlastní vzorek)

Do reakční směsi se někdy přidávají další komponenty, které mají za úkol zvýšit výtěžky a též specifitu reakce. Používají se např. při podezření na přítomnost inhibitorů *Taq* polymerázy v roztoku templátové DNA.

- BSA - hovězí serum-albumin. Prostřednictvím tohoto enzym-stabilizujícího proteinu můžeme dosáhnout vyšších výnosů PCR reakce
- DMSO - dimethyl sulfoxid (molekulární vzorec C_2H_6OS), rozšiřuje optimální rozmezí koncentrací $MgCl_2$, zlepšuje denuraci DNA

Praktické provedení:

PCR reakci jsme vždy míchali ve sterilním boxu, který byl zbaven (sterilizujícím UV světlem) mikroorganismů a veškeré DNA, která by mohla kontaminovat vzorky a sloužit jako nechtěný templát. Přesné složení reakční směsi jsme stanovili podle již vyzkoušeného protokolu, hodnoty jsou znázorněny v tabulce X. Poté jsme stanovili složení *master mixu*, tedy reakční směsi vynásobené počtem vzorků, včetně pozitivní a negativní kontroly. Jako pozitivní kontrola nám sloužila templátová DNA, obsahující úsek DNA specifický pro danou reakci, tzn. nesoucí gen, který chceme amplifikovat, použité pozitivní kontroly jsou v tabulce IX. Negativní kontrola obsahovala pouze *master mix*, tedy všechny složky PCR kromě templátové DNA. Negativní kontrola ověřovala čistotu reakční směsi od náhodné kontaminace DNA a také vylučovala falešně pozitivní výsledek amplifikace. Složení *master mixu* jsme počítali bez objemu templátové DNA, který se pak přidával do každé mikrozkušavky zvlášť.

Před vlastním mícháním *master mixu* jsme si nejdříve sterilní box vysterilizovali (20 min UV světlem), poté jsme si připravili potřebné roztoky a nechali je pomalu rozpouštět na ledu. V boxu jsme podle protokolu namíchali *master mix* do sterilní zkumavky (začali jsme vodou končili polymerázou). Z takto připraveného *master mixu* jsme odpipetovali 24 μ l (vždy stejný objem) do jednotlivých mikrozkušavek, kalibrovaných na objem 200 μ l.

DNA jsme přidávali mimo PCR box na stole, který je určen jen pro tuto činnost. Mikrozkušavky jsme po přidavku DNA umístili do ledovacího stojánku, abychom snížili riziko nesespecifického nasednutí primerů na ne zcela komplementární místa v DNA, což se může přihodit při laboratorní teplotě a DNA–polymeráza by mohla, byť s nízkou účinností, syntetizovat nežádoucí úseky DNA. Do každé mikrozkušavky, kromě negativní kontroly, jsme přidali 1 μ l příslušné DNA (naředěné na 20-50 ng/ μ l).

Takto připravené vzorky jsme vložili do termocykleru (viz výše). Zkušavky s reakční směsí jsou v termocykleru umístěny v kovovém bloku, jehož teplota je řízena podle programu nastaveného uživatelem, PCR podmínky a primery jsou popsány v tabulce IX.

Tab. IX: PCR podmínky a primery používané pro amplifikaci genů tetracyklinové rezistence.

Gen	Primery	Sekvence primerů 5'-3' (Odkaz)	Cykly PCR reakce	Délka výsledného produktu [bp]	Pozitivní kontrola
<i>tet(B)</i>	<i>tet(B)</i> (F) <i>tet(B)</i> (R)	TACGTGAATTTATTGCTTCGG ATACAGCATCCAAAGCGCAC (Aminov <i>et al.</i> , 2002)	I. 4min/94°C II. 30s/94°C III. 31s/61°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 3min/72°C	206	Plazmid nesoucí gen <i>tet(B)</i> (pRT11 obsahující 2,7 kb <i>HpaI</i> fragment s <i>tet(B)</i> z lambda: Tn10) (Aminov <i>et al.</i> 2002)
<i>tet(L)</i>	<i>tet(L)</i> (F) <i>tet(L)</i> (R)	CATTTGGTCTTATTGGATCG ATTACACTTCCGATTTTCGG (Aarestrup <i>et al.</i> , 2000)	I. 5min/94°C II. 30s/94°C III. 30s/55°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 3min/72°C	494	<i>Staphylococcus aureus</i> pSTS9 (Aarestrup <i>et al.</i> 2000)
<i>tet(V)</i>	<i>tet(V)</i> (f) <i>tet(V)</i> (frc)	CGAGACCACCTTCGACAGCG GCCTACGGTTTCATCCTGGC (Kyselková <i>et al.</i> , nepublikováno)	I. 7min/95°C II. 1min/94°C III. 15s/65°C IV. 30s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 5min/72°C	331	<i>Mycobacterium DNA 4C</i> (Kyselková <i>et al.</i> , nepublikováno)
<i>otr(B)</i>	<i>otr(B)</i> (F) <i>otr(B)</i> (R)	CCGACATCTACGGGCGCAAGC GGTGATGACGGTCTGGGACAG (Nikolakopoulou <i>et al.</i> , 2005)	I. 5min/94°C II. 1min/94°C III. 1min/68°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/72°C	947	<i>Streptomyces rimosus subsp. rimosus</i> DSMZ 40260 (ATTC 10970)
<i>tet(Z)</i>	<i>tet(Z)</i> (F) <i>tet(Z)</i> (R)	CCTTCTCGACCAGGTCGG ACCCACAGCGTGTCCGTC (Aminov <i>et al.</i> , 2001)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 30s/60°C IV. 50s/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/68°C	204	Plazmid, nesoucí gen <i>tet(Z)</i> (pAGHD1 obsahující <i>tet(Z)</i> z pAG1 plazmidu z <i>Corynebacterium glutamicum</i>) (Tauch <i>et al.</i> , 2000)
<i>tet(M)</i>	<i>tet(M)</i> (F) <i>tet(M)</i> (R)	ACAGAAAGCTTATTATATAAC TGGCGTGTCTATGATGTTTAC (Aminov <i>et al.</i> , 2001)	I. 4min/94°C II. 20s/94°C III. 30s/52,3°C IV. 1min/72°C (zpět na krok II., opakovat 34x) V. 7min/68°C	171	Plazmid pAT101, nesoucí gen <i>tet(M)</i> z transpozonu Tn1545 rodu <i>Streptococcus</i> (Martin <i>et al.</i> , 1986)

Tab. X: Výsledné složení PCR reakčních směsí pro jednotlivé geny tetracyklinové rezistence.

Výsledné koncentrace ve 25 μ l reakci						
Amplifikovaný gen	<i>tet(B)</i>	<i>tet(L)</i>	<i>tet(V)</i>	<i>otr(B)</i>	<i>tet(Z)</i>	<i>tet(M)</i>
Pufr	1x ^a	1x ^a	1x ^a	1x ^b	1x ^a	1x ^a
MgCl ₂	1,5mM	1,5mM	1,5mM	-	1,5mM	1,5mM
dNTPs	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM	0,2mM
Forwad primer	500nM	1000nM	500nM	100nM	250nM	500nM
Reverse primer	500nM	1000nM	500nM	100nM	250nM	500nM
DMSO	5 %	5 %	5 %	-	5%	5 %
BSA	0,12mg/ml	0,12mg/ml	0,12mg/ml	-	0,12mg/ml	0,12mg/ml
DreamTaq TM polymeráza	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l	-	0,05U/ μ l	0,05U/ μ l
Templátová DNA	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l	0,8 – 2ng/ μ l
Q-solution	-	-	-	1x	-	-
Quiagen Taq	-	-	-	0,05U/ μ l	-	-

^a Pufr bez přídavku MgCl₂, který obsahuje 500mM KCl, 100mM Tris-Cl (pH 9.0) a 0,1% Triton X-100 v optimalizovaném poměru (Fermentas)

^b Pufr dodávaný s QuiagenTaq (Quiagen; obsahuje již Mg²⁺ ionty, přesné složení nezveřejněno)

3.4. Elektroforéza

Elektroforéza patří v molekulární biologii k nejpoužívanějším separačním technikám při izolaci a analýze nukleových kyselin a bílkovin. Principem elektroforetické separace je pohyb nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě – anodě (Šmarda *et al.*, 2005).

3.5. Gelová elektroforéza

Z praktických důvodů se elektroforéza neprovádí přímo v roztoku, ale ve vhodném nosiči, tím bývá obvykle gel. Elektroforetické gely používané pro separaci nukleových kyselin jsou nejčastěji tvořeny polyakrylamidem nebo agarózou, které vytvářejí síťovou strukturu polymerních molekul s póry, jejichž velikost lze ovlivnit složením roztoku a koncentrací polymeru. Agarózové gely jsou vhodné pro separaci molekul nukleových kyselin o velikosti od 100bp až po zhruba 50kb. Podle polohy gelu v elektroforetické aparatuře rozlišujeme horizontální a vertikální gelovou elektroforézu, které mají deskové uspořádání a dále kapilární elektroforézu, u níž je gel uvnitř kapiláry.

Velikost nukleové kyseliny nebo jejího fragmentu o neznámé velikosti lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů o známé velikosti, které se označují jako standardy velikosti nebo hmotnostní standardy.

Po dokončení elektroforézy jsou polohy separovaných molekul neviditelné, je třeba je zviditelnit vhodným barvivem. Nejčastěji je používán ethidiumbromid, který se vmezeřuje mezi sousední páry bází v DNA a vytváří s ní komplex, který po osvětlení ultrafialovým světlem fluoreskuje. Molekuly DNA o stejné velikosti jsou pak na gelu patrné jako proužky, jejichž intenzita je úměrná koncentraci DNA (Šmarda *et al.*, 2005).

Praktické provedení:

V našem případě jsme pracovali s agarózovými gely v horizontální elektroforetické aparatuře. Nejčastěji jsme požívali 1% nebo 2% gel, v závislosti na velikosti PCR produktu. Pro menší PCR produkty jsme volili 2% gel pro větší 1% gel, příprava agarózových gelů je zobrazena v tabulce XI.

Do Erlenmayerovy baňky jsme navázili agarózu a smíchali ji s pufrem v daném poměru (viz tabulka). Baňku jsme vložili do mikrovlnné trouby a nechali jsme agarózu v pufru dokonale rozpustit (cca 3 min na 800W). Vzniklý gel jsme částečně zchladili pod proudem vody a nalili ho do předem připravené vany s hřebenem. Po ztuhnutí gelu jsme hřeben odstranili. Gel jsme vložili do elektroforetické nádoby, obsahující TAE pufr. Do první jamky jsme nanесли marker (měřítko, podle kterého se odečítá velikost jednotlivých proužků DNA) a do dalších jamek vlastní vzorky (5 μ l z PCR reakční směsi) smíchané s nanášecím pufrem (6x Orange DNA Loading Dye, Fermentas) v poměru 1:6. Pufr, tedy hlavně jeho barva, umožňuje orientaci při nanášení vzorků do jamek a také umožňuje kontrolovat, jestli vzorky správně putují gelem při vlastní separaci. Jedná se o velmi hustou kapalinu a po smíchání se vzorkem dobře klesá do jamek v gelu. Používali jsme napětí 100V a elektroforézu jsme nechali běžet přibližně 45min. Po uplynutí této doby jsme gel obarvili ethidium-bromidem (1mg/l pufru). DNA s navázaným ethidium-bromidem jsme detekovali pomocí UV lampy. V místě, kam doputovaly molekuly DNA o stejné velikosti, se utvořil viditelný proužek. Přibližnou velikost molekul DNA v jednotlivých prouzcích jsme odečetli podle markeru.

Tab. XI: Příprava agarózových gelů podle velikosti fragmentů DNA, vhodné markery.

	Agaróza [g]	Pufr (1xTAE ^a) [ml]	Velikosti fragmentů [pb]	Použitý marker
1 % gel	1	100	947	Gene Ruler™ 1kb DNA Ladder
2 % gel	2	100	171 - 494	Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder

^a 40 mM Tris, 20mM kys. octová, 1 mM EDTA, pH=8,0

4. Výsledky

Výsledky PCR detekce vybraných *tet-r* genů shrnují tabulky XII a XIII. Z výsledků je patrné, že rezistom exkrementu léčené krávy (OE) obsahoval na začátku i na konci experimentu geny *tet(B)*, *tet(L)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(W)* a *tet(Q)*. Gen *tet(V)* byl detekován na začátku experimentu pouze v jednom opakování.

Nad naše očekávání byly rezistenční geny detekovány také v kontrolním exkrementu neléčeného zvířete (E). Tyto vzorky obsahovaly na začátku i na konci experimentu geny *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(W)* a *tet(Q)* ve všech opakováních. Gen *tet(L)* byl překvapivě detekován na začátku experimentu pouze v jednom opakování, na konci experimentu však byl nalezen už ve všech opakováních. Gen *tet(V)* byl detekován na začátku a na konci experimentu v jednom opakování.

Lze shrnout, že rezistom exkrementu léčeného zvířete se od rezistomu kontrolního neléčeného zvířete jasně lišil pouze v přítomnosti genu *tet(B)*.

Půdní vzorky bez přídavku exkrementu (S), měly podle očekávání, velmi chudý profil screenovaných *tet-r* genů. Detekován byl pouze *tet(L)* gen a to ve všech vzorcích, a *tet(V)* gen, a to pouze ve vzorcích z farmy 1. Gen *otr(B)*, charakteristický pro producenty tetracyklinu, nebyl nalezen v žádném půdním ani jiném vzorku.

Ve všech půdách inkubovaných s exkrementy léčeného (SOE) i neléčeného (SE) zvířete byly nalezeny geny *tet(L)*, *tet(Z)*, *tet(M)*, *tet(W)*. Gen *tet(V)* byl nalezen ve všech opakováních v SE i SOE půdách pouze u farmy 1 a dále ve dvou SE vzorcích u farmy 3. Gen *tet(B)* byl nalezen pouze v jednom opakování v SOE půdě z farmy 1.

Gen *tet(Q)*, charakteristický pro exkrementy, nebyl detekován v žádném půdním vzorku obohaceném exkrementy.

Tetracyklinový rezistom půdních vzorků byl významně obohacen *tet-r* geny fekálního bakteriálního společenstva.

Rozdíl mezi přenosem genů z exkrementu léčeného a neléčeného zvířete do půdy byl minimální.

Z šesti *tet-r* genů detekovaných v exkrementech se do půdy nepřenášel, v detekovatelném množství, pouze gen *tet(Q)*.

Tab.XII: Distribuce tetracyklin rezistenčních genů, pro efluxní pumpy, v exkrementech a inkubovaných půdách.

<i>tet-r</i> geny / výskyt		Exkrement				S			SE			SOE		
		E na začátku	E na konci	OE na začátku	OE na konci	Farma 1	Farma 2	Farma 3	Farma 1	Farma 2	Farma 3	Farma 1	Farma 2	Farma 3
EFFLUXNÍ PUMPY	<i>tet(B)</i> častý u G-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>tet(L)</i> zejména G+ s nízkým obsahem GC	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	<i>tet(Z)</i> G+ s vysokým obsahem GC (<i>Corynebacterium</i>)	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>tet(V)</i> G+ s vysokým obsahem GC (<i>Mycobacterium</i>)	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
		-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
		-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
		-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
	<i>otr(B)</i> (<i>Streptomyces</i> , <i>Mycobacterium</i>)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tab.XIII: Distribuce tetracyklin rezistenčních genů, pro proteiny ribozomální protekce, v exkrementech a inkubovaných půdách.

<i>tet-r</i> geny / výskyt		Exkrement				S			SE			SOE		
		E na začátku	E na konci	OE na začátku	OE na konci	Farma 1	Farma 2	Farma 3	Farma 1	Farma 2	Farma 3	Farma 1	Farma 2	Farma 3
PRP	<i>tet(M)</i> <i>G+/G-</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>tet(W)</i> <i>G+/G- zejména fakultativně anaerobní</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
		+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
	<i>tet(Q)</i> <i>G+/G- zejména anaerobní</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pozn. *Tet(Q)*, *tet(W)* výsledky získané pomocí real-time PCR (Kyselková *et al.*, nepublikováno).

5. Diskuse

Výsledky neprokázaly rozdíl mezi přítomností *tet-r* genů v exkrementech léčeného a kontrolního (nelečeného) zvířete, výjimkou byl gen *tet(B)* detekovaný v exkrementu léčeného zvířete.

Gen *tet(B)* se typicky vyskytuje u třídy Gamma Proteobacteria, zejména u enterobakterií (tj. čeledi Enterobacteriaceae) např. u rodů *Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Proteus*. Je dobře zdokumentováno, že bakterie *E. coli* snadno získávají rezistence a jsou více odolné k antibiotikům než ostatní fekální mikroflóra (Österbalt *et al.*, 2000). Tito autoři zjistili, že míra ATB-rezistence proporcionálně odpovídá hladině antibiotika působícího na intestinální mikroflóru. Tato skutečnost by vysvětlila rozdíl mezi oběma typy vzorků, jelikož v exkrementech léčeného zvířete byly detekovány rezidua tetracyklinového antibiotika na rozdíl od kontrolního vzorku neléčeného zvířete. Dolejská *et al.* (2008) sledovali prevalenci TET-r izolátů *E. coli* na dvou mléčných farmách, kde byla zvířata ošetřována tetracyklinovými antibiotiky. Studie také ukázala, že tetracyklinový rezistom byl reprezentován výhradně geny *tet(B)* a *tet(A)*, že výskyt TET-r izolátů odpovídal spotřebě tetracyklinových antibiotik, a že rezistence se lišila v závislosti na stáří zvířat. V této práci bohužel byly sledovány pouze geny *tet(A)*, *tet(B)*, *tet(C)*, *tet(D)*, *tet(E)*.

Shodný výskyt ostatních *tet-r* genů ve vzorku léčeného i neléčeného zvířete, lze vysvětlit získáním rezistenčních genů kontrolním zvířetem v důsledku předchozí léčby tetracyklinovými antibiotiky v průběhu života (přesné údaje bohužel nejsou dostupné) nebo sdílením společné mikroflóry, jak je typické pro uzavřená společenstva. Rybaříková *et al.* (2010) ukázali, že významným rezervoárem i vektorem rezistentních *E. coli* je v kravínech mléčných farem hmyz.

Půdy bez přídavku exkrementu měly nízký výskyt *tet-r* genů. Oproti našemu očekávání jsme v těchto půdách nedetekovali gen *otr(B)*, typický pro půdní producenty tetracyklinu – *Streptomyces*. Je možné, že se zde gen *otr(B)* vyskytuje, ale není dostatečně abundantní na to, abychom ho mohli detekovat. Detekovali jsme pouze gen *tet(L)*, který je velmi rozšířený, byl nalezen v půdě i v ŽO (Wu *et al.*, 2010, Schwaiger *et al.*, 2009), dokonce i v nedotčených půdách (Ghosh *et La Para*, 2007). Gen *tet(L)* byl zatím nalezen u 38 bakteriálních rodů (tabulka IV), vyskytuje se hlavně u kmenů Firmicutes, Bacteroidetes a Actinobacteria. To, že jsme ho detekovali i v půdě s přídavkem exkrementu od lečené a

kontrolní krávy je v souladu s jeho promiskuitou u velkého množství G+ a G- bakteriálních rodů, a tedy asi častým HGP. Dále jsme také detekovali v půdě jedné z farem gen *tet(V)* ve všech opakováních. Tento gen je typický pro mykobakterie, tedy skupinu bakterií patřící do kmenu Actinobacteria (tabulka IV). Je pravděpodobné, že právě půda z této farmy byla bohatá na mykobakterie.

Do půdy ošetřovné exkrementy neléčeného i léčeného zvířete se přenesly geny *tet(Z)*, *tet(M)* a *tet(W)*. Buď tedy došlo k adaptaci fekálních bakterií na půdní prostředí, nebo došlo k HGP mezi fekálními a půdními bakteriemi. Gen *tet(Z)* byl zjištěn zatím pouze u dvou bakteriálních rodů *Lactobacillus* a *Corynebacterium*, je tedy charakteristický pro kmény Firmicutes a Actinobacteria. V případě genu *tet(Z)* bude hrát asi větší roli adaptace nositele genu v novém prostředí než-li HGP, protože právě *Corynebacterium* patřící do kmene Actinobacteria, vykazuje tedy schopnost čelit nepříznivým podmínkám. Podobně i *Lactobacillus* může přežívat v půdě, např. v rhizosféře (Holt *et al.*, 1994).

Zatímco geny *tet(W)* a *tet(M)* byly nalezeny u mnoha bakteriálních rodů, dokonce v případě genu *tet(M)* u 68 rodů. U obou genů se jedná především o zástupce kménů Firmicutes, Proteobacteria a Actinobacteria, u *tet(W)* za zmínku stojí také bakteriální kmen Bacteroidetes (tabulka IV). Geny *tet(M)* a *tet(W)* se nacházejí na konjugovatelných plazmidech a transpozonech (Chopra *et Roberts*, 2001), data tedy naznačují, že může docházet k HGP.

To že gen *tet(B)* byl detekován pouze v jednom opakování v půdě s přídavkem exkrementu od léčené krávy ukazuje na neschopnost enterobakterií přežít v takovýchto podmínkách. Přenos genu *tet(V)* lze na základě výsledků prokázat pouze v případě přidání exkrementů neléčeného zvířete do půdy z farmy 3, jeho přenos byl však sporadický stejně jako jeho výskyt ve vzorcích exkrementu.

Přenos genu *tet(Q)* z obou exkrementů do půdy nebyl detekován. Gen *tet(Q)* je charakteristický především pro striktní anaerobní bakterie, zejména zástupce Bacteroidetes (tab VI), které tvoří až 40 % fekální mikroflóry skotu (Durso *et al.*, 2010) a v půdě, která byla každý týden během dvou měsíční inkubace promíchávána, pravděpodobně špatně přežívaly. Z literárních údajů vyplývá, že gen *tet(Q)* byl nalezen ve všech třech typech prostředí (Kobashi *et al.*, 2007; Patterson *et al.*, 2007; Peak *et al.*, 2007; Wu *et al.*, 2010; Schmitt *et al.*, 2006).

6. Závěr

V teoretické části své práce jsem shrnula výsledky prací zabývajících se výskytem genů odpovědných za rezistenci k tetracyklinu v intestinálním traktu, živočišných odpadech a půdě.

Literární data naznačila, že půda obohacená živočišnými odpady poskytuje nejbohatší rezervoár *tet-r* genů. Je však stále nedostatek prací, které by současně a za použití téže metodiky sledovaly výskyt *tet-r* genů ve všech typech prostředí našeho zájmu a napomáhaly vysvětlit, které faktory ve vytváření rezervoárů ATB-rezistence a šíření rezistenčních genů v půdním prostředí hrají významnou roli.

Z výsledků experimentální části vyplynulo, že zdrojem *tet-r* genů byly exkrementy skotu nezávisle na aktuální léčbě antibiotiky, a že tyto geny byly následně přenositelné do půdy.

Vliv reziduí tetracyklinových antibiotik v exkrementu hrál zanedbatelnou roli na rezistom exkrementů i exkrementy obohacených půd.

Výsledky experimentu naznačily rozdělení sledovaných genů do několika skupin s odlišným potenciálem pro jejich šíření v prostředí:

- (i) Jako nejvíce invazivní se jevil gen *tet(L)*, nalezený ve všech vzorcích, včetně nehnojených půd a dále geny *tet(M)* a *tet(W)*. Jedná se o geny detekované v širokém spektru bakterií. Lze usuzovat, že pro šíření těchto tří genů hraje pravděpodobně významnou roli horizontální přenos.
- (ii) Geny *tet(Z)* a *tet(V)* se také přenášely do půdy, ale vzhledem k omezenému výskytu mezi bakteriálními taxony, je předpokládána pouze adaptace jejich nositelů v novém prostředí. Méně úspěšný v přenosu se jevil gen *tet(V)*.
- (iii) Výskyt genu *tet(B)* byl podmíněn selekčním tlakem ATB v exkrementu a jeho přenos do půdy byl velmi omezený.
- (iv) Gen *tet(Q)* se nepřenášel, pravděpodobně z důvodů nevhodných podmínek pro přežití či HGP mezi nositeli a případnými půdními recipienty.

Seznam použité literatury:

Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. (2000). Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **37**: 127 – 137

Alexander TW, Yanke JL, Reuter T, Topp E, Read RR, Selinger BL, McAllister TA. (2011). Longitudinal characterization of antimicrobial resistance genes in feces shed from cattle fed different subtherapeutic antibiotik. *BMC Microbiology* **11**: 2 - 12

Allen SA, Boerlin P, Janecko N, Lumsden JS, Barker IK, Pearl DL, Reid-Smith RJ, Jardine C. (2011). Antimicrobial resistance in generic *Escherichia coli* isolates from wild small mammals living in swine farm, residential, landfill, and natural environments in Southern Ontario, Canada. *Environmental Microbiology* **77**: 882 - 888

Alonso A, Sánchez P, Martínéz JL. (2001). Environmental selection of antibiotic resistance genes. *Environmental Microbiology* **3**: 1 - 9

Aminov RI. (2010). A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future. *Frontiers in Microbiology* **1**: 1 - 7

Aminov RI, Chee-Sanford JC, Garrigues N, Teferedegne B, Krapac IJ, White BA, Mackie RI. (2002). Development, validation, and application of PCR primers for detection of tetracycline efflux genes of gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 1786 - 1793

Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. (2001). Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Applied and Environmental Microbiology* **67**: 22 – 32

Andermont A. (2003). Commensal flora may play key role in spreading antibiotic resistance. *ASM News* **69**: 601 - 607

Bednář M, Fraňková V, Schindler J, Souček A, Vávra J. (1996). Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha, pp 160 - 184

Beinlich KL, Chuanchuen R, Schweizer HP. (2001). Contribution of multidrug efflux pumps to multiple antibiotic resistance in veterinary clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology letters* **198**: 129 - 134

Cromwell GL. (2001). Antimicrobial and promicrobial agents. In: Lewis A, Southern L (eds). Swine nutrition. 2nd ed. CRC press, Boca Raton FL, pp 426

Cohen M. (1998). Antibiotic use. In: Harrison PF, Lederberg J (eds). Antimicrobial Resistance: Issues and Options. Division of Health Sciences Policy, Institute of Medicine, National Academy Press, Washington, DC, pp 41

Davies J. (1994). Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *Science* **264**: 375 – 382

D'Costa VM, Griffiths E, Wright GD. (2007). Expanding the soil antibiotic resistome: exploring environmental diversity. *Current Opinion in Microbiology* **10**: 481 – 489

Dolejská M., Šenk D., Čížek A., Rybaříková J., Sychra O., Literák I. (2008). Antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolates in cattle and house sparrows on two Czech dairy farms. *Research in Veterinary Science* **85**: 491 – 494

Durso LM, Harhay GP, Smith TPL, Bono JL, DeSantis TZ, Harhay DM, Andersen GL, Keen JE, Laegreid WW, Clawson ML. (2010). Animal-to-animal variation in fecal microbial diversity among beef cattle. *Applied and Environmental Microbiology* **76**: 4858 - 4862

Geddes A. (2008). 80th Anniversary of the discovery of penicillin, an appreciation of Sir Alexander Fleming. *International Journal of Antimicrobial Agents* **32**: 373

Ghosh S, LaPara MT. (2007). The effects of subtherapeutic antibiotic use in farm animals on the proliferation and persistence of antibiotic resistance among soil bacteria. *The ISME Journal* **1**: 191 - 203

Götz A, Smalla K. (1997). Manure enhances plasmid mobilization and survival of *Pseudomonas putida* introduced into field soil. *Applied and Environmental Microbiology* **63**: 1980 – 1986

Hogan D, Kolter R. (2002). Why are bacteria refractory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology* **5**: 472 – 477

Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Williams ST. (1994). Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (eds). 9th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, pp 787

Hölzel CS, Harms KS, Küchenhoff H, Kunz A, Müller C, Meyer K, Schwaiger K, Bauer J. (2009). Phenotypic and genotypic bacterial antimicrobial resistance in liquid pig manure is variously associated with contents of tetracyclines and sulfonamides. *Journal of Applied Microbiology* **108**: 1642 - 1656

Chee-Sanford JC, Mackie RI, Koike S, Krapac IG, Lin YF, Yannarell AC, Maxwell S, Aminov RI. (2009). Fate and transport of antibiotic resistance genes following land application of manure waste. *Journal of Environmental Quality* **38**: 1086 – 1108

Chopra I. (1994). Tetracycline analogs whose primary target is not the bacterial ribosome. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **38**: 637 – 640

Chopra I, Roberts MC. (2001). Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular biology Reviews* **65**: 232 – 260

Jindal A, Kocherginskaya S, Mehboob A, Robert M, Mackie RI, Raskin L, Zilles JL. (2006). Antimicrobial use and resistance in swine waste treatment systems. *Applied and Environmental Microbiology* **72**: 7813 - 7820

Kobashi Y, Hasebe A, Nishio M, Uchiyama H. (2007). Diversity of tetracycline resistance genes in bacteria isolated from various agricultural environments. *Microbes and Environments* **22**: 44 - 51

Levy SB, McMurry LM, Barbosa TM, Burdett V, Courvalin P, Hillen W, Roberts MC, Rood JI, Taylor DE. (1999). Nomenclature for new tetracycline resistance determinants. *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **43**: 1523 - 1524

Literák I, Dolejská M, Radimerský T, Klimeš J, Friedman M, Aarestrup FM, Hasman H. (2009). Antimicrobial-resistant fecal *Escherichia coli* in wild mammals in central Europe: multiresistant *Escherichia coli* producing extended-spectrum β -laktamases in wild boars. *Journal of Applied Microbiology* **108**: 1702 - 1711

Madigan MT, Martinko JM, Parker J. (2006). Brock Biology of Microorganisms. 11th ed. Pearson Education, USA, pp 669 - 700

Manavathu EK, Fernandez CL, Cooperman BS, Taylor DE. (1990). Molecular studies on the mechanism of tetracycline resistance mediated by Tet(O). *Antimicrobial agents and Chemotherapy* **34**: 71 – 77

Martin P, Trieu-Cuot P, Courvalin P. (1986). Nucleotide sequence of the Tet M tetracycline resistance determinant of the streptococcal conjugative shuttle transposon Tn1545. *Nucleic Acids Research* **14**: 7047 – 7058

Mindlin SZ, Soina VS, Petrova MA, Gorlenko ZhM. (2008). Isolation of antibiotic resistance bacterial strains from Eastern Siberia permafrost sediments. *Russian Journal of Genetics* **44**: 27 - 34

Nass T, Mikami Y, Imai T, Poirel L, Nordmann P. (2001). Characterization of In53, a class 1 plasmid- and composite transposon-located integron of *Escherichia coli* which carries an unusual array of gene cassettes. *Journal of Bacteriology* **183**: 235 – 249

Ng. LK, Martin I, Alfa M, Mulvey M. (2001). Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes* **15**: 209 – 215

Nikolakopoulou TL, Egan S, van Overbeek LS, Guillaume G, Heuer H, Wellington EMH, van Elsas JD, Collard J-M, Smalla K, Karagouni AD. (2005). PCR detection of oxytetracycline resistance genes *otr(A)* and *otr(B)* in tetracycline-resistant streptomycete isolates from diverse habitats. *Current Microbiology* **51**: 211 – 216

Nwosu VC. (2001). Antibiotic resistance with particular reference to soil microorganisms. *Research in Microbiology* **152**: 421 - 430

Österbalt M, Hakanen A, Manninen R, Leistevuo T, Peltonen R, Meurman O, Huovinen P, Kotilainen P. (2000). A between-species comparison of antimicrobial resistance in enterobacteria in fecal flora. *Antimicrob. Agents Chemother* **44**: 1479 - 1484

Patterson AJ, Colangeli R, Spigaglia P, Scott KP. (2007). Distribution of specific tetracycline and erythromycin resistance genes in environmental samples assessed by microarray detection. *Environmental Microbiology* **9**: 703 - 715

Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. (1996). Proton - dependent multidrug efflux systems. *Microbiology and Molecular biology Reviews* **60**: 575 - 608

Peak N, Knapp CHW, Yung RK, Hanfelt MM, Smith MS, Aga DS, Graham DW. (2007). Abundance of six tetracycline resistance genes in wastewater lagoons at cattle feedlots with different antibiotic use strategies. *Environmental Microbiology* **9**: 143 – 151

Roberts MC. (1996). Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews* **19**: 1 – 24

Roberts MC. (2005). Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiology letters* **245**: 195 – 203

Rowe-Magnus DA, Guerout AM, Mazel D. (2002). Bacterial resistance evolution by recruitment of super-integron gene cassettes. *Molecular Microbiology* **43**: 1657 - 1669

Rybaříková J, Dolejská M, Materna D, Literák I, Čížek A. (2010). Phenotypic and genotypic characteristics of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from symbiotic flies, cattle and sympatric insectivorous house martins from a farm in the Czech Republic (2006–2007). *Research in Veterinary Science* **89**: 179 – 183

Sambrook J, Russel DW. (2001). Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Cold Spring Harbor, New York, pp 8.18 – 8.113

Schmitt H, Stoob K, Hamscher G, Smit E, Seinen W. (2006). Tetracyclines and tetracycline resistance in agricultural soils: microcosm and field studies. *Microbial Ecology* **51**: 267 - 276

Schwaiger K, Harms K, Hölzel Ch, Meyer K, Karl M, Bauer J. (2009). Tetracycline in liquid manure selects for co-occurrence of the resistance genes tet(M) and tet(L) in *Enterococcus faecalis*. *Veterinary Microbiology* **139**: 386 - 392

Smalla K, Heuer H, Götz A, Niemeyer D, Krögerrecklenfort E, Tietze E. (2000). Exogenous isolation of antibiotic resistance plasmids from piggery manure slurries reveals a high prevalence and diversity of IncQ-like plasmids. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 4854 - 4862

Srinivasan V, Nam HM, Sawant AA, Headrick SI, Nguyen LT, Oliver SP. (2007). Distribution of tetracycline and streptomycin resistance genes and class 1 integrons in Enterobacteriaceae isolated from dairy and nondairy farm soils. *Microbial Ecology* **55**: 184 - 193

Šmarda J, Doškař J, Pantůček R, Růžičková V, Koptíková J. (2005). Metody molekulární biologie. Vydavatelství Masarykovy Univerzity, Brno, pp 73 - 110

Tauch A, Puhler A, Kalinowski J, Thierbach G. (2000). Tet(Z) and new tetracycline determinant discovered in gram-positive bacetria, show high homology to gram-negative regulated efflux system. *Plasmid* **44**: 285 – 291

Thaker M, Spanogiannopoulos P, Wright GD. (2009). The tetracycline resistome. *Cellular and Molecular Life Sciences* **67**: 419 – 431

Thomashow RF, Bonsall RF, Weller DM. (1997). Antibiotic production by soil and rhizosphere microbes in situ. In: Hurst CJ, Knudson GR, McInerney MJ, Stetzenbach LD, Walter MV (eds). *Manual of Environmental Microbiology*. ASM Press, Washington, DC, pp 493 - 499

Trieber CA, Taylor DE. (2002). Mutations in the 16S rRNA genes of *Helicobacter pylori* mediate resistance to tetracycline. *Journal of Bacteriology* **184**: 2131 - 2140

Vaisvila R, Morgan RD, Pasfai J, Raleigh EA. (2001). Discover and distribution of super-integrans among pseudomonads. *Molecular Microbiology* **42**: 587 - 601

Votava M. (2005). *Lekářská mikrobiologie obecná*. Neptun, Brno, pp 235

Walsh F, Ingenfeld A, Zampiccolli M, Hilber-Bodmer M, Frey JE, Duffy B. (2011). Real-time PCR methods for quantitative monitoring of streptomycin and tetracycline resistance genes in agricultural ecosystems. *Journal of Microbiological Methods* **86**: 150 – 155

Watanabe T. (1963). Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriology Reviews* **27**: 87 - 115

Witte W. (1998). Medical consequences of antibiotic use in agriculture. *Science* **279**: 996 - 997

Wu N, Qiao M, Zhang B, Cheng WD, Zhu YG. (2010). Abundance and diversity of tetracycline resistance genes in soil adjacent to representative swine feedlots in China. *Environmental Science & Technology* **44**: 6933 – 6939

<http://faculty.washington.edu/marilynr/>, Roberts 2011

<http://en.wikipedia.org/wiki/Mycoplasma>

[http://search.who.int/search?q=antibiotic+multiresistance&ie=utf8&site=default_collection
&client=_en&proxystylesheet=_en&output=xml_no_dtd&oe=utf8](http://search.who.int/search?q=antibiotic+multiresistance&ie=utf8&site=default_collection&client=_en&proxystylesheet=_en&output=xml_no_dtd&oe=utf8)