

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PEDAGOGICKÁ FAKULTA

Katedra biologie

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Bc. Adéla Unzeitigová

**Charakterizace mikroflóry a výskyt genů rezistence k antibiotikům  
ve slepých střevech rodičovských generací brojlerů a nosnic**

Olomouc 2024

vedoucí práce: Mgr. Eva Jahodářová, Ph.D.

konzultant: Mgr. Tereza Kubasová, Ph.D.

### **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Evy Jahodářové, Ph.D., s využitím podkladů (použitá literatura, internetové zdroje, vlastní empirická data) citovaných v práci a uvedených v příloženém seznamu literatury. Diplomová práce byla vypracována v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o autorském právu, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) v platném znění.

V Olomouci dne 17. 4. 2024

---

Adéla Unzeitigová

## **Poděkování**

Na tomto místě bych chtěla velmi poděkovat mé vedoucí diplomové práce Mgr. Evě Jahodářové Ph.D., za nasměrování k tak zajímavému tématu, cenné rady a za její čas, který mi věnovala. Děkuji za vedení obou mých závěrečných prací a za podporu v průběhu studia.

V rámci této práce bych chtěla především poděkovat Mgr. Tereze Kubasové Ph.D., se kterou jsem strávila týden ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství. Děkuji za všechnen čas a trpělivost a při vysvětlování metodik a následném vedení při experimentech a zpracovávání výsledků. Děkuji za ochotu při konzultacích a za motivaci a vlídné přijetí, i když nejsem z oboru. Také velmi děkuji všem zaměstnankyním z Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, se kterými jsem se při experimentech potkala.

V neposlední řadě děkuji rodině za podporu během celého studia

Velmi si vážím toho, že jsem při studiu na Pedagogické fakultě dostala příležitost vyzkoušet si práci v mikrobiologické laboratoři a jsem vděčná všem, díky kterým mi to bylo umožněno.

## ANOTACE

Jméno a příjmení:	Bc. Adéla Unzeitigová
Katedra:	Katedra biologie
Vedoucí práce:	Mgr. Eva Jahodářová, Ph.D.
Rok obhajoby:	2024

Název práce:	Charakterizace mikroflóry a výskyt genů rezistence k antibiotikům ve slepých střevech rodičovských generací brojlerů a nosnic
Název v angličtině:	Characterization of microbiome and presence of antibiotic resistance genes in caecal microbiome of parental generation of boilers and egg-laying hens
Zvolený typ práce:	Výzkumná práce
Anotace práce:	<p>Diplomová práce se zabývá problémem antibiotické rezistence, zejména jejím rozšířením ve velkochovech drůbeže. Jelikož střevní bakterie jsou často přehlíženým rezervoárem genů antibiotické rezistence, první část se zaměřuje na vývoj a složení střevní mikroflóry slepic. Další část literární rešerše se zabývá antibiotiky a jejich využitím ve veterinární medicíně. Zároveň se zaměřuje na problém antibiotické rezistence a metody její detekce.</p> <p>Cílem praktické části bylo popsat složení střevní mikroflóry brojlerů a nosnic po produktivním věku, a zároveň pomocí metody real-time PCR detekovat vybrané geny antibiotické rezistence v těchto vzorcích. Výsledky obou experimentů byly proti sobě vyneseny v korelační analýze, pomocí které byly předpovězeny čeledě, jež mohou sloužit jako možný rezervoár genů antibiotické rezistence.</p>
Klíčová slova:	antibiotická rezistence, střevní mikroflóra, brojler, nosnice, rodičovské farmy
Anotace v angličtině:	<p>This thesis deals with the problem of antibiotic resistance, especially its spread in poultry farms. Intestinal bacteria are often an overlooked reservoir of antibiotic resistance genes, so the first part focuses on the development and composition of the chicken intestinal microflora. Next section of the literature review deals with antibiotics and their use in veterinary medicine. It also focuses on the problem of antibiotic resistance and methods of its detection.</p> <p>The aim of the practical part was to describe the composition of the intestinal microflora of broilers and laying hens after the productive age, and to detect selected antibiotic resistance genes in these samples using real-time PCR method. The</p>

	results of both experiments were compared in a correlation analysis, through which families that may serve as potential reservoirs of antibiotic resistance genes were predicted.
Klíčová slova v angličtině:	antibiotic resistance, intestinal microbiota, broiler, egg-laying hen, parent flock
Přílohy vázané v práci:	-
Rozsah práce:	87
Jazyk práce	Čeština

## Seznam zkratk

ATB	antibiotika
DHPS	dihydropteroát-syntetáza
DNA	deoxyribonukleová kyselina
ESBL	Extended-spectrum $\beta$ -lactamases
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
EARS-Net	Evropský systém surveillace antibiotické rezistence
ECDC	Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí
EMA	Evropský úřad pro léčivé přípravky
ESAC- Net	Evropský systém sledování spotřeby antibiotik
MBC	minimální baktericidní koncentrace
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRL	Maximum Residue Level
NAP	národní antibiotický program
PCU	populační korekční jednotka
RNA	ribonukleová kyselina
ÚSKVBL	Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv
WHO	Světová zdravotnická organizace

# Obsah

1. ÚVOD .....	9
2. TEORETICKÁ ČÁST.....	11
2.1 Střevní mikroflóra .....	11
2.1.1 Střevní mikroflóra kuřat .....	12
2.1.2 Vývoj střevní mikroflóry.....	13
2.1.3 Způsoby modifikace střevní mikroflóry .....	14
2.2 Antibiotika.....	15
2.2.1 Historie antibiotik.....	15
2.2.2 Mechanismy působení antibiotik .....	18
2.2.3 Antibiotika ve veterinární medicíně .....	22
2.2.3.1 Historie používání antibiotických látek ve veterinární medicíně.....	22
2.2.3.2 Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně.....	23
2.2.4 Antibiotická politika .....	25
2.3 Antibiotická rezistence .....	28
2.3.1 Vznik antibiotické rezistence .....	28
2.3.1.1 Mechanismy vzniku antibiotické rezistence .....	29
2.3.2 Přenos genů rezistence mezi bakteriemi .....	29
2.3.3 Přenos genů antibiotické rezistence v prostředí .....	31
2.3.4 Rezistence u vybraných skupin antibiotik.....	32
2.4 Metody detekce bakteriální rezistence .....	34
2.4.1 Kultivační metody .....	35
2.4.2 Molekulárně biologické metody.....	38
3. CÍLE PRÁCE .....	41
4. PRAKTICKÁ ČÁST.....	42
4.1 Materiál a metody.....	42
4.1.1 Pitva.....	42
4.1.2 Izolace DNA.....	42
4.1.3 Real-time PCR.....	42
4.1.4 Sekvenování oblasti V3/V4.....	44
4.2 Výsledky.....	46
4.2.1 Složení střevní mikroflóry.....	46
4.2.2 Geny rezistence v cekální mikroflóře.....	52

4.2.3 Korelační analýza.....	57
5. DISKUZE.....	60
6. ZÁVĚR.....	65
7. LITERATURA .....	67



# 1. ÚVOD

Uvedení antibiotik na trh bylo rozhodně jedním z největších milníků medicíny dvacátého století. Díky antibiotikům se průměrná délka života zvýšila o 23 let a některé nemoci, které byly dříve smrtelné, bylo možné poměrně jednoduše vyléčit (Hutchings et al. 2019). Brzy se však zjistilo, že i tento „záračný“ lék má svá omezení. Bakterie, proti kterým antibiotika působí, se na přítomnost léku mohou adaptovat a vzniká tak antibiotická rezistence (Fleming 1945).

Antibiotická rezistence má genetický základ a je kódovaná specifickými geny. K vytvoření genu antibiotické rezistence dochází při styku bakterie s antibiotikem. Pokud je však gen rezistence pro bakterii evoluční výhodou, tento gen je spolu s dalším genetickým materiálem předáván do dalších generací. Bakterie mají zároveň schopnost horizontálního přenosu, a tak mohou být geny rezistence, pomocí mobilních genetických elementů, předávány mezi různými druhy bakterií (Barker 1999).

Geny antibiotické rezistence se tak mohou u bakterií vyskytovat i bez předchozího kontaktu bakterie s antibiotikem (Barlow 2009). Rezistentní bakterie významně omezují efektivitu léčby a nemoci, které byly donedávna léčitelné, se znovu stávají smrtelné. V důsledku infekcí způsobených rezistentními bakteriemi ročně v Evropské unii zemře 33 000 lidí (OECD 2022).

Místa s největším výskytem rezistentních bakterií, označované jako rezervoáry antibiotické rezistence, jsou především nemocnice a odpadní vody, ale také prostředí velkochovů hospodářských zvířat (Bueno et al. 2018). Ve velkochovech se antibiotika od jejich objevení používala k prevenci onemocnění a také jako stimulatory růstu (Dibner a Richards 2005). I přesto, že tyto praktiky byly v Evropské unii zakázány před téměř dvaceti lety (v roce 2006), velkochovy dodnes představují velký rezervoár genů antibiotické rezistence (Florez-Cuadrado et al. 2018).

Jelikož antibiotika nepůsobí cíleně pouze na patogenní bakterie, geny antibiotické rezistence jsou důležité i pro bakterie komenzální (Marshall et al. 2009). Komenzální bakterie tak představují obrovský rezervoár, protože například ve střevní mikroflóře slepic se vyskytuje až  $10^{10}$  bakterií na gram tráveniny (Juricova et al. 2021).

Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci autorky s názvem *Střevní mikroflóra kuřat*. První kapitola teoretické části je věnována tématu střevní mikroflóry, jejímu významu a

složení. Další kapitoly se věnují antibiotikům a jejich využití ve veterinární medicíně, a dále také problému antibiotické rezistence a metodám její detekce.

Cílem praktické části je detekce vybraných genů antibiotické rezistence ve vzorcích střevní mikroflóry slepic pomocí real-time PCR. Dále se práce zabývá popisem složení konkrétních vzorků střevní mikroflóry slepic. Výsledky obou experimentů jsou proti sobě vyneseny v korelační analýze, pomocí které je možné předpovědět bakteriální čeledě, jež jsou potenciálně významnými nositeli genů antibiotické rezistence.

## 2. TEORETICKÁ ČÁST

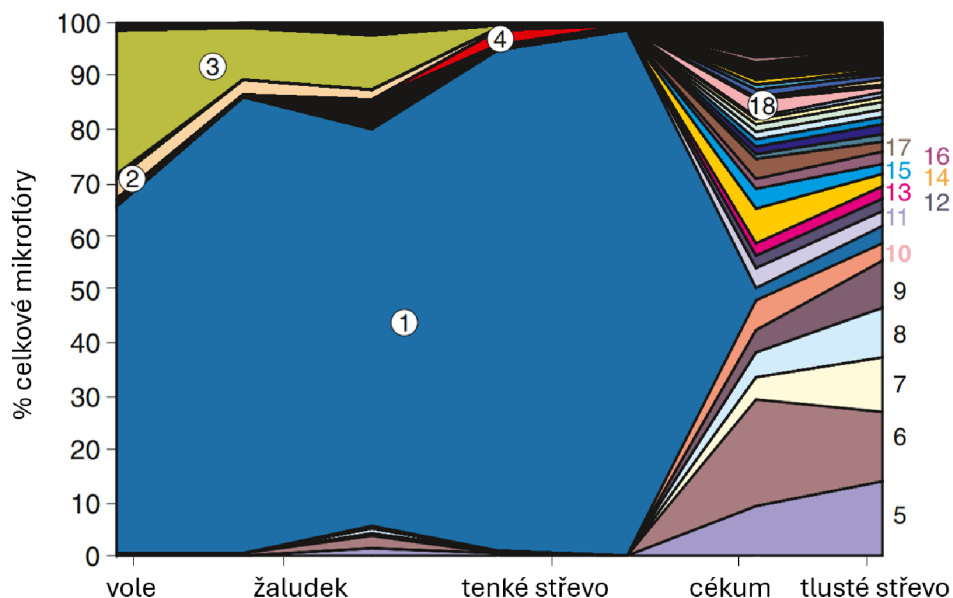
### 2.1 Střevní mikroflóra

Zdravá střevní mikroflóra plní pro hostitele mnoho důležitých funkcí. Napomáhá trávení, stimuluje vývoj střevních tkání a velmi významně se podílí na zdraví a odolnosti jedince (Jandhyala 2015). Zdravá populace komenzálních bakterií ve střevě funguje na principu kompetitivní exkluze, kdy zdravá populace znemožní kolonizaci střeva cizími druhy bakterií, které mohou být i patogenní (Nurmi et al. 1992).

Složení střevní mikroflóry bylo dlouho popisováno jen pomocí kultivačních metod, které pro tuto oblast zkoumání nejsou dostatečné. Střeva obývá mnoho anaerobních bakterií, které běžně kultivovat nelze (Gong et al. 2002a; Jandhyala 2015). V dnešní době můžeme celkové složení mikroflóry popsat díky celogenomovému sekvenování. Tato metoda umožnila detailnější pochopení složení mikroflóry a jejího vlivu na zdraví jedince (Gong et al. 2002a; Ghanbari et al. 2015).

Základní složení střevní mikroflóry je u všech všežravých teplokrevných zvířat, včetně člověka, velmi podobné. Podobnost lze ale pozorovat pouze na úrovni kmenů. Základní složení mikroflóry tvoří kmeny *Bacteroidetes*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Actinobacteria* (Pushpanathan et al. 2019; Crespo-Piazuelo et al. 2018; Kubasova et al. 2019). Druhové složení je však velmi rozdílné, například *Faecalibacterium* nalézané u kuřat má s lidským *Faecalibacterium prausnitzii*, na základě sekvenace 16S rRNA pouze 96–97% podobnost (Rychlík 2020).

Různé oblasti střev obsahují různé množství a také druhové zastoupení mikroorganismů (Obrázek 1) (Glendinning et al. 2019). V rámci zkoumání střevní mikroflóry slepic je objektem zájmu především slepé střevo, jelikož se zde vyskytuje největší počet (až  $10^{10}$  bakterií na gram tráveniny) a také nejvíce různých druhů mikrobů (kolem 700 druhů) z celého trávicího traktu (Sergeant et al. 2014).



Obrázek 1 Složení mikroflóry trávicího traktu dospělé slepice

Jsou popsány pouze nejzastoupenější rody. 1 – *Lactobacillus*, 2 – *Veillonella*, 3- *Gallibacterium*, 4 – *Campylobacter*, 5 – unclassified *Lachnospiraceae*, 6 – *Bacteriodes*, 7 – *Faecalibacterium*, 8 – *Megamonas*, 9 – *Olsenella*, 10 – *Phascolarctobacterium*, 11 – *Prevotella*, 12 – *Blautia*, 13 – *Pseudoflavonifractor*, 14 – *Barnesiella*, 15 – *Desulfovibrio*, 16 - *Clostridium* XIVa, 17 – unclassified *Porphyromonadaceae*, 18 – *Alistipes* Převzato z (Videnska et al. 2013a).

### 2.1.1 Střevní mikroflóra kuřat

Nejvýznamnějším donorem správné mikroflóry pro kuře jsou dospělí jedinci (Gong et al. 2002b). Proto v běžném kurníku, kde jsou kuřata v blízkosti slepic a jejich trusu, se „dospělá“ mikroflóra vyvine do jednoho týdne. To ale neplatí pro kuřata chovaná v komerčních líhních (Kubasova et al. 2019). V komerčních líhních je úplně přerušeno s dospělými jedinci, a tak je hlavním zdrojem mikroflóry krmivo, podestýlka a prostředí líhně (Gong et al. 2002b). Bez kontaktu s dospělými jedinci se střevní mikroflóra vyvíjí mnohem pomaleji a není schopna plnohodnotně zastoupit princip kompetitivní exkluze, a kuřata se tak stávají náchylnější k různým patogenům jako je *Salmonella* (Crhanova et al. 2011; Videnska et al. 2013b) nebo *Campylobacter* (Patuzzi et al. 2021).

Dle obsáhlé meta-analytické studie Chica Cardenas et al. (2021) se ve slepém střevě objevuje 109 rodů bakterií z 11 kmenů. Nejpočetnějšími kmeny jsou *Firmicutes*, *Bacteroidetes* a *Proteobacteria*. Dále se velmi často objevují kmeny *Spirochaetes*, *Verrumicrobia*, *Deferribacteres*, *Tenericutes* a *Synergistetes*. Na úrovni rodů, jsou nejzastoupenější

*Oscilospira*, *Bacteroides*, *Helicobacter*, *Lactobacillus*, *Megamonas*, *Ruminococcus* a *Campylobacter*.

### 2.1.2 Vývoj střevní mikroflóry kuřat

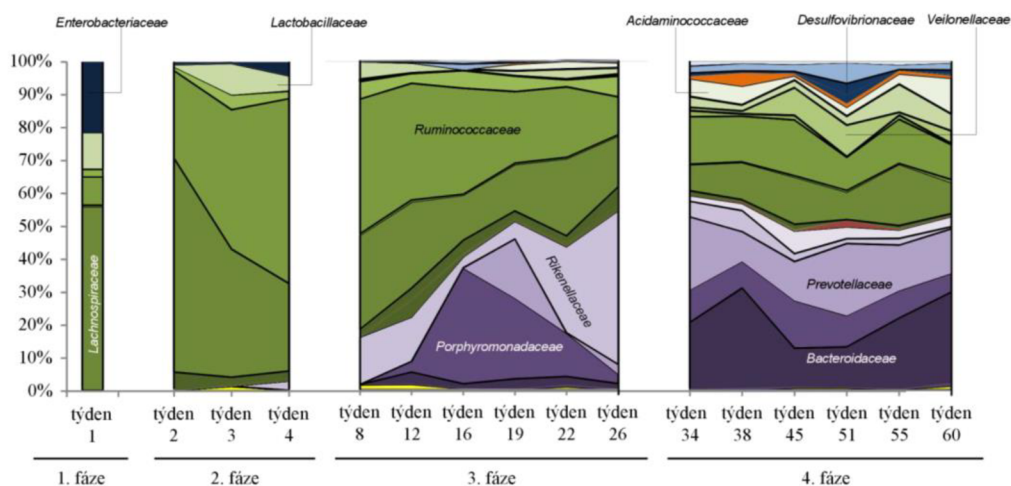
Vývoj střevní mikroflóry nosnic v komerční produkci se rozděluje na čtyři vývojová stadia (Obrázek 2). Jako první stadium je označován první týden, mezi 2.–4. týdnem nastává druhé stadium, třetí stadium trvá do 6. měsíce a od 6. měsíce nastává stabilní čtvrtá a poslední fáze vývoje (Videnska et al. 2014).

Jako první střevo osidlují zástupci kmene *Proteobacteria* (21–50 %), a to především druh *Escherichia coli* (Videnska et al. 2014). Dochází k tomu, jelikož je *E. coli* všudypřítomný fakultativní anaerob (Tenailon et al. 2010) a je tedy pravděpodobné, že přijde do kontaktu i s vylíhlým kuřetem. Dle studie Glendinning et al. (2019) jsou vzorky odebrané ze slepých střev v prvním dnu života tvořeny především rodem *Clostridium* sensu stricto 1 patřící do kmene *Firmicutes*. Do konce prvního týdne se dominantním taxonem mikroflóry slepých střev stanou zástupci čeledi *Lachnospiraceae* (kmen *Firmicutes*) (Videnska et al. 2014).

Ve druhém stadiu je 90 % mikroflóry tvořeno zástupci čeledi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae* (kmen *Firmicutes*). Zastoupení kmene *Proteobacteria* se snížilo pod 10 %. Minoritně je v této fázi zastoupena také čeleď *Lactobacillaceae*. V počátcích třetího stadia je mikroflóra tvořena čeleděmi *Lachnospiraceae* a *Ruminococcaceae*. Na úrovni rodu pak *Faecalibacterium*, *Bifidobacterium* (Glendinning et al. 2019).

Toto stadium je dále charakterizováno nahrazováním kmene *Firmicutes* bakteriemi kmene *Bacteroidetes* (Videnska et al. 2014).

Čtvrté stadium je velmi komplexní a také stabilní. Kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* jsou zastoupeny rovnoměrně (cca 45 %). V této fázi se také znovuobjevují zástupci kmene *Proteobacteria*, především rody *Desulfovibrio* a *Succinivibrio*, které tvoří kolem 5 % mikroflóry (Videnska et al. 2014).



Obrázek 2 Vývoj střevní mikroflóry nosnic dle Videnska et al. (2014)

Graf znázorňuje procentuální zastoupení nejvýznamnějších bakteriálních čeledí ve slepých střevech nosnic během 60 týdnů. Kmen *Bacteroidetes* je znázorněn fialově, *Firmicutes* zeleně a *Proteobacteria* modře.

### 2.1.3 Způsoby modifikace střevní mikroflóry kuřat

V komerčních chovech má na složení střevní mikroflóry vliv především složení krmných směsí. Tyto směsi mohou být založeny například na bázi kukuřice, ječmenu nebo sóji. Při podávání kukuřičných směsí dochází například ke zvyšování počtu zástupců rodu *Enterococcus* (Apajalahti et al. 2004), naopak dieta založená na sóji zvyšuje počty *Lachnospiraceae* a *Lachnoclostridium* (Li et al. 2020). Zastoupení rodu *Lactobacillus* zvyšuje dieta založená na ječmeni (Apajalahti et al. 2004).

Jako alternativa přirozeně získané mikroflóry se ve velkochovech používají probiotika. Jde o izolované kultury mikroorganismů, které mají přispívat ke zdraví hostitele (Kabir 2009). Příznivý vliv na užítkovost brojlerů, modulaci jejich střevní mikroflóry a inhibici patogenů, mají například probiotické druhy patřící do rodu *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus* a *Saccharomyces* (Zulkifli et al. 2000; Kalavathy et al. 2003; Gil de Los Santos et al. 2010; Mountzouris et al. 2007).

Dále se na trhu objevují přípravky pro kompetitivní exkluzi jako Aviguard a Broilact. Ty mají na rozdíl od probiotik rozmanitější složení, podobné tomu, které se přenáší z dospělé slepice na kuřata. Tyto přípravky se skládají z rodů *Lactobacillus*, *Clostridiales*, různých druhů *Bacteroides*, *Megamonas*, *Megasphaera*, *Dialister*, *Phascolarctobacterium*, *Sutterella*, *Parasutterella* a *Bifidobacterium* (Rychlik 2020).

Dříve byla střevní mikroflóra modifikována především podáváním antibiotik. Antibiotika z hlediska užítkovosti příznivě ovlivňovala zdraví zvířat. Zajišťovala prevenci onemocnění

a vyšší váhové přírůstky (Ferket et al. 2002). Tyto postupy ale vedly k postupné adaptaci bakterií ve střevě, které se tak stávaly k antibiotikům rezistentní. Rutinní používání antibiotik tak muselo být zakázáno z důvodu možného šíření rezistentních bakterií na člověka (Castanon 2007).

## 2.2 Antibiotika

Uvedení antibiotik na trh ve 20. století bylo jedním z největších milníků moderní medicíny (Hutchings et al. 2019). Antibiotika jsou látky, které inhibují nebo přímo usmrcují bakterie, aniž by škodily lidským buňkám a tkáním. Teoreticky by se tedy dalo říct, že antibiotika selektivně poškozují buňky prokaryotní, a přitom neovlivňují buňky eukaryotní (Beneš 2018). Antibiotika, ale nejenže léčí bakteriální infekce, dokážou jim i předcházet. Užití antibiotik proto umožnilo provádět první transplantace orgánů a kardiochirurgické operace. Zavedení antibiotik na trh zvýšilo délku průměrného lidského života o 23 let (Hutchings et al. 2019).

Produkce antibiotik je životní strategií některých bakterií a hub, které se takto snaží omezit výskyt potravních konkurentů v jejich životním prostředí. Například jde o grampozitivní bakterie kmene *Actinobacteria* rodu *Streptomyces* (Durand et al. 2019; Anderson et al. 2012). Producenty antibiotik jsou ale i jiné bakterie a některé houby, které produkují například peniciliny a cefalosporiny. Další možností získávání antibiotik je chemická syntéza. Dříve byla tato skupina látek nazývána jako chemoterapeutika, ale toto rozdělení se již nepoužívá (Beneš 2018).

### 2.2.1 Historie antibiotik

První antibiotika byla používána již ve starověkých kulturách. Zmínky o antibiotické léčbě sahají až do roku 1550 př. n. l., kdy byl v Egyptě vytvořen Ebersův papyrus, dokument popisující medicínské postupy své doby. V Ebersově papyru se objevuje zmínka o léčbě plesnivým chlebem, který byl využíván pro zdravotní problémy, jako byly hnisavé rány, onemocnění močového měchýře a střevní problémy (Parkins 2001). Dalším příkladem je medicína starověké Číny, podle které byly vhodnou léčbou vředů a hnisavých ran plesnivé sójové boby (Kourkouta et al. 2018).

Způsob, jakým plesnivý chléb a plesnivé sójové boby působily na tyto obtíže, byl tehdy neznámý. Až o mnoho století později bylo objeveno, že plíseň na chlebu, dnes nazývaná

*Penicillium*, produkuje penicilin, což je jedna z prvních známých látek s antibiotickými vlastnostmi (Kourkouta et al. 2018).

Dalším případem užívání antibiotik bez znalosti toho, jak fungují, je tisíc let starý recept na léčbu infekce způsobenou bakterií *Staphylococcus aureus* (Harrison et al. 2015). Harrison et al. (2015) zrekonstruovali potenciální lék na infekci *Staphylococcus aureus* z Anglosaské knihy medicínských postupů z 10. století. Tento lék byl schopen usmrtit kolonie *Staphylococcus aureus* i methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA). Lék obsahoval několik složek, které jsou známy pro svoji určitou antibakteriální účinnost, ale plného potenciálu antibiotického účinku bylo dosaženo až jejich smícháním. Tato studie ukazuje, že středověké texty jsou možným zdrojem „nových“ antibiotik.

### **Antibiotická éra**

Počátek antibiotické éry bývá spojován se jmény Paul Ehrlich a Alexander Fleming, faktem ale je, že první antibiotikem podávaným v nemocnicích byl lék zvaný Pyocyanáza (Aminov 2010), který vyvinuli němečtí vědci Rudolf Emmerich a Oscar Löw (Emmerich a Löw 1901). Pyocyanáza byla založena na extraktech bakterie *Pseudomonas aeruginosa* (Gonçalves a Vasconcelos 2021), které při laboratorním testování dokázaly usmrtit bakterie způsobující cholera, tyfus a antrax. Bohužel při praktickém využití léčba nebyla dostatečně efektivní, na pacienty působila různě, a nakonec byla pro člověka spíše toxická (Kourkouta et al. 2018; Aminov 2010).

Dílo Paula Ehrlicha vycházelo z jeho pozorování syntetických a anilinových barev, při kterém objevil, že tato barviva dokážou zabarvit určité mikroby a jiné nikoliv. Toto pozorování jej nasměrovalo k vytvoření látky se selektivním účinkem proti určitým mikrobům. V roce 1904 započal výzkum s cílem objevit lék proti syfilidě. Léčba tohoto onemocnění byla tehdy téměř nemožná (Winau et al. 2004; Aminov 2010).

Společně s chemikem Alfredem Bertheimem a bakteriologem Sachariem Hatou syntetizovali stovky derivátů vysoce toxického léku nazývaného Atoxyl. V roce 1909 v průběhu šestisté série pokusů objevili látku, která byla schopna vyléčit syfilidou infikované králíky. Tuto sloučeninu pojmenovali Salvarsan, a do padesátých let 19. století se stala nejpředepisovanějším lékem proti syfilidě (Winau et al. 2004; Kawamura 2023).

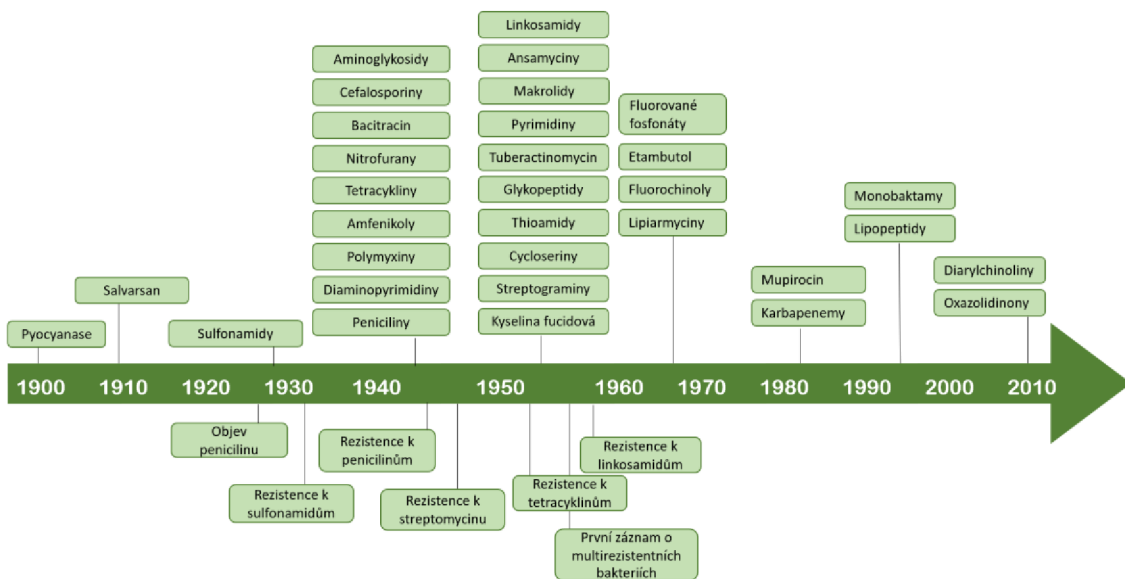
Paul Ehrlich kromě léku na syfilis především představil revoluční metodiku pro systematický a rozsáhlý výzkum. Jeho postup se stal základem pro vývoj mnoha dalších léků,



včetně antimikrobiálních látek. Posílil tak základy moderního lékařství a farmakologie (Valent et al. 2016).

Avšak nejvýznamnějším milníkem v rozvoji antimikrobiálních léčiv bylo objevení penicilinu. V roce 1928 Alexander Fleming zaznamenal antibakteriální vlastnosti plísně rostoucí na staré Petriho misce. Flemingovi se podařilo vzorek plísně izolovat a správně jej identifikoval jako plíseň *Penicillium* (Fleming 1929). Proto nová látka dostala název penicilin. Během svých experimentů zjistil, že penicilin účinkuje proti stafylokokům a obecně zejména proti gram-pozitivním bakteriím (Aminov 2010; Nicolaou a Rigol 2018). Byl to ale až tým vědců z Oxfordu vedený Howardem Floreyem a Ernestem Chainem, kterému se podařilo purifikovat dostatečné množství účinné látky z *Penicillium* (Chain a Florey, 2005). Až jejich postup vedl k masové výrobě a distribuci penicilinu v roce 1940 (Aminov 2010). Za svůj přínos v oblasti medicíny obdržel Fleming spolu s Floreyem a Chainem v roce 1945 Nobelovu cenu za fyziologii a lékařství (Fleming 1945). Ve stejném roce potvrdila Dorothy Hodgkin beta-laktamy jako účinnou látku penicilinu, což umožnilo vývoj polysyntetických derivátů penicilinu (Hutchings et al. 2019).

Fleming podobně jako Ehrlich velmi ovlivnil vědu a experimenty svým inovátorským přístupem k výzkumu. Jeho metoda, využívající inhibiční zóny na naočkované tuhé půdě, vyžadovala mnohem méně zdrojů než testy na modelových zvířatech, a proto se stala široce využívanou a započala tak zlatou éru objevování nových antibiotických látek mezi lety 1950–1970 (viz Obrázek 3). Antibiotika objevená v těchto letech jsou dodnes základem léčby (Aminov 2010).



Obrázek 3 Časová osa uvedení skupin antibiotik na trh

Ve spodní části jsou znázorněny první výskyty vybraných rezistencí a jiné důležité milníky antibiotické éry. Upraveno dle: Doğan 2022; Fleming 1929; Roberts 2003; Thumu a Halami 2012; Honoré a Cole 1994

## 2.2.2 Mechanismy působení antibiotik

Antibiotika je možné dělit dle mnoha kritérií, např. dle původu, mechanismu působení, cílového místa účinku, síly účinku, spektra účinku, chemické struktury, rozpustnosti i způsobu podávání (Anderson et al. 2012). V této kapitole je používáno členění antibiotik dle mechanismu působení a jsou uvedeny příklady antibiotik, ke kterým se vztahují geny antibiotické rezistence, kterým se věnuje praktická část.

### Antibiotika působící proti buněčné stěně bakterií

Nepostradatelnou součástí buněčné stěny bakterií je peptidoglykan, který tvoří vnější kostru bakteriální buňky. Jeho hlavní funkcí je udržovat tvar buňky a bránit jejímu rozpínání (Vollmer et al. 2008). Peptidoglykan je ideálním cílem pro léčbu, protože jeho struktura zůstává téměř identická u všech grampozitivních a gramnegativních bakterií po miliony let. Dále je výhodou, že se nachází na povrchu buňky grampozitivních bakterií a přímo pod vnější membránou gramnegativních bakterií, což zajišťuje snadný přístup (Beneš 2018).

Významným kritériem je také skutečnost, že peptidoglykan není přítomen v eukaryotních buňkách, což znamená, že antibiotika zaměřená na inhibici jeho syntézy nepoškozují lidský ani zvířecí organismus. Antibiotika, která blokují syntézu peptidoglykanu, mají svůj účinek zejména proti množícím se bakteriím, které jsou závislé na intenzivní syntéze této látky. Tato antibiotika jsou proto ideální pro léčbu akutních infekcí (Lima et al. 2020).

Tato skupina antibiotik zahrnuje zejména  $\beta$ -laktamová antibiotika, která se dělí do pěti hlavních podskupin: peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobaktamy a inhibitory  $\beta$ -laktamáz (Poole 2004).

### Peniciliny

Peniciliny jsou antibiotika se širokým spektrem účinku, které se využívají především k léčbě infekcí vyvolaných grampozitivními bakteriemi a některých smíšených infekcí. Jde o pravděpodobně nejznámější a nejúspěšnější skupinu antibiotik. Peniciliny se dodnes v mnoha případech v humánní medicíně používají jako antibiotikum první volby (Štefan 2022). Jediným nežádoucím účinkem penicilinů bývají různé alergické reakce (Shenoy et al. 2019).

### **Antibiotika působící na buněčnou membránu bakterií**

Buněčná membrána bakterií odděluje bakteriální buňku od vnějšího prostředí. Je tvořena lipidovou dvouvrstvou s mnoha vmezeřenými proteiny. Buněčná membrána plní funkci bariérovou a také zde dochází k buněčnému dýchání (Kimelberg 1976).

Antibiotika, jejichž cílovým místem je cytoplazmatická membrána, narušují její funkci a strukturu, což vede ke smrti bakteriální buňky. Některá antibiotika z této skupiny nepůsobí na grampozitivní bakterie, jelikož nejsou schopny proniknout vrstvou peptidoglykanu. Jiné naopak nepůsobí na gramnegativní bakterie, protože se nedokážou navázat na vnější membránu těchto bakterií. Účinek bohužel není zcela selektivní, jelikož působí na struktury podobné těm, které se nacházejí v eukaryotických buňkách. Proto se tato antibiotika používají spíše povrchově (Štefan 2022).

### **Antibiotika působící na nukleové kyseliny**

Antibiotika této skupiny cílí na syntézu DNA. Na procesu syntézy DNA se podílí mnoho makromolekul, jako například enzymy topoizomerázy. Antibiotika této skupiny cílí na enzym topoizomeráza IV a DNA gyráza. Topoizomeráza IV odpojuje nově replikovanou DNA, čímž umožňuje správnou segregaci chromozomů a plazmidů. Bez funkční topoizomerázy IV se zreplikovaná DNA není schopna od původního chromozomu či plazmidu odpojit. Při poškození DNA gyráza nedochází ke správnému nadšroubovicovému vinutí, což má dopad na prostorové uspořádání DNA a její metabolismus (Khodursky a Cozzarelli 1998).

Jelikož je DNA pro život klíčová, antibiotická rezistence vzniká relativně rychle a také se rychle šíří (Beneš 2018). Antibiotika patřící do této skupiny se nazývají chinolony a pro humánní lékařství jsou klíčová (European Medicines Agency 2019).

## **Antibiotika působící na ribozomy**

Tato skupina antibiotik ovlivňuje funkci ribozomů několika způsoby, vážou se na funkční centra ribozomů a inhibují proteosyntézu v různých fázích. Způsob, který využívají například linkosamidy, je zabránění přístupu tRNA nesoucí aminokyseliny, což znemožňuje pokračování proteosyntézy. Některá antibiotika mohou také zapříčinit uvolnění tRNA předčasně, to vede k vytváření nefunkčních bílkovin. Další typ antibiotik zamezuje posunu ribozomu po mRNA, což způsobuje chyby během procesu translace (Spížek a Řezanka 2017).

Tato antibiotika specificky neovlivňují funkci eukaryotních ribozomů, protože se jejich struktura výrazně liší. Mohou však narušovat funkci mitochondriálních ribozomů, které jsou téměř identické s těmi bakteriálními. Léčba tetracykliny je často spojována s nežádoucími účinky, jako jsou únava a celková slabost, což může být způsobeno právě poškozením mitochondrií pacienta (Singh et al. 2014).

### Linkosamidy

Linkosamidy jsou úzkospektrá antibiotika působící pouze na grampozitivní bakterie, jelikož neproniknou vnější membránou gramnegativních bakterií. Linkosamidy poškozují bakterie i v malých dávkách a nedovolují plně uplatnit mechanismy virulence. Linkosamidy se používají na anaerobní nebo smíšené infekce, které mají chronický průběh (Spížek a Řezanka, 2017; Štefan 2022).

Ve veterinární medicíně se řadí do skupiny antibiotik skupiny C, což znamená, že v humánní medicíně jsou dostupné alternativy k tomuto antibiotiku (European Medicines Agency 2019).

### Tetracykliny

Tetracykliny byly jedny z prvních antibiotických přípravků vůbec. Dříve byly oblíbené především kvůli širokospektrým bakteriostatickým účinkům. Používaly se od léčby bronchitid, infekcí močových cest až po léčbu pohlavně přenosných bakteriálních infekcí. Tetracykliny se ale brzy začaly využívat i v živočišné výrobě nejen jako léky, ale i jako růstové stimulanty. Důsledkem tohoto nadužívání se samozřejmě brzy objevila rezistence u mnoha patogenních bakterií (Roberts 2003).

Ve veterinární medicíně se řadí do skupiny antibiotik skupiny D, což znamená, že se řadí mezi antibiotika první volby (European Medicines Agency 2019).

## Aminoglykosidy

Aminoglykosidy na bakteriální buňky působí navázáním na 30S podjednotku ribozomu, následkem toho dochází k tvorbě nefunkčních proteinů. Aminoglykosidy ale na rozdíl od ostatních antibiotik, které působí na ribozomy působí baktericidně. Aminoglykosidy tedy musí působit i na jiné struktury v bakteriální buňce. Pravděpodobně se jedná o poškození buněčné membrány nebo inhibici replikace DNA. Do skupiny aminoglykosidů se řadí antibiotikum streptomycin. Ten se používá pro léčbu tuberkulóz, mykobakterióz a enterokokových a streptokokových onemocnění (Štefan 2022).

Ve veterinární medicíně se řadí do skupiny antibiotik skupiny C (European Medicines Agency 2019).

## **Oxidačně působící antibiotika**

Tato antibiotika způsobují těžké poškození bakteriálních buněk. Antibiotikum se váže na makromolekuly bakterií, na enzymy i nukleové kyseliny. Jakmile se antibiotikum naváže, pozmění strukturu makromolekul a ty nejsou schopny dále fungovat (Beneš 2018). Kvůli nespecifickému mechanismu účinku, je pro bakterie téměř nemožné vytvořit rezistenci (McOsker a Fitzpatrick 1994).

## **Antibiotika inhibující jednotlivé metabolické dráhy**

Antibiotika této skupiny působí na enzymy metabolických drah bakterií. Tato antibiotika na živočišné buňky nepůsobí, protože využívají jiné metabolické dráhy než bakterie, a v případě stejných metabolických drah využívají bakterie jiné enzymy (Beneš 2018).

## Sulfonamidy

Sulfonamidy působí na různé grampozitivní i gramnegativní bakterie. Používají se na těžší průjmové infekce a záněty močových cest. Díky nim byla eradikována lepra (Beneš 2018). Sulfonamidy mají stejnou strukturu jako kyselina p-aminobenzoová, která je klíčová pro syntézu enzymu dihydropteroát-syntáza, který je součástí metabolické dráhy kyseliny listové. Tím že se sulfonamid naváže místo kyseliny p-aminobenzoové, vznikají nefunkční enzymy pro tvorbu kyseliny listové. Bez kyseliny listové dochází k poruchám nukleových kyselin a poškození bakteriální buňky (Sköld 2000).

## 2.2.3 Antibiotika ve veterinární medicíně

### 2.2.3.1 Historie používání antibiotických látek ve veterinární medicíně

Antibiotika se brzy po objevení začala využívat i ve veterinární medicíně. Když se antibiotika používají jako lék, podávají se krátkodobě ve vyšších koncentracích. Brzy bylo ale zjištěno, že v malých koncentracích a dlouhodobě fungují jako stimulatory růstu a prevence onemocnění (Moore et al. 1946). I přes varování, že při tomto způsobu podávání si bakterie rychle budují rezistenci (Fleming 1945), byla antibiotika velmi výhodná, a tak se začala na farmách rutinně využívat (Skřivanová a Rada 2014).

Jedna z prvních studií, která potvrdila schopnost antibiotik v malých dávkách působit jako stimulatory růstu, byla studie Moore et al. (1946). Během této studie bylo zjištěno, že přidání streptomycinu a sulfadimidinu do krmiva drůbeže vedle k větším příbytkům na váze než u drůbeže, která byla krmena bez těchto aditiv. Tyto výsledky přisuzovali tomu, že streptomycin a sulfadimidin inhibují činnost střevních bakterií, které produkují toxiny nebo využívají živiny na úkor zvířete.

Jako antibiotické stimulatory růstu jsou dnes označovány látky, které jsou podávány v malých dávkách, mají schopnost podpořit růst zvířete a zlepšit vstřebávání živin a zefektivnit celkovou živočišnou produkci (Ronquillo a Hernandez 2017). Jak stimulatory růstu fungují, není dodnes spolehlivě vysvětleno, pravděpodobně inhibují růst střevní mikroflóry a tím snižují konkurenci o živiny mezi mikroflórou a zvířetem nebo eliminují patogenní bakterie, což zlepšuje celkové zdraví zvířat (Ronquillo a Hernandez 2017).

Od 50. let se jako stimulatory růstu používaly peniciliny, streptomyciny, chlortetracykliny a oxytetracykliny. Později se začala využívat skupina antibiotik nazývaná „specifická nutriční antibiotika“. Do této skupiny patřil zejména bacitracin, flavofosfolipol, virginiamycin, avoparcin a další (Skřivanová a Rada 2014). Využívání antibiotik jako růstových stimulatorů bylo velmi oblíbené. Pro výkrm zvířat bylo potřeba méně krmiva, a proto maso a jiné živočišné produkty mohly být pro spotřebitele levnější (Al-Dobaib a Mousa 2009).

Rutinní používání antibiotik v živočišné výrobě má ale závažné důsledky. Mezi ně patří zejména vznik antibiotické rezistence a přenos rezistentních bakterií na člověka. Zpočátku nebyla antibiotická rezistence považována za velkou hrozbu, jelikož stále docházelo k objevu nových antibiotik a bakteriálních mechanismů, na které mohou antibiotika působit. Avšak

koncem 80. let 20. století došlo k téměř úplnému zastavení vývoje nových antibiotik a význam rezistence jako závažného problému pro veřejné zdraví se zvýšil (Mancuso et al. 2021).

Dalším důsledkem rutinního používání antibiotik v živočišné výrobě jsou rezidua antibiotických látek v živočišných produktech. Antibiotika mohou přetrvávat v masných a mléčných produktech a mohou mít potenciální negativní dopady na lidské zdraví, včetně nárůstu rezistence v lidském mikrobiomu (Ronquillo a Hernandez 2017).

První zemí, která zakázala používání antibiotik jako stimulatorů růstu, bylo Švédsko v roce 1986. Postupně se přidávaly i další státy, ale ty zakazovaly využívání pouze několika druhů antibiotik. Až v roce 2006 bylo Evropským parlamentem plošně zakázáno využívání veškerých antibiotik jako krmných aditiv za účelem prevence nebo stimulace růstu (Skřivanová a Rada 2014).

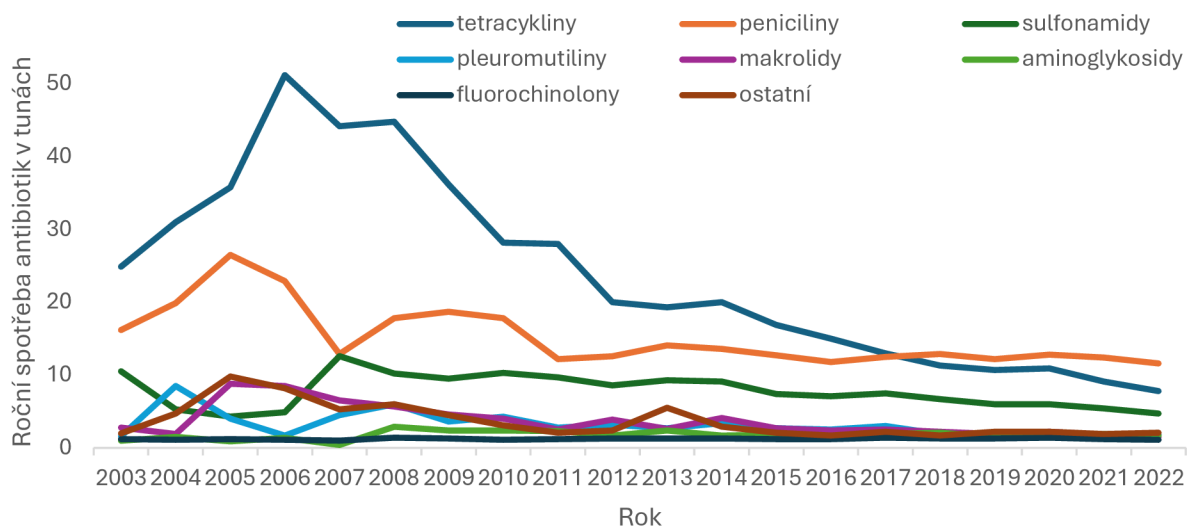
### **2.2.3.2 Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně**

V rámci živočišné výroby již není možné antibiotika používat preventivně nebo za účelem stimulace růstu. Pro ochranu welfare zvířat jsou ve veterinární medicíně stále využívána. I v rámci veterinárního lékařství je ale nadměrná spotřeba antibiotik, a tím zvýšená antibiotická rezistence, dlouhodobým problémem. Z tohoto důvodu je potřeba spotřebu antibiotik monitorovat, vyhodnocovat a podnikat určité kroky k nápravě (OECD 2022). V České republice je spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně dlouhodobě monitorována. Komentované spotřeby antimikrobik ve veterinární medicíně vydává Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčiv (ÚSKVBL) od roku 2003 (Hera et al. 2010).

Spotřeba antibiotik je zaznamenávána dvěma způsoby. Prvním je sledování počtu využitých balení antibiotik, ze kterých jsou v hmotnostních objemech vyjádřeny čisté antibiotické látky. Druhou možností je standardizovaný ukazatel mg/PCU, přičemž mg je spotřebovaná dávka antibiotik a PCU (Population Correction Unit) vyjadřuje součin hmotnosti populace hospodářských zvířat (v kilogramech živé hmotnosti) a korekčního koeficientu, který odráží průměrnou hmotnost jednoho zvířete v daném druhu. Pro stanovení hodnoty PCU jsou v České republice využívána především data z databází EUROSTAT a TRACES, jelikož jde o mezinárodně uznávané databáze a je možné porovnávat hodnoty mezi státy (ÚSKVBL 2020).

Ve veterinární medicíně v České republice převažuje každoročně používání sedmi skupin antibiotik, konkrétně tetracyklinů, sulfonamidů a penicilinů, makrolidů, pleuromutilinů, aminoglykosidů a fluorochinolonů (Obrázek 4). I přes dlouhotrvající trend snižování spotřeby

antibiotik ve veterinární medicíně jsou tyto skupiny antibiotik každoročně využívány v celkovém množství přesahujícím tunu (ÚSKVBL 2020).



Obrázek 4 Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně mezi lety 2003–2022

(Hera et al. 2010; ÚSKVBL 2020; European Medicines Agency 2023; European Medicines Agency 2022)

V České republice je ve veterinární medicíně tzv. skupina „TOP 3“ antibiotických skupin, které se používají nejvíce. Jsou to tetracykliny, sulfonamidy a peniciliny. Již několik let zastupují tyto skupiny zhruba 75 % veškerých spotřebovaných antibiotik (ÚSKVBL 2020).

Česká republika je jednou ze zemí s nejvyšší spotřebou tetracyklinů a sulfonamidů, používaných pro medikaci zvířat. Dlouhodobá spotřeba tetracyklinů a sulfonamidů se promítá do profilů rezistence bakterií. Různé typy genů *tet* a *sul*, kódujících rezistence, jsou nalézány ve vzorcích odebraných od různých druhů hospodářských zvířat. Spotřeba tetracyklinů ale klesá, mezi lety 2010 a 2018 klesla o 57 % (přepočet z vyjádření v mg/PCU). Poprvé v hodnocené historii u nás prodej penicilinu převážil tetracyklinová antibiotika v roce 2018 (ÚSKVBL 2020).

Důležitou součástí používání antibiotik ve veterinární medicíně je také měření zbytkového množství antibiotika v živočišných produktech. Legislativně jsou stanoveny hodnoty MRL (maximum residue level), což jsou maximální hladiny reziduí v živočišných produktech určených ke konzumaci (Schwarz a Chaslus-Dancla 2001).



V rámci monitoringu antibiotických reziduí bylo v roce 2021 vyšetřeno 1810 vzorků tkání a hodnoty MRL byly překročeny pouze ve třech případech. V roce 2022 byly ze 1 751 vyšetřovaných vzorků hodnoty překročeny pouze ve dvou případech. Situace je tedy hodnocena pozitivně, jelikož šlo vždy o jednotlivé selhání, např. nedodržení ochranné lhůty po poslední aplikaci léku (Státní veterinární správa 2022).

#### **2.2.4 Antibiotická politika**

Předepisování antimikrobiálních léčiv je regulováno antibiotickou politikou, což představuje souhrn opatření zaměřených na efektivní a bezpečné užívání antibiotik jak v humánní, tak veterinární praxi (Cully 2014).

V České republice začala antibiotická politika vznikat v 50. letech 20. století, tedy v době, kdy byl zaveden penicilin do klinické praxe. V roce 2003 byla jmenována komise pro Národní program antibiotické politiky a v roce 2009 byl ustanoven Národní antibiotický program (NAP). Cílem NAP je zajištění dostupné a účinné antibiotické léčby a systémový boj s antibiotickou rezistencí (Státní zdravotní ústav 2009).

NAP dodnes vytvořil dva akční plány pro boj s antibiotickou rezistencí. První akční plán NAP pro období 2011–2013 byl vytvořen na popud nadužívání a nesprávného používání antibiotik ve všech druzích léčebných zařízení. Tento stav se týkal většiny evropských zemí a Česká republika se v rámci některých rezistencí patogenů řadila k nejhorším v Evropě. Bylo třeba implementovat principy z Doporučení Rady EU (2002/77/ES) o obezřetném používání antimikrobiálních látek v lékařství a Doporučení Rady EU (2009/C 151/01) o bezpečnosti pacientů včetně prevence a kontroly infekcí (Státní zdravotní ústav 2011). Pro tento plán bylo velkou výhodou, že již v té době byla v České republice funkční síť antibiotických středisek; existující metodika vyšetření citlivosti k antibiotikům; dlouhodobá kontinuita epidemiologicky relevantních dat a také dlouhá účast v projektu EARS-Net (Evropský systém surveillance antibiotické rezistence) (Státní zdravotní ústav 2011).

Druhý akční plán NAP pro období 2019–2022 navazoval na první akční plán. Hlavními pilíři tohoto programu bylo: zlepšení informovanosti široké veřejnosti o problému rezistencí k ATB, pokračování v kontrolách a prevencích antibiotické rezistence a podpora výzkumu rezistencí. Tento plán dbal na spolupráci mezi humánní a veterinární medicínou (Státní zdravotní ústav 2019).

V rámci Evropy se antibiotické rezistenci věnuje několik organizací. Evropský systém surveillance antibiotické rezistence (EARS-Net) byl prvním nezávislým projektem (1999),

který shromažďoval a analyzoval stav antibiotické rezistence u klinicky významných bakterií na národní a Evropské úrovni. Česká republika se tohoto projektu účastní téměř od začátku (ECDC, 2024). Další agenturou Evropské unie je Evropské centrum pro prevenci a kontrolu nemocí (ECDC), které je zaměřeno na prevenci a kontrolu infekčních nemocí (ECDC 2024).

Za posuzování nových léčiv, jejich registrace a doporučení správného podávání je zodpovědný Evropský úřad pro léčivé přípravky (EMA) (EMA, 2024). Následnou spotřebu antibiotik monitoruje Evropský systém sledování spotřeby antibiotik (ESAC-Net), který dále poskytuje data potřebná k monitorování trendů a identifikaci oblastí s vysokým rizikem rezistence (ECDC, 2024). Organizaci celosvětových programů pro kontrolu a prevenci onemocnění a dalších zdravotních hrozeb má na starost Světová zdravotnická organizace (WHO) (World Health Organisation 2024).

Aktuální strategie, podle které se řídí antibiotická politika v Evropské unii, byla představena v roce 2019 v rámci Zelené dohody pro Evropu (Green Deal). Jedním z pilířů Zelené dohody je strategie Farm to Fork, která se věnuje udržitelnému zemědělství, snižování emisí, ale také snížení prodeje antimikrobiálních látek pro hospodářská zvířata. Bylo stanoveno, že do roku 2030 by se měl prodej antibiotik ve veterinárním sektoru snížit o 50 %. Prodej antibiotik v EU v roce 2018 činil 118,3 mg/PCU, proto byla cílová hodnota stanovena na 59,2 mg/PCU (European Commission 2020). Evropská unie se pomalu k tomuto cíli blíží, v roce 2022 byla hodnota prodaných antibiotik 84,8 mg/PCU (European Medicines Agency 2023).

V roce 2019 byla Evropskou unií vydána také Kategorizace antibiotik za účelem jejich uvážlivého a zodpovědného používání u zvířat. Kategorizace slouží především jako návod pro veterinární lékaře. Tato zpráva kategorizovala antibiotika do čtyř skupin, dle potenciálních důsledků zvýšené antibiotické rezistence při používání u zvířat (European Medicines Agency 2019):

A: Vyvarujte se (do této kategorie patří antibiotika, která nejsou registrována jako veterinární léčivé přípravky a nesmí se podávat žádným zvířatům)

B: Omezte (tato antibiotika jsou kriticky významná v humánním lékařství a měla by sloužit jako poslední možnost léčby zvířat)

C: Používejte obezřetně (v humánním lékařství existují alternativy k těmto antibiotikům, i přesto by měla být používána, pouze pokud antibiotika ze skupiny D nemohou být klinicky účinná)

D: Používejte uvážlivě (pokud je léčba antibiotiky nutná, první volnou by měla být antibiotika z této skupiny)

V roce 2021 v České republice ze všech prodaných antibiotik pro veterinární medicínu tvořila antibiotika ze skupiny D 75,8 %, ze skupiny C 18,8 %, ze skupiny B 5,3 %. V minulém roce (2022) byly tyto hodnoty téměř totožné (European Medicines Agency 2022; European Medicines Agency 2023).

## 2.3 Antibiotická rezistence

Antibiotická rezistence je jedním z největších problémů moderní medicíny. Každoročně je rezistentními bakteriemi způsobeno více než 670 000 nemocí a více než 33 000 lidí v důsledku těchto infekcí umírá. Antimikrobiální rezistence způsobuje také velkou ekonomickou zátěž, nemoci mají závažnější průběh a léčba je proto mnohem nákladnější. Léčba infekcí způsobených rezistentními bakteriemi v Evropě ročně vychází na 1,1 miliard euro (OECD 2022).

Vůbec první, kdo varoval před antibiotickou rezistencí, byl Alexander Fleming. Zdůrazňoval nutnost správného používání antibiotik. Pokud je během léčby antibiotika podáváno malé množství anebo není podáváno dostatečně dlouho, bakterie se stanou rezistentními (Fleming 1945).

Bakterie, které jsou rezistentní ke třem a více nepříbuzných antibiotik, označujeme jako multirezistentní. Původně se multirezistentní kmeny objevovaly pouze v nemocnicích, dnes je ale lze najít kdekoliv (Livermore 2007; Summers 2006). Multirezistentní kmeny, které jsou významně nebezpečné, bývají označovány termínem „superbugs“. Mezi skupinu superbugs patří enterobakterie produkující širokospektré beta-laktamázy, bakterie se získanou rezistencí ke kolistinu, multirezistentní kmeny *Pseudomonas aeruginosa*, vankomycin-rezistentní enterokoky, methicilin-rezistentní *Staphylococcus aureus* a bakterie se získanou rezistencí k aminoglykosidům (Kolář 2019). Většina těchto bakterií je dokumentována v rámci organizace Ears-Net (ECDC 2024).

### 2.3.1 Vznik antibiotické rezistence

Určitá rezistence vůči antibiotikům představuje přirozený jev známý jako primární antibiotická rezistence. Například mykoplazmata jsou přirozeně odolná vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, *Streptococcus* spp. má přirozenou rezistenci vůči aminoglykosidům a *Escherichia coli* vůči penicilinům (Beneš 2018). Primární rezistence se u bakterií vyskytuje, i když se nikdy nesetkaly s antibiotiky (Aminov 2010).

Naproti tomu získaná rezistence představuje nežádoucí a vážný jev, který vznikl až po zavedení antibiotik do léčebného procesu. Získaná rezistence vzniká vlivem dlouhodobé expozice nevhodným nebo nedostatečným dávkám antibiotik (Fleming 1945). Hlavními mechanismy získané rezistence jsou: modifikace cílového místa, kde antibiotikum působí, enzymatická inaktivace antibiotika, efluxní pumpy a změny propustnosti membrány (Kapoor et al. 2017).

### 2.3.1.1 Mechanismy vzniku antibiotické rezistence

Je popsáno sedm mechanismů, které zajišťují antibiotickou rezistenci bakterií (Beneš 2018). Některé jsou velmi specifické, jako například mechanismus, který zabraňuje aktivaci antibiotika. Tento mechanismus je funkční pouze vůči antibiotikům, která ke své aktivaci potřebují bakteriální enzymy, například nitroimidazoly (Van Der Wouden a Kleibeuker 2000). Pokud antibiotikum působí na metabolickou dráhu, bakterie se může bránit použitím alternativní dráhy. Rezistence k sulfonamidům tak může vzniknout tak, že bakterie začne využívat kyselinu listovou z prostředí, místo toho, aby si ji sama vyráběla (Sköld 2000). Dalším specifickým mechanismem je vytváření cílových míst v nadbytku. Bylo objeveno, že například mykobakterie mohou být rezistentní k fluorochinolonům produkcí peptidů *MfpA*, jejichž strukturou napodobují DNA. Antibiotikum se tak naváže na uměle vytvořené peptidy místo na DNA-topoizomerázy a bakterii tak nepoškodí (Montero et al. 2001).

Další čtyři mechanismy jsou běžnější a často se vyskytují v kombinacích (Beneš 2018). Bakterie je schopna se před antibiotiky bránit například mutací struktury, na kterou antibiotikum cílí, antibiotikum pak není schopné se na ni navázat, a ztrácí účinek. Dalším účinným a pro bakterii výhodným mechanismem je enzymatická inaktivace antibiotika, při kterém enzym antibiotikum rozštěpí nebo připojí postranní skupinu a antibiotikum tak ztratí své vlastnosti (Wright 2003).

Efluxní pumpy jsou součástí bakteriální buňky. Bakterie jimi odčerpávají nežádoucí látky z cytoplazmy. Slouží tak i k odčerpávání pro bakterii nežádoucích molekul antibiotika. Činnost efluxních pump je ale energeticky náročná, což znamená, že nedokáže antibiotika úplně neutralizovat, ale spíše jejich účinek potlačit. Je však výhodou, že může odčerpávat několik různých typů antibiotik najednou. Mezi bakteriemi se mohou horizontálním přenosem šířit geny kódující výhodnější typy efluxních systémů (Poole 2009).

Čtvrtý základní typ rezistence je možné pozorovat u gramnegativních bakterií, je způsoben změnou propustnosti jejich vnější membrány. Tato změna je způsobena buď úplnou ztrátou nebo mutací porinových proteinů, které normálně slouží k transportu živin do buňky (Delcour 2009). Například  $\beta$ -laktamová antibiotika, která pronikají do buňky skrze poriny OmpC a OmpF, mohou být blokována mutacemi těchto proteinů (Jaffe et al. 1982).

### 2.3.2 Přenos genů rezistence mezi bakteriemi

Geny rezistence se šíří jednak z generace na generaci, a jednak horizontálně mezi různými druhy bakterií. Pokud jsou geny rezistence pro bakterii selekční výhodou, rezistentní

kmeny postupně vytlačí populaci původní. Mezi různými druhy jsou geny přenášeny horizontálním přenosem pomocí mobilních genetických elementů (MacGowan a Macnaughton 2017).

Jedním z hlavních mechanismů horizontálního přenosu je transformace. Při transformaci mohou bakterie přijmout cizí DNA z okolního prostředí. Procesu transformace je schopno asi 80 druhů bakterií (Johnston et al. 2014), mezi které patří i důležité patogeny jako *Neisseria gonorrhoeae*, *Vibrio cholerae* a *Streptococcus pneumoniae* (Blokesh 2016). Dalším významným mechanismem je konjugace. Při konjugaci může bakterie přenášet plazmidy obsahující geny rezistence na jiné bakterie prostřednictvím přímého buněčného kontaktu konjugativním pilusem (Clark a Adelberg 1962). Třetím mechanismem horizontálního přenosu je transdukce. Během transdukce mohou bakteriofágy, viry infikující bakterie, přenášet geny rezistence mezi bakteriemi. Když bakteriofág infikuje bakterii, může se stát, že během svého replikačního cyklu převezme část bakteriální DNA a následně přenesení tento genetický materiál do další bakterie, kterou infikuje (Ozeki a Ikeda 1968).

Mobilní genetické elementy, které se mohou pohybovat v nebo mezi molekulami DNA, jsou inserční sekvence, transpozony, integrony a genové kazety. Mobilní genetické elementy, které se mohou pohybovat mezi buňkami jsou plazmidy a integrační konjugativní elementy (Partridge et al. 2018).

### **Komezální bakterie jako nositelé antibiotické rezistence**

Jelikož antibiotika nepůsobí cíleně pouze na patogenní bakterie, geny antibiotické rezistence jsou důležité pro přežití i bakterií komezálních (Marshall et al. 2009). Pokud jsou tedy komezální bakterie opakovaně vystavovány účinku antibiotik, vzniká u nich rezistence jako nutná odpověď na selekční tlak. Vzniklý gen antibiotické rezistence je pro bakterii evoluční výhodou, a tak je předáván do dalších generací (MacGowan a Macnaughton 2017). Daný bakteriální kmen se tak stává rezervoárem genu antibiotické rezistence. Rezervoáry rezistentních genů mohou být i komezální bakterie, které je mohou dále přenášet na patogenní bakterie a dále na člověka (Marshall et al. 2009).

Studie o přítomnosti antibiotické rezistence u konkrétních bakteriálních taxonů jsou kvůli jejich specifickým požadavkům na kultivaci omezené. Z toho důvodu byla antibiotická rezistence studována například u laktobacilů a bifidobakterií, u kterých jsou selektivní podmínky kultivace známy (Dec et al. 2017).

Jelikož selektivní podmínky kultivace pro většinu střevních bakterií nejsou známy, pro jejich charakterizaci je využívána především metoda shotgun sekvenování DNA získané z trusu nebo střev. Tato metoda u kuřat ukázala, že střevní mikroflóra kuřat představuje důležitý zdroj genů pro antibiotickou rezistenci, přičemž nejhojnějšími geny jsou ty, které kódují efluxní pumpy a rezistenci k fluorochinolonom a tetracyklinům (Qu et al. 2008).

Shotgun sekvenování je sice schopné zaznamenat celkový obsah genů antibiotické rezistence, ale není schopné určit původního bakteriálního hostitele detekované antibiotické rezistence. Metoda schopná zaznamenat jak konkrétní bakterii, tak gen rezistence, který nese, je metoda celogenomového sekvenování (Zhang et al. 2015).

### **2.3.3 Přenos genů antibiotické rezistence v prostředí**

Světová zdravotnická organizace na problém antibiotické rezistence nahlíží z pohledu konceptu Jedno zdraví. Jde o přístup, který zdůrazňuje vzájemné propojení lidského zdraví, zdraví zvířat a zdraví životního prostředí. Aby bylo možné efektivně řešit globální problém antibiotické rezistence, je zásadní tomuto propojení porozumět (Hernando-Amado et al. 2019).

Antibiotická rezistence vzniká především kontaktem bakterie s antibiotiky. Rezistence tedy vzniká kvůli nesprávnému podávání antibiotik, ale také důsledkem antibiotického znečištění životního prostředí. Do životního prostředí se antibiotika mohou dostávat prostřednictvím výměšků lidí a zvířat, nevhodnou likvidací léků, přímým znečištěním životního prostředí v rostlinné produkci a prostřednictvím odpadních toků z výroby antibiotik (Larsson a Flach 2022).

Různé bakterie mají však různé životní nároky a například mnoho bakterií v trávicím traktu je zásadně anaerobního charakteru, a proto vykazuje špatné přežití a omezenou schopnost disperze mimo lidské tělo (Berg et al. 2005). Hlavní cesty přenosu rezistentních bakterií jsou proto spíše mezi lidmi a mezi zvířaty a lidmi (Larsson a Flach 2022). K přenosu rezistentních bakterií mezi lidmi, ať už v rámci nemocničního prostředí anebo ve společnosti, dochází stejnými cestami jako kterýchkoli jiných bakterií. Jde o přenos pomocí aerosolů, špatných hygienických návyků a nedodržováním hygienických opatření při přípravě jídla. Dodržování základních hygienických zásad má tak vliv i na zpomalení šíření rezistentních bakterií mezi lidmi (Mattner et al. 2012). Na šíření rezistence mezi lidmi má v dnešní době velký vliv také globalizace světa a vysoká frekvence cestování mezi jednotlivými státy a kontinenty (Prestinaci et al. 2015). Ze životního prostředí jsou to pak dále voda a vítr, které dokážou šířit bakterie na velké vzdálenosti (Allen et al. 2010). Místa, kde dochází k největší kumulaci rezistentních

bakterií, jsou označována jako rezervoáry antibiotické rezistence. Jde především o nemocnice a odpadní vody, ale také prostředí velkochovů (Bueno et al. 2018).

### **Rodičovské chovy brojlerů a nosnic v České republice**

Cílem rodičovských chovů je produkce násadových vajec, ze kterých se líhnou kuřata finálních hybridů brojlerů a nosnic. Tyto chovy hrají zásadní roli v produkci vajec pro další chov slepic, ačkoli nejsou určeny přímo pro masnou produkci. Do rodičovských chovů jsou skupovány jednodenní kuřice a kohoutci z prarodičovských chovů, ve kterých je zajišťována genetická diverzita a udržován vyšší genetický kapitál (Brouček et al. 2011).

V rodičovském hejně slepic je cílem dosáhnout maximální produkce násadových vajec. Hejno bývá tvořeno v poměru 12 kohoutů na 100 slepic. Do hejna se řadí pouze slepice a kohouti v dobrém zdravotním stavu a ostatní kuřata se vyřadí jako nevhodná pro další chov. V hale rodičovského hejna jsou instalována snášková hnízda, kdy jedno hnízdo připadá na 4–5 slepic. Slepícím není umožněno nocovat v hnízdech a snášet mimo ně vejce. Snesená násadová vejce se sbírají minimálně třikrát denně a po sebrání bývají dezinfikována formaldehydovými parami (Brouček et al. 2011).

Délka života slepic a kohoutů v rodičovských chovech bývá různá, dle intenzity snášek. Produktivní život těchto slepic je označen jako snáškový cyklus a ten trvá cca od 20. týdne do maximálně 80. týdne (Brouček et al. 2011).

### **2.3.4 Rezistence u vybraných skupin antibiotik**

#### **$\beta$ -laktamová antibiotika**

Rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům vzniká několika způsoby. Prvním je změna cílového místa působení antibiotika, dále změny v propustnosti membrán, a především tvorbou enzymu  $\beta$ -laktamáza (Pitout et al. 1997). Bakterie také mohou aktivně  $\beta$ -laktamová antibiotika z buňky odstraňovat pomocí efluxních pump (Li et al. 1994).

$\beta$ -laktamázy jsou enzymy, které štěpí molekuly  $\beta$ -laktamových antibiotik. Dělí se do tříd A–D podle Amblerova schématu, ve kterém jsou členěny dle sekvencí aminokyselin (Ambler 1980). Klinicky důležité se brzy staly širokospektré  $\beta$ -laktamázy (ESBL – extended-spectrum  $\beta$ -lactamases) (Blanc et al. 2006). První výskyty ESBL byly zaznamenány již v 90. letech minulého století (Sirot et al. 1987). ESBL patřící do třídy A jsou schopny štěpit široké spektrum cefalosporinů i 3. a 4. generace a monobaktamy. Mezi enzymy této třídy patří enzymové rodiny TEM, SHV, CTX-M, VEB, and GES (Cantón et al. 2012).



Nejrozšířenějšími ESBL jsou enzymy TEM, SHV a CTX-M. Enzymy těchto enzymatických rodin snadno mutují, TEM enzymů se v této době vyskytuje přes 140 a CTX-M bylo objeveno přes 240 (Rana et al., 2022; Cantón et al. 2012).

TEM laktamázy byly původně úzkospektré, působily pouze na peniciliny a cefalosporiny první generace, ale stále byly citlivé na inhibitory  $\beta$ -laktamáz. Intenzivní používání těchto inhibitorů způsobilo evoluci rezistence a TEM se zařadily mezi ESBL. Koncem 20. století se objevila třetí generace TEM enzymu tzv. complex mutant TEM enzymy. Enzymy skupiny TEM jsou kódovány genem *bla*TEM (Robin et al. 2007).

### **Rezistence ke streptomycinu**

Hlavním mechanismem účinku streptomycinu je navázání se na ribozomální podjednotku, čímž inhibuje proteosyntézu. Jedním z výhodných mechanismů rezistence je tak mutace v genech *rpsL*, *rrs* kódující komponenty 30S ribozomální podjednotky tedy S12 a16S rRNA (Rocha et al. 2021).

Nejdůležitějším a také nejrozšířenějším mechanismem rezistence vůči streptomycinu je inaktivace antibiotika působením modifikujících enzymů. Ty změni prostorové uspořádání molekuly antibiotika, a tím znemožní její vazbu na cílové místo (Zhang et al. 2023). Enzymy modifikující aminoglykosidy dělíme do tří skupin podle typu reakce, kterou způsobují, na acetyltransferázy, fosfotransferázy a adenyltrasferázy (Ramirez a Tolmasky 2010). Geny kódující tyto enzymy se nacházejí na plazmidech a transpozonech. Jedná se například o *StrA* kódující fosfotranferázový enzym a *aadA* kódující enzym adenyltransferáza (Hollingshead a Vapnek 1985)

### **Linkosamidy**

Účinku linkosamidů se bakterie brání třemi způsoby. Prvním z nich je modifikace cílového místa, a to prostřednictvím mutací v 23S rRNA části velké ribozomální podjednotky. Druhým mechanismem je využití efluxních pump. Třetím způsobem obrany je enzymatická inaktivace antibiotik (Spížek a Řezanka 2017). Tyto enzymy, nazývané nucleotidyltransferázy jsou kódovány geny *lmu* (dříve *lin*). Bylo popsáno 10 genů kódujících tyto enzymy příkladem *linA* a *linB* (dnes označované *lmuA*, *lmuB*) (Yang et al. 2024).

### **Tetracykliny**

Nositeli mechanismů antibiotické rezistence jsou geny *tet* a *otr*. Je známo několik desítek *tet* genů, které kódují různé mechanismy rezistence. Prvním mechanismem je tvorba

efluxních pump, druhým je tvorba speciálních ribozomálních bílkovin a třetím je syntéza inaktivačních enzymů.

Když se ochranné ribozomální proteiny navážou na ribozom, dojde k uvolnění tetracyklinu od ribozomu a proteosyntéza může nadále pokračovat. Aktuálně je známých 13 genů kódujících ochranné proteiny. Jsou to například *tetO*, *tet32*, *tetW*, *tet44*, *tetQ* (Warburton et al. 2016). Nejběžnější formou rezistence k tetracyklinům jsou efluxní pumpy. Eflux geny se nachází především na plazmidech a transpozomech, což je jedním z důvodů jejich širokého rozšíření. Je popsáno 36 genů kódujících proteiny efluxních pump, jedním z nich je gen *tetA(P)* (Zhu et al. 2021).

### **Sulfonamidy**

Rezistence k sulfonamidům je způsobena mutacemi v genu pro syntézu enzymu dihydropteroát-syntetáza (DHPS) anebo přímo získáváním alternativních DHPS (Perreten a Boerlin 2003). Rezistence také může vznikat nadprodukcí kyseliny p-aminobenzoové, jelikož působení sulfonamidů je založeno na kompetici s touto kyselinou. Zvýšením její koncentrace se sníží účinnost antibiotika (Beneš 2018).

Rezistence k sulfonamidům je ale nejčastěji způsobena alternativními geny pro syntézu DHPS, geny *sul*. Je popsáno 5 *sul* genů. Ty se vyskytují na chromozomech i plazmidech (Lin et al. 2021).

## **2.4 Metody detekce bakteriální rezistence**

Testování antibiotické rezistence je významnou součástí klinické praxe, epidemiologických analýz a monitorování jejího výskytu a přenosu. V každé z těchto oblastí jsou preferovány jiné metody hodnocení antibiotické rezistence vzhledem k jejich přesnosti, dostupnosti a ceně (Kolář et al. 2020).

V rámci klinické praxe by před zahájením antibiotické léčby mělo vždy dojít k mikrobiologickému vyšetření, které stanoví konkrétního původce infekce a jeho citlivost k antibiotikům (Kolář et al. 2020). Kvůli velkému nárůstu rezistentních mikrobů se testování citlivosti k antibiotikům rychle stalo nedílnou součástí péče o pacienty s infekčními chorobami a zůstává základem klinického rozhodování o výběru antibiotik (Tan 2014).

V akutních případech ale může být potřeba zahájit antibiotickou terapii ihned. Při akutním zahájení antibiotické léčby lékař nebo veterinář musí vycházet z kvalifikovaného předpokladu na určení pravděpodobného původce infekce, včetně znalosti aktuálních údajů o

primární a sekundární rezistenci daného druhu mikroorganismu. I v případě akutní infekce a zahájení antibiotické léčby pouze na základě kvalifikovaného odhadu je na místě tento postup potvrdit mikrobiologickým vyšetřením, které stanoví konkrétního původce infekce a jeho citlivost k antibiotikům a antibiotická terapie tak může být adekvátně upravena (Kolář et al. 2020). Cílem antibiotické terapie by mělo být použití antibiotika s prokazatelně největším účinkem na danou bakterii a zároveň s co nejužším spektrem účinku (Štefan 2022).

V rámci epidemiologických analýz a monitoringu antibiotické rezistence jde především o zaznamenávání údajů, které vedou ke zvyšování kvality používání antibiotik a umožňují formulovat antibiotickou politiku (Státní zdravotní ústav 2019).

Metody testování rezistence na antibiotika se dělí na kultivační a molekulárně biologické. Pro účely klinické praxe se využívají spíše metody kultivační, pro oblast výzkumu se používají převážně metody molekulárně biologické. Toto rozdělení neplatí striktně, oba typy metod mají své místo v obou oblastech (Kolářová 2020).

#### **2.4.1 Kultivační metody**

Kultivační metody neboli metody fenotypové se dle údajů, které poskytují, dělí na kvalitativní a kvantitativní. Kvalitativními testy pouze zjišťujeme, jestli je bakterie k antibiotikům citlivá anebo rezistentní. Kvantitativní metody jsou oproti tomu přesnější a užitečnější. Určují totiž hodnotu minimální inhibiční koncentrace (MIC) každého testovaného antibiotika vůči zkoumané bakterii (Barker 1999), a tak poskytuje údaje potřebné pro kvalitní antibiotickou terapii (Kolář et al. 2020).

Hodnota MIC udává minimální koncentraci antibiotika, která je schopna zabránit růstu bakterií (Wiegand et al. 2008). Pokud je třeba bakterii usmrtit, je zapotřebí nasadit antibiotikum v koncentraci MBC (minimální baktericidní koncentrace), což je koncentrace potřebná k usmrcení mikroorganismu (Syal et al. 2017).

Výsledné hodnoty kultivačních metod se porovnávají s tzv. *breakpointy*, což jsou hodnoty koncentrace antibiotika, které odděluje kmeny rezistentní a citlivé a citlivé při zvýšené expozici (Arendrup et al. 2020). Hodnoty pro interpretaci výsledků jsou v Evropě stanovovány dle systému EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Klinické *breakpointy* se mění v závislosti na objevech nových mechanismů rezistence, výskytu kmenů se zvýšenou rezistencí nebo v závislosti na nových klinických indikacích (Kolářová 2020).

**Disková difúzní metoda** je kvalitativní metoda stanovení citlivosti vůči antibiotikům, která pracuje s čistými kulturami nebo s bakteriální suspenzí kolonie vyrostlé na agaru. Tyto kultury jsou naočkovány na Mueller-Hilton agar, na který jsou po zaschnutí přeneseny disky napuštěné antibiotiky o známé koncentraci (Kolářová 2020). Petriho miska s disky a bakteriálním kmenem je kultivována dle nároků testovaného kmene. Při kultivaci se z disků uvolňují účinné látky. Následující den je citlivost testovaného kmene hodnocena podle velikosti inhibičních zón, které se vytvořily, nebo nevytvořily kolem antibiotického disku (Obrázek 5) (Barker 1999). Pokud se inhibiční zóna nevytvoří vůbec, znamená to, že kmen je zcela rezistentní. Pokud je antibiotikum účinné, kolem disku se vytvoří průzračná zóna bez mikroorganismu a v milimetrech je hodnocen její průměr. Výsledné hodnoty jsou poté porovnávány s již zmíněnými klinickými breakpointy (Kolářová 2020).



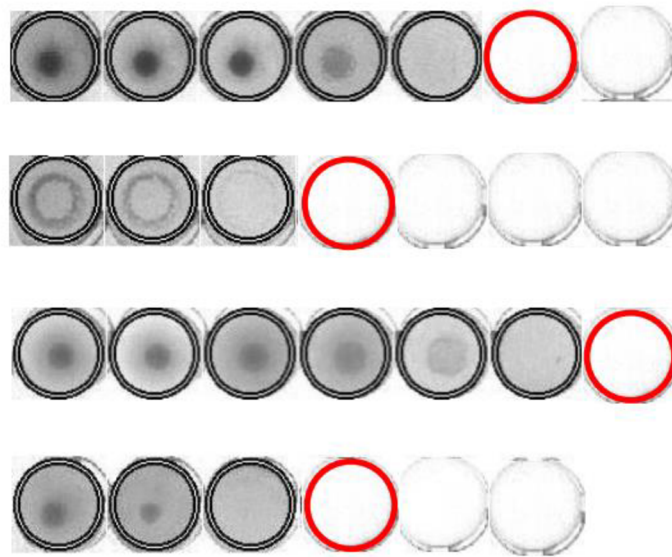
Obrázek 5 Měření inhibičních zón

Převzato z: EUCAST 2021a

Kvalitativní kultivační metodou je **bujónová diluční metoda**. Tato metoda je založena na očkování stejného množství bakteriální kultury do řady zkumavek s bujónem a vzestupnou koncentrací antibiotika. Z tohoto testu se získává hodnota MIC. Výsledky jsou hodnoceny proti tmavému pozadí, zkumavky, ve kterých je pozorovatelný světlý zákal, obsahují živé bakterie, zkumavky bez zákalu znamenají, že je přítomné antibiotikum v dostatečné koncentraci, která dokáže usmrtit bakterie (Obrázek 6).

Existují již automatizované systémy například VITEK 2, které pracují na principu bujónové diluční metody, ale v miniaturizované verzi. Růst mikroorganismů je hodnocen v krátkých

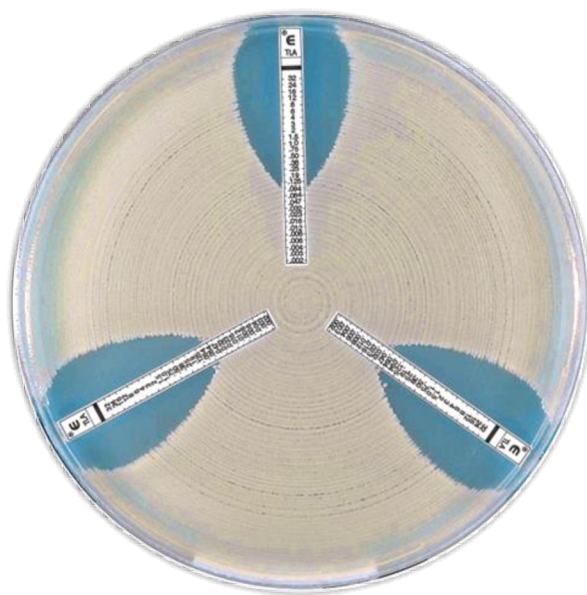
intervalech, a tak je možné stanovit hodnotu MIC (která je zásadní pro správnou antibiotickou léčbu) během několika hodin (Funke et al. 1998).



Obrázek 6 Určení MIC pomocí bujonové diluční metody

Červeně jsou zaznačeny jamky, ve kterých nedošlo k nárůstu kolonie. Koncentrace antibiotika odpovídá MIC. Převzato z: EUCAST 2021b

Kombinací difúzní a diluční metody je takzvaný **E-test**. E-test je komerčně vyráběný plastový proužek, který je napuštěn postupně se snižujícími dávkami antibiotika. Počáteční fáze je stejná jako u difúzního testu, kdy je agar naočkován určitou bakteriální kulturou. Na ni je poté položen E-test. Po následné inkubaci je odečten výsledek. Inhibiční zóny kolem E-testu jsou ve tvaru elipsy. Místo, kde spodní okraj elipsy protíná proužek, značí hodnotu MIC (Obrázek 7) (Brown a Brown 1991).



Obrázek 7 Inhibiční zóny vytvořené kolem E-testu

Převzato z: Biomerieux 2023

#### 2.4.2 Molekulárně biologické metody

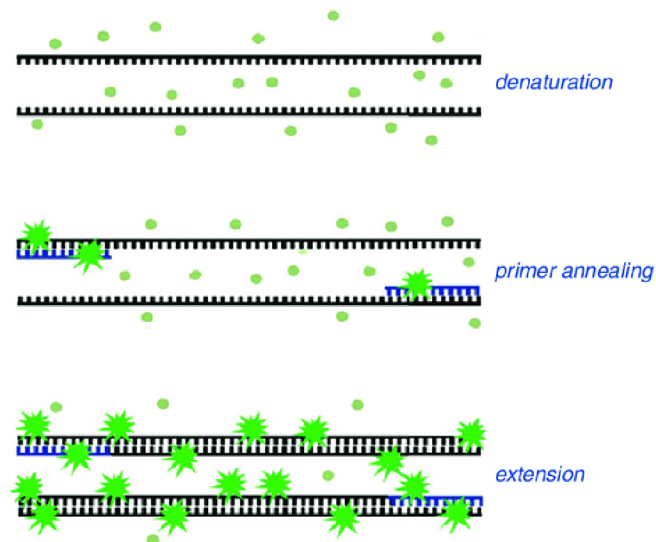
Molekulárně biologické metody jsou dnes běžnou součástí epidemiologických analýz, surveillance infekcí a antibiotických rezistencí. Díky mnohým výhodám se postupně dostávají do klinické praxe, kde je ale stále zapotřebí minimálně kombinace kultivačních i molekulárně biologických metod. Jejich hlavní výhoda spočívá v rychlosti, specifitě a citlivosti. Nevýhodou je nemožnost určit životaschopnost organismu a případné falešně pozitivní výsledky (Kolářová, 2020). V dnešní době jsou základními molekulárně biologickými metodami PCR, real-time PCR, sekvenování a různé metody založené na hybridizaci včetně mikročipů (Woodford a Sundsfjord 2005).

Cílem molekulárně biologických metod využívaných v rámci zkoumání antibiotické rezistence je detekce genů kódujících různé mechanismy rezistence, popřípadě také způsob jejich šíření. Horizontální přenos může být detekován pomocí specifických markerů mobilních genetických elementů (Luby et al. 2016).

Pravděpodobně nepoužívanější molekulárně biologickou metodou je **metoda real-time PCR** založená na principu klasické PCR. Reakce probíhá přibližně ve čtyřiceti cyklech, které se dělí do čtyř fází. Iniciační fáze trvá několik prvních cyklů, po ní následuje fáze exponenciální, při které dochází k nárůstu nových DNA molekul. V další fázi nárůst zpomaluje, a když dojde k vyčerpání reakčních složek následuje fáze plateau. Výslednou hodnotou této metody je tzv. Ct hodnota (z angl. cycle of treshold). Kromě genů zájmu je při reakci nutné využít i jeden

referenční gen, který slouží jako kontrola množství vstupního materiálu (Bustin et al. 2009). Pro detekci genů antibiotické rezistence u bakterií se využívají například ribozomální geny jako gen *rpsL* (Dumas et al. 2006) nebo gen *rrs* pro 16S rRNA (Salerno et al. 2022).

Nárůst DNA ve vzorku je zaznamenáván pomocí fluorescenčního substrátu, který po navázání se k molekule DNA vyšle fluorescenční signál. Pro značení se nejčastěji užívá univerzální substrát Sybergreen (Obrázek 8).



Obrázek 8 Funkce Sybergreenu při real-time PCR

Při fázi denaturace, jsou molekuly Sybergreenu volně ve vzorku a nevysílají žádný fluorescenční signál. Fluorescence se začíná zvyšovat při nasedání primerů. Na konci každého cyklu je zaznamenána výsledná hodnota fluorescence. Převzato z: Fraga et al. 2014

Při testování celého genomu určitého vzorku (např. DNA střevní mikroflóry) real-time PCR dokáže zaznamenat přítomnost genu rezistence, ale z výsledku není možné vyčíst, kdo je nositelem daného genu. Tuto informaci lze zjistit pomocí **celogenomového sekvenování**. Z výsledků celogenomového sekvenování je možné zjistit přítomnost genů kódujících rezistenci i markerů mobilních genetických elementů. Na základě těchto výsledků je možné předpokládat a pozorovat princip šíření genů mezi bakteriemi, nebo mezi bakteriemi a prostředím (Luby et al. 2016).

Jednou z nejstarších, ale stále využívaných molekulárně biologických metod je **hybridizace** (Kolářová 2020). Umožňuje detekci DNA a RNA přímo z biologického materiálu. Princip spočívá v párování jednořetězcových fragmentů ve vzorku s jednořetězcovou sondou značenou markerem. Na principu hybridizace funguje například metoda **DNA mikročipů**, při které je na

čipu pevně ukotveno mnoho jednořetězcových oligonukleotidů, ke kterým se může navázat komplementární řetězec DNA. Pomocí této metody je možné detekovat velké množství sekvencí najednou (Harrington et al. 2000).

Využívanou hybridizační metodou je také metoda FISH (fluorescenční in situ hybridizace). V tomto případě je sonda značená fluorescenčně a při navázání oligonukleotidů je možné pozorovat fluorescenční signál z dané sondy (Moter a Göbel 2000).

### **Hmotnostní spektrometrie**

V poslední době je identifikace bakteriálních agens pro terapeutické účely prováděna pomocí hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF. Technika MALDI-TOF využívá laserový paprsek k ionizaci vzorku a měření času letu iontů, což umožňuje identifikaci biomolekul na základě jejich hmotnosti. Tato technika je rychlá, přesná a ekonomicky výhodná a bez potřeby kultivace bakterií. Nahrazuje tak fenotypické metody identifikace. Pro ověření antibiotické rezistence však není možné MALDI-TOF MS využívat univerzálně. MALDI-TOF MS je schopen odhalit například rezistenci ke karbapenemům u *Acinetobacter baumannii* (Kempf et al. 2012) a *Bacteroides fragilis* (Johansson et al. 2014). Také je možno přesně určit vankomycin citlivé a rezistentní kmeny *Eterococcus faecium* (Nagy et al. 2011). Detekce rezistentních kmenů pomocí hmotnostní spektrometrie má velký potenciál, který ještě nebyl dostatečně prozkoumán (Charretier a Schrenzel 2016).



### **3. CÍLE PRÁCE**

Cílem této diplomové práce je:

1. Popsat složení střevní mikroflóry rodičovských generací brojlerů a nosnic po produktivním věku.
2. Stanovit četnost genů antibiotické rezistence ve slepých střevech rodičovských generací brojlerů a nosnic.
3. Porovnat přítomnost genů pro rezistenci k antibiotikům mezi jednotlivými farmami.
4. Pomocí korelační analýzy předpovědět hlavní bakteriální čeledě, které jsou nositeli genů antibiotické rezistence ve slepých střevech brojlerů a nosnic.

## 4. PRAKTICKÁ ČÁST

### 4.1 Materiál a metody

#### Materiál

K experimentu byla využita DNA ze vzorků slepých střev dospělých jedinců brojlerů a nosnic. Jednalo se o jedince z farem rodičovských generací. Brojleři byli utraceni ve stáří 50 a 55 týdnů, nosnice byly utraceny v 60–74 týdnech. Z Farmy 1–4 pocházejí brojleři a z Farmy 5 pocházejí nosnice. Celkově bylo utraceno 18 jedinců (12 brojlerů a 6 nosnic).

Typ farmy	Farma	Označení zvířete	Typ farmy	Farma	Označení zvířete
brojleři	Farma 1	Slepice 1	nosnice	Farma 4	Slepice 1
		Slepice 2		Slepice 2	
		Slepice 3		Slepice 3	
	Farma 2	Slepice 1		Farma 5	Slepice 1
		Slepice 2		Slepice 2	
		Slepice 3		Slepice 3	
	Farma 3	Slepice 1		Slepice 4	
		Slepice 2		Slepice 5	
		Slepice 3		Slepice 6	

Obrázek 9 Označení brojlerů a nosnic z jednotlivých farem

#### Metodika práce

##### 4.1.1 Pitva

Při pitvě byl slepicím odebrán obsah slepých střev. Obsah byl ihned po vyjmutí uložen na led pro účely izolace bakteriální DNA k sekvenování a real-time PCR analýze. Tyto vzorky byly zamrazeny a uchovány při  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Pitva probíhala v souladu s českou legislativou podle zákona o ochraně zvířat a welfare č. 246/1992 Sb.

##### 4.1.2 Izolace DNA

DNA ze vzorků slepých střev byla extrahována pomocí kitu QIAamp DNA Stool Mini kit (Qiagen) dle návodu uvedeného výrobcem. Dále byla stanovena koncentrace DNA pomocí spektrofotometru Nanodrop a následně zamrazena a uchovávána při teplotě  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

##### 4.1.3 Real-time PCR

Izolovaná DNA byla použita jako templát pro real-time PCR kvantifikaci genů *blaTEM*, *aadA*, *strA*, *sul2*, *tet(Q)*, *linA*, *tet(W)*, *tet(32)*, *tet(O)*, *tet(44)*, *tetA(P)* (Tabulka 1).

Pro reakci byly nejprve připraveny PCR směsi obsahující 94 µl PCR vody, 3 µl forward primeru a 3 µl reverse primeru. A dále směsi obsahující 60 µl PCR vody a 20 µl DNA. Real-time PCR byla provedena pomocí QuantiTect SYBR Green PCR Master Mixu (Qiagen) v celkovém objemu 3 µl na 384-jamkových destičkách. Směs DNA, směs primerů a master mix byly rozpipetovány pomocí pipetovací stanice Nanodrop NS-2 Stage (Innovadyne).

Real-time PCR probíhala ve fázích: Hot start 95°/15 min, dále samotná PCR reakce probíhala v 40 cyklech. PCR probíhala ve fázích denaturace 94°/20 sek, nasedání 61°/30 sek, extenze 72°/30 sek. Real-time PCR a nárůst fluorescence byly provedeny a zaznamenány pomocí LightCycler II (Roche).

Výstup tohoto procesu představovaly hodnoty Ct (cycle of treshold) pro každý vzorek. Vzorky byly zhotoveny v triplikátech a pro výpočty byly použity průměrné hodnoty z opakování. Jako referenční gen byl použit gen pro 16S rRNA.

Ct hodnoty vzorků byly normalizovány na průměrnou Ct hodnotu genu pro 16S rRNA ( $\Delta Ct$ ) a přepočítány jako  $2^{-\Delta Ct}$ .

Tabulka 1 Seznam použitých primerů. F – forward primer; R – reverse primer

Primer	Sekvence primeru	Reference
<i>blaTEM</i> F	ACCAATGCTTAATCAGTGAG	Olesen et al. 2004
<i>blaTEM</i> R	GCGGAACCCCTATTTG	Olesen et al. 2004
<i>aadA</i> F	CAGCCCGTCTTACTTGAAGC	Faldynova et al. 2013
<i>aadA</i> R	GATCTCGCCTTTCACAAAGC	Faldynova et al. 2013
<i>strA</i> F	ACCCTAAACTCTTCAATGC	Faldynova et al. 2013
<i>strA</i> R	TCCCCAATACATTGAATAGG	Faldynova et al. 2013
<i>sul2</i> F	CGCAATGTGATCCATGATGT	Faldynova et al. 2013
<i>sul2</i> R	GCGAAATCATCTGCCAAACT	Faldynova et al. 2013
<i>tetQ</i> F	AGAATCTGCTGTTTGCCAGTG	Aminov et al. 2001
<i>tetQ</i> R	CGGAGTGTCAATGATATTGCA	Aminov et al. 2001
<i>linA</i> F	GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	Seidlerova et al. 2020
<i>linA</i> R	GCTTCTTTTGAAATACATGGTATTTTTTCGATC	Seidlerova et al. 2020
<i>tetW</i> F	AGCGACAGCGTGAGGTAAA	Juricova et al. 2021
<i>tetW</i> R	AAGTTGCGTAAGAGCGTCCA	Juricova et al. 2021

<i>tet(32)</i> F	GCTCACTCCGGAAGTGTCTC	Juricova et al. 2021
<i>tet(32)</i> R	TTCAAAGGTTCCCCCGCAAT	Juricova et al. 2021
<i>tetO</i> F	ACGGAAAGTTTATTGTATAACC	Aminov et al. 2001
<i>tetO</i> R	TGGCGTATCTATAATGTTGAC	Aminov et al. 2001
<i>tet44</i> F	CGAAAGCAAAGTTTCACTCGGT	Juricova et al. 2021
<i>tet44</i> R	AAGCGAAAATCCGAGGGAGT	Juricova et al. 2021
<i>tetA(P)</i> F	AGTTGCAGATGTGTACAGTCG	Juricova et al. 2021
<i>tetA(P)</i> R	CTTCCGCAATCCAAGCTTCA	Juricova et al. 2021
<i>16S rRNA</i> F	TCCTACGGGAGGCAGCAG	Juricova et al. 2021
<i>16S rRNA</i> R	CGTATTACCGCGGCTGCT	Juricova et al. 2021

#### 4.1.4 Sekvenování oblasti V3/V4

Složení bakteriálního společenství bylo stanoveno pomocí sekvenování 18 vzorků DNA přes variabilní úseky V3 a V4 genu pro 16S rRNA.

Izolovaná DNA byla naředěna na koncentraci 5 ng/μl byla použita jako templát v PCR s forward primerem 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-CCTACGGGNGGCWGCAG-3' a reverse primerem 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAG-MID-GT-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'. Sekvence psané kurzívou slouží jako index/adaptor, MID je krátká sekvence nukleotidů sloužící k rozeznání jednotlivých vzorků, GT je mezníková sekvence, která slouží k oddělení MIDu a samotného primeru. Sekvence primeru je označená podtržítkem a slouží k amplifikaci oblasti V3/V4 16S rRNA.



Obrázek 10 Design primeru pro 16S rRNA pro Illumina Miseq sekvenování

Po ligaci adaptorů následovala PCR amplifikace pomocí KAPA HiFi Hot Start Ready Mix kit. Výsledné PCR produkty byly purifikovány použitím AMPure kuliček. Koncentrace DNA byla

měřena fluorimetricky a byla naředěna na koncentraci 100 ng/μl. Několik vzorků s rozdílnými MID sekvencemi byly smíchány a opatřeny indexy pomocí Nextera XT Index Kit (Illumina), což umožňuje sekvenování více vzorků během jednoho cyklu. Koncentrace jednotlivých DNA ve směsi byla stanovena pomocí KAPA LC Quantification Complete kit (Kapa Biosystems). Všechny vzorky byly naředěny 4 ng/μl a bylo přidáno 20 % phiX DNA. Samotné sekvenování probíhalo pomocí MiSeq Reagent Kit v3 a přístroje MiSEQ 2000 podle návodu výrobce (Illumina).

Výsledné sekvence byly rozřazeny do taxonomických jednotek. Pro vytvoření taxonomické jednotky byla hranice podobnosti 97 %. Pro vygenerování tabulkového souboru byl použit software Qiime.

### **Vyhodnocení dat**

Pro vyhodnocování byly brány v potaz pouze čeledě, které alespoň v jednom vzorku tvořily alespoň 1 % z celkového složení.

Pro vyhodnocení a zobrazení dat byl využit program R a Microsoft Excel. Korelační analýza, ve které proti sobě byly vyneseny výsledky relativní četnosti genů rezistence vůči zastoupení čeledí ve vzorcích byla provedena v programu R. Aluviální diagram, který zobrazuje výskyt nejvíce zastoupených genů na jednotlivých farmách, byl také zpracován v programu R.

## 4.2 Výsledky

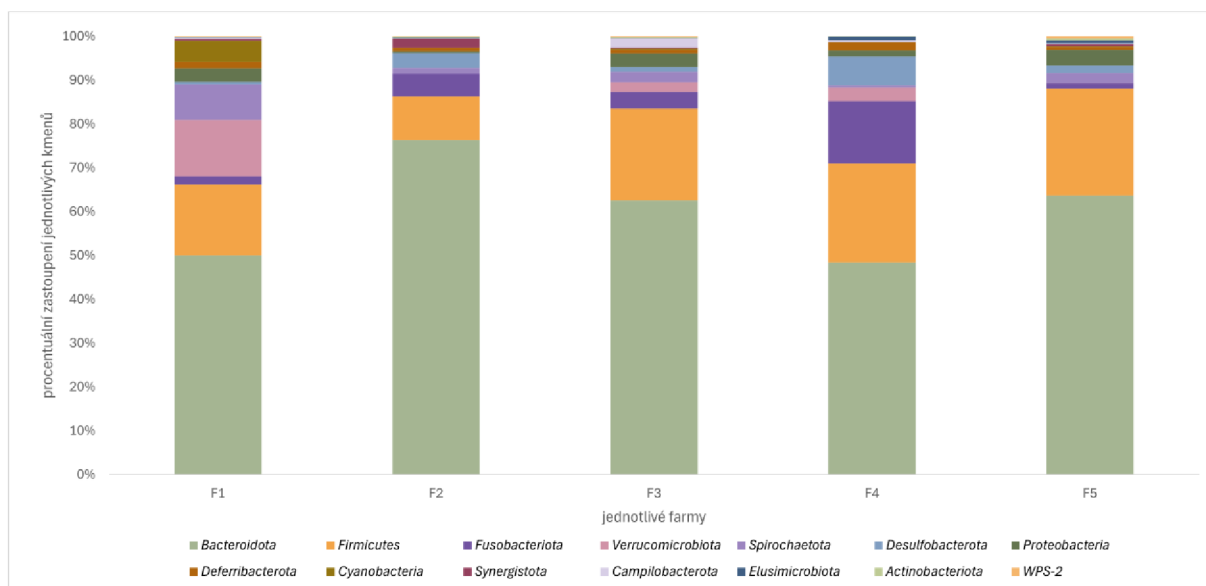
### 4.2.1 Složení střevní mikroflóry

V první části práce bylo stanoveno složení střevní mikroflóry 18 brojlerů a nosnic pomocí sekvenování variabilních oblastí V3 a V4 genu pro 16S rRNA. Ve vzorcích z cekálního obsahu bylo nalezeno 14 kmenů (Obrázek 11).

Nejdominantnějším kmenem v cekální mikroflóře brojlerů a nosnic byl kmen *Bacteroidota* ( $58,6 \pm 10,4$  %). U brojlerů z Farmy 2 tvořil tento kmen téměř tři čtvrtiny cekální mikroflóry. Naopak u brojlerů z farem 1 a 4 netvořil ani polovinu. Druhým nejpočetnějším kmenem byl kmen *Firmicutes* ( $18,3 \pm 5,2$  %). Pouze na Farmě 2 tento kmen tvořil méně než 10 % celkové cekální mikroflóry.

Kmeny *Fusobacteriota* ( $5,1 \pm 4,6$  %) a *Verrucomicrobiota* ( $3,5 \pm 4,5$  %) se na farmách vyskytovaly ve velmi různém zastoupení. Cekální mikroflóra brojlerů z Farmy 4 byla ze 13,9 % tvořena zástupci kmene *Fusobacteriota*. Tento kmen na ostatních farmách tvořil pět a méně procent z celkové cekální mikroflóry. Kmen *Verrucomicrobiota* u brojlerů z Farmy 1 tvořil 12,1 % cekální mikroflóry, na Farmě 2 a 5 se ale tento kmen nevyskytoval vůbec.

Minoritní kmeny, které tvořily méně než 5 % celkové mikroflóry, byly kmeny *Spirochaetota*, *Desulfobacterota*, *Cyanobacteria*, *Deferribacterota*, *Proteobacteria*, *Campilobacterota*, *Synergistota*, *Elusimicrobiota*, *WPS-2* a *Actinobacteriota*.



Obrázek 11 Procentuální zastoupení bakteriálních kmenů v cekální mikroflóře rodičovských generací brojlerů a nosnic po produktivním věku

## Složení střevní mikroflóry zvířat z jednotlivých farem

### Farma 1

V cekální mikroflóře slepic z Farmy 1 byly dominantní tři čeledě, jejichž zastoupení bylo větší než 10 %. Jednalo se o čeledě *Bacteroidaceae* ( $19,3 \pm 3$  %) a *Rikenellaceae* ( $12,1 \pm 2,7$  %) z kmene *Bacteroidota* a čeleď *WCHB1-41* ( $11,6 \pm 6,7$  %) z kmene *Verrucomicrobiota*. Čeleď *Bacteroidaceae* byla zcela zastoupena pouze rodem *Bacteroides*. V rámci čeledi *Rikenellaceae* se jednalo především o zástupce rodů *Alistipes* a *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*.

Menší procentuální zastoupení pak tvořila čeleď *Spirochaetaceae* ( $7,7 \pm 5,0$  %), zastoupená rody *Treponema* a *Spirochaetaceae\_uncultured*. Z kmene *Firmicutes* se ve střevní mikroflóře objevovalo mnoho zástupců třídy *Clostridia*, čeledí *Clostridia\_vadinBB60\_group* ( $6,5 \pm 2,6$  %) a *Clostridia\_UCG-014* ( $0,9 \pm 0,3$  %) zastoupených stejnojmennými rody.

Kmen *Bacteroidota* byl reprezentován čeleděmi *Bacteroidales\_\_Other* ( $5,4 \pm 2,2$  %), *Prevotellaceae* ( $4,5 \pm 1,6$  %) a *Tannerellaceae* ( $2,3 \pm 0,4$  %). Z čeledě *Tannerellaceae* se zde vyskytovali především zástupci rodu *Parabacteroides* ( $1,7 \pm 0,2$  %). Poměrně významně zastoupenou čeledí byla čeleď *Gastranaerophilales* z kmene *Cyanobacteria*, ta tvořila  $4,5 \pm 0,9$  % cekální mikroflóry slepic z Farmy 1. Ostatní čeledě, které se v céku brojlerů z Farmy 1 vyskytovaly, tvořily méně než 2 % celkové mikroflóry (Tabulka 2).

### Farma 2

Téměř polovinu cekální mikroflóry brojlerů z Farmy 2 tvořili zástupci rodu *Bacteroides* ( $43 \pm 2,4$  %) čeledě *Bacteroidaceae* z kmene *Bacteroidota*. Kmen *Bacteroidota* byl dále zastoupen čeleděmi *Rikenellaceae* ( $14,1 \pm 0,9$  %), *Prevotellaceae* ( $7,7 \pm 1,8$  %), *Bacteroidales\_\_Other* ( $4,4 \pm 1,2$  %) a *Tannerellaceae* ( $2,7 \pm 0,3$  %). Čeleď *Rikenellaceae* byla zastoupena převážně rody *Alistipes* a *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*. Dále se zde objevily rody *Alloprevotella*, *Prevotellaceae\_Ga6A1\_group* a *Prevotellaceae\_UCG-001*, patřící do čeledě *Prevotellaceae*.

Čtvrtou nejpočetnější čeledí céka byla čeleď *Fusobacteriaceae* ( $5,1 \pm 4,5$  %). Tato čeleď byla zastoupena pouze zástupci rodu *Fusobacterium*, ten u jednoho zvířete tvořil až 11,6 % mikroflóry.

Méně než 5 %, ale více než 1 % tvořily čeledě *Desulfovibrionaceae* ( $3,3 \pm 0,9$  %), *Synergistaceae* ( $2,0 \pm 0,5$  %) a *Spirochaetaceae* ( $1,3 \pm 0,7$  %). Do této kategorie 1–5 % patřily také čeledě *Oscillospiraceae* ( $2,5 \pm 0,9$  %), *Lachnospiraceae* ( $1,9 \pm 1,0$  %)

a *Acidaminococcaceae* ( $1,5 \pm 1,1$  %) z kmene *Firmicutes* a dále *Barnesiellaceae* ( $1,2 \pm 0,2$  %) a *Marinifilaceae* ( $1,2 \pm 0,6$  %) z kmene *Bacteroidota*. Ostatní čeledě popsané v cekální mikroflóře brojlerů z Farmy 2 tvořily méně než 1 %. Například kmen *Proteobacteria* průměrně tvořil pouze 0,4 % cekální mikroflóry brojlerů z Farmy 2 a byl zastoupen pouze čeleděmi *Sutterellaceae*, *Rhodospirillales\_\_uncultured* a *Succinivibrionaceae*. Kmen *Verrucomicrobiota* se na této farmě vůbec nevyskytoval (Tabulka 2).

### **Farma 3**

Stejně jako na předešlých farmách i na Farmě 3 byl nejzastoupenějším taxonem rod *Bacteroides* ( $38,6 \pm 3,8$  %). Kmen *Bacteroidota* byl převážně zastoupen již zmíněným rodem *Bacteroides* a dále čeleděmi *Prevotellaceae* ( $8,8 \pm 1,2$  %), *Rikenellaceae* ( $7,0 \pm 1,5$  %), *Tannerellaceae* ( $2,7 \pm 0,2$  %) a *Bacteroidales\_\_Other* ( $2,7 \pm 0,5$  %). Ostatní čeledě kmene *Bacteroidota* tvořily méně než 0,5 % celkové cekální mikroflóry.

Z kmene *Firmicutes* byly v céku nejpočetnějšími čeleděmi *Oscillospiraceae* ( $5,1 \pm 1,1$  %), *Lachnospiraceae* ( $4,9 \pm 1,6$  %) a *Ruminococcaceae* ( $2,8 \pm 0,7$  %). Ve slepých střevech se dále objevoval rod *Fusobacterium* čeledě *Fusobacteriaceae* a z celkového bakteriálního zastoupení tvořil  $3,7 \pm 2,6$  %. Zhruba dvěma procenty byly zastoupeny čeledě *Spirochaetaceae* ( $2,3 \pm 0,5$  %) a *Helicobacteraceae* ( $2,1 \pm 1,3$  %). Z čeledě *Spirochaetaceae* se zde vyskytovaly především rody *Treponema* a *Spirochaetaceae\_\_uncultured*. Čeď *Helicobacteraceae* byla zastoupena pouze rodem *Helicobacter*.

Rody *Sutterella* a *Parasutterella* patřící do čeledi *Sutterellaceae*, tvořily  $2,1 \pm 0,4$  % cekální mikroflóry. Poslední čeledí, která průměrně tvořila více než 2 % mikroflóry, byla čeď *WCHB1-41* ( $2,1 \pm 2,9$  %). Čeď *WCHB1-41* ale nad procentního zastoupení dosáhla pouze v céku jednoho brojlera, kde tvořila 6,2 % celkové cekální mikroflóry.

Na Farmě 3 se vyskytovaly všechny z nejčtenějších 40 čeledí. Čeledě, které nejsou zmíněné v tomto textu, tvořily méně než 2 % celkové cekální mikroflóry brojlerů z této farmy (Tabulka 2).

### **Farma 4**

Bakteriální zastoupení v cékách jednotlivých slepic z Farmy 4 se mezi sebou poměrně lišilo. Čeď *Bacteroidaceae*, která na ostatních farmách byla nejdominantnější čeledí, byla dominantní pouze u slepice 1 ( $41,7$  %). V cékách slepic 2 a 3 byla společně s čeledí *Bacteroidaceae* ( $18,8 \pm 1,6$  %) dominantní čeď *Fusobacteriaceae* ( $20,5 \pm 4,3$  %). Čeď



*Bacteroidaceae* byl zastoupena pouze rodem *Bacteroides* a čeleď *Fusobacteriaceae* rodem *Fusobacterium*. V cekální mikroflóře slepice 1 však čeleď *Fusobacteriaceae* netvořila ani 1 % celkového složení.

Rozdíl mezi slepicí 1 a slepicemi 2 a 3 byl také v procentuálním zastoupení čeledě *Bacteroidales\_\_Other*, kdy u slepice 1 tato čeleď tvořila 14,56 % mikroflóry a u slepic 2 a 3 maximálně 0,2 %. Dalšími čeleděmi z kmene *Bacteroidota* v mikroflóře slepic z Farmy 4 byly čeledě *Prevotellaceae* ( $5,3 \pm 2,9$  %), *Barnesiellaceae* ( $3,7 \pm 3,0$  %), *Rikenellaceae* ( $3,3 \pm 1,3$  %) a *Tannerellaceae* ( $2,9 \pm 0,7$  %) a *Muribaculaceae* ( $2,8 \pm 1,6$  %).

Dalším rozdílem bylo zastoupení rodu *Mucispirillum* z čeledě *Deferribacteraceae*. Ten tvořil 5 % cekální mikroflóry slepice 2. U slepic 1 a 3 byl ale výskyt *Deferribacteraceae* maximálně 0,4 %. Mikroflóra slepice 3 byla specifická zastoupením rodu *Cerasicoccus* (8,9 %) čeledě *Puniceicoccaceae*, a rodu *Elusimicrobium* (2,4 %) čeledě *Elusimicrobiaceae*. U ostatních slepic z Farmy 4 se tyto rody ani čeledě vůbec neobjevily.

Kmen *Firmicutes* byl zastoupen především čeleděmi *Oscillospiraceae* ( $6,8 \pm 3,5$  %), *Ruminococcaceae* ( $3,5 \pm 1$  %), *Lachnospiraceae* ( $2,7 \pm 0,7$  %). Další početnou čeledí, která tvořila více než jedno procento, byla čeleď *Desulfovibrionaceae* ( $6,4 \pm 3,7$  %), zastoupena rody *Desulfovibrio* a *Desulfovibrionaceae\_uncultured*. Jediným nad procentním rodem z kmene *Proteobacteria* se zde ukázal rod z čeledě *Sutterellaceae* ( $1,2 \pm 0,3$  %) (Tabulka 2).

## **Farma 5**

Z Farmy 5 pochází nejstarší jedinci tohoto experimentu. Z této farmy jsme získávali cekální obsah od rodičovské generace nosnic po produktivním věku, což znamená stáří 60–74 týdnů. Deset nejpočetnějších čeledí zde tvořily pouze čeledě kmenů *Bacteroidota* a *Firmicutes*. Početnější byl ale kmen *Bacteroidota* zastoupen čeleděmi *Bacteroidaceae* ( $31,8 \pm 2,8$  %), *Prevotellaceae* ( $12,1 \pm 2,4$  %), *Rikenellaceae* ( $8,0 \pm 2,4$  %), *Bacteroidales\_\_Other* ( $4,5 \pm 1,0$  %) a *Tannerellaceae* ( $2,6 \pm 0,4$  %). Čeleď *Bacteroidaceae* byla opět zastoupena pouze rodem *Bacteroides*. Z *Rikenellaceae* se zde objevily pouze dva rody, a to *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group* a *Alistipes*. Z čeledě *Tannerellaceae* se v céku objevil například rod *Parabacteroides*.

Nejzastoupenější čeledě kmene *Firmicutes*, které obývaly cékum nosnic byly čeledě *Ruminococcaceae* ( $3,9 \pm 2,1$  %), *Selenomonadaceae* ( $3,5 \pm 2,9$  %), *Acidaminococcaceae* ( $3,4 \pm 2,7$  %), *Lachnospiraceae* ( $3,2 \pm 1,8$  %), *Oscillospiraceae* ( $2,3 \pm 1,1$  %). Další čeledě kmene *Firmicutes*, které tvořily více než 1 % cekální mikroflóry byly *Lactobacillaceae*

( $1,9 \pm 1,1$  %), zastoupena pouze rodem *Lactobacillus*. Dále čeledě *Muribaculaceae* ( $1,3 \pm 0,9$  %), *Veillonellaceae* ( $1,2 \pm 0,9$  %) a *Clostridia\_vadinBB60\_group* ( $1,2 \pm 0,7$  %).

Z čeledě *Ruminococcaceae* se v cekální mikroflóře všech slepic objevoval rod *Faecalibacterium*. U slepice 5 se z čeledě *Ruminococcaceae* navíc vyskytovaly rody *Fournierella* a *Subdoligranulum*. Z čeledě *Selenomonadaceae* se zde vyskytoval pouze rod *Megamonas*. Stejně tak čeleď *Acidaminococcaceae* byla reprezentována pouze jedním rodem, a to *Phascolarctobacterium*. Dále také čeleď *Veillonellaceae* byla zastoupena pouze jedním rodem, rodem *Megasphaera*.

Jedenáctou nejpočetnější čeledí byla čeleď *Spirochaetaceae* ( $2,2 \pm 1,3$  %). Z kmene *Proteobacteria* se v cekální mikroflóře v nadprocentním zastoupení objevila čeleď *Succinivibrionaceae* ( $2,0 \pm 1,6$  %) zastoupena především rodem *Anaerobiospirillum* a čeleď *Sutterellaceae* ( $1,1 \pm 0,9$  %), která stejně jak na ostatních farmách byla zastoupena rody *Parasutterella* a *Sutterella*

Méně než 2 % cekální mikroflóry dále tvořily čeledě *Desulfovibrionaceae* ( $1,7 \pm 0,2$  %), *Fusobacteriaceae* ( $1,2 \pm 0,9$  %). Ostatní z vybraných 40 čeledí se zde vyskytovaly v zastoupení menším než 1 %. Nejmenší zastoupení zde měl kmen *Verrucomicrobiota*, který se vyskytoval v cekální mikroflóře pouze jedné nosnice v podobě rodu *Cerasicoccus* z čeledi *Puniceicoccaceae* 0,03 % (Tabulka 2).

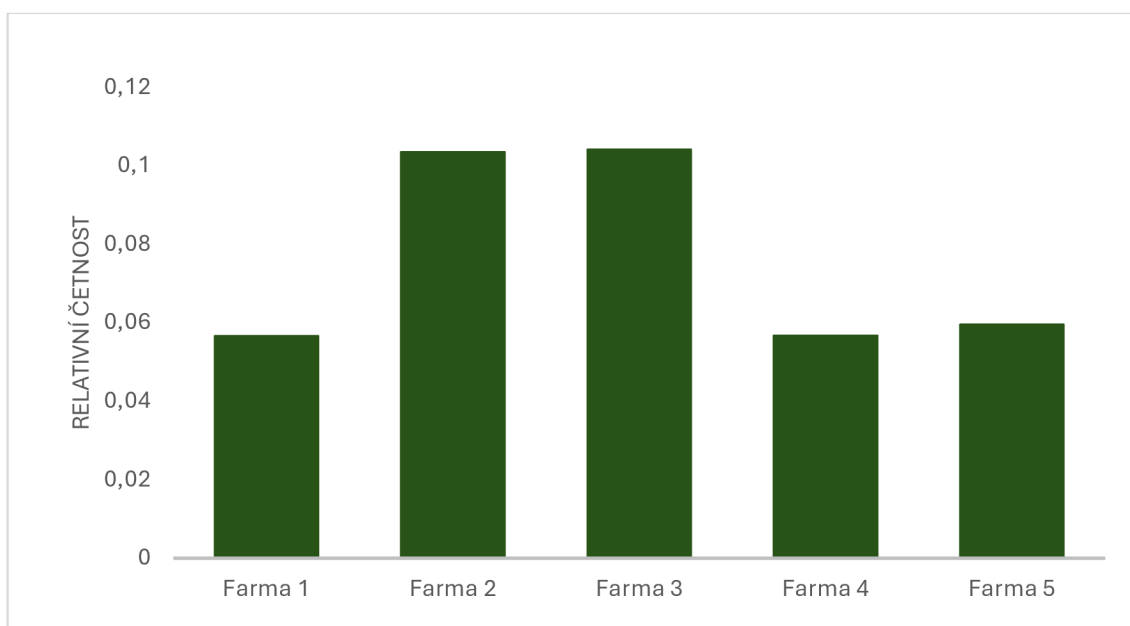
Tabulka 2 Procentuální zastoupení nejčtenější čeledí ve střevní mikroflóře slepic z pěti farem

Čeď	Farma 1	Farma 2	Farma 3	Farma 4	Farma 5
<i>Bacteroidaceae</i>	19,3 ± 3	43 ± 2,4	38,6 ± 3,8	26,4 ± 10,9	31,8 ± 2,8
<i>Rikenellaceae</i>	12,1 ± 2,7	14,1 ± 0,9	7 ± 1,5	3,3 ± 1,3	8 ± 2,4
<i>Prevotellaceae</i>	4,5 ± 1,6	7,7 ± 1,8	8,8 ± 1,2	5,3 ± 2,9	12,1 ± 2,4
<i>Fusobacteriaceae</i>	1,8 ± 1,4	5,1 ± 4,5	3,7 ± 2,6	13,9 ± 10	1,2 ± 0,9
<i>Bacteroidales__Other</i>	5,4 ± 2,2	4,4 ± 1,2	2,7 ± 0,5	4,9 ± 6,8	4,5 ± 1
<i>Oscillospiraceae</i>	2 ± 0,7	2,5 ± 0,9	5,1 ± 1,1	6,8 ± 3,5	2,3 ± 1,1
<i>Lachnospiraceae</i>	1,8 ± 0,3	1,9 ± 1	4,9 ± 1,6	2,7 ± 0,7	3,2 ± 1,8
<i>Tannerellaceae</i>	2,3 ± 0,4	2,7 ± 0,3	2,7 ± 0,2	2,9 ± 0,7	2,6 ± 0,4
<i>Spirochaetaceae</i>	7,7 ± 5	1,3 ± 0,7	2,3 ± 0,5	0 ± 0	2,2 ± 1,3
<i>Ruminococcaceae</i>	0,9 ± 0,1	0,2 ± 0,3	2,8 ± 0,7	3,5 ± 1	3,9 ± 2,1
<i>Desulfovibrionaceae</i>	0,6 ± 0,1	3,3 ± 0,9	1,2 ± 0,5	6,4 ± 3,7	1,7 ± 0,2
<i>WCHB1-41</i>	11,6 ± 6,7	0 ± 0	2,1 ± 2,9	0,1 ± 0,2	0 ± 0
<i>Clostridia_vadinBB60_group</i>	6,5 ± 2,6	0,7 ± 0,5	1,5 ± 1,1	1,9 ± 1,7	1,2 ± 0,7
<i>Acidaminococcaceae</i>	0,7 ± 0,2	1,5 ± 1,1	1,6 ± 2,2	1,6 ± 0,9	3,4 ± 2,7
<i>Selenomonadaceae</i>	0 ± 0	0 ± 0	0,9 ± 0,9	0,9 ± 0,6	3,5 ± 2,9
<i>Barnesiellaceae</i>	1,2 ± 0,5	1,2 ± 0,2	0,3 ± 0,1	3,7 ± 3	1,1 ± 0,7
<i>Muribaculaceae</i>	0,3 ± 0,2	0 ± 0	1,3 ± 0,2	2,8 ± 1,6	1,3 ± 0,9
<i>Sutterellaceae</i>	0,8 ± 0,2	0,3 ± 0,2	2,1 ± 0,4	1,2 ± 0,3	1,1 ± 0,9
<i>Deferribacteraceae</i>	1,5 ± 0,8	0,8 ± 0,7	0,9 ± 0,6	1,9 ± 2,2	0,6 ± 0,7
<i>Lactobacillaceae</i>	0,4 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,6 ± 0,8	1,9 ± 1,1
<i>Gastranaerophilales</i>	4,5 ± 0,9	0 ± 0	0,2 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,2
<i>Succinivibrionaceae</i>	0,2 ± 0,1	0 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0 ± 0,1	2 ± 1,6
<i>Clostridia_UCG-014</i>	0,9 ± 0,3	0,7 ± 0,6	0,7 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,5
<i>Marinifilaceae</i>	0,5 ± 0,1	1,2 ± 0,6	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0	0,5 ± 0,2
<i>Paludibacteraceae</i>	1,4 ± 1,3	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,3	0,2 ± 0,2	0,8 ± 0,5
<i>Synergistaceae</i>	0,4 ± 0,2	2 ± 0,5	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,4
<i>Veillonellaceae</i>	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2	1,2 ± 0,9
<i>Puniceicoccaceae</i>	0,5 ± 0,2	0 ± 0	0,1 ± 0,1	3 ± 4,2	0 ± 0
<i>UCG-010</i>	1,4 ± 1,2	0,7 ± 0,2	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,2	0,5 ± 0,2
<i>Helicobacteraceae</i>	0,2 ± 0	0,1 ± 0,1	2,1 ± 1,3	0,3 ± 0,2	0,1 ± 0,1
<i>F082</i>	0,5 ± 0,3	0,3 ± 0,3	0,3 ± 0,2	0 ± 0	0,7 ± 0,3
<i>Elusimicrobiaceae</i>	0,1 ± 0,2	0,2 ± 0,3	0 ± 0,1	0,8 ± 1,1	0,7 ± 0,4
<i>Rhodospirillales uncultured</i>	1,8 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3
<i>Peptostreptococcaceae</i>	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,5	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,4	0,5 ± 0,4
<i>Atopobiaceae</i>	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,3	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,5 ± 0,3
<i>WPS-2</i>	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	0 ± 0	0,5 ± 0,5
<i>Butyricicoccaceae</i>	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,2	0,6 ± 0,6	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
<i>Enterococcaceae</i>	0,1 ± 0,1	0,4 ± 0,6	0 ± 0	0,1 ± 0,1	0 ± 0
<i>Brachyspiraceae</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,5 ± 0,5	0,1 ± 0,1
<i>Enterobacteriaceae</i>	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0,2 ± 0,5

#### 4.2.2 Geny rezistence v cekální mikroflóře

V další části práce jsem se zabývala přítomností genů pro antibiotické rezistence ve střevní mikroflóře brojlerů a nosnic. Bylo vybráno 11 genů antibiotické rezistence: *blaTEM*, *aadA*, *strA*, *sul2*, *tet(Q)*, *linA*, *tet(W)*, *tet(32)*, *tet(O)*, *tet(44)* a *tetA(P)*.

Výskyt vybraných genů rezistence v celkové DNA odebrané ze slepých střev slepic byl zjišťován pomocí real-time PCR. Po normalizaci vůči genu pro 16S rRNA jsme stanovili relativní četnost sledovaných genů na jednotlivých farmách. Z pěti testovaných farem se bylo nejvíce genů rezistence pozorováno na Farmě 2 a Farmě 3 (Obrázek 12)



Obrázek 12 Relativní četnost zkoumaných genů rezistence na jednotlivých farmách

Jednotlivé geny antibiotické rezistence se však na farmách vyskytovaly s různou četností. Gen kódující rezistenci k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům *blaTEM* se nejvíce vyskytoval v DNA odebrané z cék slepic z Farmy 4. I zde se se ale výskyt tohoto genu blížil nule. Gen rezistence k sulfonamidům *sul2* se objevoval především na Farmě 2, ale také na Farmě 1. *LinA* kódující rezistenci k linkosamidům se objevoval na všech farmách a jeho relativní četnost kolísala v rozmezí hodnot 0,01 až 0,05. Nejvíce genu *linA* se vyskytovalo na Farmě 2 a Farmě 3, nejméně potom na Farmě 4. Dále byl zkoumán výskyt genů rezistence ke streptomycinu, konkrétně *strA* a *aadA*. Ze zkoumaných farem se jako největší rezervoár těchto genů ukázala Farma 2. Geny *strA* a *aadA* byly dále detekovány i na Farmě 1. Na ostatních farmách se geny rezistence ke streptomycinu téměř nevyskytovaly.



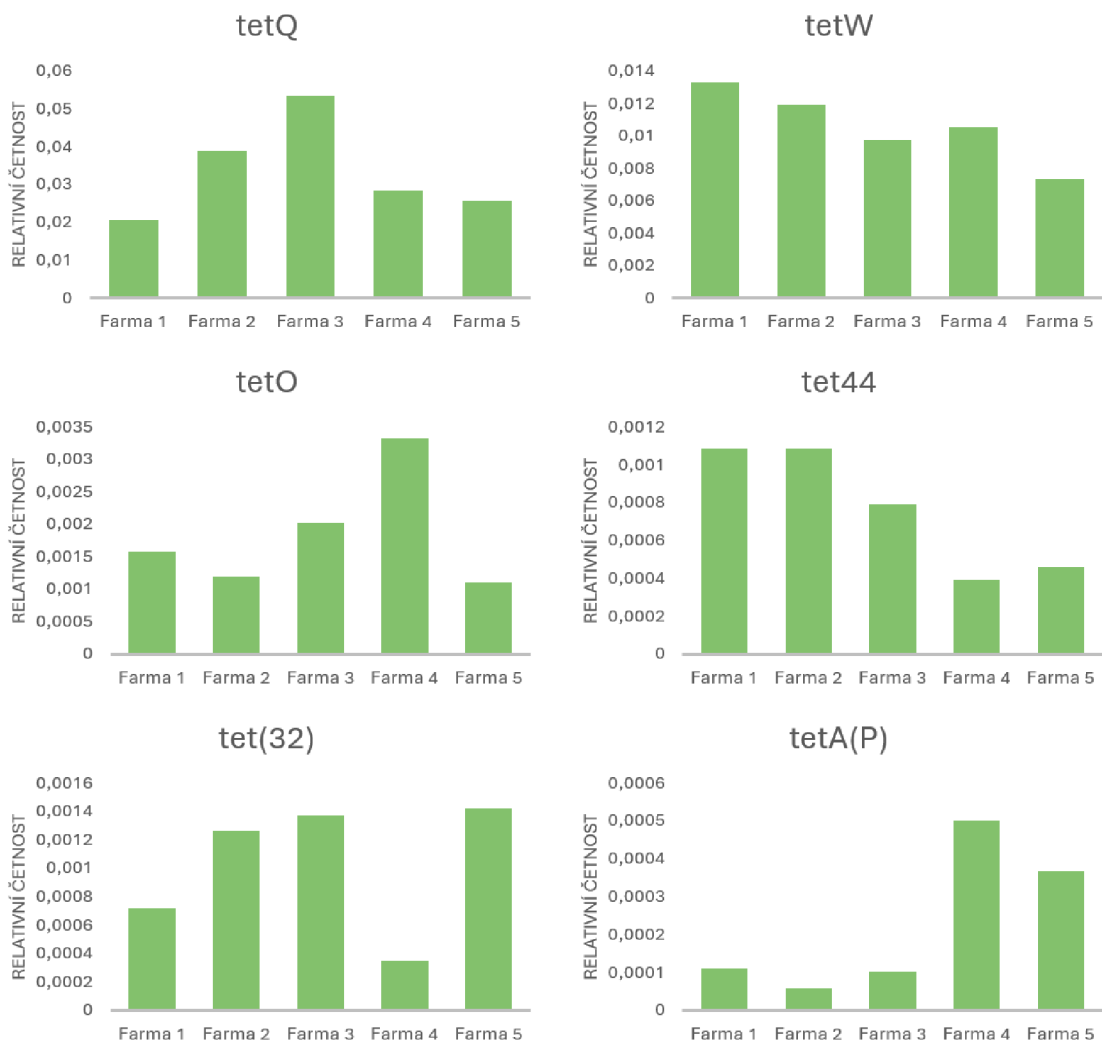
Obrázek 13 Relativní četnost vybraných genů antibiotické rezistence k betalaktamům (blaTEM), sulfonamidům (sul2), linkosamidům (linA) a streptomycinu (strA, aadA) na jednotlivých farmách

Geny kódující rezistenci k tetracyklinovým antibiotikům byly nalezeny ve vzorcích ze všech zkoumaných farem. Nejčastěji se ve střevní mikroflóře vyskytovaly geny *tetQ* a *tetW*, a naopak nejméně gen *tetA(P)*.

Nejvyšší relativní četnost genu *tetQ* byla detekována na Farmě 3, kde dosáhla hodnoty více než 0,05. Průměrná relativní četnost genu *tetQ* na ostatních farmách (1, 2, 4, 5) byla 0,03. Nejvyšší výskyt genu *tetW* byl detekován na farmách 1, 2 a 4. Na zbylých dvou farmách byly naměřeny hodnoty menší než 0,01. Dalším zkoumaným genem byl gen *tetO*. Největším rezervoárem genu *tetO* byla střevní mikroflóra slepic z Farmy 4, kde relativní četnost dosahovala hodnoty 0,003. Na ostatních farmách gen *tetO* dosahoval hodnoty 0,002 a nižší.

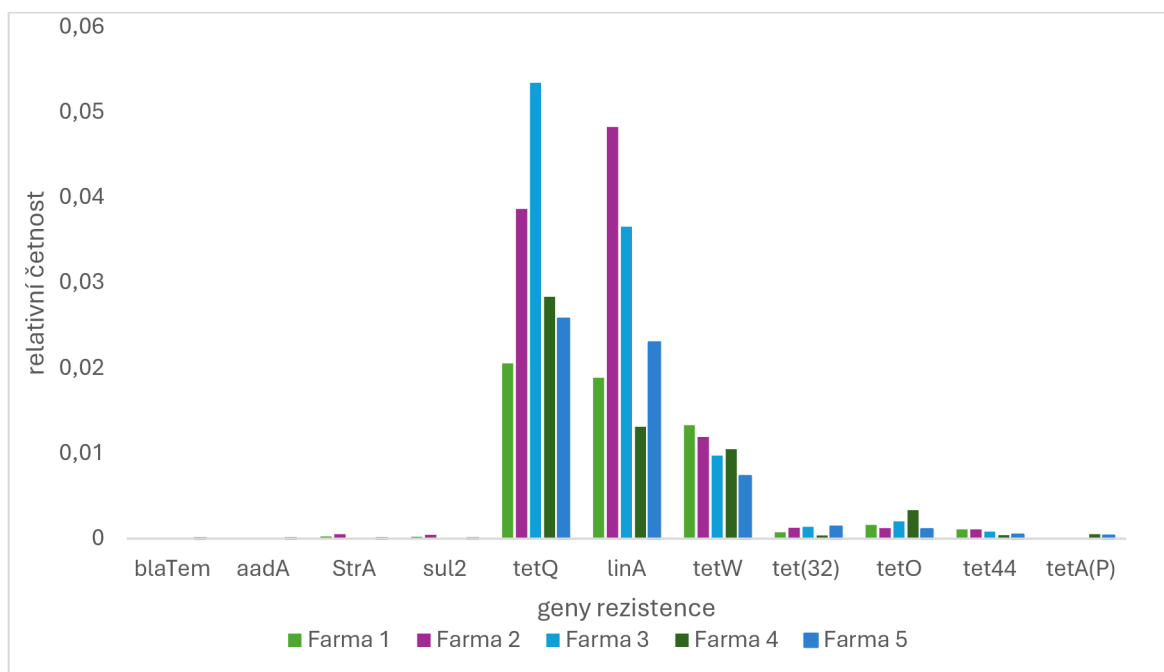
Gen *tet44* se nejvíce vyskytoval na Farmě 1 a Farmě 2, kde dosahoval hodnot větších než 0,001. Naopak na Farmě 4 se hodnoty blížily nule.

Jako největším rezervoárem genu *tet(32)* se ukázaly vzorky mikroflóry z Farmy 5, 3 a 2 s relativní četností více než 0,001. Na Farmě 4 se tento gen vyskytoval nejméně. Farma 4 ale byla největším rezervoárem genu *tetA(P)* kde relativní četnost dosahovala hodnoty 0,005. Hodnoty menší než 0,0001 byly naměřeny na farmách 1,2 a 3.



Obrázek 14 Relativní četnost genů antibiotické rezistence k tetracyklinu na jednotlivých farmách

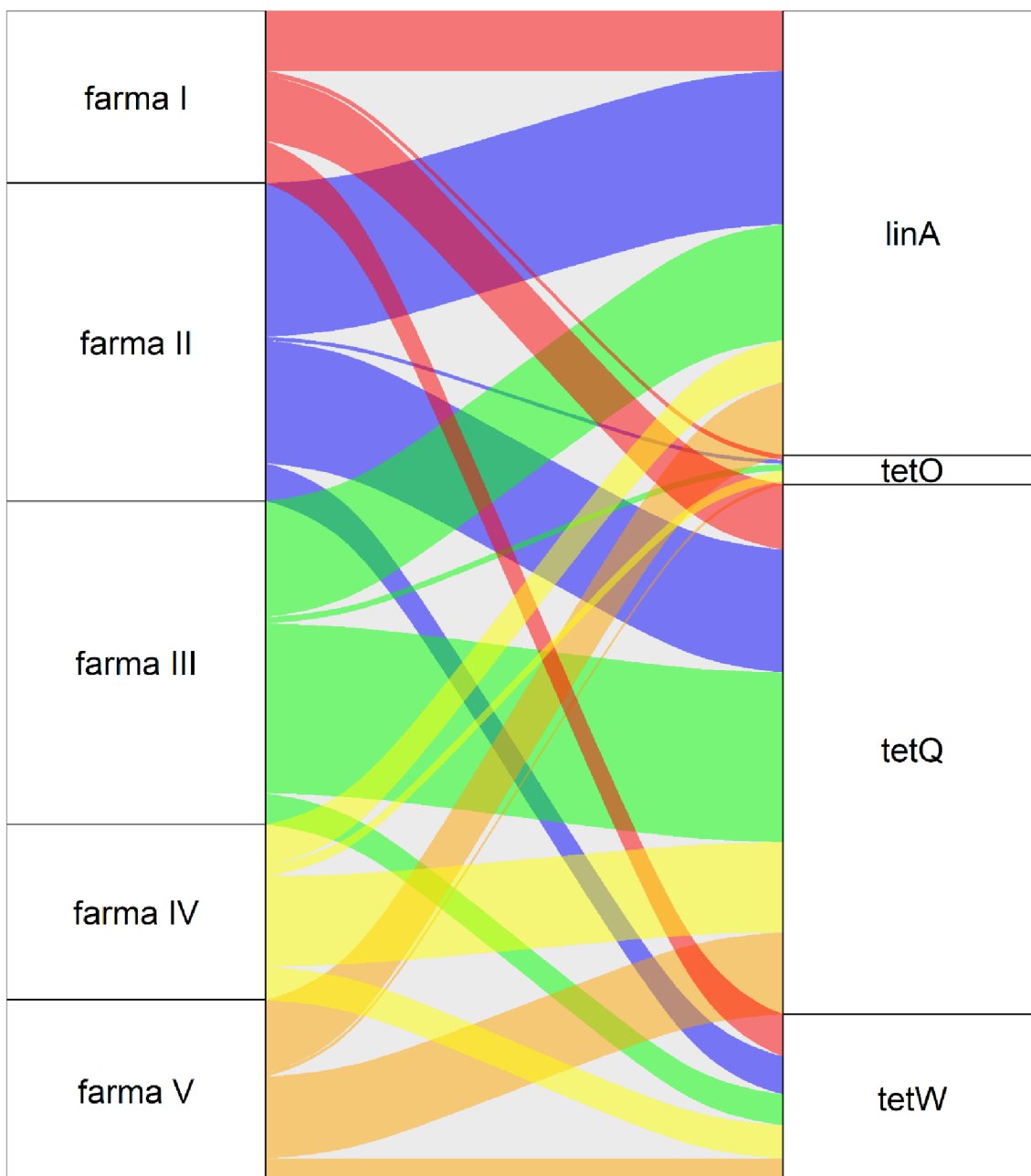
Z jedenácti zkoumaných genů antibiotické rezistence vykazovaly nejvyšší prevalenci geny *tetQ*, *linA*, *tetW* a *tetO*. Geny *linA* a *tetQ* se na všech farmách dohromady vyskytovaly s relativní četností vyšší než 0,13. Geny *linA* a *tetQ* se s nejvyšší četností vyskytovaly na Farmě 2 a 3 a geny *tetW* a *tetO* spíše na Farmě 1 a 4 (Obrázek 15).



Obrázek 15 Relativní četnost genů antibiotické rezistence na jednotlivých farmách

V následujícím grafu (Obrázek 16) je zobrazen výskyt nejzastoupenějších genů, tedy *tetQ*, *linA*, *tetW* a *tetO* na jednotlivých farmách. Z tohoto grafu je patrné, že výskyt genů *linA* a *tetQ* velmi převažuje výskyt genů *tetW* a *tetO*.

I v případě, že bereme v potaz pouze čtyři nejzastoupenější geny, Farma 2 a Farma 3 jsou největšími rezervoáry antibiotické rezistence z pěti pozorovaných farem.



Obrázek 16 Výskyt nejvíce zastoupených genů na jednotlivých farmách



### 4.2.3 Korelační analýza

Pomocí programu R byla provedena korelační analýza, ve které proti sobě byly vyneseny výsledky relativní četnosti genů rezistence vůči zastoupení čeledí ve vzorcích.

Vysoká míra korelace mezi geny rezistence a bakteriálním osídlením byla nalezena u čeledí *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae* a *Muribaculaceae*. Naopak nízká míra korelace byla pozorována u čeledí *Succinivibrionaceae*, *Elusimicrobiaceae*, *Lactobacillaceae* a *Selenomonadaceae* (Obrázek 17).

Ve vzorcích, kde se vyskytovaly čeledě *Bacteroidaceae*, *Rikenellaceae* a *Ruminococcaceae*, byl zachycen vyšší výskyt genů antibiotické rezistence ke streptomycinu, přičemž *Bacteroidaceae* byly jedinými významnými nositeli genu *aadA*. Gen *strA* se významně pojil se všemi třemi čeleděmi. Nízká míra korelace mezi geny rezistence ke streptomycinu se naopak objevila u čeledí *Barnesiellaceae* a *Brachyspiraceae*. *Brachyspiraceae* vykazovala nízkou míru korelace k oběma genům, čeleď *Barnesiellaceae* pouze k *strA*.

Žádná z čeledí nebyla korelační analýzou označena jako významný nositel genu *sul2*. Nízká korelace *sul2* byla prokázána u čeledí *Barnesiellaceae* a *Lactobacillaceae*. Také pro gen *blaTEM* nebyla prokázána korelace s žádnou ze zkoumaných čeledí.

Jako čeledě, které jsou pravděpodobným rezervoárem genu *linA*, se ukázaly *Rikenellaceae*, *Ruminococcaceae*, *Muribaculaceae* a *Synergistaceae*. Nízká míra korelace genu *linA* se pojila s čeleděmi *Selenomonadaceae*, *Lachnospiraceae*, *UCG-010* a *Sutterellaceae*.

Vysoká korelace genů antibiotické rezistence k tetracyklinům se se objevila u dvanácti čeledí. Konkrétně čeleď *Rikenellaceae* byla spojena s geny *tetQ* a *tet44*. Dalšími významnými nositeli genu *tetQ* byly čeledě *Bacteroidales\_\_Other*, *Synergistaceae* a *Ruminococcaceae*. Nízká míra korelace genu *tetQ* se ukázala vůči čeledím *Helicobacteraceae*, *UCG-010* a *Sutterellaceae*.

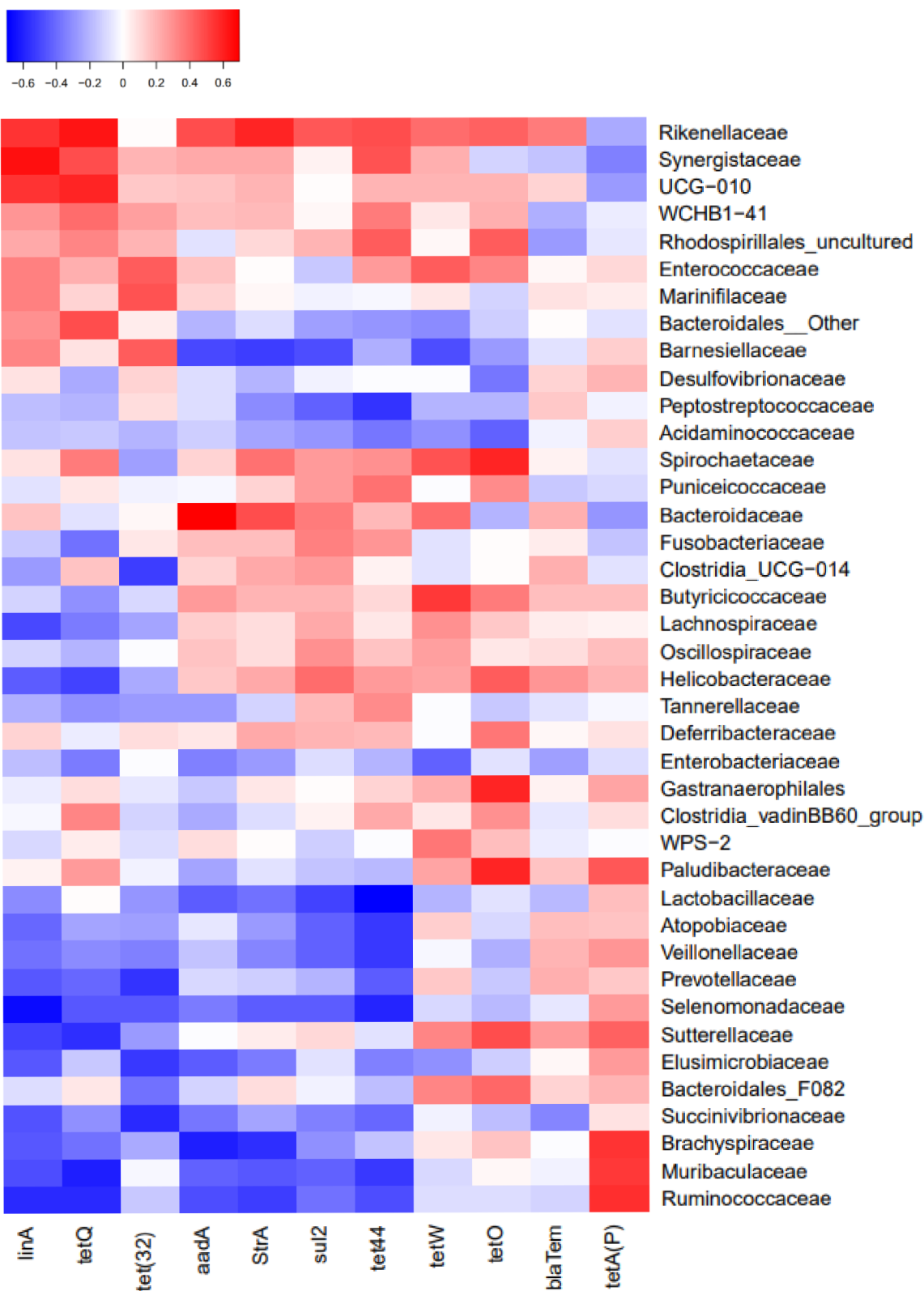
Čeleď *Ruminococcaceae* spolu s čeledí *Muribaculaceae* byly významnými nositeli genu *tetQ*, *tet44* a *tetA(P)*. Další čeledí, která se ukázala jako možný nositel genu *tetA(P)*, byla čeleď *Brachyspiraceae*.

Jedinou statisticky významnou čeledí v tomto experimentu pojící se s genem *tetW* se stala čeleď *Butyricoccaceae*. Nízká korelace genu *tetW* se pojila naopak s čeledí *Barnesiellaceae*.

U čeledě *Marinifilaceae* byla pozorována významná korelace s genem *tet(32)*. Oproti tomu nízká korelace byla pozorována vůči čeledím *Prevotellaceae*, *Succinivibrionaceae*, *Elusimicrobiaceae* a *Clostridia\_UCG-014*.

Čeď *Spirochaetaceae* byla dle korelační analýzy nositelem pouze jednoho genu antibiotické rezistence, a to genu *tetO*. Dalšími čeleděmi, které byly korelační analýzou spojeny s genem *tetO* byly čeledě *Gastranaerophilales*, *Pahudibacteraceae* a *Sutterellaceae*.

Zbývající čeledě *Fusobacteriaceae*, *WCHB1-41*, *Oscillospiraceae*, *Clostridia\_vadinBB60\_group*, *Desulfovibrionaceae*, *Puniceicoccaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Deferribacteraceae*, *Tannerellaceae*, *Rhodospirillales\_uncultured*, *WPS-2*, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcaceae* a *Bacteroidales\_F082* nevykazovaly žádnou statisticky významnou míru korelace vůči zkoumaným genům antibiotické rezistence.



Obrázek 17 Heat-mapa znázorňující korelace mezi frekvencí výskytu genů antibiotické rezistence a bakteriálními čeleděmi

Modrá barva zobrazuje negativní korelaci, červená korelaci pozitivní.

## 5. DISKUZE

Diplomová práce se zabývala charakterizací mikroflóry a detekcí vybraných genů antibiotické rezistence ve střevní mikroflóře rodičovských generací brojlerů a nosnic po produktivním věku. Tyto slepice pocházely z komerční produkce, vylíhly se tedy do prostředí líhně a dále byly přesunuty do prostorů rodičovské farmy. Během života se tak nepotkaly se zvířaty jiného stáří a veškeré bakterie osidluující jejich trakt tedy pocházely pouze z prostředí farem a z krmiva.

Jelikož výskyt genů rezistence může být spojován s určitými taxony bakterií, první část praktické části se věnovala popisu cekální mikroflóry slepic z vybraných farem. Jednalo se o pět farem, ze kterých pocházelo 12 rodičovských brojlerů a osm rodičovských nosnic. Tyto slepice již byly staré, po tzv. produktivním věku. Byly utraceny mezi 54.–72. týdnem života, což v rámci vývoje jejich cekální mikroflóry odpovídá čtvrtému stadiu vývoje dle Videnska et al. (2014).

Pro čtvrtou fázi vývoje je typické rovnoměrné zastoupení kmenů *Bacteroidota* a *Firmicutes* (Videnska et al., 2014). U slepic z těchto farem se ale ve střevní mikroflóře vyskytovalo téměř o dvě třetiny více zástupců kmene *Bacteroidota* ( $58,6 \pm 10,4$  %) než *Firmicutes* ( $18,3 \pm 5,2$  %). Pro čtvrté stadium jsou dále typické čeledě *Prevotellaceae*, *Bacteroidaceae*, *Bacteroidales\_\_Other*, *Deferribacteraceae*, *Lachnospiraceae*, *Peptostreptococcaceae*, *Lactobacillaceae*, *Acidaminococcaceae*, *Desulfovibrionaceae* (Rychlik 2020). Z nichž se na pozorovaných farmách vyskytovaly všechny zmíněné. Dle studie (Xu et al. 2023) jsou pro takto staré slepice typické rody *Faecalibacterium*, *Rikenellaceae\_RC9\_gut\_group*, *Desulfovibrio* a *Eubacterium*. Z těchto rodů se u mnou pozorovaných slepic nevyskytoval pouze rod *Eubacterium*.

Na Farmě 2 a 4 byl pozorován zvýšený výskyt rodu *Fusobacterium*, které se ve střevní mikroflóře slepic vyskytuje spíše ojediněle (Rychlik 2020). Dle studie Kollarcikova et al. (2019) je výskyt rodu *Fusobacterium* nad 5 % spojováno s nižší produkcí vajec, což odpovídá stáří těchto slepic. Na Farmě 4 rod *Fusobacterium* tvořil 13,9 % cekální mikroflóry. Bohužel nemáme záznamy o zdravotním stavu těchto slepic, a tak nelze zhodnotit případný vliv tohoto rodu na zvíře.

Mezi farmami se také objevovaly rozdíly v zastoupení čeledě *Spirochaetaceae*. Na Farmách 1, 2, 3 a 5 se v různém zastoupení objevoval rod *Treponema*, do kterého se řadí mnoho patogenních druhů (Shukla et al. 2022), ale běžně se ve střevní mikroflóře slepic vyskytuje

(Rychlik 2020). Z čeledě *Spirochaetaceae* je pro slepice potenciálním patogenem rod *Brachyspira* (Stephens a Hampson 2001). Ten byl v nadprocentním výskytu zaznamenán pouze na Farmě 4. Výskyt rodu *Brachyspira* může naznačovat specifické environmentální faktory na Farmě 4, které podporují jeho přežívání a šíření, což může mít důsledky pro zdraví a výkonnost slepic chovaných na této farmě.

Také kmen *Verrucomicrobia* je ve střevní mikroflóře slepic spíše ojedinělý (Rychlik 2020). Na Farmě 1 tento kmen tvořil téměř 12 % cekální mikroflóry. Jednalo se konkrétně o čeď WCHB1-41, nedávný výzkum ukázal, že tato čeď významně ovlivňuje nutriční požadavky během chladu. Podílí se totiž na biosyntéze argininu a mastných kyselin a je také schopna rozkládat mucin a přeměňovat jej na mastné kyseliny s krátkým řetězcem, které poskytují živiny dalším bakteriím ve střevě. WCHB1-41 tak může přispívat k produkci energie během studeného období (Guo et al. 2021). Tento významný podíl čeledi WCHB1-41 může naznačovat specifické adaptační mechanismy mikroflóry slepic v daném prostředí Farmy 1, které by mohly zahrnovat i reakci na chladnější podmínky.

Střevní mikroflóra slepic bývá většinou zkoumána maximálně do stáří 45 dnů, což je běžná délka života brojlera z komerční farmy (Yang et al. 2011; Bjerrum et al. 2006; Lundberg et al. 2021). Neexistuje proto moc studií, se kterými by se výsledky uvedené v této diplomové práci daly porovnávat. Dále je střevní mikroflóra častěji zkoumána pomocí odběru vzorků z trusu, protože v rámci tohoto přístupu není potřeba obětovat zvíře a je možné vzorky odebírat opakovaně. Jde o preferovaný způsob studia mikroflóry, jelikož stejná zvířata mohou být pozorována v delším časovém období. Vzorky z trusu ale nelze porovnávat se vzorky z cekální mikroflóry. Ve vzorcích z trusu jsou obsaženy spíše bakterie z tenkého střeva než ze střev slepých. Vzorky z trusu a slepých střev se shodují pouze v 88 % jednotlivých taxonů a kvantitativní zastoupení jednotlivých čeledí se také velmi liší (Stanley et al. 2015).

V porovnání s dostupnými studiiemi a poznatky byla střevní mikroflóra pozorovaných slepic tvořena bakteriemi běžnými pro slepice tohoto stáří. Objevovaly se pouze značné rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých taxonů. Metodika chovu rodičovských generací slepic a kohoutů je pro nosné typy i brojlerů stejná (Brouček et al. 2011), nejspíše proto se neobjevovaly významné rozdíly mezi farmami brojlerů a farmou nosnic.

V další části diplomové práce byly pomocí real-time PCR detekovány vybrané geny antibiotické rezistence ve vzorcích cekální mikroflóry slepic. Je známo, že geny antibiotické rezistence se vyskytují ve střevní mikroflóře brojlerů i přesto, že jim nikdy nebyla antibiotika podávána (Xiong et al. 2018).

Jelikož je plošné užívání antibiotik zakázáno, tak je velmi pravděpodobné, že bakterie, které se nacházely ve střevech těchto zvířat, nikdy nebyly v kontaktu s antibiotiky, a i přesto se na farmách objevovaly některé geny antibiotické rezistence s relativně vysokou četností. Jednalo se především o geny kódující rezistenci k tetracyklinu, kódující tvorbu proteinů chránících ribozomální protein, a to geny *tetQ* a *tetW* a *tetO* a dále gen *linA* kódující nucleotidyltransferázy.

Zvýšený výskyt těchto genů rezistence může být způsoben tím, že chlortetracyklin, oxytetracyklin (Skřivanová a Rada 2014) a lincomycin byly dlouhá léta používány jako stimulatory růstu (Thumu a Halami 2012). Tetracykliny jsou také dodnes při léčbě zvířat antibiotikem první volby (European Medicines Agency 2019), což může také přispět k udržení selekčního tlaku na geny rezistence v bakteriální populaci na farmách. Nepřiměřené dávkování antibiotik tak vede k postupnému hromadění rezistentních mikroorganismů v prostředí, což bylo zjištěno i v případě střevní mikroflóry sledovaných slepic. Tato skutečnost ukazuje na potřebu odpovědného a cíleného využívání antibiotik v živočišné produkci a potřebu kvalitní surveillance antibiotické rezistence.

Geny antibiotické rezistence samozřejmě představují největší problém, pokud se objeví u patogenních bakterií. Přehlíženým rezervoárem těchto genů jsou ale komenzální bakterie (Yang et al. 2022). V další části diplomové práce byly pomocí korelační analýzy prognostikovány bakteriální čeledě, které jsou možným rezervoárem genů antibiotické rezistence. Tento přístup slouží k identifikaci klíčových skupin bakterií, které by mohly hrát rozhodující roli v šíření antibiotické rezistence v mikrobiomu a tím napomoci k lepšímu porozumění tohoto problému.

Výsledky této metody ale nelze brát jako definitivní. I když se u některé čeledě vyskytuje vyšší frekvence genů pro rezistenci, neznamená to automaticky, že všichni zástupci dané čeledě tyto geny nesou. Také málo zastoupené taxony mohou nést geny pro rezistenci s vysokou frekvencí, ale kvůli jejich malému počtu se tyto informace nemusí projevit v celkové analýze. Zároveň čeledě s nízkou korelací s geny pro rezistenci k antibiotikům nemusí nutně znamenat, že nejsou nositeli těchto rezistentních genů.

Tématem komenzálních bakterií jako rezervoáru genů rezistence se obsáhle zabývala studie Juricova et al. (2021), při které bylo zjištěno, že téměř polovina vzorků odebraných ze slepých střev slepic obsahovala alespoň jeden typ antibiotické rezistence s tím, že nejčetnější byly geny *tetW*, *tet32*, *tetO* a *tetQ*. Dle této studie se geny rezistence k tetracyklinům vyskytovaly u tří kmenů, a to *Firmicutes*, *Bacteroides* a *Actinobacteria*.

Korelační analýza jako potenciální rezervoáry genů antibiotické rezistence k tetracyklinům *tetQ*, *tetA(P)*, *tet44*, *tetW* a *tet32* označila také především kmeny *Bacteroidetes* a *Firmicutes* (kmen *Actinobacteria* se ve vzorcích nevyskytoval). Gen *tetO* se ukázal jako nejrozšířenější, jeho výskyt koreloval se čtyřmi kmeny, a to *Bacteroidota*, *Firmicutes*, *Proteobacteria* a *Spirochaetota*. Kmen *Spirochaetota* se také významně pojil s výskytem genu *tetA(P)*.

Studie Yang et al. (2022) označila jako hlavní nositele genů antibiotické rezistence rody *Escherichia*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, a *Lactobacillus*. U zkoumaných slepic se však rody *Escherichia*, *Staphylococcus* a *Klebsiella* vůbec nevyskytovaly a s výskytem rodů *Lactobacillus* a *Enterococcus* se dle korelační analýzy výskyt genů rezistence nepojil.

Při nahlížení na tyto výsledky je ale nutno brát v potaz i stáří zvířat. Jako významný nositel genů rezistence byl označen kmen *Proteobacteria* (Poirel et al. 2018; Xiao et al. 2023), do kterého patří i *Escherichia coli*. *Escherichia coli* je jedna z prvních bakterií, která osidluje střeva slepic (Videnska et al. 2014). Zastoupení kmene *Proteobacteria* s přibývajícím věkem klesá a společně s ním klesá i četnost genů antibiotické rezistence (Xiao et al. 2023; Zhu et al. 2021).

Zvýšený výskyt genů antibiotické rezistence není problém pouze České republiky a Evropy, ale také například Indie, kde jsou antibiotika jako růstové stimulanty užívaná dodnes (Paul et al. 2022). Dalším příkladem je studie Yang et al. (2022), dle které se ve střevech kuřat z Číny objevuje signifikantně více genů rezistence než u kuřat evropských. Tento rozdíl je nejspíše způsoben odlišnými postupy v chovu zvířat a používání antibiotik v těchto zemích. Jelikož se jedná o globální problém, bylo by vhodné jej řešit koordinovaně na mezinárodní úrovni.

To, že jsou velkochovy nebezpečným rezervoárem antibiotické rezistence, dokazuje studie Wang et al. (2021), ve které porovnávali střevní mikroflóru pracovníků velkochovů kuřat a kontrolní skupiny lidí žijících více než 5 km od velkochovu. Výsledky této studie ukazují, že pracovníci z velkochovů mají ve své mikroflóře o 27 % genů antibiotické rezistence více.

Téma antibiotické rezistence ve střevní mikroflóře slepic, ale i dalších hospodářských zvířat ve velkochovech, je důležitým a komplexním problémem pro lidské zdraví. Studie ukazují, že i přes zákazy používání antibiotik ve velkochovu slepic jsou geny rezistence k antibiotikům stále široce rozšířené. Komenzální bakterie ve střevech slepic jsou důležitým rezervoárem těchto genů a mohou být stěžejním prostředníkem přenosu rezistence mezi

mikroorganismy. Porozumění těmto procesům je nezbytné pro efektivní kontrolu a prevenci antibiotické rezistence v živočišné produkci i pro ochranu veřejného zdraví.



## 6. ZÁVĚR

Antibiotická rezistence je problémem diskutovaným již od doby objevení antibiotik (Fleming 1945). Postupně se ale stala jednou z největších zdravotních hrozeb naší doby. Dle Světové zdravotnické organizace je problém antibiotické rezistence zařazen mezi 10 největších hrozeb pro lidské zdraví (World Health Organisation 2019).

Rezistence vzniká především neadekvátním podáváním antibiotik při léčbě bakteriálních infekcí, což bylo poprvé zmíněno již v roce 1945, kdy Alexander Fleming před tímto jevem varoval. Od té doby se ukázalo, že tento problém má mnohem hlubší dopady, než se původně očekávalo. Nejen zdravotnictví, ale i sektor živočišné výroby se významně podílel na rozšíření antibiotické rezistence. Antibiotika se zde využívala dlouhá léta jako stimulatory růstu, což znamená, že byla podávána dlouhodobě a v malých dávkách (Castanon 2007). Tento způsob podávání je přesně opačný, než je pro bezpečné používání antibiotik doporučeno (Štefan 2022).

Jednou ze strategií boje s antibiotickou rezistencí je celkové snížení spotřeby antibiotik (European Commission 2020), čehož se v hospodářském sektoru daří dosáhnout (European Medicines Agency 2023). V České republice například došlo k významnému poklesu spotřeby antibiotik v tomto odvětví od roku 2011 (ÚSKVBL 2020), což odpovídá zavedení prvního NAP (Státní zdravotní ústav 2011).

V rámci veterinární medicíny došlo k zásadní změně v roce 2006, a to k zákazu využívání antibiotik jako stimulatorů růstu. Dále byla v roce 2019 vydána kategorizace antibiotik pro veterinární medicínu, která rozděluje antibiotika dle impaktu na humánní medicínu. Tato opatření byla zavedena s cílem snížit riziko rezistence mikroorganismů vůči antibiotikům a zachovat účinnost těchto léčiv v léčbě lidských i zvířecích onemocnění (European Medicines Agency, 2019).

Jako významný rezervoár genů antibiotické rezistence byly označeny také komenzální bakterie ve střevech hospodářských zvířat (Juricova et al. 2021). Tato skutečnost zdůrazňuje důležitost sledování a porozumění složení střevní mikroflóry v chovech zvířat. Proto bylo v praktické části jako první popsáno složení střevní mikroflóry slepic z rodičovských farem. Střevní mikroflóra slepic z těchto farem byla tvořena převážně bakteriemi kmene *Bacteroidota* a *Firmicutes*, což jsou kmeny běžné pro takto staré slepice a jejichž změny mohou odrážet potenciální vlivy prostředí, stravy nebo chovatelských postupů (Videnska et al. 2013). Detailní pochopení mikrobiomu zvířat poskytuje cenné informace pro strategie prevence a kontrolu antibiotické rezistence v zemědělských systémech (Juricova et al. 2021).

V dalším kroku byly ve vzorcích ze slepých střev detekovány geny antibiotické rezistence vůči  $\beta$ -laktamovým antibiotikům, tetracyklinům, linkosamidům, sulfonamidům a streptomycinu. Na všech farmách se s největší prevalencí vyskytovaly geny kódující rezistenci k tetracyklinům a gen *linA*, kódující rezistenci k linkosamidům. Tato skutečnost může být vysvětlena tím, že se tato antibiotika dlouho využívala jako stimulanty růstu (Skřivanová a Rada 2014). Tetracykliny jsou zároveň dodnes antibiotiky první volby ve veterinární medicíně (European Medicines Agency 2019).

Posledním cílem diplomové práce bylo pomocí korelační analýzy předpovědět čeledě, které jsou potenciálními rezervoáry vybraných genů antibiotické rezistence. V rámci provedené korelační analýzy byly identifikovány čeledě z kmenů *Firmicutes* a *Bacteroidetes* jako hlavní rezervoáry antibiotické rezistence ve střevech. Tyto kmeny jsou zároveň nejzastoupenějšími kmeny ve střevní mikroflóře „dospělých“ slepic (Videnska et al. 2013). Tato práce ukazuje na spojení mezi složením střevní mikroflóry a potenciálními rezervoáry genů antibiotické rezistence. Porozumění těmto procesům a souvislostem je důležitým krokem k pochopení šíření rezistentních bakterií a vývoji strategií pro kontrolu antibiotické rezistence v chovech hospodářských zvířat.

## 7. LITERATURA

AL-DOBAIB, S. N. a MOUSA, H. M., 2009. *Benefits and risks of growth promoters in animal production*. online. Journal of Food, Agriculture & Environment. roč. 7, č. 2, s. 202-208. Dostupné z: [https://www.researchgate.net/profile/Hassan-Mousa/publication/286316147\\_Benefits\\_and\\_risks\\_of\\_growth\\_promoters\\_in\\_animal\\_production/links/59c68fce0f7e9bd2c00f4502/Benefits-and-risks-of-growth-promoters-in-animal-production.pdf](https://www.researchgate.net/profile/Hassan-Mousa/publication/286316147_Benefits_and_risks_of_growth_promoters_in_animal_production/links/59c68fce0f7e9bd2c00f4502/Benefits-and-risks-of-growth-promoters-in-animal-production.pdf). [citováno 2024-03-02].

ALLEN, Heather K.; DONATO, Justin; WANG, Helena Huimi; CLOUD-HANSEN, Karen A.; DAVIES, Julian et al., 2010. *Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments*. online. Nature Reviews Microbiology. roč. 8, č. 4, s. 251-259. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2312>. [citováno 2024-04-08].

AMBLER, R.P., 1980. *The structure of  $\beta$ -lactamases*. online. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences. roč. 289, č. 1036, s. 321-331. ISSN 0080-4622. Dostupné z: <https://doi.org/10.1098/rstb.1980.0049>. [citováno 2024-01-21].

AMINOV, R. I.; GARRIGUES-JEANJEAN, N. a MACKIE, R. I., 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. online. Appl. Environ. Microbiol. č. 67, s. 22-32. Dostupné z: <https://doi.org/https://doi.org/10.1128/AEM.67.1.22-32.2001>. [citováno 2023-12-20].

AMINOV, Rustam, 2010. *A brief history of the antibiotic era: lessons learned and challenges for the future*. online. Frontiers in microbiology. roč. 1, č. 134. Dostupné z: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2010.00134/full>. [citováno 2023-09-13].

ANDERSON, Rosaleen J.; GROUNDWATER, Paul W.; TODD, Adam a WORSLEY, Alan J., 2012. *Antibacterial agents: chemistry, mode of action, mechanisms of resistance, and clinical applications*. online. Chichester, West Sussex: John Wiley. ISBN 978-047-0972-441. [citováno 2024-02-14].

APAJALAHTI, J.; KETTUNEN, A. a GRAHAM, H., 2004. *Characteristics of the gastrointestinal microbial communities, with special reference to the chicken*. online. World's Poultry Science Journal. roč. 60, č. 2, s. 223-232. ISSN 00439339. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/WPS200415>. [citováno 2024-02-06].

ARENDRUP, M.C.; FRIBERG, N.; MARES, M.; KAHLMETER, G.; MELETIADIS, J. et al., 2020. *How to interpret MICs of antifungal compounds according to the revised clinical breakpoints v. 10.0 European committee on antimicrobial susceptibility testing (EUCAST)*. online. Clinical Microbiology and Infection. roč. 26, č. 11, s. 1464-1472. ISSN 1198743X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.06.007>. [citováno 2024-02-29].

- BARKER, Keith F., 1999. *Antibiotic resistance: a current perspective*. online. British Journal of Clinical Pharmacology. roč. 48, č. 2, s. 109-124. ISSN 0306-5251. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2125.1999.00997.x>. [citováno 2024-02-29].
- BARLOW, Miriam, 2009. *What Antimicrobial Resistance Has Taught Us About Horizontal Gene Transfer*. online. Horizontal Gene Transfer. Methods in Molecular Biology. s. 397-411. ISBN 978-1-60327-852-2. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9\\_23](https://doi.org/10.1007/978-1-60327-853-9_23). [citováno 2024-04-03].
- BENEŠ, Jiří, 2018. *Antibiotika: systematika, vlastnosti, použití*. 1. Praha: Grada Publishing. ISBN 978-80-271-0636-3. [citováno 2024-01-03].
- BERG, Gabriele; EBERL, Leo a HARTMANN, Anton, 2005. *The rhizosphere as a reservoir for opportunistic human pathogenic bacteria*. online. Environmental Microbiology. roč. 7, č. 11, s. 1673-1685. ISSN 1462-2912. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2005.00891.x>. [citováno 2024-04-08].
- BIOMERIEUX, 2023. *ETEST® Telavancin*. online. In: Biomerieux. Dostupné z: <https://www.biomerieux-usa.com/clinical/etest-tla>. [citováno 2024-03-03].
- BJERRUM, L.; ENGBERG, R.M.; LESER, T.D.; JENSEN, B.B.; FINSTER, K. et al., 2006. *Microbial community composition of the ileum and cecum of broiler chickens as revealed by molecular and culture-based techniques*. online. Poultry Science. roč. 85, č. 7, s. 1151-1164. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ps/85.7.1151>. [citováno 2024-03-24].
- BLANC, Vanessa; MESA, Raul; SACO, Montserrat; LAVILLA, Susana; PRATS, Guillem et al., 2006. *ESBL – and plasmidic class C  $\beta$ -lactamase-producing E. coli strains isolated from poultry, pig and rabbit farms*. online. Veterinary Microbiology. roč. 118, č. 3-4, s. 299-304. ISSN 03781135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2006.08.002>. [citováno 2024-01-23].
- BLOKESCH, Melanie, 2016. *Natural competence for transformation*. online. Current Biology. roč. 26, č. 23, s. 1126–1130. ISSN 09609822. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.023>. [citováno 2024-03-03].
- BROUČEK, Jan; BENKOVÁ, Jana a ŠOCH, Miloslav, 2011. *Technologie a technika chovu drůbeže při splnění podmínek welfare: certifikovaná metodika*. online. V Českých Budějovicích: Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta. ISBN 978-80-7394-337-0. Dostupné z: [http://www.cvzv.sk/pdf/broucek/technologie\\_hydina.pdf](http://www.cvzv.sk/pdf/broucek/technologie_hydina.pdf). [citováno 2024-04-08].
- BROWN, Derek F. J. a BROWN, Lynda, 1991. *Evaluation of the E test, a novel method of quantifying antimicrobial activity*. Online. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Roč. 27, č. 2, s. 185-190. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/27.2.185>. [citováno 2024-04-12].

- BUENO, I.; WILLIAMS-NGUYEN, J.; HWANG, H.; SARGEANT, J. M.; NAULT, A. J. et al., 2018. *Systematic Review: Impact of point sources on antibiotic-resistant bacteria in the natural environment*. online. *Zoonoses and Public Health*. roč. 65, č. 1. ISSN 1863-1959. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/zph.12426>. [citováno 2024-04-02].
- BUSTIN, Stephen A; BENES, Vladimir; GARSON, Jeremy A; HELLEMANS, Jan; HUGGETT, Jim et al., 2009. *The MIQE Guidelines: Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments*. online. *Clinical Chemistry*. roč. 55, č. 4, s. 611-622. ISSN 0009-9147. Dostupné z: <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>. [citováno 2024-02-29].
- CANTÓN, Rafael; GONZÁLEZ-ALBA, José María a GALÁN, Juan Carlos, 2012. *CTX-M Enzymes: Origin and Diffusion*. online. *Frontiers in Microbiology*. roč. 3. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00110>. [citováno 2024-01-21].
- CASTANON, J.I.R., 2007. *History of the Use of Antibiotic as Growth Promoters in European Poultry Feeds*. online. *Poultry Science*. roč. 86, č. 11, s. 2466-2471. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.3382/ps.2007-00249>. [citováno 2024-03-02].
- CLARK, A J a ADELBERG, E A, 1962. *Bacterial Conjugation*. online. *Annual Review of Microbiology*. roč. 16, č. 1, s. 289-319. ISSN 0066-4227. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.16.100162.001445>. [citováno 2024-03-03].
- CRESPO-PIAZUELO, Daniel; ESTELLÉ, Jordi; REVILLA, Manuel; CRIADO-MESAS, Lourdes; RAMAYO-CALDAS, Yulixaxis et al., 2018. *Characterization of bacterial microbiota compositions along the intestinal tract in pigs and their interactions and functions*. online. *Scientific Reports*. roč. 8, č. 1. ISSN 2045-2322. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-30932-6>. [citováno 2024-01-31].
- CRHANOVA, Magdalena; HRADECKA, Helena; FALDYNOVA, Marcela; MATULOVA, Marta; HAVLICKOVA, Hana et al., 2011. *Immune Response of Chicken Gut to Natural Colonization by Gut Microflora and to Salmonella enterica Serovar Enteritidis Infection*. online. *Infection and Immunity*. roč. 79, č. 7, s. 2755-2763. ISSN 0019-9567. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/IAI.01375-10>. [citováno 2024-03-02].
- CULLY, Megan, 2014. *Public health: The politics of antibiotics*. online. *Nature*. roč. 509, č. 7498, s. 16-17. ISSN 0028-0836. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/509S16a>. [citováno 2024-02-19].
- DEC, Marta; URBAN-CHMIEL, Renata; STĘPIEŃ-PYŚNIAK, Dagmara a WERNICKI, Andrzej, 2017. *Assessment of antibiotic susceptibility in Lactobacillus isolates from chickens*. online. *Gut Pathogens*. roč. 9, č. 1, s. 1-16. ISSN 1757-4749. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13099-017-0203-z>. [citováno 2024-04-09].
- DELCOUR, Anne H., 2009. *Outer membrane permeability and antibiotic resistance*. online. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*. roč. 1794, č. 5, s. 808-816. ISSN 15709639. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.11.005>. [citováno 2024-03-04].

- DIBNER, J.J. a RICHARDS, J.D., 2005. *Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action*. online. Poultry Science. roč. 84, č. 4, s. 634-643. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ps/84.4.634>. [citováno 2024-02-19].
- DOĞAN, Ahmet, 2022. *The Problem of Resistance in Antibiotics and New Treatments*. online. In: Health and Science 2022. EFE Academy Publishing, s. 47-56. [citováno 2024-03-30].
- DUMAS, Jean-Luc; DELDEN, Christian; PERRON, Karl a KÖHLER, Thilo, 2006. *Analysis of antibiotic resistance gene expression in Pseudomonas aeruginosa by quantitative real-time-PCR*. online. FEMS Microbiology Letters. roč. 254, č. 2, s. 217-225. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2005.00008.x>. [citováno 2024-03-02].
- DURAND, Guillaume; RAOULT, Didier a DUBOURG, Grégory, 2019. *Antibiotic discovery: history, methods and perspectives*. online. International Journal of Antimicrobial Agents. roč. 53, č. 4, s. 371-382. ISSN 09248579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.11.010>. [citováno 2024-01-22].
- ECDC, 2024. online. Dostupné z: <https://www.ecdc.europa.eu/en>. [citováno 2024-01-24].
- EMA, 2024. online. Dostupné z: <https://www.ema.europa.eu/en/homepage>. [citováno 2024-01-24].
- EMMERICH, Rudolf a LÖW, Oscar, 1901. *Die künstliche Darstellung der immunisierenden Substanzen (Nucleasen-Immunitätsproteine) und ihre Verwendung zur Therapie der Infektionskrankheiten und zur Schutzimpfung an Stelle des Heilserums*. online. Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten. roč. 36, č. 1, s. 9-28. Dostupné z: [https://ia800708.us.archive.org/view\\_archive.php?archive=/22/items/crossref-pre-1909-scholarly-works/10.1007%252Fbf02140313.zip&file=10.1007%252Fbf02141216.pdf](https://ia800708.us.archive.org/view_archive.php?archive=/22/items/crossref-pre-1909-scholarly-works/10.1007%252Fbf02140313.zip&file=10.1007%252Fbf02141216.pdf). [citováno 2024-03-30].
- EUCAST, 2021a. *Disc Diffusion Methodology*. online. In: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Dostupné z: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/disk\\_diffusion\\_methodology/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/disk_diffusion_methodology/). [citováno 2024-03-03].
- EUCAST, 2021b. *MIC determination of nonfastidious and fastidious organisms*. online. In: European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Dostupné z: [https://www.eucast.org/ast\\_of\\_bacteria/mic\\_determination/](https://www.eucast.org/ast_of_bacteria/mic_determination/). [citováno 2024-03-03].
- EUROPEAN COMMISSION, 2020. *From farm to fork – Our food, our health, our planet, our future – The European Green Deal*. online. Publications Office of the European Union. Dostupné z: <https://doi.org/10.2875/653604>. [citováno 2024-01-16].
- EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2019. *Categorisation of antibiotics in the European Union*. online. Dostupné z: <https://bit.ly/30ZeuRi>. [citováno 2024-01-16].

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2022. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2021*. online. Publications Office of the European Union. ISBN 978-92-9155-069-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.2809/39517>. [citováno 2024-01-16].

EUROPEAN MEDICINES AGENCY, 2023. *Sales of veterinary antimicrobial agents in 31 European countries in 2022*. online. ISBN 978-92-9155-072-2. Dostupné z: <https://doi.org/10.2809/895656>. [citováno 2024-01-16].

FALDYNOVA, M; VIDENSKA, P; HAVLICKOVA, H; SISAK, F; JURICOVA, H et al., 2013. *Prevalence of antibiotic resistance genes in faecal samples from cattle, pigs and poultry*. online. Veterinární medicína. roč. 58, č. 6. Dostupné z: [vetmed.agriculturejournals.cz](http://vetmed.agriculturejournals.cz). [citováno 2023-12-20].

FERKET, P. R.; PARKS, C. W. a GRIMES, J. L., 2002. *Benefits of dietary antibiotic and mannanoligosaccharide supplementation for poultry*. online. Multi-State Poultry Meeting. roč. 14, s. 1-22. Dostupné z: <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=a5338630ecd3236868c198dfcfc042e40862e5b4>. [citováno 2024-03-02].

FLEMING, Alexander, 1929. *On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with special reference to their use in the isolation of B. influenzae*. online. British journal of experimental pathology. roč. 10, č. 3, s. 226. Dostupné z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2048009/>. [citováno 2024-03-30].

FLEMING, Alexander, 1945. *Penicillin*. online. Dostupné z: <https://www.nobelprize.org/uploads/2018/06/fleming-lecture.pdf>. [citováno 2024-01-20].

FLOREZ-CUADRADO, Diego; MORENO, Miguel A.; UGARTE-RUIZ, María a DOMÍNGUEZ, Lucas, 2018. *Antimicrobial Resistance in the Food Chain in the European Union*. online. Biological Emerging Risks in Foods. Advances in Food and Nutrition Research. roč. 86, s. 115-136. ISBN 9780128139776. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/bs.afnr.2018.04.004>. [citováno 2024-04-03].

FRAGA, Dean; MEULIA, Tea a FENSTER, Steven, 2014. Real-Time PCR. online. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*. roč. 8, č. 1. ISSN 1948-3430. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/9780470089941.et1003s08>. [citováno 2024-03-02].

FUNKE, Guido; MONNET, Dominique; DEBERNARDIS, Chiara; VON GRAEVENITZ, Alexander a FRENEY, Jean, 1998. *Evaluation of the VITEK 2 System for Rapid Identification of Medically Relevant Gram-Negative Rods*. online. Journal of Clinical Microbiology. roč. 36, č. 7, s. 1948-1952. ISSN 0095-1137. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/JCM.36.7.1948-1952.1998>. [citováno 2024-03-03].

GHANBARI, Mahdi; KNEIFEL, Wolfgang a DOMIG, Konrad J., 2015. *A new view of the fish gut microbiome: Advances from next-generation sequencing*. online. Aquaculture. roč. 448, s. 464-475. ISSN 00448486. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2015.06.033>. [citováno 2024-03-29].

GIL DE LOS SANTOS, J.R.; STORCH, O.B. a GIL-TURNES, C., 2010. *Bacillus cereus* var. *toyoi* and *Saccharomyces boulardii* increased feed efficiency in broilers infected with *Salmonella enteritidis*. online. British Poultry Science. roč. 46, č. 4, s. 494-497. ISSN 0007-1668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/00071660500181461>. [citováno 2024-02-10].

GLENDINNING, Laura; WATSON, Kellie A. a WATSON, Mick, 2019. *Development of the duodenal, ileal, jejunal and caecal microbiota in chickens*. online. Animal Microbiome. roč. 1, č. 1. ISSN 2524-4671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s42523-019-0017-z>. [citováno 2024-02-07].

GONÇALVES, Thiago a VASCONCELOS, Ulrich, 2021. *Colour Me Blue: The History and the Biotechnological Potential of Pyocyanin*. online. Molecules. roč. 26, č. 4. ISSN 1420-3049. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/molecules26040927>. [citováno 2024-01-22].

GONG, Jianhua; FORSTER, Robert J; YU, Hai; CHAMBERS, James R; SABOUR, Parviz M et al., 2002a. *Diversity and phylogenetic analysis of bacteria in the mucosa of chicken ceca and comparison with bacteria in the cecal lumen*. online. FEMS Microbiology Letters. roč. 208, č. 1, s. 1-7. ISSN 03781097. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11051.x>. [citováno 2024-02-06].

GONG, Jianhua; FORSTER, Robert J.; YU, Hai; CHAMBERS, James R.; WHEATCROFT, Roger et al., 2002b. *Molecular analysis of bacterial populations in the ileum of broiler chickens and comparison with bacteria in the cecum*. online. FEMS Microbiology Ecology. roč. 41, č. 3, s. 171-179. ISSN 01686496. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00978.x>. [citováno 2024-02-06].

GUO, Na; WU, Qunfu; SHI, Fuyu; NIU, Jiahuan; ZHANG, Tao et al., 2021. *Seasonal dynamics of diet–gut microbiota interaction in adaptation of yaks to life at high altitude*. online. Npj Biofilms and Microbiomes. roč. 7, č. 1, s. 38. ISSN 2055-5008. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41522-021-00207-6>. [citováno 2024-03-26].

HARRINGTON, Christina A; ROSENOW, Carsten a RETIEF, Jacques, 2000. *Monitoring gene expression using DNA microarrays*. online. Current Opinion in Microbiology. roč. 3, č. 3, s. 285-291. ISSN 13695274. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00091-6](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00091-6). [citováno 2024-03-31].

HARRISON, Freya; ROBERTS, Aled E. L.; GABRILSKA, Rebecca; RUMBAUGH, Kendra P.; LEE, Christina et al., 2015. *A 1,000-Year-Old Antimicrobial Remedy with Antistaphylococcal Activity*. online. MBio. roč. 6, č. 4, s. 01129-15. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/mbio.01129-15>. [citováno 2023-09-11].

HERA, Alfred; KOUTECKÁ, Lenka; DORN, Dalibor a POKLUDOVÁ, Lucie, 2010. *Spotřeba antibiotik a antiparazitik ve veterinární medicíně v ČR v letech 2003 – 2010*. online. Ústav pro státní kontrolu veterinárních biopreparátů a léčí. Dostupné z: <https://www.uskvbl.cz/cs/informace/tiskove-centrum/tiskprohl>. [citováno 2024-01-22].



HERNANDO-AMADO, Sara; COQUE, Teresa M.; BAQUERO, Fernando a MARTÍNEZ, José L., 2019. *Defining and combating antibiotic resistance from One Health and Global Health perspectives*. online. *Nature Microbiology*. roč. 4, č. 9, s. 1432-1442. ISSN 2058-5276. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0503-9>. [citováno 2024-04-08].

HOLLINGSHEAD, Susan a VAPNEK, Daniel, 1985. *Nucleotide sequence analysis of a gene encoding a streptomycin/spectinomycin adenyltransferase*. online. *Plasmid*. roč. 13, č. 1, s. 17-30. ISSN 0147619X. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0147-619X\(85\)90052-6](https://doi.org/10.1016/0147-619X(85)90052-6). [citováno 2024-01-23].

HONORÉ, N a COLE, S T, 1994. *Streptomycin resistance in mycobacteria*. online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. roč. 38, č. 2, s. 238-242. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.2.238>. [citováno 2024-01-23].

HUTCHINGS, I. Matthew; TRUMAN, W. Andrew a WILKINSON, Barrie, 2019. *Antibiotics: Past, present and future*. online. *Current Opinion in Microbiology*. roč. 51, s. 72–80. Dostupné z: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1369527419300190> [citováno 2023-08-28].

CHAIN, E a FLOREY, H.W., 2005. *THE CLASSIC: Penicillin as a Chemotherapeutic Agent*. online. *Clinical Orthopaedics and Related Research*. č. 439, s. 23-26. Dostupné z: <https://doi.org/10.1097/01.blo.0000183429.83168.07>. [citováno 2024-01-22].

CHARRETIER, Yannick a SCHRENZEL, Jacques, 2016. *Mass spectrometry methods for predicting antibiotic resistance*. online. *PROTEOMICS – Clinical Applications*. roč. 10, č. 9-10, s. 964-981. ISSN 1862-8346. Dostupné z: <https://doi.org/10.1002/prca.201600041>. [citováno 2024-03-02].

CHICA CARDENAS, Luis Alberto; CLAVIJO, Viviana; VIVES, Martha a REYES, Alejandro, 2021. *Bacterial meta-analysis of chicken cecal microbiota*. online. *PeerJ*. roč. 9. ISSN 2167-8359. Dostupné z: <https://doi.org/10.7717/peerj.10571>. [citováno 2024-02-10].

JAFFE, A; CHABBERT, Y A a SEMONIN, O, 1982. *Role of porin proteins OmpF and OmpC in the permeation of beta-lactams*. online. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. roč. 22, č. 6, s. 942-948. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.22.6.942>. [citováno 2024-03-04].

JANDHYALA, Sai Manasa, 2015. *Role of the normal gut microbiota*. online. *World Journal of Gastroenterology*. roč. 21, č. 29. ISSN 1007-9327. Dostupné z: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i29.8787>. [citováno 2024-02-07].

JOHANSSON, Åsa; NAGY, Elisabeth a SÓKI, József, 2014. *Detection of carbapenemase activities of Bacteroides fragilis strains with matrix-assisted laser desorption ionization – Time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS)*. online. *Anaerobe*. roč. 26, s. 49-52.

ISSN 10759964. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2014.01.006>. [citováno 2024-03-02].

JOHNSTON, Calum; MARTIN, Bernard; FICHANT, Gwennaele; POLARD, Patrice a CLAVERYS, Jean-Pierre, 2014. *Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control*. online. Nature Reviews Microbiology. roč. 12, č. 3, s. 181-196. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro3199>. [citováno 2024-03-03].

JURICOVA, H; MATIASOVICOVA, J; KUBASOVA, T; CEJKOVA, D a RYCHLIK, I, 2021. *The distribution of antibiotic resistance genes in chicken gut microbiota commensals*. online. Scientific reports. roč. 11, č. 1, s. 3290. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82640-3>. [citováno 2023-12-20].

KABIR, S. M. Lutful, 2009. *The Role of Probiotics in the Poultry Industry*. online. International Journal of Molecular Sciences. roč. 10, č. 8, s. 3531-3546. ISSN 1422-0067. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ijms10083531>. [citováno 2024-02-10].

KALAVATHY, R.; ABDULLAH, N.; JALALUDIN, S. a HO, Y.W., 2003. *Effects of Lactobacillus cultures on growth performance, abdominal fat deposition, serum lipids and weight of organs of broiler chickens*. online. British Poultry Science. roč. 44, č. 1, s. 139-144. ISSN 0007-1668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/0007166031000085445>. [citováno 2024-02-10].

KAPOOR, Garima; SAIGAL, Saurabh a ELONGAVAN, Ashok, 2017. *Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians*. online. Journal of Anaesthesiology Clinical Pharmacology. roč. 33, č. 3, s. 300-305. ISSN 0970-9185. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP\\_349\\_15](https://doi.org/10.4103/joacp.JOACP_349_15). [citováno 2024-01-24].

KAWAMURA, Ichiro, 2023. *Sahachiro Hata (1873-1938) and his contributions to the birth of antimicrobial chemotherapy*. online. Journal of Infection and Chemotherapy. roč. 29, č. 5, s. 546-548. ISSN 1341321X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2023.02.010>. [citováno 2024-01-22].

KEMPF, Marie; BAKOUR, Sofiane; FLAUDROPS, Christophe; BERRAZEG, Meryem; BRUNEL, Jean-Michel et al., 2012. *Rapid Detection of Carbapenem Resistance in Acinetobacter baumannii Using Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry*. online. PLoS ONE. roč. 7, č. 2. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031676>. [citováno 2024-03-02].

KHODURSKY, Arkady B. a COZZARELLI, Nicholas R., 1998. *The Mechanism of Inhibition of Topoisomerase IV by Quinolone Antibacterials*. online. Journal of Biological Chemistry. roč. 273, č. 42, s. 27668-27677. ISSN 00219258. Dostupné z: <https://doi.org/10.1074/jbc.273.42.27668>. [citováno 2024-03-02].

KIMELBERG, Harold K., 1976. *Protein-liposome interactions and their relevance to the structure and function of cell membranes*. online. Molecular and Cellular Biochemistry.

roč. 10, č. 3, s. 171-190. ISSN 0300-8177. Dostupné z:  
<https://doi.org/10.1007/BF01731688>. [citováno 2024-02-19].

KOLÁŘ, Milan, 2019. *Nebezpečné multirezistentní bakterie „superbugs“ v současné medicíně*. online. Interní medicína pro praxi. roč. 21, č. 3, s. 142-148. Dostupné z:  
<https://www.solen.cz/pdfs/int/2019/03/02.pdf>. [citováno 2024-03-03].

KOLÁŘ, Milan; REJMAN, Dominik a BARDONĚ, Jan, 2020. *Zásady antibiotické léčby*. V Olomouci: Univerzita Palackého. ISBN 978-80-244-5740-6. [citováno 2024-02-03].

KOLÁŘOVÁ, Libuše, 2020. *Obecná a klinická mikrobiologie*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7492-477-4. [citováno 2024-02-03].

KOLLARCIKOVA, Miloslava; KUBASOVA, Tereza; KARASOVA, Daniela; CRHANOVA, Magdalena; CEJKOVA, Darina et al., 2019. *Use of 16S rRNA gene sequencing for prediction of new opportunistic pathogens in chicken ileal and cecal microbiota*. online. Poultry Science. roč. 98, č. 6, s. 2347-2353. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.3382/ps/pey594>. [citováno 2024-03-23].

KOURKOUTA, Lambrini; TSALOGLIDOU, A; KOUKOURIKOS, K; ILIADIS, C; PLATI, P et al., 2018. *History of Antibiotics*. online. Sumerianz Journal of Medical and Healthcare. roč. 1, č. 2, s. 51-54. Dostupné z: <https://www.sumerianz.com>. [citováno 2023-09-10].

KUBASOVA, Tereza; KOLLARCIKOVA, Miloslava; CRHANOVA, Magdalena; KARASOVA, Daniela; CEJKOVA, Darina et al., 2019. *Contact with adult hen affects development of caecal microbiota in newly hatched chicks*. online. PLOS ONE. roč. 14, č. 3. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0212446>. [citováno 2024-01-31].

LARSSON, D. G. Joakim a FLACH, Carl-Fredrik, 2022. *Antibiotic resistance in the environment*. online. Nature Reviews Microbiology. roč. 20, č. 5, s. 257-269. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00649-x>. [citováno 2024-04-08].

LIMA, Lidia; SILVA, Bianca; BARBOSA, Gisele a BARREIRO, Eliezer, 2020.  *$\beta$ -lactam antibiotics: An overview from a medicinal chemistry perspective*. online. European Journal of Medicinal Chemistry. roč. 208. ISSN 02235234. Dostupné z:  
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2020.112829>. [citováno 2024-01-22].

LIN, Hui; SUN, Wanchun; JIN, Danfeng; YU, Qiaogang; YANG, Yuyi et al., 2021. *Effect of composting on the conjugative transmission of sulfonamide resistance and sulfonamide-resistant bacterial population*. online. Journal of Cleaner Production. roč. 285. ISSN 09596526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.125483>. [citováno 2024-01-24].

LIVERMORE, David M., 2007. *Introduction: the challenge of multiresistance*. online. International Journal of Antimicrobial Agents. roč. 29, s. 1-7. ISSN 09248579. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0924-8579\(07\)00158-6](https://doi.org/10.1016/S0924-8579(07)00158-6). [citováno 2024-03-03].

LI, X Z; LIVERMORE, D M a NIKAIDO, H, 1994. *Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of Pseudomonas aeruginosa: resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin.* online. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. roč. 38, č. 8, s. 1732-1741. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.38.8.1732>. [citováno 2024-01-23].

LI, Yang; GUO, Baozhu; WU, Zhengke; WANG, Weiwei; LI, Chong et al., 2020. *Effects of Fermented Soybean Meal Supplementation on the Growth Performance and Cecal Microbiota Community of Broiler Chickens.* online. Animals. roč. 10, č. 6. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani10061098>. [citováno 2024-02-10].

LUBY, Elizabeth; IBEKWE, A. Mark; ZILLES, Julie a PRUDEN, Amy, 2016. *Molecular Methods for Assessment of Antibiotic Resistance in Agricultural Ecosystems: Prospects and Challenges.* online. Journal of Environmental Quality. roč. 45, č. 2, s. 441-453. ISSN 00472425. Dostupné z: <https://doi.org/10.2134/jeq2015.07.0367>. [citováno 2024-02-29].

LUNDBERG, Randi; SCHARCH, Christian a SANDVANG, Dorthe, 2021. *The link between broiler flock heterogeneity and cecal microbiome composition.* online. Animal Microbiome. roč. 3, č. 1, s. 1-14. ISSN 2524-4671. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s42523-021-00110-7>. [citováno 2024-03-24].

MACGOWAN, Alasdair a MACNAUGHTON, Emily, 2017. *Antibiotic resistance.* online. Medicine. roč. 45, č. 10, s. 622-628. ISSN 13573039. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mpmed.2017.07.006>. [citováno 2024-03-31].

MANCUSO, Giuseppe; MIDIRI, Angelina; GERACE, Elisabetta a BIONDO, Carmelo, 2021. *Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens.* online. Pathogens. roč. 10, č. 10. ISSN 2076-0817. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>. [citováno 2024-01-22].

MARSHALL, Bonnie M.; OCHIENG, Dorothy J. a LEVY, Stuart B., 2009. *Commensals: Underappreciated Reservoir of Antibiotic Resistance.* online. Microbe. roč. 4, č. 5, s. 231-238. Dostupné z: [http://josedondarza.com/Bio406/pdf/Microbe%204\(5\)2009.pdf](http://josedondarza.com/Bio406/pdf/Microbe%204(5)2009.pdf). [citováno 2024-04-03].

MATTNER, Frauke; BANGE, Franz-C.; MEYER, Elisabeth; SEIFERT, Harald; WICHELHAUS, Thomas A. et al., 2012. *Preventing the Spread of Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens.* online. Deutsches Ärzteblatt international. roč. 109, č. 3, s. 39-45. Dostupné z: <https://doi.org/10.3238/arztebl.2012.0039>. [citováno 2024-04-08].

MCOSKER, C. a FITZPATRICK, P., 1994. *Nitrofurantoin: Mechanism of action and implications for resistance development in common uropathogens.* online. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. roč. 33, č. , s. 23-30. ISSN 0305-7453. Dostupné z: [https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl\\_A.23](https://doi.org/10.1093/jac/33.suppl_A.23). [citováno 2024-01-20].

MONTERO, Clemente; MATEU, Guaniri; RODRIGUEZ, Rosalva a TAKIFF, Howard, 2001. *Intrinsic Resistance of Mycobacterium smegmatis to Fluoroquinolones May Be Influenced by New Pentapeptide Protein MfpA.* online. Antimicrobial Agents and

Chemotherapy. roč. 45, č. 12, s. 3387-3392. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.45.12.3387-3392.2001>. [citováno 2024-03-03].

MOORE, P.R.; EVENSON, A.; LUCKEY, T.D.; MCCOY, E.; ELVEHJEM, C.A. et al., 1946. *Use of sulfasuxidine, streptothricin, and streptomycin in nutritional studies with the chick*. online. Journal of Biological Chemistry. č. 165, s. 437-441. ISSN 0021-9258. [citováno 2024-01-20].

MOTER, Annette a GÖBEL, Ulf B, 2000. *Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms*. online. Journal of Microbiological Methods. roč. 41, č. 2, s. 85-112. ISSN 01677012. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0167-7012\(00\)00152-4](https://doi.org/10.1016/S0167-7012(00)00152-4). [citováno 2024-03-31].

MOUNTZOURIS, K.C.; TSIRTSIKOS, P.; KALAMARA, E.; NITSCH, S.; SCHATZMAYR, G. et al., 2007. *Evaluation of the Efficacy of a Probiotic Containing Lactobacillus, Bifidobacterium, Enterococcus, and Pediococcus Strains in Promoting Broiler Performance and Modulating Cecal Microflora Composition and Metabolic Activities*. online. Poultry Science. roč. 86, č. 2, s. 309-317. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/ps/86.2.309>. [citováno 2024-02-10].

NAGY, Elisabeth; BECKER, Simone; SÓKI, József; URBÁN, Edit a KOSTRZEWA, Markus, 2011. *Differentiation of division I (cflA-negative) and division II (cflA-positive) Bacteroides fragilis strains by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. online. Journal of Medical Microbiology. roč. 60, č. 11, s. 1584-1590. ISSN 0022-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.1099/jmm.0.031336-0>. [citováno 2024-03-02].

NICOLAOU, Kyriacos a RIGOL, Stephan, 2018. *A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis*. online. The Journal of Antibiotics volume. roč. 71, č. 2, s. 153–184. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/ja.2017.62>. [citováno 2023-11-26].

NURMI, E.; NUOTIO, L. a SCHNEITZ, C., 1992. *The competitive exclusion concept: development and future*. online. International Journal of Food Microbiology. roč. 15, č. 3-4, s. 237-240. ISSN 01681605. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(92\)90054-7](https://doi.org/10.1016/0168-1605(92)90054-7). [citováno 2024-02-07].

OECD, 2022. *Antimicrobial Resistance in the EU/EEA A One Health Response*. online. Dostupné z: <https://www.oecd.org/health/Antimicrobial-Resistance-in-the-EU-EEA-A-One-Health-Response-March-2022.pdf>. [citováno 2024-01-19].

OLESEN, Inger; HASMAN, Henrik a MØLLER AARESTRUP, Frank, 2004. *Prevalence of  $\beta$ -Lactamases among Ampicillin-Resistant Escherichia coli and Salmonella Isolated from Food Animals in Denmark*. online. Microbial Drug Resistance. roč. 10, č. 4, s. 334-340. ISSN 1076-6294. Dostupné z: <https://doi.org/10.1089/mdr.2004.10.334>. [citováno 2024-01-21].

- OZEKI, Haruo a IKEDA, Hideo, 1968. *Transduction Mechanisms*. online. Annual Review of Genetics. roč. 2, č. 1, s. 245-278. ISSN 0066-4197. Dostupné z: <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.02.120168.001333>. [citováno 2024-03-03].
- PARKINS, Michael D., 2001. *Pharmacological practices of ancient Egypt*. online. History of Medicine Days. č. 5, s. 5-11. Dostupné z: [www.magicgatebg.com](http://www.magicgatebg.com). [citováno 2023-09-06].
- PARTRIDGE, Sally R.; KWONG, Stephen M.; FIRTH, Neville a JENSEN, Slade O., 2018. *Mobile Genetic Elements Associated with Antimicrobial Resistance*. online. Clinical Microbiology Reviews. roč. 31, č. 4, s. 00088-17. ISSN 0893-8512. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/CMR.00088-17>. [citováno 2024-03-03].
- PATUZZI, Ilaria; ORSINI, Massimiliano; CIBIN, Veronica; PETRIN, Sara; MASTRORILLI, Eleonora et al., 2021. *The Interplay between Campylobacter and the Caecal Microbial Community of Commercial Broiler Chickens over Time*. online. Microorganisms. roč. 9, č. 2. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020221>. [citováno 2024-03-02].
- PAUL, Shyam Sundar; RAMA RAO, Savaram Venkata; HEGDE, Nagendra; WILLIAMS, Nicola J.; CHATTERJEE, Rudra Nath et al., 2022. *Effects of Dietary Antimicrobial Growth Promoters on Performance Parameters and Abundance and Diversity of Broiler Chicken Gut Microbiome and Selection of Antibiotic Resistance Genes*. online. Frontiers in Microbiology. roč. 13. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.905050>. [citováno 2024-03-27].
- PERRETEN, Vincent a BOERLIN, Patrick, 2003. *A New Sulfonamide Resistance Gene ( sul3 ) in Escherichia coli Is Widespread in the Pig Population of Switzerland*. online. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. roč. 47, č. 3, s. 1169-1172. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.47.3.1169-1172.2003>. [citováno 2024-01-24].
- PITOUT, Johann D.D.; SANDERS, Christine C. a SANDERS, W.Eugene, 1997. *Antimicrobial Resistance with Focus on  $\beta$ -Lactam Resistance in Gram-Negative Bacilli*. online. The American Journal of Medicine. roč. 103, č. 1, s. 51-59. ISSN 00029343. Dostupné z: [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(97\)00044-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(97)00044-2). [citováno 2024-01-21].
- POIREL, Laurent; MADEC, Jean-Yves; LUPO, Agnese; SCHINK, Anne-Kathrin; KIEFFER, Nicolas et al., 2018. *Antimicrobial Resistance in Escherichia coli*. online. Microbiology Spectrum. roč. 6, č. 4. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.ARBA-0026-2017>. [citováno 2024-03-27].
- POOLE, K., 2004. *Resistance to beta-lactam antibiotics*. online. Cellular and Molecular Life Sciences. roč. 61, č. 17, s. 2200–2223. ISSN 1420-682X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s00018-004-4060-9>. [citováno 2024-01-22].
- POOLE, Keith, 2009. *Efflux pumps as antimicrobial resistance mechanisms*. online. Annals of Medicine. roč. 39, č. 3, s. 162-176. ISSN 0785-3890. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/07853890701195262>. [citováno 2024-03-03].

- PRESTINACI, Francesca; PEZZOTTI, Patrizio a PANTOSTI, Annalisa, 2015. *Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon*. online. Pathogens and Global Health. roč. 109, č. 7, s. 309-318. ISSN 2047-7724. Dostupné z: <https://doi.org/10.1179/2047773215Y.0000000030>. [citováno 2024-04-08].
- PUSHPANATHAN, Premalatha; MATHEW, Gifty Sara; SELVARAJAN, Sribal; SESHADRI, Krishna G. a SRIKANTH, Padma, 2019. *Gut Microbiota and Its Mysteries*. online. Indian Journal of Medical Microbiology. roč. 37, č. 2, s. 268-277. ISSN 02550857. Dostupné z: [https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM\\_19\\_373](https://doi.org/10.4103/ijmm.IJMM_19_373). [citováno 2024-01-31].
- QU, Ani; BRULC, Jennifer M.; WILSON, Melissa K.; LAW, Bibiana F.; THEORET, James R. et al., 2008. *Comparative Metagenomics Reveals Host Specific Metavirulomes and Horizontal Gene Transfer Elements in the Chicken Cecum Microbiome*. online. PLoS ONE. roč. 3, č. 8, s. 2945. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002945>. [citováno 2024-04-09].
- RAMIREZ, Maria S. a TOLMASKY, Marcelo E., 2010. *Aminoglycoside modifying enzymes*. online. Drug Resistance Updates. roč. 13, č. 6, s. 151-171. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.drup.2010.08.003>. [citováno 2024-01-23].
- RANA, Chanchal; RAJPUT, Shiveeli; BEHERA, Manisha; GAUTAM, Devika; VIKAS, Vaibhav et al., 2022. *Global epidemiology of CTX-M-type  $\beta$ -lactam resistance in human and animal*. online. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. roč. 86. ISSN 01479571. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2022.101815>. [citováno 2024-01-21].
- ROBERTS, Marilyn C., 2003. *Tetracycline Therapy: Update*. online. Clinical Infectious Diseases. roč. 36, č. 4, s. 462-467. ISSN 1058-4838. Dostupné z: <https://doi.org/10.1086/367622>. [citováno 2024-02-19].
- ROBIN, Frédéric; DELMAS, Julien; SCHWEITZER, Cédric; TOURNILHAC, Olivier; LESENS, Olivier et al., 2007. *Evolution of TEM-Type Enzymes: Biochemical and Genetic Characterization of Two New Complex Mutant TEM Enzymes, TEM-151 and TEM-152, from a Single Patient*. online. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. roč. 51, č. 4, s. 1304-1309. ISSN 0066-4804. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/AAC.01058-06>. [citováno 2024-01-23].
- ROCHA, Deisy M. G. C.; MAGALHÃES, Carlos; CÁ, Baltazar; RAMOS, Angelica; CARVALHO, Teresa et al., 2021. *Heterogeneous Streptomycin Resistance Level Among Mycobacterium tuberculosis Strains From the Same Transmission Cluster*. online. Frontiers in Microbiology. roč. 12. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.659545>. [citováno 2024-03-03].
- RONQUILLO, Manuel a HERNANDEZ, Juan Carlos, 2017. *Antibiotic and synthetic growth promoters in animal diets: Review of impact and analytical methods*. online. Food Control. roč. 72, s. 255-267. ISSN 09567135. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.03.001>. [citováno 2024-01-22].

- RYCHLIK, Ivan, 2020. *Composition and Function of Chicken Gut Microbiota*. online. *Animals*. roč. 10, č. 1. ISSN 2076-2615. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/ani10010103>. [citováno 2024-03-02].
- SALERNO, Barbara; FURLAN, Maddalena; SABATINO, Raffaella; DI CESARE, Andrea; LEATI, Marta et al., 2022. *Antibiotic resistance genes load in an antibiotic free organic broiler farm*. online. *Poultry Science*. roč. 101, č. 3. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101675>. [citováno 2024-03-02].
- SEIDLEROVA, Zuzana; KUBASOVA, Tereza; FALDYNOVA, Marcela; CRHANOVA, Magdalena; KARASOVA, Daniela et al., 2020. *Environmental Impact on Differential Composition of Gut Microbiota in Indoor Chickens in Commercial Production and Outdoor, Backyard Chickens*. Online. *Microorganisms*. Roč. 8, č. 5. ISSN 2076-2607. Dostupné z: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050767>. [ciováno 2024-04-13].
- SERGEANT, Martin J.; CONSTANTINIDOU, Chrystala; COGAN, Tristan A.; BEDFORD, Michael R.; PENN, Charles W. et al., 2014. *Extensive Microbial and Functional Diversity within the Chicken Cecal Microbiome*. online. *PLoS ONE*. roč. 9, č. 3. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091941>. [citováno 2024-02-07].
- SHENOY, Erica S.; MACY, Eric; ROWE, Theresa a BLUMENTHAL, Kimberly G., 2019. *Evaluation and Management of Penicillin Allergy*. online. *JAMA*. roč. 321, č. 2. ISSN 0098-7484. Dostupné z: <https://doi.org/10.1001/jama.2018.19283>. [citováno 2024-02-19].
- SHUKLA, Mayur; PEREIRA, Lara a PILLAY, Allan, 2022. *Treponema*. online. *Molecular Typing in Bacterial Infections, Volume I*. s. 191-213. ISBN 978-3-030-74017-7. Dostupné z: [https://doi.org/10.1007/978-3-030-74018-4\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-030-74018-4_9). [citováno 2024-03-24].
- SCHWARZ, Stefan a CHASLUS-DANCLA, Elisabeth, 2001. *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. online. *Veterinary Research*. roč. 32, č. 34, s. 201-225. ISSN 0928-4249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1051/vetres:2001120>. [citováno 2024-01-31].
- SINGH, Rochika; SRIPADA, Lakshmi a SINGH, Rajesh, 2014. *Side effects of antibiotics during bacterial infection: Mitochondria, the main target in host cell*. online. *Mitochondrion*. roč. 16, s. 50-54. ISSN 15677249. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.10.005>. [citováno 2024-02-19].
- SIROT, D.; SIROT, J.; LABIA, R.; MORAND, A.; COURVALIN, P. et al., 1987. *Transferable resistance to third-generation cephalosporins in clinical isolates of Klebsiella pneumoniae: identification of CTX-1, a novel  $\beta$ -lactamase*. online. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. roč. 20, č. 3, s. 323-334. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/20.3.323>. [citováno 2024-01-23].



- SKÖLD, Ola, 2000. *Sulfonamide resistance: mechanisms and trends*. online. Drug Resistance Updates. roč. 3, č. 3, s. 155-160. ISSN 13687646. Dostupné z: <https://doi.org/10.1054/drup.2000.0146>. [citováno 2024-01-21].
- SKŘIVANOVÁ, Eva a RADA, Vojtěch, 2014. *Vliv výživy na výskyt patogenních bakterií v drůbežím mase*. online. Vědecký výbor výživy zvířat. Dostupné z: <https://vuzv.cz/wp-content/uploads/2018/03/Studie-Rada-Sk%C5%99ivanov%C3%A1-2014.pdf> [citováno 2024-01-22].
- SPÍŽEK, Jaroslav a ŘEZANKA, Tomáš, 2017. *Lincosamides: Chemical structure, biosynthesis, mechanism of action, resistance, and applications*. online. Biochemical Pharmacology. roč. 133, s. 20-28. ISSN 00062952. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.12.001>. [citováno 2024-01-23].
- STANLEY, Dragana; GEIER, Mark S; CHEN, Honglei; HUGHES, Robert J a MOORE, Robert J, 2015. *Comparison of fecal and cecal microbiotas reveals qualitative similarities but quantitative differences*. online. BMC Microbiology. roč. 15, č. 51, s. 1-11. ISSN 1471-2180. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0388-6>. [citováno 2024-03-24].
- STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2009. online. Dostupné z: <https://szu.cz/temata-zdravi-a-bezpecnosti/narodni-antibioticky-program/>. [citováno 2024-01-17].
- STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2011. *Akční plán Národního antibiotického programu pro období 2011-2013*. online. Dostupné z: [https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/06/AP\\_NAP\\_2011\\_2013.pdf](https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/06/AP_NAP_2011_2013.pdf). [citováno 2024-01-17].
- STÁTNÍ ZDRAVOTNÍ ÚSTAV, 2019. *Akční plán Národního antibiotického programu České republiky (AP NAP) na období 2019-2022*. online. Dostupné z: [https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/06/AP\\_NAP\\_2019\\_2022\\_textova\\_cast.pdf](https://szu.cz/wp-content/uploads/2023/06/AP_NAP_2019_2022_textova_cast.pdf). [citováno 2024-01-17].
- STEPHENS, C.P. a HAMPSON, D.J., 2001. *Intestinal spirochete infections of chickens: a review of disease associations, epidemiology and control*. online. Animal Health Research Reviews. roč. 2, č. 1, s. 83-91. ISSN 1466-2523. Dostupné z: <https://doi.org/10.1079/AHRR200116>. [citováno 2024-03-24].
- SUMMERS, Anne O., 2006. *Genetic Linkage and Horizontal Gene Transfer, the Roots of the Antibiotic Multi-Resistance Problem*. online. Animal Biotechnology. roč. 17, č. 2, s. 125-135. ISSN 1049-5398. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/10495390600957217>. [citováno 2024-03-03].
- STÁTNÍ VETETINÁRNÍ SPRÁVA, 2022. *Spotřeba veterinárních antibiotik v ČR stále klesá, ve srovnání se zbytkem Evropy je podprůměrná*. online. Dostupné z: <https://www.svscr.cz/spotreba-veterinarnich-antibiotik-v-cr-stale-klesa-ve-srovnani-se-zbytkem-evropy-je-podprumerna/>. [citováno 2024-01-31].
- SYAL, Karan; MO, Manni; YU, Hui; IRIYA, Rafael; JING, Wenwen et al., 2017. *Current and emerging techniques for antibiotic susceptibility tests*. online. Theranostics. roč. 7, č.

7, s. 1795-1805. ISSN 1838-7640. Dostupné z: <https://doi.org/10.7150/thno.19217>. [citováno 2024-02-29].

ŠTEFAN, Marek, 2022. *Antibiotika v klinické praxi*. Druhé vydání. Praha: Galén. ISBN 978-807-4926-099.

TAN, Thean Yen, 2014. *Use of molecular techniques for the detection of antibiotic resistance in bacteria*. online. Expert Review of Molecular Diagnostics. roč. 3, č. 1, s. 93-103. ISSN 1473-7159. Dostupné z: <https://doi.org/10.1586/14737159.3.1.93>. [citováno 2024-02-20].

TENAILLON, Olivier; SKURNIK, David; PICARD, Bertrand a DENAMUR, Erick, 2010. *The population genetics of commensal Escherichia coli*. online. Nature Reviews Microbiology. roč. 8, č. 3, s. 207-217. ISSN 1740-1526. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2298>. [citováno 2024-03-02].

THUMU, Surya Chandra Rao a HALAMI, Prakash M., 2012. *Acquired Resistance to Macrolide–Lincosamide–Streptogramin Antibiotics in Lactic Acid Bacteria of Food Origin*. online. Indian Journal of Microbiology. roč. 52, č. 4, s. 530-537. ISSN 0046-8991. Dostupné z: <https://doi.org/10.1007/s12088-012-0296-5>. [citováno 2024-03-26].

ÚSKVBL, 2020. *Zvýšení kvality používání antimikrobik ve veterinární medicíně*. Dostupné také z: <https://bezpecnostpotravin.cz/zvyseni-kvality-pouzivani-antimikrobik-ve-veterinari-medicine/>. [citováno 2024-01-22].

VALENT, Peter; GRONER, Bernd; SCHUMACHER, Udo; SUPERTI-FURGA, Giulio; BUSSLINGER, Meinrad et al., 2016. *Paul Ehrlich (1854-1915) and His Contributions to the Foundation and Birth of Translational Medicine*. online. Journal of Innate Immunity. roč. 8, č. 2, s. 111-120. ISSN 1662-811X. Dostupné z: <https://doi.org/10.1159/000443526>. [citováno 2024-01-22].

VAN DER WOUDE, Thijs a KLEIBEUKER, Van Zwet, 2000. *Review article: nitroimidazole resistance in Helicobacter pylori*. online. Aliment Pharmacol Ther. roč. 14, č. 1, s. 7-14. Dostupné z: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00675.x>. [citováno 2024-03-03].

VIDENSKA, Petra; FALDYNOVA, Marcela; JURICOVA, Helena; BABAK, Vladimir; SISAK, Frantisek et al., 2013a. *Chicken faecal microbiota and disturbances induced by single or repeated therapy with tetracycline and streptomycin*. online. BMC Veterinary Research. roč. 9, č. 1. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-30>. [citováno 2024-03-02].

VIDENSKA, Petra; SISAK, Frantisek; HAVLICKOVA, Hana; FALDYNOVA, Marcela a RYCHLIK, Ivan, 2013b. *Influence of Salmonella enterica serovar Enteritidis infection on the composition of chicken cecal microbiota*. online. BMC Veterinary Research. roč. 9, č. 1. ISSN 1746-6148. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-140>. [citováno 2024-03-02].

- VIDENSKA, Petra; SEDLAR, Karel; LUKAC, Maja; FALDYNOVA, Marcela; GERZOVA, Lenka et al., 2014. *Succession and Replacement of Bacterial Populations in the Caecum of Egg Laying Hens over Their Whole Life*. online. PLoS ONE. roč. 9, č. 12. ISSN 1932-6203. Dostupné z: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115142>. [citováno 2024-02-06].
- VOLLMER, Waldemar; BLANOT, Didier a DE PEDRO, Miguel, 2008. *Peptidoglycan structure and architecture*. online. FEMS Microbiology Reviews. roč. 32, č. 2, s. 149-167. ISSN 1574-6976. Dostupné z: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>. [citováno 2024-01-22].
- WANG, Yanan; LYU, Na; LIU, Fei; LIU, William J.; BI, Yuhai et al., 2021. *More diversified antibiotic resistance genes in chickens and workers of the live poultry markets*. online. Environment International. roč. 153, č. 106534, s. 1-13. ISSN 01604120. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106534>. [citováno 2024-03-26].
- WARBURTON, Philip J.; AMODEO, Nina a ROBERTS, Adam P., 2016. *Mosaic tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins*. online. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. roč. 71, č. 12, s. 3333-3339. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw304>. [citováno 2024-01-23].
- WIEGAND, Irith; HILPERT, Kai a HANCOCK, Robert E W, 2008. *Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances*. online. Nature Protocols. roč. 3, č. 2, s. 163-175. ISSN 1754-2189. Dostupné z: <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.521>. [citováno 2024-02-29].
- WINAU, Florian; WESTPHAL, Otto a WINAU, Rolf, 2004. *Paul Ehrlich — in search of the magic bullet*. online. Microbes and Infection. roč. 6, č. 8, s. 786-789. ISSN 12864579. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2004.04.003>. [citováno 2024-01-22].
- WOODFORD, Neil a SUNDSFJORD, Arnfinn, 2005. *Molecular detection of antibiotic resistance: when and where?* online. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. roč. 56, č. 2, s. 259-261. ISSN 1460-2091. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dki195>. [citováno 2024-02-29].
- WORLD HEALTH ORGANISATION, 2024. online. Dostupné z: <https://www.who.int/about/who-we-are>. [citováno 2024-03-30].
- WORLD HEALTH ORGANISATION, 2019. *Ten threats to global health in 2019*. online. In: World Health Organisation. Dostupné z: <https://www.who.int/news-room/spotlight/ten-threats-to-global-health-in-2019>. [citováno 2024-04-02].
- WRIGHT, G, 2003. *Mechanisms of resistance to antibiotics*. online. Current Opinion in Chemical Biology. roč. 7, č. 5, s. 563-569. ISSN 13675931. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2003.08.004>. [citováno 2024-03-03].
- XIAO, Shasha; MI, Jiandui; CHEN, Yingxin; FENG, Kunxian; MEI, Liang et al., 2023. *The abundance and diversity of antibiotic resistance genes in layer chicken ceca is*

*associated with farm environment*. online. *Frontiers in Microbiology*. roč. 14, č. 1177404, s. 1-12. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1177404>. [citováno 2024-03-26].

XIONG, Wenguang; WANG, Yulin; SUN, Yongxue; MA, Liping; ZENG, Qinglin et al., 2018. *Antibiotic-mediated changes in the fecal microbiome of broiler chickens define the incidence of antibiotic resistance genes*. online. *Microbiome*. roč. 6, č. 1. ISSN 2049-2618. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0419-2>. [citováno 2024-03-26].

XU, Hengyong; LU, Yuxiang; LI, Dan; YAN, Chaoyang; JIANG, Yuru et al., 2023. *Probiotic mediated intestinal microbiota and improved performance, egg quality and ovarian immune function of laying hens at different laying stage*. online. *Frontiers in Microbiology*. roč. 14, č. 1041072. ISSN 1664-302X. Dostupné z: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1041072>. [citováno 2024-03-23].

YANG, Jintao; TONG, Cuihong; XIAO, Danyu; XIE, Longfei; ZHAO, Ruonan et al., 2022. *Metagenomic Insights into Chicken Gut Antibiotic Resistomes and Microbiomes*. online. *Microbiology Spectrum*. roč. 10, č. 2, s. 01907-21. ISSN 2165-0497. Dostupné z: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01907-21>. [citováno 2024-03-27].

YANG, X.J.; LI, W.L.; FENG, Y. a YAO, J.H., 2011. *Effects of immune stress on growth performance, immunity, and cecal microflora in chickens*. online. *Poultry Science*. roč. 90, č. 12, s. 2740-2746. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01591>. [citováno 2024-03-24].

YANG, Zhishuang; LAN, Tianjing; LUO, Hongyan; LI, Pei; WANG, Mingshu et al., 2024. *Emergence and mobilization of a novel lincosamide resistance gene *lmv(I)*: From environmental reservoirs to pathogenic bacteria*. online. *Science of The Total Environment*. roč. 906. ISSN 00489697. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2023.167400>. [citováno 2024-03-03].

ZHANG, Chao; CLEVELAND, Kyle; SCHNOLL-SUSSMAN, Felice; MCCLURE, Bridget; BIGG, Michelle et al., 2015. *Identification of low abundance microbiome in clinical samples using whole genome sequencing*. online. *Genome Biology*. roč. 16, č. 1, s. 1-16. Dostupné z: <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0821-z>. [citováno 2024-04-09].

ZHANG, Yuan; ZHANG, Ning; WANG, Mengyu; LUO, Ming; PENG, Yao et al., 2023. *The prevalence and distribution of aminoglycoside resistance genes*. online. *Biosafety and Health*. roč. 5, č. 1, s. 14-20. ISSN 25900536. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.bsheal.2023.01.001>. [citováno 2024-01-23].

ZHU, Ting; CHEN, Tao; CAO, Zhen; ZHONG, Shan; WEN, Xin et al., 2021. *Antibiotic resistance genes in layer farms and their correlation with environmental samples*. online. *Poultry Science*. roč. 100, č. 12. ISSN 00325791. Dostupné z: <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101485>. [citováno 2024-03-26].

ZHU, Yao; WANG, Changzhen; SCHWARZ, Stefan; LIU, Wenyu; YANG, Qin et al., 2021. *Identification of a novel tetracycline resistance gene, *tet(63)*, located on a*

*multiresistance plasmid from Staphylococcus aureus*. online. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. roč. 76, č. 3, s. 576-581. ISSN 0305-7453. Dostupné z: <https://doi.org/10.1093/jac/dkaa485>. [citováno 2024-01-23].

ZULKIFLI, I.; ABDULLAH, N.; AZRIN, N. Mohd. a HO, Y.W., 2000. *Growth performance and immune response of two commercial broiler strains fed diets containing Lactobacillus cultures and oxytetracycline under heat stress conditions*. online. British Poultry Science. roč. 41, č. 5, s. 593-597. ISSN 0007-1668. Dostupné z: <https://doi.org/10.1080/713654979>. [citováno 2024-02-10].

## SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Složení mikroflóry trávicího traktu dospělé slepice .....	12
Obrázek 2 Vývoj střevní mikroflóry nosnic dle Videnska et al. (2014).....	14
Obrázek 3 Časová osa uvedení skupin antibiotik na trh .....	18
Obrázek 4 Spotřeba antibiotik ve veterinární medicíně mezi lety 2003–2022 .....	24
Obrázek 5 Měření inhibičních zón .....	36
Obrázek 6 Určení MIC pomocí bujonové diluční metody .....	37
Obrázek 7 Inhibiční zóny vytvořené kolem E-testu .....	38
Obrázek 8 Funkce Sybergreenu při real-time PCR .....	39
Obrázek 9 Označení brojlerů a nosnic z jednotlivých farem .....	42
Obrázek 10 Design primeru pro 16S rRNA pro Illumina Miseq sekvenování .....	44
Obrázek 11 Procentuální zastoupení bakteriálních kmenů v cekální mikroflóře rodičovských generací brojlerů a nosnic po produktivním věku .....	46
Obrázek 12 Relativní četnost zkoumaných genů rezistence na jednotlivých farmách .....	52
Obrázek 13 Relativní četnost vybraných genů antibiotické reistence k betalaktamům (blaTEM), sulfonamidům (sul2) , linkosamidům (linA) a streptomycinu (strA, aadA) na jednotlivých farmách.....	53
Obrázek 14 Relativní četnost genů antibiotické rezistence k tetracyklinu na jednotlivých farmách.....	54
Obrázek 15 Relativní četnost genů antibiotické rezistence na jednotlivých farmách.....	55
Obrázek 16 Výskyt nejvíce zastoupených genů na jednotlivých farmách.....	56
Obrázek 17 Heat-mapa znázorňující korelace mezi frekvencí výskytu genů antibiotické rezistence a bakteriálními čeleděmi .....	59

## **SEZNAM TABULEK**

Tabulka 1 Seznam použitých prumerů .....	43
Tabulka 2 Procentuální zastoupení nejčetnější čeledí ve střevní mikroflóře slepic z 5 farem .	51