

ANTIMIKROBIÁLNA REZISTENCIA KMEŇOV *ESCHERICHIA COLI* V POTRAVINOVOM REŤAZCI KURACIEHO MÄSA *ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF ESCHERICHIA COLI STRAINS IN FOOD CHAIN OF BROILER CHICKEN*

TEJOVÄ Martina¹, RIMÄROVÄ Kvetoslava¹, PIPOVÄ Monika²

¹ Ústav verejného zdravotníctva a hygieny, Lekárska fakulta UPJŠ, Košice

² Katedra hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín, Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie, Košice

ABSTRAKT

Východiská: Indikácia antimikrobiálnej liečby v produkčných chovoch zvierat má výrazný negatívny dopad na verejné zdravie populácie. Pravidelné užívanie antibiotík prispieva ku rozvoju rezistentných bakteriálnych kmeňov schopných vyvolať mnohé infekčné ochorenia u ľudí. Rezistentné bakteriálne kmene sú tiež schopné ovplyvňovať determinanty rezistencie (enzymatická inaktivácia antibiotika, zmeny v cieľovom mieste látky, zmena permeability bunkovej steny) u často sa vyskytujúcich patogénnych mikroorganizmov v populácii.

Ciele: Cieľom štúdie bol výskum zameraný na sledovanie antimikrobiálnej rezistencie kmeňov *Escherichia coli* izolovaných z črevného obsahu brojlerových kurčiat a určenie minimálnych inhibičných koncentrácií voči 18 druhom vybraných druhov antimikrobiálnych látok.

Súbor a metodika: Vzorky črevného obsahu brojlerových kurčiat sme použili na prípravu série desaťnásobných riedení, ktoré sme následne vyočkovali na povrch Endo agaru. Z typických kolónií *E. coli* sme pripravili bujónové kultúry, ktoré sme použili na extrakciu DNA. Antimikrobiálnu rezistenciu sme testovali využitím mikrodoštičiek EUVSEC a EUVSEC 2, určených na testovanie citlivosti a určenie minimálnej inhibičnej koncentrácie črevných izolátov *E. coli* na vybrané druhy antimikrobiálnych látok.

Výsledky: Rezistencia na antibiotiká bola testovaná u potvrdených *Escherichia coli* kmeňov pomocou lyofilizovaných doštičiek Sensititre™. Antimikrobiálna rezistencia kmeňov *E. coli* bola potvrdená u 17 druhov antibiotík a chemoterapeutík. Najvýraznejšia antimikrobiálna rezistencia kmeňov *E. coli* sa prejavila voči sulfónamidom (79,1 %), tetracyklínu (58,3 %), ampicilínu (54,17 %), trimetoprímu (50 %) a cefotaxímu (41,7 %). Najvyššia miera citlivosti bakteriálnych kmeňov sa prejavila voči antibiotiku azitromycín. Intermediárna rezistencia bola potvrdená u 7 druhov antibiotík a chemoterapeutík. Z celkových 24 skúmaných bakteriálnych kmeňov *Escherichia coli* 20 vykazovalo rezistenciu voči viacerým druhom testovaných látok a 3 kmene boli zaradené medzi producentov ESBL.

Záver: Štúdia potvrdila skutočnosť, že brojlerové kurčatá sú prameňom kmeňov *E. coli* rezistentných na antibiotiká a chemoterapeutiká. Bez efektívnych antimikrobiálnych látok terapia infekcií nebude dostatočne efektívna, čo ohrozuje zdravie ľudí aj zvierat.

Kľúčové slová: Antibiotiká. Antimikrobiálna rezistencia. Brojlerové kurčatá. *Escherichia coli*. Mikrodilučné metódy. PCR metóda.

ABSTRACT

Background: The indication of antimicrobial therapy in the production of slaughter animals has shown a severe negative effect on the global public health. Overuse of antibiotics is associated with the promotion of resistant bacterial strains. These strains capable of causing dangerous infectious diseases in the human population. There is a connection between resistant bacterial strains and the determinants of resistance (enzymatic inactivation of antibiotics, alteration of target sites, cell membrane permeability) frequently arising in pathogenic organisms.

Objective: Our study aimed to monitor the antimicrobial resistance of *Escherichia coli* strains isolated from the colon content of broiler chickens and determine the minimum inhibitory concentration against 18 selected types of antimicrobials.

Sample and methods: Intestinal contents of broiler chickens were used to prepare series of tenfold dilutions inoculated on the surface of Endo agar. Within our research facility, we obtained broth cultures by subsequent incubation of typical bacterial colonies grown on the surface of Endo agar to extract DNA information by using the species-specific PCR method. Antimicrobial resistance was examined by commercial EUVSEC and EUVSEC2 microplates. Commercial microplates are designed for sensitivity testing and determining the minimum inhibitory concentration of intestinal *E. coli* isolates to selected types of antimicrobial drugs.

Results: Antibiotic resistance was examined in *E. coli* strains using lyophilized Sensititre™ plates. Resistance was confirmed in 17 selected types of antimicrobials. The most pronounced antimicrobial resistance of *E. coli* strains poses sulfonamides (79.1 %), tetracycline (58.3 %), ampicillin (54.17 %), trimethoprim (50 %), and cefotaxime (41.7 %). The antibiotic azithromycin was characterized as the antibiotic with the highest sensitivity rate. Intermediate resistance appears to develop in 7 types of antibiotics and synthetic antibiotics. 20 out of 24 bacterial strains showed resistance to more than one antimicrobial agent. 3 of them were defined as ESBL producers.

Conclusion: The study confirmed the fact that broiler chickens are a source of antibiotic-resistant strains of *E. coli*. Without effective antimicrobial drugs, the therapy of infections will not be effective enough, which threatens the health of both humans and animals.

Key words: Antibiotics. Antimicrobial resistance. Broiler chicken. *Escherichia coli*. Microdilution methods. PCR method.

ÚVOD

Escherichia coli patrí ku Gram-negatívnym, fakultatívne anaeróbnym, pohyblivým tyčinkám, ktoré sú súčasťou mikrobiómu tráviaceho traktu [1]. Mnohé kmene *E. coli* je možné zaradiť ku nepatogénnym. Tieto kmene sa vyskytujú v intestinálnom trakte a podieľajú sa na tvorbe vitamínov B, K a základných aminokyselín [2]. Malá skupina však patrí ku patogénnym baktériám, ktoré spôsobujú závažné ochorenia ako gastroenteritídy, hemolytickú kolitídu, hemolyticko-uremický syndróm, infekcie urinárneho traktu, septikémie, pneumónie a meningitídy [1].

Na základe patogenity je možné baktérie *E. coli* rozdeliť na niekoľko typov podľa mechanizmov a faktorov virulencie, ktoré sú schopné vyvolať priebeh ochorenia organizmu. Medzi najvýznamnejšie patogénne typy sa zaraďujú kmene enterotoxigénne (EPEC), enteropatogénne (EPEC), kmeň produkujúci shigatoxín (STEC) a extraintestinálne patogénne *E. coli* (ExPEC). Ochorenia spôsobené kmeňmi *E. coli* sú ovplyvnené génmi kódovanými plazmidmi a bakteriofágmi [3].

Patogenitu baktérií je možné definovať ako schopnosť baktérií vyvolať ochorenie. Medzi najdôležitejšie vlastnosti ovplyvňujúce rozvoj ochorenia patria toxicita, invazívnosť a taktiež imunitný stav hostiteľského organizmu. Patogénne mikroorganizmy sú schopné meniť faktory virulencie v snahe napadnúť hostiteľský organizmus. Antimikrobiálna rezistencia napomáha patogénnym mikroorganizmom inhibovať letálne účinky antimikrobiálnych látok. Prenos génov schopných bojovať s imunitným systémom hostiteľského organizmu je mechanizmus, ktorý využívajú patogénne mikroorganizmy pre prenos faktorov virulencie a rezistencie [4]. Medzi dva hlavné spôsoby rezistencie patrí prirodzená a získaná. Prirodzenú rezistenciu je možné opísať ako rezistenciu, ktorá vzniká bez ohľadu na kontakt patogénneho mikroorganizmu s daným antibiotikom. Získaná rezistencia vzniká pri zmene genetickej informácie patogénneho mikroorganizmu, kedy sa pôvodne účinné antibiotikum mení na neúčinné [5]. Ku najčastejším mechanizmom získanej rezistencie je možné zaradiť schopnosť mikroorganizmov zamedziť prieniku antibiotika, vytvoriť alteráciu väzobného miesta antibiotika v dôsledku postranlačnej modifikácie a inaktiváciu antibiotika [4].

CIEĽ PRÁCE

Cieľom našej práce bolo primárne určenie antimikrobiálnej rezistencie kmeňov *E. coli* izolovaných z črevného obsahu brojlerových kurčiat voči 18 druhom vybraných antimikrobiálnych látok, často indikovaných v klinickej praxi, prostredníctvom kultivačného mikrobiologického vyšetrenia. Pre genotypové potvrdenie izolátov *E. coli* bolo nevyhnutné vykonať extrakciu DNA metódou druhovo špecifickej PCR. Testovanie rezistencie kmeňov *E. coli* bolo vykonané použitím bujónovej mikrodilučnej metódy a určením minimálnych inhibičných koncentrácií. Na základe identifikovaných hodnôt minimálnych inhibičných koncentrácií bolo vykonané zatriedenie kmeňov *E. coli* do troch skupín: citlivé, intermediárne rezistentné a rezistentné kmene. Vyhodnotenie stupňa rezistencie bolo vykonané u kmeňov, u ktorých bola potvrdená rezistencia voči určeným druhom antibiotík.

SÚBOR A METODIKA

Kmene *Escherichia coli* sme izolovali z črevného obsahu kurčiat (hybrid COBB 500). Pripravili sme sériu desaťnásobných riedení v sterilnom fyziologickom roztoku a následne vyočkovali metódou rozteru na povrch Endoagaru v Petriho miskách. Po 24-hodinovej inkubácii pri teplote 37 °C sme kolónie typického tvaru preočkovali do bujónu s mozgovou -srdcovou infúziou (BHI), ktoré sme opäť inkubovali 24 hodín pri teplote 37 °C. Pripravené bujónové kultúry boli využité pre extrakciu DNA a potvrdenie metódou PCR [6].

Pre potvrdenie kmeňov *E. coli* druhovo špecifickou PCR sme využili primery: ECO-1 (forward primer) 5'-GAC CTC GGT TTA GTT CAC AGA-3' a ECO-2 5'-CAC ACG CTG ACG CTG ACC A-3' (reverse primer) [7]. Pripravili sme reakčnú zmes, ktorá obsahovala požadované množstvo Hot FirePol Blend Master Mix, primerov ECO-1, ECO-2, templátovú DNA a PCR H₂O (Solis BioDyne, Estónsko). Ako pozitívnu kontrolu sme použili referenčný kmeň *E. coli* CCM 3954 (Česká zbierka mikroorganizmov, Brno, Česká republika) (Amplia, Slovenská republika). Termocyklér sme nastavili na 95 °C na 12 minút, pri tejto teplote sme uskutočnili fázu iniciálnej denaturácie. Táto teplota slúžila na aktiváciu Hot FirePol polymerázy. Nasledovala fáza amplifikácie, počas ktorej sa v 20 cykloch opakovali 3 kroky: denaturácia, pri teplote 95 °C 20 sekúnd, annealing pri teplote 58 °C 60 sekúnd a elon-

gácia pri teplote 72 °C 2 minúty. Fáza finálnej extenzie prebehla pri teplota 72 °C počas 10 minút. Veľkosť výsledného produktu bola 585 bp (bázových párov).

Rezistenciu kmeňov *E. coli* sme testovali bujónovou mikrodilučnou metódou. Metóda nám poskytla kvantitatívne aj kvalitatívne výsledky MIC (minimálne inhibičné koncentrácie) prostredníctvom koncentrácií antibiotík rozriedených do jamiek mikrotitračných doštičiek. Použili sme doštičky Sensititre™ EUVSEC a EUVSEC² (Thermo Fisher Scientific, Veľká Británia) na určenie MIC koncentrácií pre Gram-negatívne baktérie *E. coli*. Kvalitatívny rast sa prejavil ako viditeľný zákal alebo sediment buniek na dne jamky príslušnej mikrodštičky. Za MIC koncentráciu daného antibiotika sme považovali viditeľné zastavenie rastu baktérie. Na základe MIC breakpointov (CLSI, 2020) sme kmene *E. coli* rozdelili na tri hlavné skupiny: rezistentné, intermediárne rezistentné a citlivé [8]. Následne sme porovnali MIC koncentrácie antibiotík ceftazidín a cefotaxím samostatne a taktiež v kombinácii s kyselinou klavulánovou, ktorá je charakteristická svojou funkciou inhibítora ESBL (širokospektrálnych β -laktamáz).

VÝSLEDKY

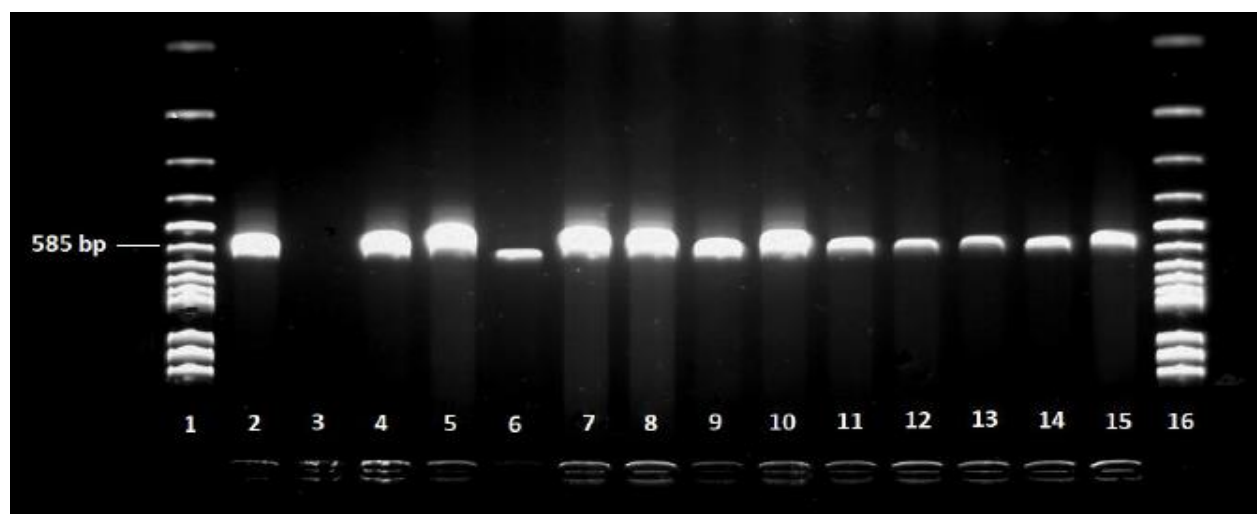
Kultiváciou sme získali z črevného obsahu

brojlerových kurčiat 24 izolátov *E. coli*, ktoré boli charakteristické typickým kovovým leskom. Kmene *E. coli* sme následne identifikovali prostredníctvom druhovo špecifickej PCR metódy, ktorá potvrdila prítomnosť génov bakteriálneho druhu *E. coli* u 24 skúmaných izolátov získaných z črevného obsahu kurčiat. Veľkosť získaného PCR produktu bola 585 bp (bázových párov) (Obr. č. 1).

Testovanie rezistencie kmeňov *E. coli* sme uskutočnili pomocou bujónovej mikrodilučnej metódy. Pri tejto metóde sme testovali 8 skupín antibiotík: penicilíny, amfenikoly, makrolidy, aminoglykozidy, tetracyklíny, chinolóny, fluorochinolóny, karbapenémy, celafosporíny a tiež sulfónamidy.

Testovali sme výskyt antimikrobiálnej rezistencie voči 18 druhom antimikrobiálnych látok: ampicilín (AMP), chloramfenikol (CHL), azitromycín (AZI), gentamicín (GEN), tetracyklín (TET), kyselina nalidixová (NAL), sulfónamidy (SMX), trimetoprim (TMP), meropeném (MERO), ertapeném (ETP), ciprofloxacín (CIP), imipeném (IMI), cefoxitín (FOX), cefepím (FEP), cefotaxím (FOT), cefotaxím s kyselinou klavulánovou (F/C), ceftazidín (TAZ) a ceftazidín s kyselinou klavulánovou (T/C).

Výsledky testovania 24 kmeňov *E. coli* spolu s hodnotami MIC pre jednotlivé antibiotiká a ich zaradením medzi rezistentné, intermediárne rezistentné a citlivé sumarizujú tabuľky č. 1 a 2.



Obrázok 1 Potvrdenie identity izolátov *E. coli* druhovo špecifickou PCR (dráha 1: ladder 100 bp, dráha 2: pozitívna kontrola *E. coli* CCM 3954, dráha 3: negatívna kontrola, dráhy 4 – 15 izoláty *E. coli* brojlerových kurčiat, dráha 16: ladder 100 bp)

Tabuľka 2 Minimálne inhibičné koncentrácie [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] pre vybrané antimikrobiálne látky* u izolátov *E. coli* brojlerových kurčiat [I. časť]

Kmeň	SMX	TMP	CIP	TET	MERO	AZI	NAL	FOT	CHL	AMP	GEN
EA1	>1024	>32	0,06	>64	0,12	4	8	>4	<8	2	<0,5
EA9	<8	<0,25	<0,015	<2	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	8	<0,5
EA108	>1024	>32	0,03	<2	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	8	<0,5
EA113	>1024	>32	0,03	<2	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	4	1
EA141	>1024	>32	0,06	64	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	>64	<0,5
EA142	>1024	>32	0,03	<2	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	4	<0,5
EA144	<8	<0,25	<0,015	<2	0,12	4	<4	<0,25	<8	2	1
EA145	<8	<0,25	<0,015	<2	0,12	4	<4	<0,25	<8	2	<0,5
EA146	>1024	>32	0,25	>64	0,12	8	>128	>4	<8	>64	1
EA147	>1024	>32	0,5	64	0,12	8	128	>4	<8	>64	1
EA148	>1024	>32	0,5	>64	0,12	8	16	>4	<8	>64	<0,5
EA150	>1024	>32	0,06	64	0,12	8	8	>4	<8	2	<0,5
EA151	>1024	>32	0,5	>64	<0,03	16	128	>4	16	64	<0,5
EA152	>1024	<0,25	0,5	<64	<0,03	8	16	<0,25	<8	>64	<0,5
EC66	<8	<0,25	<0,03	64	<0,03	<2	<4	<0,25	<8	8	1
EC67	>1024	<0,25	<0,015	<2	4	<2	<4	<0,25	<8	>64	<0,5
EC68	<8	<0,25	<0,03	>64	0,06	8	8	<0,25	<8	>64	<0,5
EC73	>1024	<0,25	2	<64	8	8	16	>4	16	>64	8
EC74	>1024	<0,25	0,015	<2	>16	64	<4	>4	<8	2	<0,5
EC75	>1024	<0,25	<0,015	>64	<0,03	<2	>128	2	<8	>64	>32
EC84	>1024	>32	8	>64	<0,03	4	>128	<0,25	<8	>64	<0,5
EC85	>1024	<0,25	<0,015	<2	<0,03	8	<4	<0,25	<8	>64	1
EC86	>1024	0,5	0,5	<2	8	16	128	>4	<8	2	2
EC87	>1024	>32	8	>64	<0,03	<2	>128	>4	<8	64	<0,5

Legenda: rezistentné kmene, intermediárne kmene, * sulfónamidy (SMX), trimetoprim (TMP), ciprofloxacín (CIP), tetracyklín (TET), meropeném (MERO), azitromycín (AZI), kyselina nalidixová (NAL), cefotaxím (FOT), chloramfenikol (CHL), ampicilín (AMP), gentamicín (GEN)

Tabuľka 3 Minimálne inhibičné koncentrácie [$\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$] pre vybrané antimikrobiálne látky* u izolátov *E. coli* u brojlerových kurčiat [II. časť]

Kmeň	FOX	ETP	IMI	TAZ	FEP	F/C	T/C
EA1	2	<0,015	<0,12	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA9	8	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	0,25/4
EA108	4	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	0,25/4
EA113	4	<0,015	0,25	0,5	<0,06	<0,06/4	0,25/4
EA141	2	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA142	4	<0,015	0,5	0,5	0,12	0,12/4	0,5/4
EA144	2	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA145	2	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA146	2	<0,015	<0,12	<0,25	0,12	<0,06/4	<0,12/4
EA147	4	<0,015	0,25	<0,25	0,12	0,12/4	<0,12/4
EA148	4	<0,015	0,25	0,5	0,12	0,12/4	<0,12/4
EA150	2	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA151	4	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EA152	16	<0,015	0,5	<0,25	0,25	<0,06/4	<0,12/4
EC66	8	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	0,25/4
EC67	8	0,06	0,5	1	0,12	0,12/4	<0,12/4
EC68	16	0,06	0,5	0,5	0,12	0,12/4	0,25/4
EC73	>64	>2	8	>128	8	0,5/4	<0,12/4
EC74	>64	>2	0,5	>128	>32	>64/4	>128/4
EC75	16	0,5	0,5	8	1	0,25/4	4,4
EC84	4	<0,015	0,25	<0,25	0,12	0,12/4	<0,12/4
EC85	4	<0,015	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4
EC86	32	>2	2	>128	32	>64/4	>128/4
EC87	4	0,06	0,25	<0,25	<0,06	<0,06/4	<0,12/4

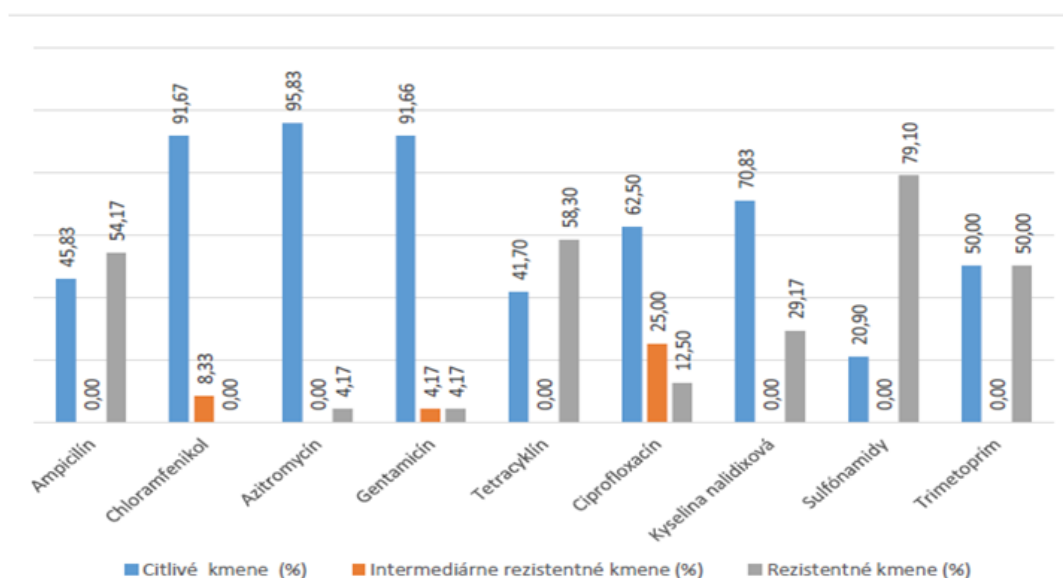
Legenda: rezistentné kmene, intermediárne kmene, * cefoxitín (FOX), ertapeném (ETP), imipeném (IMI), ceftazidín (TAZ), cefepím (FEP), cefotaxím s kyselinou klavulánovou (F/C), a ceftazidín s kyselinou klavulánovou (T/C).

Z určenia minimálnych inhibičných koncentrácií vyplýva, že kmene *E. coli* izolované z črevného obsahu kurčiat vykazovali rezistenciu ku antimikrobiálnym látkam nasledovných antibiotík a chemoterapeutík (Obr. 2 a 3):

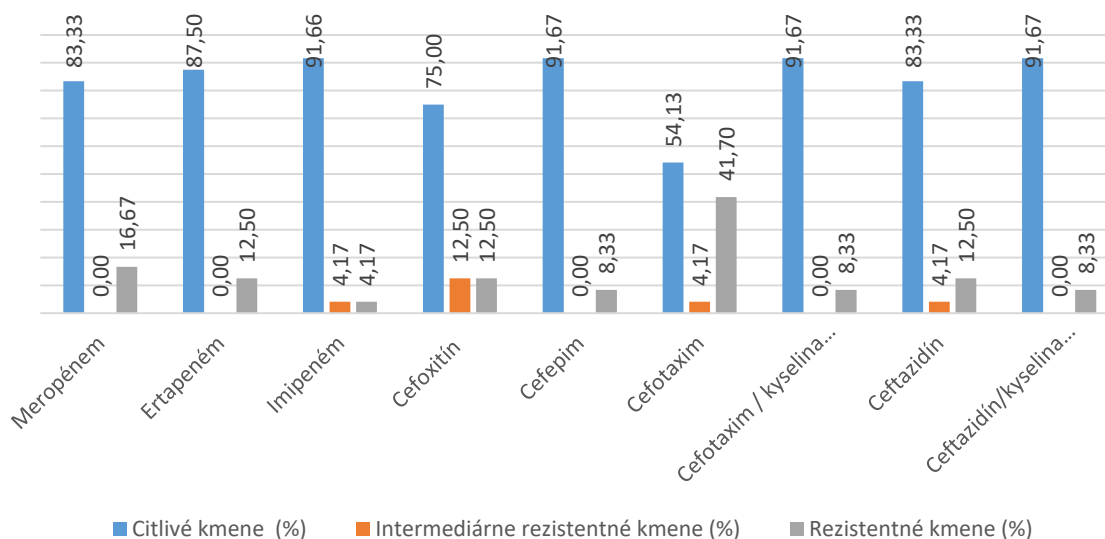
- azitromycín: 4,17 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- gentamicín: 4,17 % kmeňov vykazovalo úplnú a 4,17 % intermediárnu rezistenciu;
- imipeném: 4,17 % kmeňov úplnú a 4,17 % intermediárnu rezistenciu;
- cefepim: 8,33 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- cefotaxím/ kyselina klavulánová: 8,33 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- ceftazidín/ kyselina klavulánová: 8,33 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- chloramfenikol: 8,33 % kmeňov vykazovalo intermediárnu rezistenciu;
- cefoxitín: 12,5 % kmeňov vykazovalo úplnú a 12,5 % intermediárnu rezistenciu;
- ceftazidín: 12,5 % kmeňov vykazovalo úplnú a 4,1 % intermediárnu rezistenciu;
- ciprofloxacín: 12,5 % kmeňov vykazovalo úplnú a 25 % intermediárnu rezistenciu;
- ertapeném: 12,5 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- meropeném: 16,67 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;

- kyselina nalidixová: 29,17 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- cefotaxím: 41,7 % kmeňov vykazovalo úplnú a 4,17 % intermediárnu rezistenciu;
- trimetoprim: 50 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- ampicilín: 54,17 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- tetracyklín: 58,3 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu;
- sulfónamidy: 79,1 % kmeňov vykazovalo úplnú rezistenciu.

Antimikrobiálna rezistencia sa prejavila voči 17 druhom antimikrobiálnych látok (Obr. 2 a 3). Najvyššia miera výskytu rezistencie sa prejavila ku sulfónamidom (79,1 %), tetracyklínu (58,3 %), ampicilínu (54,17 %), ku trimetoprimu (50,0 %) a cefotaxímu (41,7 %). Naopak voči azitromycínu sa prejavila najvyššia miera citlivosti (95,8 %). Intermediárna rezistencia sa prejavila smerom ku 7 druhom antimikrobiálnych látok. Z 24 skúmaných bakteriálnych kmeňov *E. coli* až 20 kmeňov vykazovalo rezistenciu voči viacerým druhom testovaných látok. Zároveň sme potvrdili porovnaním minimálnych inhibičných koncentrácií antibiotík ceftazidín a cefotaxím samostatne a v kombinácii s kyselinou klavulánovou prítomnosť troch kmeňov *E. coli* produkujúcich ESBL (rozšírené spektrum β -laktamáz).



Obrázok 2 Percentuálny výskyt citlivých, intermediárne rezistentných a rezistentných kmeňov *E. coli* voči vybraným antimikrobiálnym látkam [I. časť]



Obrázok 3 Percentuálny výskyt citlivých, intermediárne rezistentných a rezistentných kmeňov *E. coli* voči vybraným antimikrobiálnym látkam [II. časť]

DISKUSIA

Antimikrobiálne látky zohrávajú kľúčovú rolu pri minimalizácii morbidít a mortality v živočíšnych chovoch. Častá indikácia antibiotík pri terapii infekčných ochorení však predstavuje významné globálne riziko pre verejné zdravie. Nevhodná aplikácia antibiotík je asociovaná so zvýšenou frekvenciou výskytu rezistencie bakteriálnych kmeňov v gastrointestinálnej mikroflóre zvierat a následná konzumácia živočíšnych potravín môže viesť ku prenosu baktérií rezistentných na antimikrobiálne látky v humánnej populácii [9].

E. coli je súčasťou endogénnej gastrointestinálnej mikroflóry, čo spôsobuje závažné riziko pri vzniku rezistencie voči antimikrobiálnym látkam, indikovaných pri terapii humánnych aj zvieracích ochorení [10]. Štúdia Kocúreková et al. (2021) poukazuje na fakt, že existuje korelácia medzi rezistentnými kmeňmi *E. coli* izolovaných z brojlerových kurčiat a kmeňov *E. coli* izolovaných z humánnych vzoriek. Takýto vzťah naznačuje možný prenos rezistentných baktérií *E. coli* naprieč populáciami [11].

Chov kurčiat patrí ku významným zdrojom šírenia rezistentných kmeňov *E. coli*. Patogénne kmene *E. coli* kurčiat predstavujú globálne riziko pre verejné zdravie z dôvodu šírenia rezistentných kmeňov *E. coli* do humánnej populácie a následnú neúčinnosť indikovanej antibiotickej liečby. Na území Slovenskej republiky bola pozorovaná najvyššia

miara rezistencie kmeňov *E. coli* z humánnych vzoriek voči penicilínom (64,5 %). Obdobné percento rezistencie bolo na Slovensku zaznamenané i u izolátov z hydiny, kde rezistencia *E. coli* voči penicilínu dosiahla 67 %. Rezistencia *E. coli* voči fluorochinolónom a cefalosporínom III. generácie má u ľudí na Slovensku mierne stúpajúci trend, v roku 2014 dosiahla úroveň u fluorochinolónov 43 % a u cefalosporínov III. generácie 31,8 %. Percento rezistencie izolátov z hydiny voči flourochinolónom v roku 2014 bolo na Slovensku zrovnateľné s rezistenciou u ľudí. V roku 2014 bol priemer EÚ rezistencie *E. coli* voči aminoglykozidom v ľudskej populácii 9,4 % a na Slovensku 22,8 %. Nižšie percentá rezistencie boli u izolátov zo zvierat, a to u hydiny bola rezistencia *E. coli* voči gentamicínu na úrovni 16 % . Izoláty *E. coli* z hydiny vykazovali najvyššie percentá rezistencie voči sulfametoxazolu 91 %, trimetoprímu 84 % a tetracyklínu 42 % [12].

Ribeiro et al. (2023) sa vo svojej štúdii venovali frekvencii výskytu rezistentných kmeňov *E. coli* v chovoch brojlerových kurčiat. Hydínové mäso patrí v súčasnosti ku celosvetovo najviac konzumovanému druhu mäsa. Pre zabezpečenie vysokej úrovne produkcie sú používané antimikrobiálne látky na terapeutické účely a prevenciu ochorení. Táto skutočnosť však prispieva ku rozvoju antimikrobiálnej rezistencie bakteriálnych kmeňov voči antimikrobiálnym látkam. Štúdia potvrdila výskyt rezistentných izolátov *E. coli* u brojlerových kurčiat

v najvyššej miere voči antibiotikám ampicilín, tetracyklín, ciprofloxacín a trimetropím. Naša štúdia taktiež potvrdila najvyššiu mieru rezistencie izolátov *E. coli* voči tetracyklínu, ampicilínu a trimetropímu. Naopak u antibiotika ciprofloxacín sme zaznamenali takmer 5 krát nižšiu mieru rezistencie v porovnaní so štúdiou Ribeira et al. [9].

Mwansa et al. (2023) vo svojej štúdii determinovali výskyt rezistentných kmeňov *E. coli* u farmárskych pracovníkov v produkcii kurčiat. Z celkových 80 izolátov *E. coli* až 58 vykazovalo vysokú mieru rezistencie voči antibiotiku tetracyklín (87,9 %), trimetopím (48,3%), ampicilín (46,8 %), kyselina nalidixová (19,0 %), ciprofloxacín (12,1 %), cefotaxím (8,6 %) a chloramfenikol (5,2 %) [8]. Naša štúdia potvrdila prítomnosť rezistentných kmeňov *E. coli* vo vyššej miere voči: trimetopím (50 %), ampicilín (54,17 %), kyselina nalidixová (29,17 %), ciprofloxacín (12,5 %), cefotaxim (41,7 %) a chloramfenikol (8,33 %). Naopak nižšiu mieru rezistencie v porovnaní so štúdiu Mwansa et al. sme zaznamenali u antibiotika tetracyklín (58,3 %) [13].

Antimikrobiálnej rezistencii kmeňov *E. coli* u konvenčných a ekologických brojlerových kurčiat sa venovala štúdia Kima et al. (2021). Výsledky preukázali v oboch skupinách prítomnosť rezistentných *E. coli* kmeňov, avšak izoláty z konvenčných chovov prejavili vyššiu mieru rezistencie voči antibiotiku neomycín a tetracyklín v porovnaní s brojlerovými kurčatami z ekologických chovov [14]. Naša štúdia sa venovala určovaniu výskytu rezistentných kmeňov *E. coli* v produkčných chovoch brojlerových kurčiat. Najvyššia miera rezistencie sa taktiež zaznamenala voči antibiotiku tetracyklín. V skupine aminoglykozidov sme testovali rezistenciu antibiotika gentamicín, na ktoré sme zaznamenali rezistenciu len v miere 4,17 %. Výskyt rezistentných kmeňov sa medzi chovmi výrazne líši, pričom je možné vyhodnotiť vyššiu mieru rezistentných bakteriálnych kmeňov u brojlerových kurčiat v konvenčných chovoch.

Štúdia Abreua et al. (2023) informovala v dôsledku častej indikácie antimikrobiálnych látok v chovoch brojlerových kurčiat o možnosti užívania alternatívnych látok pre minimalizáciu výskytu rezistentných bakteriálnych kmeňov. Optimalizácia sanitačných procesov a implementácia analýzy nebezpečenstva a kritických kontrolných bodov je nevyhnutná pre zlepšenie úrovne v chovoch brojlerových kurčiat. Štúdia sa zamerala na posúdenie účinnosti

alternatívnych látok v porovnaní s konvenčnými antibiotikami ako sú antimikrobiálne peptidy a bakteriofágy. Antimikrobiálne peptidy sú definované ako malé proteíny prítomné vo všetkých živých organizmoch [15]. Daneshmad et al. (2019) vo svojej štúdii potvrdili, že pri indikácii cLF 36 peptidu odvodeného od laktoferínu dochádza ku schopnosti tlmiť infekciu u brojlerových kurčiat trpiacich *E. coli* a to moduláciou expresie cytokínov IL-2 a IL-6 [16]. Bakteriofágy patria medzi vírusy, ktoré sa špecificky zameriavajú na inaktiváciu baktérií. Bakteriofágy sú ubikvitárne prítomné, nachádzajú sa vo všetkých biotopoch vrátane vody, rastlín, potravín a zároveň patria ku dôležitým zložkám ľudského mikrobiómu prítomného v gastrointestinálnej sústave. Huff et al. (2003) testovali účinnosť aplikácie bakteriofágov vo forme aerosólového spreja pri infekcii vyvolanej *E. coli*. Výsledky štúdie potvrdili zníženie mortality u brojlerových kurčiat z 50 na 20 % [17].

ZÁVER

Bakteriálne kmene klasifikované ako kmene *E. coli* sme testovali na výskyt rezistencie voči 18 druhom antimikrobiálnych látok. Podľa hodnôt MIC na testované antibiotiká a chemoterapeutiká sme kmene rozdelili na tri hlavné skupiny a to rezistentné, intermediárne rezistentné a citlivé. Potvrdené kmene *E. coli* preukázali najvyššiu mieru rezistencie voči sulfónamidom (79,1 %), tetracyklínu (58,3 %), ampicilínu (54,17 %), trimetropímu (50,0 %) a cefotaxímu (41,7 %). Najvyššia miera citlivosti bola prejavovaná voči antibiotiku azitromycín (95,8 %). Intermediárna rezistencia bola zaznamenaná u 7 druhov látok. Z 24 potvrdených bakteriálnych kmeňov *E. coli* preukázalo až 20 kmeňov rezistenciu voči viacerým druhom antibiotík a chemoterapeutík. Mikrodilučná metóda potvrdila u 3 skúmaných kmeňov *E. coli* produkciu rozšíreného spektra beta-laktamáz (ESBL), ktoré predstavujú v prípade infekcie pre konzumenta hydínového mäsa výrazné nebezpečenstvo.

Výskumom sme potvrdili skutočnosť, že brojlerové kurčatá sú prameňom kmeňov *E. coli*, u ktorých bola potvrdená antimikrobiálna rezistencia voči antibiotikám a chemoterapeutikám. Tento fakt poukazuje na riziko rozvoja zdravotných komplikácií v populácii. Počas spracovania brojlerových kurčiat, u ktorých je potvrdená prítomnosť rezistentných baktérií *E. coli* môže ľahko dôjsť ku prenosu. Rezistentné baktérie môžu kolonizovať humánny

črevný trakt, rozmnožiť sa a vytvoriť nosičov rezistentných mikroorganizmov. Prítomnosť rezistentných baktérií v humánnej populácii prispieva aj ku častejším komplikáciám pri liečbe mnohých infekcií a predĺženiu doby rekonvalescencie. Z národného akčného plánu antimikrobiálnej rezistencie v Slovenskej republike je zrejmé, že spotreba antibiotík v ambulantnej praxi je mierne vyššia v porovnaní s ostatnými krajinami EÚ. Významným problémom na území Slovenskej republiky je predovšetkým rezistencia Gram-negatívnych mikroorganizmov na skupinu penicilínov a cefalosporínov 3. generácie v ambulantnej liečbe. Výsledky európskeho monitoringu potvrdili značný výskyt antimikrobiálnej rezistencie vo veterinárnej praxi proti tetracyklínom a cefalosporínom 3. a vyššej generácie. Taktiež narastá aj riziko kontaminácie životného prostredia, kedy sa rezistentné baktérie môžu šíriť v prostredí farmy alebo bitúnku, čo môže viesť ku kontaminácii pôdy, vody a vzduchu. Slovenská republika sa prihlásila ku projektu One Health, ktorého hlavným cieľom je dohľad nad antimikrobiálnou rezistenciou, spotrebou antimikrobiálnych látok a ich monitorovanie [18]. Je nevyhnutné zaviesť opatrenia vedúce k racionalizácii spotreby antibiotík a skvalitneniu podmienok welfare v chovoch. Antimikrobiálna rezistencia vedie ku zvýšenej morbidite a mortalite zvierat, čo ohrozuje dobré životné podmienky zvierat a ich produktivitu. Tento fakt má výrazný dopad aj na sociálno-ekonomický vplyv a na poľnohospodárstvo krajiny [19].

Limitácie štúdie

Hlavnou limitáciou našej štúdie je obmedzený počet izolátov *E. coli*, ktoré sme mohli získať a analyzovať. Izoláty *E. coli* sme získali z črevného obsahu 42- dňových brojlerových kurčiat (*Gallus gallus spp. domesticus*, hybrid COBB 500) po ich zabití na Katedre hygieny, technológie a zdravotnej bezpečnosti potravín. Výskumná vzorka pochádza z intenzívneho produkčného chovu brojlerových kurčiat, kde sú zvieratá chované v moderných halách s kontrolovaným prostredím. Tento typ chovu umožňuje optimalizovať podmienky pre rýchly rast a zdravie kurčiat, vrátane regulácie teploty, vlhkosti, osvetlenia a ventilácie. Kurčatá boli vybrané náhodne z niekoľkých hál v rámci jednej farmy, ktorá reprezentuje typický produkčný chov brojlerov. Náhodný výber zabezpečuje, že vzorka nie je zaujatá a poskytuje reálny obraz o celkovej populácii chovu. Vzorka je reprezentatívna pre produkčný

chov brojlerových kurčiat v danej geografickej oblasti a podmienkach chovu. Zohľadňuje rôzne faktory, ako sú genetika kurčiat, štandardné postupy výživy a manažmentu chovu, ktoré sú typické pre priemerné produkčné systémy. To zabezpečuje, že výsledky výskumu môžu byť aplikované na podobné chovy v širšom kontexte.

Vzhľadom na obmedzené zdroje a dostupné vzorky sme pracovali s malým počtom izolátov, čo mohlo ovplyvniť reprezentatívnosť našich výsledkov a záverov. Tento nedostatok vzoriek mohol obmedziť našu schopnosť získania komplexného obrazu o rozšírení antimikrobiálnej rezistencie u brojlerových kurčiat a limitovať interpretáciu našich výsledkov. Ďalšie štúdie s väčším počtom izolátov by mohli lepšie identifikovať rozsah a závažnosť tohto fenoménu a umožniť širšie závery ohľadom kontroly antimikrobiálnej rezistencie u brojlerových kurčiat.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] BHUNIA K. A. *Foodborne microbial pathogens mechanisms and pathogenesis*. Second edition. Purdue University USA: Springer Science + Business Media. 2018, 365. ISBN 978-1-4939-7347-7.
- [2] MRÁZ O., SMOLA, J., VAŘEJKA F. *Speciální veterinární mikrobiologie*. Nakladatelství Praha. 1989, 148. ISBN 80-209-0042-X.
- [3] GYLES C.L., PRESCOTT J.F., SONGER G. et al. *Pathogenesis of bacterial infection in animals*. Fourth edition. State Avenue, Iowa, USA : Blackwell Publishing. 2010, 675. Publ. ISBN 978-0-8138-1237-3/2010.
- [4] ASLAM B., WANG W., ASHAD M.I. et al. Antibiotic resistance: A rundown of a global crisis. *Dove Press Journal: Infection and Drug*. 2018; 11: 1645-1658.
- [5] PIPOVÁ M., JEVINOVÁ, P. *Mikrobiológia krmív a potravín pre študijný program Bezpečnosť krmív a potravín*. Univerzita veterinárskeho lekárstva a farmácie v Košiciach. 2011. 113-115. ISBN 978-80-8077-264-2.
- [6] SHARMA N.K., REES C.E., DODD C.E. Development of a single-reaction multiplex PCR toxin typing assay for *Staphylococcus aureus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000; 66 (4): 1347-1353.
- [7] WANG R.F., CAO W.W., CERNIGLIA C.E. PCR detection and quantitation of predominant anaerobic bacteria in human and animal fecal

- samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996; 62 (4): 1242-1247.
- [8] CLSI document M100. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing*. 30th edition. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA: 2020: 32-41.
- [9] RIBEIRO J., SILVA V., MONTEIRO A. et al. Antibiotic resistance among gastrointestinal bacteria in broilers: A review focused on *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli*. *Animals*. 2023; 13 (8): 1362.
- [10] HUSSAIN A., SHAIK S., RANJAN A. et al. Risk of transmission of antimicrobial resistant *Escherichia coli* from commercial broiler and free-range retail chicken in India. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8: 2120.
- [11] KOCÚREKOVÁ T., KARAHUTOVÁ L., BUJŇÁKOVÁ, D. Antimicrobial susceptibility and detection of virulence-associated genes in *Escherichia coli* strains isolated from commercial broilers. *Antibiotics*, 2021; 10 (11): 1303.
- [12] Stav mikrobiálnej rezistencie v Slovenskej republike. *National Focal Point for Efsa. Department of Food Safety and Nutrition Ministry of Agriculture and Rural development of the Slovakia*. 2014; 53.
- [13] MWANSA M., MUKUMA M., MULILO E. et al. Determination of antimicrobial resistance patterns of *Escherichia coli* isolates from farm workers in broiler poultry production and assessment of antibiotic resistance awareness levels among poultry farmers in Lusaka, Zambia. *Frontiers in Public Health*. 2023; 10: 998860.
- [14] KIM W.S., MORISHITA T.Y., DONG F. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* between conventional and organic broiler flocks. *Journal of Applied Poultry Research*. 2021; 30 (2): 100158.
- [15] ABREU R., SEMEDO-LEMSADDEK T., CUNHA E. et al. Antimicrobial drug resistance in poultry production: Current status and innovative strategies for bacterial control. *Microorganisms*. 2023; 11 (4): 953.
- [16] DANESHMAND A., KERMANSHHAI H., SEKHAVATI M.H., et al. Antimicrobial peptide, cLF36, affects performance and intestinal morphology, microflora, junctional proteins, and immune cells in broilers challenged with *E. coli*. *Scientific Reports*, 2019; 9 (1): 14176.
- [17] HUFF W.E., HUFF G.R., RATH N.C., et al. Evaluation of aerosol spray and intramuscular injection of bacteriophage to treat an *Escherichia coli* respiratory infection. *Poultry Science*, 2003; 82 (7): 1108-1112.
- [18] Úradný vestník Európskej únie. *Odporúčanie rady na urýchlenie opatrení EÚ v boji proti antimikrobiálnej rezistencii v zmysle prístupu „jedno zdravie“*. Rada Európskej únie. 2023; 20 pp.
- [19] Národný akčný plán antimikrobiálnej rezistencie v Slovenskej republike na obdobie rokov 2019-2021. *Ministerstvo pôdohospodárstva a rozvoja vidieka Slovenskej republiky. Ministerstvo zdravotníctva Slovenskej republiky*. 2021; 29 pp.