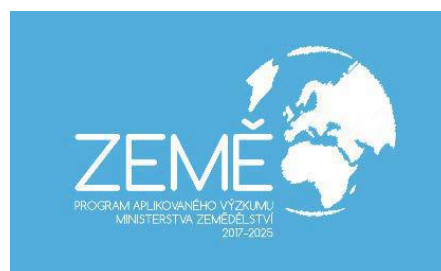


*Aktivní monitoring závažných klonů Escherichia coli v
rodičovských chovech, líhních a užitkových chovech
masné drůbeže*



prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. a kol.
Veterinární univerzita Brno
Prosinec 2024

Metodika schválená Státní veterinární správou ČR



QK22020066-V3

Aktivní monitoring závažných klonů *Escherichia coli* v rodičovských chovech, líhních a užitkových chovech masné drůbeže

(typ výsledku „NmetS“ – Metodika)

Zpracovali:

Alois Čížek¹, Aneta Papoušková¹, Kateřina Nedbalcová², David Šenk¹

1 – Veterinární univerzita Brno

2 – Výzkumný ústav Veterinárního lékařství, v. v. i.

ISBN 978-80-7305-976-7

Vydáno prosinec 2024

Vydavatel:

Veterinární univerzitu Brno

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

<https://www.vetuni.cz/o-univerzite/vyzkum-vyvoj-rozvoj/vyzkumne-projekty/nazv>

1. Vydání 2024

ISBN 978-80-7305-976-7

Podíl autorů na tvorbě metodiky:

prof. MVDr. Alois Čížek, CSc. – podíl 40 %

MVDr. Aneta Papoušková, Ph.D. – podíl 30 %

MVDr. Kateřina Nedbalcová, Ph.D. – podíl 10 %

MVDr. David Šenk, Ph.D. – podíl 20 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) Odborník z daného oboru: doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA; Státní veterinární ústav Olomouc

2) Pracovník státní veterinární správy: MVDr. Tomáš Jarosil, ředitel odboru ochrany zdraví a pohody zvířat, Ústřední veterinární správa SVS, Praha

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK22020066 s názvem: „Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice“ s finanční podporou NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

**Aktivní monitoring závažných klonů *Escherichia coli* v rodičovských chovech,
líhních a užitkových chovech masné drůbeže**

Metodika schválená Státní veterinární správou ČR

V Brně dne 12. prosince 2024

OBSAH

1. CÍL METODIKY	5
2. VLASTNÍ POPIS METODIKY	5
2. 1 Úvod a současný stav problematiky.....	5
2. 1. 1 Epizootologie a přenos APEC produkčním řetězcem	5
2. 1. 2 Drůbež jako zdroj zoonotických kmenů <i>E. coli</i>	6
2. 1. 3 Drůbež jako zdroj AmpC/ESBL-produkujících <i>E. coli</i> a jiných rezistentních kmenů	7
2. 2 Vlastní výzkum, vývoj a ověření metodických postupů	7
2. 2. 1 Druhy vzorků z různých stupňů produkčního řetězce	7
2. 2. 2 Postup laboratorního vyšetření	10
2. 2. 2. 1 Kultivační vyšetření a identifikace získaných kultur	10
2. 2. 2. 2 Stanovení citlivosti vůči antimikrobikům	12
2. 2. 2. 3 Výběr izolátů k podrobné celogenomové analýze (WGS)	12
2. 2. 2. 4 Vyhodnocení dat z WGS	16
2. 2. 2. 5 Identifikace potenciálně rizikových genotypů	17
2. 2. 2. 6 Stanovení rizika onemocnění	18
3. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“	18
4. POPIS UPLATNĚNÍ METODIKY	18
5. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	18
6. SEZNAM SOUVISEJÍCÍ POUŽITÉ LITERATURY.....	18
7. PUBLIKACE PŘEDCHÁZEJÍCÍ METODICE.....	21
8. JMÉNA Oponentů a názvy jejich organizací.....	22
9. DEDIKACE.....	22
10. OBRAZOVÁ PŘÍLOHA	23

1. Cíl metodiky

Metodika je určena orgánům SVS, pracovníkům SVÚ, specialistům na choroby drůbeže a chovatelům drůbeže, kterým má umožnit aktivní sledování výskytu epizootologicky a epidemiologicky závažných klonů *E. coli* v produkční pyramidě masné drůbeže. Znalost výskytu takových klonů v chovech a líhních je důležitým předpokladem pro realizaci preventivních a profylaktických programů tlumení ekonomicky závažných koliinfekcí masné drůbeže a omezování výskytu klonů *E. coli* s epidemiologicky významnými profily antibiotické rezistence u jatečné drůbeže.

2. Vlastní popis metodiky

2. 1 Úvod a současný stav problematiky

Komerční konzumní drůbež je produkována vysoce integrovaným systémem, jehož jednotlivé úrovně jsou úzce provázány. Vlastní produkční chovy lokálního charakteru jsou prostřednictvím líhní a rodičovských chovů spojeny s mezinárodními prarodičovskými a šlechtitelskými chovy. Tento propojený systém umožňuje sice vysoce efektivní produkci drůbežního masa, ale je spojen také s celou řadou problémů týkajících se welfare, infekčního tlaku a s tím souvisejícího používání antibiotik. Nejkomplikovanější a ekonomicky nejvíce devastující problematiku představují oportunní infekční agens, mezi nimiž zaujímá první místo *Escherichia coli*. Tato vysoce variabilní bakterie je běžným komenzálem střeva, ale za určitých okolností způsobuje ranou mortalitu vylíhnutých kuřat, respirační a systémové infekce brojlerů, septikémie a peritonitidy nosnic, podkožní infekce znehodnocující jatečná těla a některé další specifické formy infekce (Nolan et al., 2013). Kmeny asociované s infekcemi drůbeže se označují jako APEC a patří mezi tzv. extraintestinální patogenní kmeny (ExPEC). Extraintestinální *E. coli* není determinována jedním určitým setem faktorů virulence (Guabiraba et Schouler, 2015), naopak, mozaikovitá struktura genomu *E. coli* je příčinou, proč se geny virulence mohou nacházet i u komenzálních kmenů, aniž by se bez příslušného genetického kontextu – zapojení dalších faktorů virulence – jako takové projevovaly. Rozdíl mezi patogeny a komenzály by tedy v tomto případě nebyl dán ani tolik přítomností či nepřítomností určitého VF, jako spíš zapojením mnoha VF do správného kontextu, mírou adaptace kmene na přežití v extraintestinálním prostředí. Zatímco dříve se diskuze točila okolo konstatování extrémní diverzity těchto izolátů a jejich asociací s určitými znaky, jako přítomnost plazmidů ColV, příslušnost k určitým fylogenetickým skupinám nebo určitým séroskupinám, přičemž žádný z těchto znaků nestačil k vysvětlení genetického podkladu virulence a k definici patotypu APEC, převládá nyní názor, že virulentní APEC jsou reprezentovány několika liniemi se specifickým genotypem, a to zejména ST95/140, ST429 (B2), ST117 (G) a ST23/88 (C) (Mehat et al., 2021), ale není vyloučen výskyt jiných, méně typických nebo nových rizikových genotypů. Tyto linie mohou nesenou variabilní kombinaci faktorů virulence

primárně adaptovány na drůbež

přítomnost plazmidů ColV

2. 1. 1 Epizootologie a přenos APEC produkčním řetězcem

Nezbytným předpokladem vytvoření systému monitoringu a kontroly je porozumění možným cestám přenosu těchto bakterií v celém produkčním řetězci. Komerční drůbež je produkována několika-stupňovým systémem, který lze přirovnat k pyramidě, a nazývá se proto produkční pyramidou nebo produkčním řetězcem. Na vrcholu se nachází chovní jedinci čistých linií, kteří se mezi sebou kříží a plodí tzv. prarodičovské a prarodičovské linie. Trh jimi zásobuje jen několik světových producentů. Prarodičovské linie plodí rodiče, jejichž potomstvem jsou produkční hybridy – masní brojleři.

Rodičovské chovy produkují násadová vejce, která se zpravidla inkubují v komerčních líhních. Odtud jsou jednodenní kuřata převážena do chovů k výkrmu, který trvá obvykle 35 - 42 dnů. Výkrmy brojlerů představují užítkové chovy a tvoří základnu produkční pyramidy.

Komerční líhně pak tvoří důležitý uzel, kde se setkávají násadová vejce z různých rodičovských chovů; přestože vejce z jednoho rodičovského chovu se obvykle líhnou v oddělených inkubátorech, je nutná přísná biosekurita, aby nedocházelo ke zkřížené kontaminaci. Později se kuřata z dolíhňových boxů spojují do větších skupin a jsou přepravována společně.

V rámci produkčního řetězce sledujeme dva směry přenosu: vertikální a horizontální (Dame-Korevaar et al., 2019). Vertikálním přenosem v pravém slova smyslu rozumíme přenos patogenu z infikovaných pohlavních cest nosnice na embryo a je typický např. pro salmonely nebo mykoplazmata. Přítomnost stejného klonu *E. coli* v rodičovském chovu a u potomstva byla popsána opakovaně; např. Poulsen et al. (2017) identifikovali tentýž klon APEC ST95 jako hlavní příčinu chronické salpingitidy v hejnu nosnic i zvýšené mortality vylíhlých kuřat v prvním týdnu, a zároveň jej izolovali z prostředí líhně. Bakterie se mohou nacházet v obsahu vejce, aniž by způsobily úhyn embrya, avšak jejich záchyt je relativně nízký a předpokládá se, že pravý vertikální přenos nemá tak zásadní význam v přenosu *E. coli* z RCH na potomstvo jako tzv. pseudovertikální přenos, kdy je zdrojem fekální nebo environmentální kontaminace skořápky (Dame-Korevaar et al., 2019). Na povrchu skořápky bakterie obecně dlouho nepřežívají a jejich záchyt ze stěrů skořápky je velmi nízký, mohou však být izolovány z rozdrčených skořápek a předpokládá se, že v pórech skořápky mohou úspěšně přežít dezinfekční proces (Mezhoud et al., 2016; Projahn et al., 2017). Proto význam nesprávného skladování, umožňující nasávání bakterií póry skořápky, inkubace kontaminovaných vajec z podestýlky a nevčasné ošetření násadových vajec je naprosto kritické pro snížení mikrobiologické zátěže ještě na úrovni rodičovského chovu.

V prostředí líhně, ve skořápkách, prachu i na povrchu dopravních pásů, což jsou místa riziková z hlediska zkřížené kontaminace vajec z různých RCH, mohou být izolovány ESBL/AmpC *E. coli* i potenciální APEC (Zhao et al., 2019). Těsně po vylíhnutí je většina kuřat ještě kultivačně negativní, v prvních hodinách však dochází k masivní kolonizaci bakteriemi z prostředí a do produkčního chovu přicházejí kuřata již kolonizována (Laube et al., 2013; Projahn et al., 2017); intenzitu a charakter mikrobiální zátěže tedy ovlivňuje technologická kvalita kuřat a přítomnost bakterií v dolíhni, respektive skladba této environmentální populace. Je důležité, že zatímco rizikové kmeny mohou tvořit minoritní podíl této environmentální populace, zároveň mohou být extrémně efektivní kolonizátoři nechráněného střeva komerčně produkovaných kuřat a na nejnížší úrovni produkční pyramidy převládnout a podílet se na zvýšené mortalitě nebo způsobovat akutní infekce, zejména pokud se přidají další predispoziční faktory.

Na úrovni produkčního chovu dochází k dynamické obměně majoritních klonů, která pravděpodobně souvisí se zráním střevní mikroflóry kuřat a dalšími faktory (Kemmet et al., 2014). Střevo je primárním rezervoárem rizikových klonů a zdrojem kontaminace prostředí, k infekci dochází především inhalací prachu nebo poraněnou kůží. Nákazová situace v chovu je dána interakcí konkrétních predispozičních faktorů a infekčního tlaku. Rizikové klony se šíří i mezi chovy na daném území, podobně jako v líhni i zde lze předpokládat současnou perzistenci a (re)introdukcí klonů (Ronco et al., 2017; Projahn et al., 2017). Sledování cirkulace rizikových klonů a jejich vertikálního i horizontálního přenosu mezi chovy má vést k ozřejmění epizootologické situace na našem území.

2. 1. 2 Drůbež jako zdroj zoonotických kmenů *E. coli*

Drůbeží maso se vyznačuje relativně vysokou mírou bakteriální kontaminace, přičemž nezanedbatelný podíl tvoří potenciálně rizikové kmeny, ať už ESBL/AmpC nebo APEC/ExPEC (Mitchell et al., 2015). Manipulace s drůbežími produkty proto představuje možnou cestu kolonizace člověka. Zoonotický potenciál APEC je dlouhou dobu předmětem diskuzí. APEC a humánní UPEC (uropatogenní), NMEC (neonatální meningitidy) patří do stejné skupiny ExPEC, vyznačují se podobnými, i když ne zcela

totožnými virulenčními mechanismy a často se jedná o stejné ST. Ačkoli patogenní kmeny mají zřejmě tendenci se adaptovat na svého hostitele, některé významné sublinie, charakterizované sdílenými faktory virulence a určitými plazmidovými liniemi, vykazují menší míru specifity a jsou hojně sdíleny lidskou a drůbeží populací; příkladně se jedná o známé či emergentní epidemické linie ST95, ST58 a ST131:H22 (Cummins et al., 2022; Reid et al., 2022). Především ST131, v současnosti nejvýznamnější epidemický klon ExPEC u člověka, je předmětem studia jako možný původce urogenitálních infekcí získaných z potravin (tzv. FUTI) (Liu et al., 2018). Přestože význam FUTI zůstává hypotetický, význam masivního produkčního systému drůbeže jako zdroje potenciálně patogenních kmenů podceňovat nelze.

2. 1. 3 Drůbež jako zdroj AmpC/ESBL-produkujících *E. coli* a jiných rezistentních kmenů

Bez ohledu na přímý zoonotický potenciál kmenů APEC je u drůbeže popisován hojný výskyt multirezistentních kmenů *E. coli* a kmenů s epidemiologicky významným rezistenčním fenotypem, v první řadě s produkcí ESBL/pAmpC betalaktamáz. Kontaminace jatečných produktů může být zdrojem introdukce (nebo reintrodukce) těchto kmenů, respektive genetických elementů do lidské populace. Prevalence rezistentních kmenů a míra rezistence souvisí s používáním antibiotik v celém produkčním řetězci a rezistentní kmeny se vyskytují i v chovech, kde se aktuálně antibiotika nepoužívají, neboť mohou být introdukovány vertikálním přenosem s rodičovských a prarodičovských chovů (Byrne et al., 2022). Zároveň může docházet k horizontálnímu přenosu mezi zvířaty a pracovníky a perzistentní cirkulaci kmenů na farmách (Dame-Korevaar, 2019). Zdrojem zkřížené kontaminace v líhních mohou být bakterie přežívající ve skořápkách, jak bylo zmíněno výše (Projahn et al., 2017). Kmeny *E. coli* rezistentní k vyšším generacím cefalosporinů u drůbeže nejčastěji produkují betalaktamázy CMY-2, CTX-M-1 a CTX-M-55, přičemž klíčovou roli v přenosu těchto genů hrají plazmidy (I1, B/O/K/Z aj.), které cirkulují mezi různými komenzálními a oportunně patogenními kmeny v chovu, ale mohou se přenášet také vertikálně (Ewers et al., 2021). ESBL/pAmpC-betalaktamázy jsou produkovány některými významnými rizikovými liniemi (např. ST131), mohou se vyskytovat u virulentních APEC a/nebo potenciálně zoonotických kmenů, ale cirkulují zejména mezi velice variabilní populací komenzálních kmenů; jejich výskyt je epidemiologicky vždy významný, neboť komenzální populace je neustálým zdrojem genetické variability pro potenciální rizikové linie *E. coli*.

2. 2 Vlastní výzkum, vývoj a ověření metodických postupů

Důležitým základem pro ověření metodických postupů byly experimentální části dvou doktorských disertačních prací (Šenk, D. Diagnostika, terapie, prevence a profylaxe kolinfekcí drůbeže. Disertační práce, FVL VETUNI 2023, 114 s.; Papoušková, A. Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli* z drůbeže. Disertační práce, FVL VETUNI 2023, 160 s.) a několika souvisejících publikací (Papoušková et al., 2020; Papoušková a Čížek, 2020; Šenk et al., 2022).

2. 2. 1 Druhy vzorků, postup jejich odběru, uchování a transportu do laboratoře

Druhy vzorků z různých stupňů produkčního řetězce

1. **rodičovské chovy** – vzorky získané při veterinárně-hygienickém dozoru (během přejímky jednodenních kuřat, při pitvě uhynulých a utracených jedinců, vzorky prostředí chovů)
2. **líhně** – vzorky skořápek z boxů dolíhni podle původu násadových vajec
3. **vzorky z užitkových chovů** získané při veterinárně-hygienickém dozoru (vzorky z jednodenních kuřat při zdravotní přejímce, při pitvě uhynulých a utracených jedinců, vzorky prostředí chovů)

4. vzorky z konečného produktu (např. vzorky slepých střev poražených bojlerů, vzorky kůže jatečně opracovaných těl)

ad. 1) Jelikož *E. coli* běžně kolonizuje lumen střeva je pro metodicky správný odběr vzorků z klinicky nemocných zvířat důležité se ptát, kdy a jak odebírat vzorky, aby bylo možné zachytit a potvrdit výskyt APEC. Již během přejímky jednodenních kuřat a veterinární kontrole lze odebrat stěry z viscerálních orgánů s PA nálezem (koliformní omfalitidy a perihepatitidy) viz obrázky v obrazové příloze. Diagnostika kolisepsi v průběhu dalšího odchovu je založená na získání vzorů z lézí typických pro kolibacilózu (obrázky č.). Pečlivý odběr vzorků je důležitým předpokladem pro zabránění nežádoucí fekální kontaminace vzorků komenzálními kmeny *E. coli* z GIT, která komplikuje pozdější typizaci původce, stejně jako detekci faktorů virulence metodou PCR. Vždy je tedy nezbytné rozlišit, zdali se jedná o APEC nebo běžnou komenzální *E. coli*. Vzorky by měly být odebrány co nejdříve po úhynu či eutanázii z postižených viscerálních orgánů. Pokud to nelze zajistit, je možné uhynulé kusy zamrazit. Z čerstvých nebo mražených kadáverů je vhodnou tkání pro izolaci perikardiální dutiny, játra nebo slezina z jedinců s výskytem subakutních lézí (*pericarditis*, *perihepatitis*, *aerosaculitis*, atd.). Poměrně snadné je získat kulturu *E. coli* z kostní dřevě, která je obvykle prostá kontaminace. Mozek je dalším vhodným místem k odběru vzorků, ale je hůře přístupný než kostní dřevě (viz obrázek č. 1).

Každý odběr vzorků by měl být prováděn s maximální opatrností tak, aby se sterilní odběrový tampon nekontaminoval nevhodnou manipulací. Předchozí sterilizace povrchu viscerálních orgánů horkým kovovým předmětem (např. skalpel) omezí kontaminaci povrchu vzorkovaného orgánu. U mladých ptáků je vhodné provést povrchovou dezinfekci těla a následně pečlivě a rychle stažení kůže dříve, než bude proveden odběr z vnitřních orgánů. Přechodné uložení odebraných stěrů a jejich přeprava do laboratoře je nutná v transportním médiu, pokud možno v izotermickém boxu při teplotě + 4 až 8 °C s následným bezprostředním odesláním do laboratoře (Šenk, 2023).

Odběr vzorků z prostředí se může prakticky lišit v závislosti na věkové kategorii chované drůbeže a technologii ustájení. Na úrovni farem bývá před zahájením každého zástavu na halách provedena kontrola účinnosti dezinfekce, kdy je terénním veterinárním lékařem odebráno nejméně 20 ks stěrů z prostředí a technologie hal pro stanovení celkového počtu mikroorganismů (počet KTJ/cm²). Z hlediska monitoringu závažných klonů *E. coli* (APEC, ESBL/pAmpC pozitivní *E. coli*) je však důležité vytvořit pravidelný systém odběru vzorků také v průběhu vlastního chovu. Nejčastějším typem vzorků jsou „boot swabs“ - tamponové nášlapy, vzorky prachu z prostředí hal a ventilátorů (25 gramů prachu/vzorek) nebo bakteriologické stěry (tampóny s transportním médiem, houbičky v pufrované peptonové vodě – např. vzorkovací houbičky „3M™ Hydrated Sponge“) z napájecího systému, hnízd, klecí, roštů a podobně. Odběrová místa je vhodné průběžně měnit podle plánu vzorkování, aby bylo dosaženo náhodného vzorkování a bylo možné odběrová místa dokumentovat v situačním plánu. Cílem odběru je zaměřit se na těžce přístupná a špatně čistitelná místa. To umožní zvýšit pravděpodobnost pozitivního zachytu v rámci programu pravidelného odběru vzorků. Doporučená frekvence testování je odběr vzorků z každého hejna v intervalech 10 týdnů. Proškolená osoba pro odběr vzorků musí být vybavena jednorázovým oblekem (*overall*), čistou obuví s jednorázovými návleky, jednorázovými rukavicemi a respirátorem. Takto odebrané vzorky je nutné vybavit žádankou předepsanou diagnostickou laboratoří a odeslat do 24hodin expresní zásilkovou službou nebo svoznou linkou k vyšetření.

ad 2) Z praktického pohledu můžeme provoz líhně rozdělit do pěti částí: oddělení manipulace s násadovými vejci, prostory k inkubaci, přesun násadových vajec, dolíheň (líhnutí kuřat) a oddělení manipulace s kuřaty. Každá z těchto částí představuje riziko z hlediska biologické bezpečnosti a vyžaduje adekvátní kontrolu. Zvláštní pozornost by tedy měla být věnována výběru vhodné metody odběru vzorků a definování kritických oblastí provozu.

Nejčastějším typem vzorků jsou papírové podložky, bakteriologické stěry z prostředí a dopravníků, uhynulá kuřata, vejce, odpadní voda anebo prach (chmýří vylíhnutých kuřat, úlomky skořápek,

prachové částice). Důležitou otázkou je i frekvence odběru vzorků v průběhu intenzivního a často kontinuálního provozu líhně. Produkční kapacita líhní v dnešní době vzrostla ze 100 000 – 500 000 kuřat za týden, až na 2-3 milióny kuřat vylíhnutých za týden. Proto u líhní s nižší kapacitou a nízkou intenzitou líhnutí odebíráme vzorky každé 2 týdny, u aktivních líhní 1 x za týden a u líhní s využitím maximální kapacity a intenzivním líhnutím z každého oddělení po dokončení inkubace. Vlastní provedení odběru vzorků z prostředí vyžaduje získání 5 různých typů vzorků z těchto doporučených oblastí: stěry z proložek dovezených násadových vajec, stěry z pásů dopravníku, stěry po umytí a dezinfekci předlíhně/dolíhně, stěry nebo prach ze vzduchotechniky (ventilátor, potrubí, prašné komory), vzorky skořápek z dolíhni podle původu násadových vajec, stěry z dopravníků a míst kde dochází k míchání kuřat z různých rodičovských chovů a v neposlední řadě vzorky odpadní vody (Šenk, 2023).

ad 3) vzorky z užitkových chovů se získávají za stejných podmínek jako v rodičovských chovech, tj. při veterinárně-hygienickém dozoru (vzorky z jednodenních kuřat při zdravotní přejímce, při pitvě uhynulých a utracených jedinců, vzorky prostředí chovných hal).

ad 4) vzorky z konečného produktu, tj. jatečných brojlerů lze využít ke kontrole úrovně kolonizace jejich střeva a kůže (např. vzorky slepých střev, vzorky kůže krku jatečně opracovaných těl). Tento způsob odběru vzorků z jatečné drůbeže veterinární služba běžně využívá k monitoringu původců alimentárních infekcí člověka (např. salmonely, kampylobaktery) (Nařízení komise EU 2017/1495) a je použitelný i k hodnocení prevalence *E. coli* s epidemiologicky významnými profily antibiotické rezistence. Obdobné vzorkování vyřazených nosnic může poskytnout přehled o výskytu hledaných bakterií v rodičovských chovech.

Počet vzorků vs. početnost hejna

Diagnostický odběr vzorků by měl být proveden v akutní fázi infekce, tedy v době, kdy jsou pozorovány klinické příznaky onemocnění. V případech podezření z infekce je vhodným přístupem odebrat vzorky primárně z postižených zvířat a z prostředí haly kde je drůbež ustájena (včetně vybavení haly) a paralelně také ze zdravých zvířat z jiného hejna nebo haly (včetně prostředí a vybavení). Porovnání výsledů vyšetření může usnadnit diagnostiku (Holm et al., 2019).

Pro výpočet počtu odebraných vzorků bylo vytvořeno několik statistických vzorců. Tyto statistické programy přihlížejí k hodnotě prevalence (označuje podíl počtu jedinců trpících danou nemocí k počtu všech jedinců ve sledované populaci, vztahuje se k určitému časovému okamžiku a obvykle se vyjadřuje v procentech), zohledňují dále interval spolehlivosti obvykle 95 % nebo 99 % (použijeme-li konfidenční hladinu 95 %, znamená to, že změříme-li 100 nezávislých datových souborů, na nichž odhadujeme neznámý parametr intervalem spolehlivosti, tak zhruba 95 intervalů bude hledaný parametr obsahovat a zhruba pět nikoli) a počítají s velikostí populace, která má být testovaná. Tyto parametry nám umožní výpočet celkového počtu odebraných vzorků.

Pokud tedy testujeme farmu, na které předpokládáme, že výskyt infekčního onemocnění bude mít prevalenci 10-40 % můžeme pro výpočet počtu požadovaných vzorků použít přiloženou tabulku č. 1 (Mateu and Casal, 2003). Pro farmu s velikostí hejna 10 000 slepic, s očekávanou prevalencí 10 % a intervalem spolehlivosti 95 % (5% riziko) pak bude požadovaný počet vzorků k detekci onemocnění 29. V praxi je tedy důležité vybalancovat dodržování doporučeného počtu odebraných vzorků pro získání spolehlivých výsledků v rámci provedené depistáže na úrovni hejna.

Tabulka č. 1 Požadovaný počet vzorků pro diagnostiku onemocnění u nekonečné populace s očekávanou prevalencí (interval spolehlivosti 99 % a 95 %)

Očekávaná prevalence	Interval spolehlivosti (riziko)	
	1 %	5 %
0.001 %	460 515	299 572
0.01 %	46 050	29 956
0.05 %	9 209	5 990
0.1 %	4 603	2 995
0.2 %	2 301	1 497
0.4 %	1 149	748
0.5 %	919	598
1 %	459	299
2 %	228	149
5 %	90	59
10 %	44	29
20 %	21	15
50 %	7	5

Upraveno podle Mateu and Casal (2003)

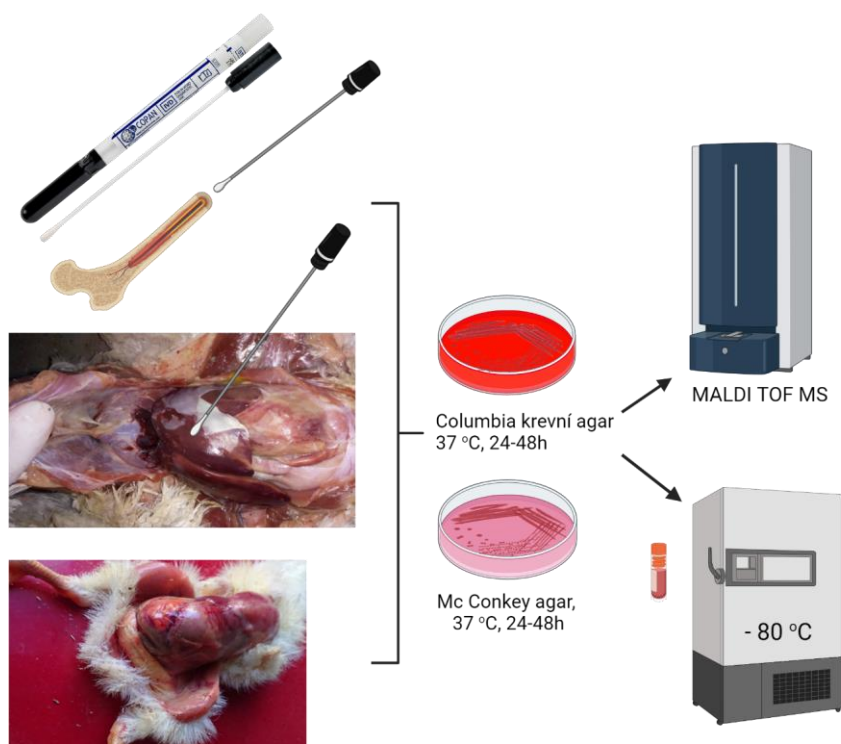
2. 2. 2 Postup laboratorního vyšetření

2. 2. 2. 1 Kultivační vyšetření a identifikace získaných kultur

Vzorky z klinických případů koliinfekcí

Vzorky se kultivují přímo na Mc Conkey agar (MCA) bez antibiotik a Columbia krevní agar. Po inkubaci při 37 °C po dobu 18-24 hodin hodnotíme růst. Po subkultivaci čisté kultury identifikujeme hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF. Identifikované kultury jsou přeočkovány na MPKA a následně zamrazeny v kryoprotektivním médiu při -80 °C (schéma č. 1).

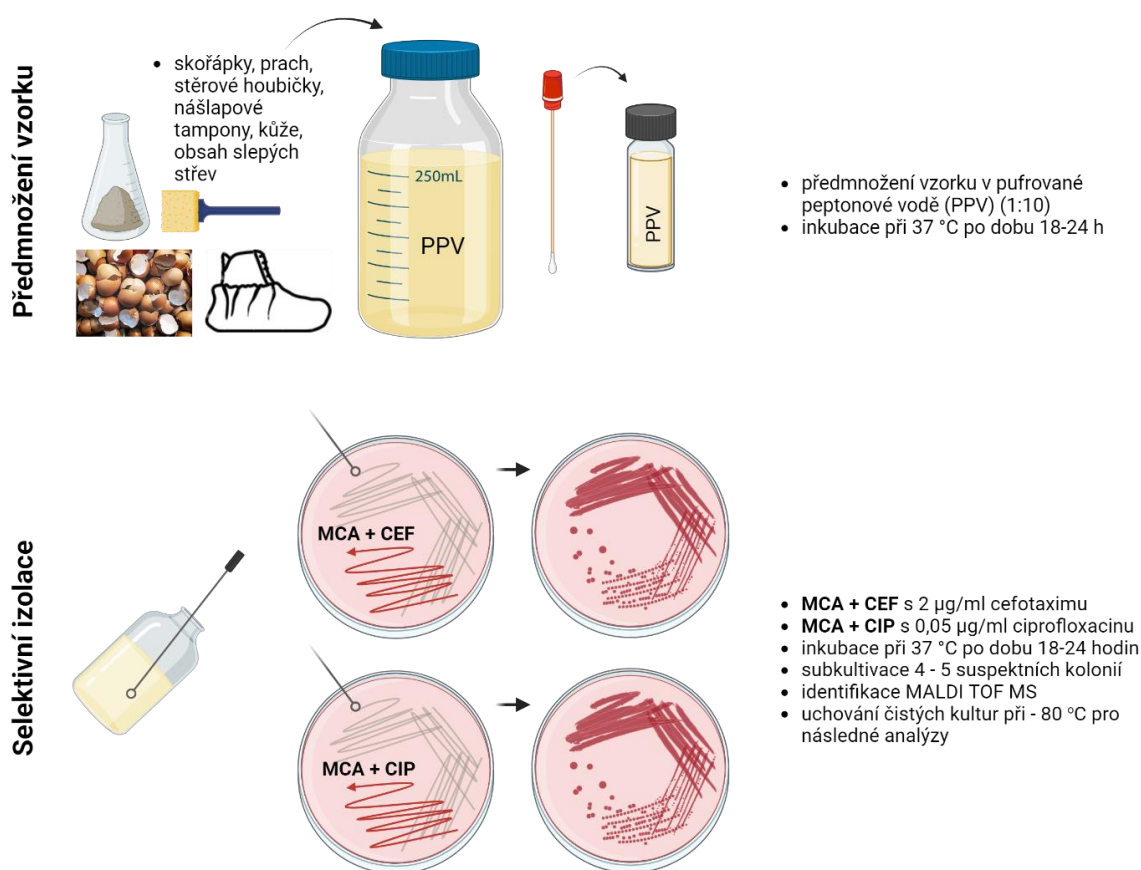
Schéma č. 1. Schéma přímé kultivace vzorků sekčního materiálu z případů koliinfekcí (vytvořeno programem BioRender)



Vzorky prostředí

Prvním krokem je pomnožení vzorku v neselektivním médiu v poměru 1:10; stěrové houbičky lze inkubovat v plastovém sáčku se 100 ml pufrované peptonové vody (PPV). Odebrané vzorky skořápek, nášlapových tamponů a prachu v laboratoři za aseptických podmínek odvážíme na laboratorních předvážkách; cca 25 g vzorku do 225 ml PPV nebo v obdobném poměru podle hmotnosti vzorku. Po inkubaci při 37 °C přibližně 18 hodin 10 µl jednorázovou inokulační kličkou očkujeme na 3 různá média: i) standardní MCA (Oxoid, Velká Británie); ii) MCA s 0,05 µg/ml ciprofloxacinu (MCA + CIP); iii) MCA s 2 µg/ml cefotaximu (MCA + CEF) (schéma č. 2). Selektivní média se používají pro zvýšení šance záchytu kmenů rezistentních k fluorochinolonům a třetí generaci cefalosporinů. Po inkubaci (při 37 °C po dobu 18-24 hodin) hodnotíme růst. Z misek s převahou typických laktóza-pozitivních kolonií (jasně růžová barva, růžový precipitát v okolí) jsou odebrány obvykle 4 izolované kolonie, pokud možno s mírně odlišnou morfologií (růstová fáze, konzistence, okraje) a kultivovány na MCA bez antibiotik. Z misek, kde je nárůst chabý, odebíráme úměrně méně kolonií. Původní vzorky pomnožené v peptonové vodě lze uchovat zamražením po přidavku 10 objemových % glycerinu. Následující den je hodnocena čistota kultur *E. coli* a případně se pokračuje s další subkulturací. Získané čisté kultury se identifikují hmotnostním spektrometrem MALDI-TOF.

Schéma č. 2 Schéma vyšetření vzorků z prostředí chovu, líhní, jatečně opracovaných brojlerů (vytvořeno programem BioRender)



2. 2. 2. 2 Stanovení citlivosti vůči antimikrobikům

Základní analýza diverzity izolátů se opírá o určení profilu antibiotické rezistence a osmi vybraných genů virulence.

Citlivost k antimikrobiálním látkám je testována diskovou difúzní metodou. Bakteriální suspenze o zákalu 0,5 °McFarlanda je 100 x naředěna na koncentraci cca 10⁶ CFU/ml a inokulována na povrch M-H agaru. Antibiotické disky aplikujeme raznicí. Odečtení inhibičních zón následuje po inkubaci při 37 °C po dobu 24 hodin. Průměry inhibičních zón a „breakpointy“ podle standardů udávaných CLSI (2020) včetně koncentrace látek v discích uvádí tabulka č. 2.

Uchování izolátů

Identifikované kultury doplněné o antibiogram lze přeočkovat na MPKA a následně zamrazit v kryoprotektivním médiu při -80°C. Takto jsou izoláty uchovány pro další charakterizaci a následný výběr pro celogenomové sekvenování.

Tabulka č. 2 Použitá antibiotika a hraniční inhibiční zóny pro interpretaci výsledků

Zkratka	Název	Množství antibiotika v disku (µg)	Průměr inhibiční zóny (mm)		
			Citlivý	Intermediární	Rezistentní
AMP	Ampicilin	10	≥ 17	14 - 16	≤ 13
AMC	Amoxicilin- klavulanát	20/10	≥ 18	14 - 17	≤ 13
KF	Cefalotin	30	≥ 18	15 - 17	≤ 14
S3	Sulfonamidy	250 - 300	≥ 17	13 - 16	≤ 12
CN	Gentamicin	10	≥ 15	13 - 14	≤ 12
NA	Nalidixinová kyselina	30	≥ 19	14 - 18	≤ 13
SXT	Sulfametoxazol- trimetoprim	1,25/23,75	≥ 16	11-15	≤ 10
TET	Tetracyklin	30	≥ 15	12-14	≤ 11
C	Chloramfenikol	30	≥ 18	13 - 17	≤ 12
CIP	Ciprofloxacin	5	≥ 21	16 - 20	≤ 15

2. 2. 2. 3 Výběr izolátů k podrobné celogenomové analýze

Cílem monitoringu je zachyt co největší diverzity potenciálně rizikových klonů *E. coli* na sledovaných úrovních produkční pyramidy. K jejich identifikaci je však nutné zapojení pokročilejších typizačních metod. Epidemiologicky nejhodnotnějším údajem je ST, sekvenční typ (metoda MLST). Celogenomová analýza nabízí komplexní charakteristiku kmene včetně údajů o ST, sérotypu, přítomnosti plazmidových replikonů a jiných mobilních genetických elementů, virulenčních a rezistenčních genů včetně odhadu fenotypu. Tato metoda je již cenově srovnatelná s tradiční MLST a vývoj směřuje k jejímu širokému zapojení v monitoringu epidemiologicky významných infekčních agens. Výběr na základě jednoduché preliminární laboratorní charakterizace musí a) efektivně zachycovat známé rizikové genotypy, b) umožňovat rozpoznání nových potenciálně rizikových genotypů, c) pokud možno nezkrusovat celkový obraz epidemiologické situace.

Fenotypový profil antibiotické rezistence

V rámci základní charakterizace provádíme testování citlivosti k vybranému profilu antimikrobiálních látek, zahrnující betalaktamy (ampicilin, amoxicilin-klavulanát, ceftazidim), aminoglykosidy (gentamicin), tetracykliny (tetracyklin), amfenikoly (chloramfenikol, florfenikol), sulfonamidy,

potencované sulfonamidy, chinolony (kyselina nalidixová, ciprofloxacin). Postup diskové difúzní metody a její vyhodnocení se odvíjí od aktuálních referenčních dokumentů CLSI (CLSI, 2020). Signifikantní výsledky jsou:

- ✓ Rezistence k ceftazidimu jako kritérium pro záchyt kmenů produkujících ESBL/AmpC nebo jiný typ významných betalaktamáz. Tyto kmeny testujeme na přítomnost ESBL metodou DDST (Double-Disc Synergy Test) dle CLSI
- ✓ Rezistence ke 3 a více skupinám AML je kritérium pro tzv. multirezistenci
- ✓ Shodný profil rezistenčního fenotypu u izolátů ze vzorků stejného původu slouží k hrubé selekci pravděpodobně totožných kmenů

Detekce vybraného profilu VAGs (genů asociovaných s virulencí) metodou PCR

Cílem tohoto kroku je záchyt kmenů, které mohou představovat potenciální extraintestinální patogeny drůbeže a člověka. Byla popsána řada genů, jejichž přítomnost koreluje se schopností kmene vyvolávat onemocnění, nikoli však konkrétní rozhodující genetický marker patotypu; jde spíše o přítomnost většího počtu VAGs ve vhodné kombinaci, která se může u různých kmenů lišit. Tyto geny jsou zpravidla asociovány s chromozomálními ostrovy patogenity (PAI) nebo virulenčními oblastmi na plazmidech typu ColV. V literatuře jsou popsány metody multiplex PCR zaměřené na přítomnost typických plazmidových genů (Johnson et al., 2008) nebo kombinaci plazmidových a chromozomálních kmenů (Ewers et al., 2005). Při současném stavu znalostí žádná omezená kombinace VAGs neumožňuje absolutní rozlišení mezi patogenním a nepatogenním kmenem. My jsme do metodiky zvolili vlastní kombinaci 8 chromozomálních a plazmidových VAGs a selekční kritérium 5 a více těchto přítomných genů. Tak můžeme usuzovat jednak na pravděpodobnou přítomnost plazmidového PAI nebo jeho části (*iroN*, *iss*, *iutA*, *ompT*, *cvaC*, *tsh*) nebo na příslušnost k fylogenetickým skupinám blízkým skupině B2, které jsou rizikové z hlediska extraintestinální patogenity (*frz*, *felA*). Tuto metodu lze snadno modifikovat zapojením dalších genů nebo jejich částečnou obměnou (např. *fyuA/irp2*, *hlyF* aj.). Tímto způsobem lze zachytit i nové rizikové genotypy.

Geny zde navrhované zahrnují VAGs typicky asociované s plazmidy typu ColV, které jsou význačným rysem kmenů *E. coli* s adaptací na drůbež. Tyto geny se dle naší zkušenosti vyskytují velmi hojně napříč fylogenetickým spektrem, a to i mezi komenzálními kmeny. Varianty těchto genů se mohou vyskytovat i na chromozomu (Johnson et al., 2008) (Tabulka č. 3). Naproti tomu geny chromozomálních PAI jsou více asociované s určitými fylogenetickými skupinami (B2, F, D, G) nebo některými význačnými liniemi z jiných skupin (např. emergentní linie ST58, ST10 aj.).

Tabulka č. 3 Přehled genů, které lze využít jako kritérium pro skríníng APEC

<i>ompT</i>	Protein vnější membrány	Plazmid
<i>hlyF</i>	Hemolysin F	Plazmid
<i>iroN</i>	Receptor salmochelinového sideroforu	Plazmid
<i>iutA</i>	Receptor aerobaktinového sideroforu	Plazmid
<i>iss</i>	Protein asociovaný s zvýšenou sérovou rezistencí	Plazmid
<i>tsh</i>	Termosenzitivní hemaglutinin (adhezin)	Plazmid
<i>cvaC</i>	Produkce kolistinu V	Plazmid
<i>irp2</i>	Siderofor yersiniabaktin	Chromozom
<i>frz</i> _(orf4)	Karbohydrátový transportér	Chromozom
<i>felA</i>	F11 varianta P fimbrií	Chromozom

Výběr těchto genů není nutně definitivní. Jejich přítomnost slouží jako vodítko, avšak v žádném případě se nejedná o absolutní kritérium pro rozlišení patogenních a komenzálních kmenů z několika důvodů: i) přítomnost genu neznamená ještě jeho aktivní expresi; ii) jak již bylo zmíněno, patogenní potenciál

kmene může být dán variabilní kombinací genů; iii) uplatnění různě virulentních kmenů v patogenním procesu je dáno podmínkami chovu, vnímavostí jedinců, mírou infekčního tlaku a dalšími proměnnými. Doporučujeme zvolit aspoň 4 plazmidové a 2 chromozomální geny s kritériem přítomnosti minimálně poloviny počtu zvolených genů.

Postup: 1-2 kolonie vortexujeme v 400 µl destilované vody a po desetiminutové inkubaci v termobloku při 100 °C centrifugujeme při 30 000 otáčkách za minutu 1-2 minuty. Odebraný supernatant s DNA zamrazíme při -30 °C. Takto izolovanou DNA lze použít na detekci osmi plazmidových a chromozomálních genů virulence metodou klasické PCR. Tabulky č. 4 a 5 uvádějí reakční podmínky a sekvence primerů pro jednotlivé reakce.

Tabulka č. 4 Reakční podmínky PCR pro vybrané geny virulence

Gen	Fáze	Čas	Teplota
<i>ompT</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 30 cyklů:		
	Denaturace	30 s	94°C
	Annealing	30 s	57°C
	Elongace	1,5 min	68°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>iroN, cvaC, iss</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 25 cyklů:		
	Denaturace	30 s	94°C
	Annealing	30 s	58°C
	Elongace	3 min	68°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>tsh</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 26 cyklů:		
	Denaturace	1 min	94°C
	Annealing	1 min	53°C
	Elongace	1 min	72°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>iutA</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 25 cyklů:		
	Denaturace	30 s	94°C
	Annealing	30 s	57°C
	Elongace	1,5 min	68°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>frz_(orf4)</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 26 cyklů:		
	Denaturace	1 min	94°C
	Annealing	1 min	53°C
	Elongace	1 min	72°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C

<i>irp2</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 25 cyklů:		
	Denaturace	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	68°C
	Elongace	3 min	68°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>hlyF</i>	1. Počáteční denaturace	2 min	94°C
	2. 25 cyklů:		
	Denaturace	30 sek	94°C
	Annealing	30 sek	63°C
	Elongace	1 min	68°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C
<i>felA</i>	1. Počáteční denaturace	3 min	94°C
	2. 30 cyklů		
	Denaturace	1 min	94°C
	Annealing	1 min	61°C
	Elongace	30 s	72°C
	3. Konečná elongace	10 min	72°C
	4. Chlazení	∞	10°C

Tabulka č. 5 Primery použité pro detekci vybraných virulenčních genů

Primer	Sekvence nikleotidů	Gen	Produkt (bp)	Citace
ompT/F	TTG CTA CTG CCA TCT CAG C	ompT	610	Bethe et al, 2012
ompT/R	CGA CAG ATA CTC TGG GTA ACA			
iroN/F	ATC CTC TGG TCG CTA ACT G	iroN	847	Ewers et al., 2007
iroN/R	CTG CAC TGG AAG AAC TGT TCT			
iss/F	ATC ACA TAG GAT TCT GCC G	Iss	309	
iss/R	CAG CGG AGT ATA GAT GCC A			
cvaC/F	CAC ACA CAA ACG GGA GCT GTT	cvaC	679	Dissanayake et al., 2008
cvaC/R	CTT CCC GCA GCA TAG TTC CAT			
tsh/F	GGT GGT GCA CTG GAG TGG	tsh	620	Moulin-Schouler et al., 2007
tsh/R	AGT CCA GCG TGA TAG TGG			
iutA/F	GGC TGG ACA TCA TGG GAA CTG G	iutA	300	Johnson et Stell, 2000
iutA/R	CGT CGG GAA CGG GTA GAA TCG			
frz/F	TCA GTA AGA ACG AAA GTG TG	frz _{orf4}	565	Dissanayake et al., 2014
frz/R	ACA GGA ACA ATC CCG TGG AT			
irp2/F	AAG GAT TCG CTG TTA CCG GAC	irp2	413	Ewers et al., 2005
irp2/R	AAC TCC TGA TAC AGG TGG C			
hlyF/F	GGC CAC AGT CGT TTA GGG TGC TTA CC	hlyF	450	Johnson et al., 2008
hlyF/R	GGC GGT TTA GGC ATT CCG ATA CTC AG			
felA/F	GGT CAA SCA GCT AAA AAC GGT AAG G	felA	239	Moulin-Schouler et al., 2006
felA/R	CCT TCA GAA ACA GTA CCG CAA TTC G			

Na základě této prvotní analýzy je uskutečněn výběr izolátů pro celogenomové sekvenování. Účelem je vyloučit na první pohled shodné izoláty, totiž ty izolované z téhož vzorku nebo vzorků stejného původu se stejným profilem antibiotické rezistence a genů virulence. Výběr kmenů pro celogenomové sekvenování se rovněž řídí původem vzorků. Pokud se jedná o klinické případy kolinfekcí, opakovaný výskyt kmene se stejným profilem v prvotní analýze může indikovat klonální vzplanutí. Výběr izolátů z dolíhni se řídí podle rodičovského chovu původu.

Vlastní výběr izolátů k analýze

- ✓ Multirezistentní izoláty
- ✓ Izoláty rezistentní k 3. generaci cefalosporinů
- ✓ Izoláty vybavené 4 (5) a více geny asociovanými s virulencí

Izolace DNA, odeslání k celogenomovému sekvenování do externí laboratoře

K izolaci čisté genomické DNA použijeme vhodný komerční kit dle návodu výrobce (např. NucleoSpin Tissue DNA extraction kit, Macherey-Nagel, Německo). Dostatečná koncentrace izolované DNA je ověřena na základě měření absorbance (Infinite m200 PRO, Tecan, Švýcarsko) s požadovaným minimem 50 µl.

Pro srovnávací analýzu většího počtu izolátů jsou vhodné platformy Illumina, tzv. high-throughput short-read sequencing.

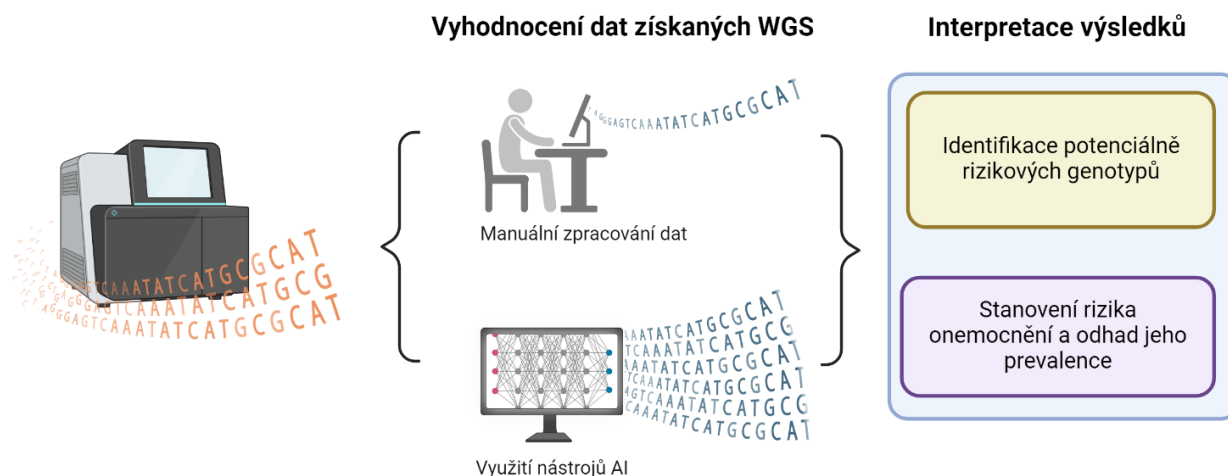
2. 2. 2. 4 Vyhodnocení dat z WGS (schéma č. 3)

Získaná hrubá data je nutno podrobit primární úpravě a statistické analýze k zhodnocení účinnosti a spolehlivosti procesu sekvenování (údaje o čistotě genomické DNA, fragmentaci apod.). Tato fáze zahrnuje odstranění nekvalitně sekvenovaných fragmentů (readů) a „odstřižení“ konců se zbytky adaptérů, tzv. trimování (např. Trimmomatic v0.36, Bolger et al., 2014). Upravená data jsou sestavena do větších celků, kontigů, tzv. de novo assembly (např. <https://github.com/tseemann/shovill>). Výsledkem jsou data ve formě souborů FASTA, které nezabírají velké množství paměti a lze s nimi snadno pracovat. Jednotlivé genomy lze následně charakterizovat pomocí veřejně dostupných online platforem, jako je Center for Genomic Epidemiology nebo Galaxy.org.

Základní typizace zahrnuje:

- ✓ MLST (např. <https://cge.food.dtu.dk/services/MLST/>)
- ✓ Fylogenetická skupina (<https://ezclermont.hutton.ac.uk/>)
- ✓ Sérotyp (<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>)
- ✓ Získané geny rezistence a chromozomální mutace (<http://genepi.food.dtu.dk/resfinder>)
- ✓ Plazmidy (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>)
- ✓ Virulence (<https://cge.food.dtu.dk/services/VirulenceFinder/>)
- ✓ Fylogenetická analýza příbuznosti izolátů různého původu s tvorbou fylogenetického stromu, popř. srovnání s příbuznými izoláty ve veřejných databázích (srovnání pangenomu souboru v programu Roary (Page et al., 2015) s určením genetické vzdálenosti na základě SNP (<https://github.com/tseemann/snp-dists>)).

Schéma č. 3. Zjednodušený pracovní postup zpracování dat získaných celogenomovým sekvenováním izolátů *E. coli* (vytvořeno programem BioRender)



2. 2. 2. 5 Identifikace potenciálně rizikových genotypů

Na základě identifikovaného sekvenčního typu, sérotypu, přítomných replikonů a genů antibiotické rezistence a profilu velkého množství VAGs se zhodnocením genetické vzdálenosti umožňuje:

- ✓ Identifikovat multirezistentní kmeny a producenty ESBL/AmpC betalaktamáz, zhodnotit prevalenci jednotlivých genů a jejich potenciální asociaci s mobilními genetickými elementy, jež facilitují přenos těchto determinant mezi kmeny a mezi různými úrovněmi produkční pyramidy (Zurfluh et al., 2014)
- ✓ Identifikovat typické genotypy významných APEC linií, jejichž šíření v chovech drůbeže je aktuálně popisováno (např. linie ST117, ST141/ST95, ST428/429, ST23/88). Tyto klony pak lze podrobit podrobnějšímu srovnání s genomy z databáze GeneBank.
- ✓ Identifikovat typické genotypy potenciálně zoonotických linií a linií s epidemiologickým významem pro člověka, jejichž zdrojem či rezervoárem může být drůbež (např. ST131, ST95). Tyto klony pak lze podrobit podrobnějšímu srovnání s genomy z databáze GeneBank.
- ✓ Identifikovat kmeny, které na základě svého genetického profilu a/nebo opakovaného výskytu mezi chovy mohou představovat emergentní rizikové linie.
- ✓ Dlouhodobý monitoring umožní sledovat dynamiku výskytu jednotlivých linií a genetických elementů se srovnáním prevalence na jednotlivých sledovaných úrovních produkční pyramidy, identifikací rizikových faktorů a vypracování souboru preventivních opatření vhodných pro daný chov a danou úroveň s cílem omezení infekční zátěže, zlepšení životních podmínek biologické bezpečnosti a omezení spotřeby antibiotik v produkčních chovech.

2. 2. 2. 6 Stanovení rizika onemocnění

Kolinfekce způsobené APEC jsou podmíněny více vlivy, a navíc se při patogenezi onemocnění může uplatnit vysoký počet faktorů asociovaných s virulencí a zakódovaných v genomu *E. coli*. Zatímco celogenomové asociační studie usnadňují porozumět evoluci genomu a vzniku patotypů *E. coli*, tak odhadnout reálné riziko klinických infekcí by měly umožnit predikční modely (Mageiros et al., 2021). Vhodný software a AI může v budoucnu usnadnit vyhodnocení složitých vztahů mezi přítomností/absencí prvků genotypu a fenotypu spojených s onemocněním, a tím přesněji

předpovědět význam izolátů *E. coli* s daným genotypem a odhadnout možnou prevalenci infekcí působených APEC.

3. Srovnání „novosti postupů“

Jedná se o novou metodiku, která navazuje na publikované zahraniční studie a využívá výsledků a zkušeností z vlastních studií autorského kolektivu (viz. publikace předcházející metodice).

4. Popis uplatnění metodiky

Cílem předkládané metodiky je poskytnout pracovníkům Státní veterinární správy ČR, veterinárních ústavů (SVÚ, VÚVeL, ÚSKVeBL), specialistům na choroby drůbeže i chovatelům drůbeže metodický postup pro cílený odběr vzorků a jejich laboratorního vyšetření se zaměřením na izolaci, identifikaci a charakterizaci epizootologicky a epidemiologicky závažných klonů *E. coli* v produkční pyramidě masné drůbeže.

5. Ekonomické aspekty

Metodika poskytuje postup, který lze využít k aktivnímu sledování výskytu epizootologicky a epidemiologicky závažných klonů *E. coli* v produkční pyramidě masné drůbeže. Znalost výskytu takových klonů v rodičovských chovech, líhních a užitkových chovech je důležitým předpokladem pro realizaci preventivních a profylaktických programů tlumení ekonomicky závažných kolinfekcí masné drůbeže. V ČR chybí údaje o přímých ekonomických ztrátách v důsledku těchto infekcí, proto musíme vycházet ze zahraničních údajů, např. v Nizozemsku odhady ukázaly ztrátu 3,7 milionu EUR v důsledku infekcí APEC v rodičovských chovech masné drůbeže (Landman and van Eck, 2015). V USA se odhaduje, že ekonomické ztráty v odvětví brojlerů mohou dosáhnout až 40 milionů dolarů ročně jen kvůli konfiskaci jatečně opracované drůbeže. Údaje, týkající se celkového ekonomického dopadu APEC na drůbežářský průmysl v USA, však nejsou k dispozici. Navíc omezování výskytu klonů *E. coli* s epidemiologicky významnými profily antibiotické rezistence u jatečné drůbeže může mít ve svém důsledku dopady na zdraví lidské populace. Jak v současné době ukazuje zájem velkých odběratelů drůbežích produktů, může produkce drůbežího masa bez použití antimikrobik do budoucna zvyšovat konkurenceschopnost domácí produkce (Papoušková et al., 2024).

6. Seznam související použité literatury

Bethe, A., Janßen, T., Ewers, C., Oelgeschläger, K., Krinke, P., Kúhl, M. Multiplex PCR I-IX. Institut für Mikrobiologie und Tierseuchen, FU Berlin. 2012, 16 p.

Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014, 30(15):2114-2120.

Byrne, N., O'Neill, L., Díaz, J.A.C. et al. Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolated from on-farm and conventional hatching broiler farms in Ireland. *Ir Vet J*. 2022, 75, 7.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing 28th ed. CLSI Supplement M100. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standard Institute. 2018, 296 pp.

Cummins ML, Reid CJ, Djordjevic SP. F Plasmid Lineages in *Escherichia coli* ST95: Implications for Host Range, Antibiotic Resistance, and Zoonoses. *mSystems*. 2022, 7:e0121221.

Dame-Korevaar A, Fischet EAJ, van der Goot J, Stegeman A, Mevius D. Transmission routes of ESBL/pAmpC producing bacteria in the broiler production pyramid, a literature review. *Prevent Vet Med.* 2019;162:136-150.

Dissanayake DRA, Octavia S, Lan R. Population structure and virulence content of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from outbreaks in Sri Lanka. *Vet Microbiol.* 2014;168:403-412.

Dissanayake DRA, Wijewardana TG, Gunawardena GA, Poxton IR. Distribution of lipopolysaccharide core types among avian pathogenic *Escherichia coli* in relation to the major phylogenetic groups. *Vet Microbiol.* 2008, 132:355-363.

Ewers C, Janßen T, Kießling S, Philipp HC, Wieler LH. Rapid Detection of Virulence-Associated Genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by Multiplex Polymerase Chain Reaction. *Avian Dis.* 2005, 49:269-273.

Ewers C, Li G, Wilking H, Kießling S, Alt K, Antão EM, Laturnus C, Diehl I, Glodde S, Homeier T, Böhnke U, Steinrück H, Philipp HC, Wieler LH. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: How closely related are they? *Int J Med Microbiol.* 2007;297:163-176.

Ewers C, de Jong A, Prenger-Berninghoff E, El Garch F, Leidner U, Tiwari SK, Semmler T. Genomic Diversity and Virulence Potential of ESBL- and AmpC- β -Lactamase-Producing *Escherichia coli* Strains From Healthy Food Animals Across Europe. *Front Microbiol.* 2021;12:626774.

Guabiraba R, Schouler C. Avian colibacillosis: still many black holes. *FEMS Microbiol Lett.* 2015;362:fnv118.

Holm, A, Hill, R, Farsang, A, Jungbäck, C. Diagnostics in the veterinary field: The role in health surveillance and disease identification. *Biologicals*, vol. 61, 2019, pp. 80-84.

Johnson JR, Stell AL. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J Inf Dis.* 2000, 181:261-272.

Johnson TJ, Wannemuehler Y, Doetkott C, Johnson SJ, Rosenberger SC, Nolan LK. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *J Clin Microbiol.* 2008;46:3987–3996.

Kemmett K, Williams NJ, Chaloner G, Humphrey S, Wigley P, Humphrey T. The contribution of systemic *Escherichia coli* infection to the early mortalities of commercial broiler chickens, *Avian Pathol.* 2014, 43:37-42.

Kravik, I.H., Kaspersen, H., Sjurseth, S.K. et al. A molecular epidemiological study on *Escherichia coli* in young chicks with colibacillosis identified two possible outbreaks across farms. *Vet Res.* 2023, 54, 10. <https://doi.org/10.1186/s13567-023-01140-6>

Landman W.J., van Eck J.H. The incidence and economic impact of the *Escherichia coli* peritonitis syndrome in Dutch poultry farming. *Avian Pathol.* 2015, 44:370–378. doi: 10.1080/03079457.2015.1060584.

Laube H, Friese A, von Salviati C, Guerra B, Kasbohrer A, Kreienbrock L, Roesler U. Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/AmpC-producing *Escherichia coli* at German broiler chicken fattening farms. *Appl Environ Microbiol.* 2013, 79:4815-4820.

Liu CM, Stegger M, Aziz M, Johnson TJ, Waits K, Nordstrom L, Gauld L, Weaver B, Rolland D, Statham S, Horwinski J, Sariya S, Davis GS, Sokurenko E, Keim P, Johnson JR, Price LB. *Escherichia coli* ST131-H22 as a Foodborne Uropathogen. *mBio*. 2018,9,4:1-11.

Mageiros, L., Méric, G., Bayliss, S.C. et al. Genome evolution and the emergence of pathogenicity in avian *Escherichia coli*. *Nat Commun* 12, 765 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-20988-w>

Mateu, E, Casal, J. Tamaño de la muestra (Sample size). *Revista de epidemiología y medicina preventiva*, vol. 1, 2003, pp. 8-14.

Mehat JW, van Vliet AHM, La Ragione RM. The Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) pathotype is comprised of multiple distinct, independent genotypes. *Avian Pathol*. 2021, 50(5):402-416.

Mitchell NM, Johnson JR, Johnston B, Curtiss R 3rd, Mellata M. Zoonotic potential of *Escherichia coli* isolates from retail chicken meat products and eggs. *Appl Environ Microbiol*. 2015, 81:1177-87.

Mezhoud H, Chantziaras I, Iguer-Ouada M, Moula N, Garmyn A, Martel A, Touati A, Smet A, Haesebrouck F, Boyen F. Presence of antimicrobial resistance in coliform bacteria from hatching broiler eggs with emphasis on ESBL/AmpC-producing bacteria. *Av Pathol* 2016, 45:493-500.

Moulin-Schouleur M, Répérant M, Laurent S, Brée A, Mignon-Grasteau S, Germon P, Rasschaert D, Schouler C. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains of avian and human origin: link between phylogenetic relationships and common virulence patterns. *J Clin Microbiol*. 2007, 45:3366-76.

NAŘÍZENÍ KOMISE (EU) 2017/1495; ze dne 23. srpna 2017, kterým se mění nařízení (ES) č. 2073/2005, pokud jde o *Campylobacter* v jatečně upravených tělech brojlerů.

Nolan LK, Barnes HJ, Vaillancourt J-P, Abdul-Aziz T, Logue CM. Colibacillosis. In: Swayne DE, Glisson JR., et al. (eds). *Diseases of Poultry*. Ames, Iowa, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2013, pp.751-805.

Page JA, Cummins CA, Hunt M, Wong VK, Reuter S, Holden MTG, Fookes M, Falush D, Keane JA, Parkhill J. Roary: rapid large-scale prokaryote pan genome analysis. *Bioinformatics*. 2015; 31: 3691-3693.

Poulsen LL, Thofner I, Bisgaard M, Christensen JP, Olsen RH, Christensen H. Longitudinal study of transmission of *Escherichia coli* from broiler breeders to broilers. *Vet Microbiol*. 2017, 207:13-18.

Projahn M, Daehre K, Roesler U, Fries A. Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded Cephamycinase-Producing Enterobacteria in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo-Vertical Transmission. *J Appl Environ Microbiol*. 2017, 83:e02364-16.

Ronco T, Stegger M, Olsen RH, Sekse C, Nordstoga AB, Pohjanvirta T, Lilje B, Lyhs U, Andersen PS, Pedersen K. Spread of avian pathogenic *Escherichia coli* ST117 O78:H4 in Nordic broiler production. *BMC Genomics*. 2017,18:13.

Reid CJ, Cummins ML, Börjesson S, Brouwer MSM, Hasman H, Hammerum AM, Roer L, Hess S, Berendonk T, Nešporová K, Haenni M, Madec JY, Bethe A, Michael GB, Schink AK, Schwarz S, Dolejska M, Djordjevic SP. A role for ColV plasmids in the evolution of pathogenic *Escherichia coli* ST58. *Nat Commun*. 2022,13:683.

Zhao S, Wang C, Chang S, Tsai Y, Chou C. Characterization of *Escherichia coli* isolated from day-old chicken fluff in Taiwanese hatcheries. *Avian Dis*. 2019,63:9–16.

Zurfluh K, Wang J, Klumpp J, Nüesch-Inderbinen M, Fanning S and Stephan R . Vertical transmission of highly similar blaCTX-M-1-harboring IncI1 plasmids in *Escherichia coli* with different MLST types in the poultry production pyramid. Front. Microbiol. 2014, 5:519. doi: 10.3389/fmicb.2014.00519

7. Publikace předcházející metodice

Nedbalcova K, Bzdil J, **Papouskova A**, Zouharova M, Matiaszkova K, Stastny K, Sladeczek V, **Senk D**, Petr M, Stolar P. Pathotypes and Phenotypic Resistance to Antimicrobials of *Escherichia coli* Isolates from One-Day-Old Chickens. Pathogens. 2023, 12(11):1330. doi: 10.3390/pathogens12111330.

Papoušková, A. Komparativní genomika izolátů *Escherichia coli* z drůbeže. Disertační práce, FVL VETUNI 2023, 160 s.

Papoušková A. [Poultry as a reservoir of zoonotic strains of *Escherichia coli*]. Klin Mikrobiol Infekc Lek. 2022, 28(2):42-44. Czech. PMID: 36546468.

Papouskova A, Cizek A. A complex approach to a complex problem: the use of whole-genome sequencing in monitoring avian-pathogenic *Escherichia coli* – a review. Acta Vet Brno. 2020, 89: 273–282.

Papouskova A, Masarikova M, Valcek A, **Senk D**, Cejkova D, Jahodarova E, **Cizek A.** Genomic analysis of *Escherichia coli* strains isolated from diseased chicken in the Czech Republic. BMC Vet Res. 2020, 16(1):189. doi: 10.1186/s12917-020-02407-2.

Papoušková A., Šenk D., Čížek A. Antibiotická politika u drůbeže – od teorie k praxi. Veterinářství 2024;74:201-206.

Šenk, D. Diagnostika, terapie, prevence a profylaxe koliinfekcí drůbeže. Disertační práce, FVL VETUNI 2023, 114 s.

Šenk D, Papoušková A, Masaříková M, Palkovičová J, **Čížek A.** Impact of commercial and autogenous *Escherichia coli* vaccine combination on broiler breeder stock performance, gross pathology, and diversity of *Escherichia coli* isolates. Acta Vet Brno. 2022; 91: 383-390.

8. Jména oponentů a názvy jejich organizací

doc. MVDr. Jan Bardoň, Ph.D., MBA
Státní veterinární ústav Olomouc

MVDr. Tomáš Jarosil
Ústřední veterinární správa, SVS Praha

9. Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu č. QK22020066 s názvem: „Opatření na snižování spotřeby a racionální užití antibiotik ve výkrmu brojlerů v České republice“ s finanční podporou NAZV Ministerstva zemědělství ČR.

10. Obrazová příloha

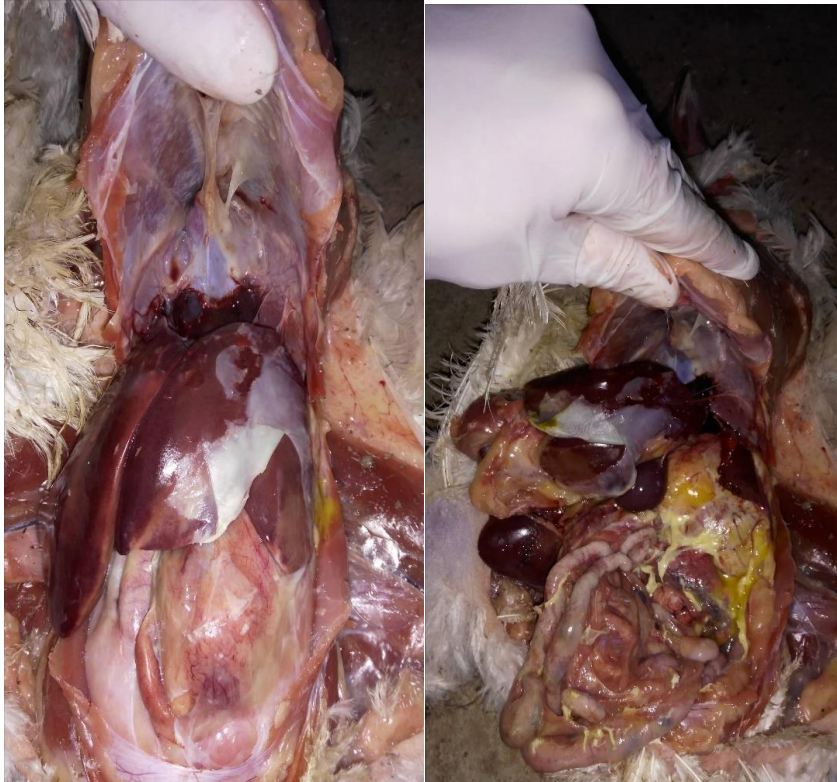
Odběr vaječných skořápek v dolíhni (foto prof. Čížek)



Omfalitidy jednodenních kuřat (foto dr. Šenk)



Perihepatitida a salpingitida (foto dr. Šenk)



Nášlapové tampony



Stěrové houbičky



Vydal: Veterinární univerzita Brno

Název: Aktivní monitoring závažných klonů *Escherichia coli* v rodičovských chovech, líhních a užitkových chovech masné drůbeže

Autoři:

Alois Čížek – podíl na vzniku metodiky 40 %

Aneta Papoušková – podíl na vzniku metodiky 30 %

Kateřina Nedbalcová – podíl na vzniku metodiky 10 %

David Šenk – podíl na vzniku metodiky 20 %

ISBN 978-80-7305-976-7

Vydáno bez jazykové úpravy.

© Veterinární univerzita Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i .

Veterinární univerzita Brno

Palackého třída 1946/1

612 42 Brno

www.vfu.cz