

Antibiotická rezistence u enterokoků izolovaných z potravin

Petra Hoffmannová

Bakalářská práce
2021

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2020/2021

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Petra Hoffmannová**
Osobní číslo: **T18102**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Antibiotická rezistence u enterokoků izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování

1. Bakterie rodu *Enterococcus* – vlastnosti, výskyt v potravinách a možnosti detekce.
2. Mechanizmy a příčiny vzniku antibiotické rezistence.
3. Antibiotická rezistence enterokoků izolovaných z potravin a nápojů.

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

Seznam doporučené literatury:

- [1] Walsh, C. Antibiotics: actions, origins, resistance. Washington: ASM Press, 2003, 335 s. ISBN 1-55581-254-6
Hudson, J.A., Frewer, L.J., Jones, G. et al. The agri-food chain and antimicrobial resistance: A review. Trends in Food Science and Technology, 69: 131-147. 2017
- [2] Rhouma, M., Romero-Barrios, P., Gaucher, M-L., Bhachoo, S. Antimicrobial resistance associated with the use of antimicrobial processing aids during poultry processing operations: cause for concern?. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2020. doi: 10.1080/10408398.2020.1798345
- [3] Schrijver, R., Stijntjes, M., Rodriguez-Bano, J. et al. Review of antimicrobial resistance surveillance programmes in livestock and meat in EU with focus on humans. Clinical Microbiology and Infection, 24: 577-590. 2018
- [4] Elektronické zdroje dostupné z knihovny UTB ve Zlíně.

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

Datum zadání bakalářské práce: **31. prosince 2020**

Termín odevzdání bakalářské práce: **21. května 2021**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 8. února 2021

PROHLÁŠENÍ AUTORA BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně, dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Antibiotická rezistence je přetrvávajícím problémem, ohrožujícím zejména lidské zdraví. Přenos potravinami je jedním z možných způsobů, jak se může rezistence šířit. Jedny z významných bakterií v potravinářském průmyslu jsou bakterie rodu *Enterococcus*. Jsou využívány pro výrobu fermentovaných potravin živočišného i rostlinného původu. Bakalářská práce popisuje výskyt rezistentních kmenů bakterií rodu *Enterococcus* v různých druzích potravin. Takový výskyt je rizikový pro přenos rezistence na patogenní kmeny. U izolovaných enterokoků byla zaznamenána rezistence na širokou škálu antibiotik a rovněž byla pozorována i multirezistence některých kmenů. Naopak byla v nízkých hodnotách pozorována rezistence na vancomycin. Infekce způsobené vancomycin rezistentními kmeny enterokoků byly v 90. letech minulého století druhým nejčastějším typem nozokomiálních nákaz.

Klíčová slova: antibiotika, antibiotická rezistence, *Enterococcus*, potraviny, vancomycin

ABSTRACT

Antibiotic resistance is rising global problem endangering human health. Antibiotic resistance is globally spreading and food safety and hygiene are significant mechanisms. The genus *Enterococcus* contains bacterial species associated with food industry. The enterococci are used for production of fermented food of animal and plant origin. The bachelor thesis describes the presence of antibiotic resistant enterococci in different types of food. The presence of resistant enterococci in foods is threat for spreading the resistance on pathogenic bacteria. There was observed antibiotic resistance to many types of antibiotics and also multidrug resistance. Prevalence of vancomycin resistance was low. Infections caused by vancomycin resistant strains were second most prevalent nosocomial diseases in 1990s.

Keywords: antibiotics, antibiotic resistance, *Enterococcus*, food, vancomycin

Dovoluji si tímto poděkovat vedoucí mé bakalářské práce doc. RNDr. Leoně Buňkové, Ph.D., za odborné vedení, rady a cennou pomoc při vypracování bakalářské práce.

Prohlašuji, že odevzdaná verze bakalářské/diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST	10
1 BAKTERIE RODU <i>ENTEROCOCCUS</i> – VLASTNOSTI, VÝSKYT V POTRAVINÁCH A MOŽNOSTI DETEKCE	11
1.1 VLASTNOSTI BAKTERIÍ RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	11
1.1.1 Základní vlastnosti a podmínky růstu	11
1.1.2 Produkce metabolitů.....	11
1.1.3 Patogenita	12
1.1.4 Antibiotická rezistence	13
1.2 VÝSKYT ENTEROKOKŮ V POTRAVINÁCH	13
1.2.1 Využití v potravinách	13
1.2.2 Negativní aspekty výskytu v potravinách	14
1.2.3 Enterokoky v mléčných produktech.....	14
1.2.4 Enterokoky v zelenině a ovoci	14
1.2.5 Enterokoky v masných produktech.....	15
1.3 MOŽNOSTI DETEKCE BAKTERIÍ RODU <i>ENTEROCOCCUS</i>	15
1.3.1 Fenotypické metody	15
1.3.2 Genotypické metody	16
2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	17
2.1 ANTIBIOTIKA.....	17
2.1.1 Chemická struktura antibiotik a jednotlivá antibiotika	18
2.2 MECHANIZMUS VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	20
2.2.1 Genetická podstata	20
2.2.2 Změna cílové molekuly	21
2.2.3 Ztížený průnik do buňky mikroorganismu	21
2.2.4 Zrychlené vylučování antibiotika.....	22
2.2.5 Inaktivace antibiotika bakteriálními enzymy	22
3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE ENTEROKOKŮ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ	24
3.1 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ ROSTLINNÉHO PŮVODU – SYROVÉ A URČENÉ K PŘÍMÉ SPOTŘEBĚ.....	24
3.2 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z RYB A MOŘSKÝCH PLODŮ	27
3.2.1 Ryby	27
3.2.2 Mořské plody určené k přímé spotřebě	28
3.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z MASA A MASNÝCH VÝROBKŮ	28
3.3.1 Syrové maso	29
3.3.2 Masné výrobky	30

3.4	ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ IZOLOVANÝCH Z MLÉKA A MLÉČNÝCH VÝROBKŮ	31
3.4.1	Mléko	31
3.4.2	Sýry	32
	ZÁVĚR	33
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	34
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	39
	SEZNAM OBRÁZKŮ	40
	SEZNAM TABULEK.....	41

ÚVOD

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou mikroorganismy, které jsou součástí střevní mikroflóry, ale také indikátory fekálního znečištění. Jakožto bakterie mléčného kvašení mají schopnost zkvašovat laktózu na kyselinu mléčnou, což může vést k jejich využití pro fermentaci potravin. Další významnou vlastností enterokoků je produkce bakteriálních toxinů, jež mohou přispívat k bezpečnosti potravin, neboť jsou schopny zamezit výskytu nežádoucích mikroorganismů. Enterokoky jsou oportunními patogeny, způsobující zejména nozokomiální nákazy, infekce močových cest, nebo bakteriémie.

Antibiotika jsou léčiva užívaná při terapii bakteriálních onemocnění. Jejich účinek spočívá ve schopnosti inhibovat růst patogenního mikroorganismu, a to bez výrazné újmy na hostitelském organismu. Různí se mechanismy svého účinku a podle těchto mechanismů jsou také volena pro léčbu jednotlivých bakteriálních infekcí.

V důsledku evoluce si bakterie byly schopny vybudovat rezistenci na antibiotická léčiva. Tato rezistence je v mikroorganismu geneticky podmíněna, a to buď kvůli přítomnosti mutace genu, anebo díky genu získanému přenosem. Přenos genu u bakterií zajišťují struktury nesoucí doplňkovou genetickou informaci. Při zisku několika rezistentních genů si bakterie buduje takzvanou multirezistenci. Multirezistentní bakterie vykazuje odolnost k více typům antibiotik a způsobuje jen obtížně léčitelné infekce.

Výskyt rezistentních bakterií v potravinách je způsoben zejména díky špatnému užívání, nebo nadužívání antibiotických léčiv u zvířat produkujících suroviny, či potraviny. Příčinou výskytu rezistentních genů u bakterií izolovaných z rostlinných potravin je zejména výskyt reziduí antibiotik v životním prostředí, či v odpadních vodách. Rizikem přítomnosti rezistentních genů u bakterií izolovaných z potravin je pak přenos těchto genů na bakterie patogenní. Správným užíváním antibiotik, zachováním hygienických zásad a norem při produkci potravin lze předcházet výraznému výskytu rezistentních bakterií v potravinách.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 BAKTERIE RODU *ENTEROCOCCUS* – VLASTNOSTI, VÝSKYT V POTRAVINÁCH A MOŽNOSTI DETEKCE

Bakterie rodu *Enterococcus* jsou přirozenými obyvateli lidského trávicího traktu, zejména tedy střev. Přirozeně se však vyskytují i v potravinách, častěji potom v potravinách živočišného původu. Jejich význam spočívá v jejich výskytu ve střevní mikroflóře, ale i při zajišťování bezpečnosti potravin, kdy chrání potravinu snížením pH díky produkci kyseliny mléčné, anebo ji chrání díky schopnosti produkovat bakteriociny. Potravina je pak chráněna před nárůstem nežádoucích mikroorganismů. Bakterie rodu *Enterococcus* patří mezi podmíněné patogeny. Nejběžnějšími druhy jsou *Enterococcus faecalis* a *E. faecium* (1).

Původně byly enterokoky taxonomicky klasifikovány jako rod *Streptococcus*. V 80. letech minulého století byly vyčleněny do samostatné skupiny, jelikož byly prokázány fylogenetické rozdíly na základě sekvence 16S ribozomální RNA (rRNA). Mezi tyto přeřazené druhy patří *E. avium*, *E. casseliflavus*, *E. cecorum*, *E. durans*, *E. galinarium*, *E. malodoratus* a *E. saccharolyticus*. Později byly další druhy přidány, a to například *E. columbae*, *E. dispar*, *E. fallox*, *E. flavescens*, *E. hirae*, *E. mundti*, *E. pseudoavium*, *E. raffinosus* nebo *E. sulfureus* (1).

1.1 Vlastnosti bakterií rodu *Enterococcus*

1.1.1 Základní vlastnosti a podmínky růstu

Obecně lze bakterie rodu *Enterococcus* považovat za fakultativně anaerobní, grampozitivní, kataláza negativní, oxidáza negativní koky. Rostou v teplotním rozmezí 10-45 °C. Jsou schopny růst v přítomnosti 6,5% koncentrace chloridu sodného (NaCl). Typickou vlastností je také růst při 0,04% koncentraci azidu sodného (NaN₃), čehož je využíváno při selektivní izolaci enterokoků. Přežívají expozici při teplotě 60 °C po dobu 30 minut a mohou růst i při pH 9,6. Jsou to bakterie nesporeující (1). Mohou se vyskytovat jako jednotlivé koky, nebo tvořit řetězce (2).

1.1.2 Produkce metabolitů

Velký význam, zejména pak v potravinářství, má schopnost enterokoků produkovat kyselinu mléčnou, jako konečný produkt zkvašování glukózy. Řadí se tedy mezi bakterie mléčného kvašení. Produkovaná kyselina mléčná snižuje pH prostředí, což má za následek schopnost inhibovat růst nežádoucích mikroorganismů (2).

Významné produkty enterokoků jsou bakteriociny. Jedná se o látky peptidické povahy, jež mají schopnost inhibovat růst jiných bakterií. Bakterie schopné produkovat bakteriociny musí nést gen kódující propeptid daného bakteriocinu, příslušné imunitní geny a gen kódující protein potřebný k vylučování bakteriocinu. Produkce bakteriocinů je výhodnější za podmínek méně příznivých pro růst, jelikož za podmínek optimálních není dostupné dostatečné množství aminokyselin pro produkci bakteriocinů (3). Enterokoky produkují enterociny typu A, B, I, L a P inhibující růst *Staphylococcus aureus*, *Listeria* sp. a *Clostridium* sp., enterocin AS-48 produkován *E. faecalis* je aktivní i proti vegetativním stádiím *Bacillus coagulans*. Enterociny bakterie *E. mundtii* vykazovaly i neobvyklou aktivitu proti gramnegativním bakteriím *Acinetobacter*, *Klebsiella* a *Pseudomonas* (2). Enterociny společně s dalšími antimikrobními látkami slouží pro kontrolu patogenů v humánní a veterinární medicíně. Jsou také zvažovány jako náhrada antibiotik při léčení nemocí způsobených multirezistentními patogeny (4).

Bakterie rodu *Enterococcus* mohou produkovat biogenní aminy dekarboxylací aminokyselin, zejména pak tyramin, vznikající z tyrosinu. Biogenní aminy jsou enterokoky produkovány už v pozdní exponenciální fázi růstu, tedy ještě před fází stacionární. Nevznikají zde tedy výhradně kvůli nedostatku živin. Biogenní aminy mohou být produkovány napříč různými potravinami, jako jsou mléčné výrobky, maso, ale například i ve víně. Potravina s vysokým množstvím biogenních aminů představuje zdravotní riziko, a po požití mohou nastat potíže jako bolest hlavy, zvracení, či zrychlené bušení srdce. Konkrétně u tyraminu to bývají migrény, nevolnost, zvracení, problémy s dýcháním, či zvýšení glykémie. Zdravotní riziko vždycky závisí na typu biogenního aminu a senzitivitě osoby, která byla biogennímu aminu vystavena (5).

1.1.3 Patogenita

Enterokoky jsou uváděny jako podmíněné patogeny a jsou spojovány s nozokomiálními nákazami. Způsobují infekce močového ústrojí, hepatobiliární sepsi, endokarditidu, bakteriémií a neonatální sepsi. Léčba je uskutečňována pomocí beta-laktamových antibiotik, jako jsou peniciliny, či glykopeptidy, a to buď samostatně, či v kombinaci s aminoglykosidy, pro jejich synergický účinek. S enterokokovou bakteriémií je spojována vysoká mortalita (30-61 %). Dle studie (6) čítala mortalita 31 %, z toho tři úmrtí byla způsobena kmeny rezistentními na ampicilin a gentamicin (6). Infekce způsobuje především druh *Enterococcus faecalis*, kdežto s rezistencí a její hrozbou souvisí především *E. faecium* (2).

1.1.4 Antibiotická rezistence

U enterokoků se nejprve projevila rezistence na beta-laktamová antibiotika. Tato rezistence je způsobena zejména genem *pbp5*, který kóduje penicilin-vázající proteiny (PBP) s nízkou afinitou k antibiotikům ampicilinu/penicilinu a cefalosporinu. Rezistence se projevuje nejen mutací penicilin-vázajících proteinů, ale také nadprodukcí enzymů beta-laktamáz (7).

V 70. letech 20. století byl kvůli rezistenci enterokoků na beta-laktamová antibiotika použit vancomycin, jako jiná možnost léčby enterokokových infekcí. Roku 1990 už se objevil vancomycin-rezistentní kmen enterokoků a byl druhým nejčastějším původcem nozokomiálních nákaz. *Enterococcus faecium* rezistentní geny získává díky mobilním genetickým jednotkám – transpozonům a plazmidům. Transpozony nesou genové shluky, právě odpovědné za rezistenci. Pro rezistenci na vancomycin je to například *van A*, *van B*, *van D*, nebo *van M*. Například rezistenci typu B na vancomycin nese transpozon *Tn1547* (7).

E. faecium je považován za multirezistentní bakterii. Je rezistentní na aminoglykosidy jako tobramycin, gentamicin a kanamycin. Tato rezistence je způsobena přítomností aminoglykosidy modifikujících enzymů, a to zejména aminoglykosid nukleotidyltransferáz (ANT), aminoglykosid acetyltransferáz (AAC) a aminoglykosid fosfotransferáz (APH). Přítomností enzymů ANT a mutací v genu *S12* je způsobena také vysoká rezistence na streptomycin (7).

1.2 Výskyt enterokoků v potravinách

1.2.1 Využití v potravinách

Enterokoky mají v potravinách poměrně důležité zastoupení. Jakožto bakterie mléčného kvašení jsou významné pro fermentaci a zrání produktů živočišných, jako jsou mléčné výrobky, ale i rostlinných, například oliv (8). Existuje škála kmenů bakterií rodu *Enterococcus* využívaných jako starterové kultury pro získání požadovaných organoleptických vlastností pro danou potravinu. Jejich bakteriociny bývají do potravin přidávány jako antimikrobní látka. Používání bakteriocinů by mohlo snížit používání chemických konzervantů a fyzikálních zásahů pro zachování údržnosti (4).

1.2.2 Negativní aspekty výskytu v potravinách

Využití enterokoků v potravinách je poněkud diskutabilní, jelikož je lze také považovat za indikátory fekálního znečištění. Jsou však dobrým ukazatelem této kontaminace, jelikož v mražených potravinách přežívají s vyšší pravděpodobností, než přežívají koliformní bakterie (9). Také jsou podle Směrnice Evropského parlamentu a Rady 2000/54/ES (32) klasifikovány jako biologický agens 2. skupiny, což znamená, že mohou způsobovat nemoci lidské populaci, obvykle léčitelné. Sahrávají také roli jako rezervoáry pro přenos virulentních a rezistentních genů v potravinovém řetězci. Jsou doporučovány metody pro zjištění bezpečnosti enterokoků použitých v potravinách, jsou prováděny testy mikrobiologické i molekulární (4).

1.2.3 Enterokoky v mléčných produktech

V syrovém mléce se enterokoky mohou vyskytovat přirozeně. Mohou také přežít chladírenské teploty a pasterační teplotu, díky jejich vlastnostem a přizpůsobivosti na jiné substráty. V mlékárenském průmyslu jsou zejména využívány jako nestarterové bakterie mléčného kvašení pro výrobu sýrů v oblasti severní Evropy. Mají například lipolytické a proteolytické enzymy nebo fermentují citrát na diacetyl, což ovlivňuje chuť při zrání sýra. V sýrech vyrobených z kozího, ovčího, či kravského mléka, se typicky nachází druhy *Enterococcus faecium*, *E. durans*, *E. faecalis* a v menší míře *E. casseliflavus* (4). Tyto druhy v mléce a v mléčných výrobcích, zejména sýrech, mohou produkovat biogenní aminy, a to především tyramin (5). Produkce enterocinů má význam, jelikož jsou schopny inhibovat růst patogenních mikroorganismů rostoucích v mléce a mléčných produktech, zejména *Listeria monocytogenes* a *Staphylococcus aureus* (4).

1.2.4 Enterokoky v zelenině a ovoci

Původ enterokoků v rostlinách je přisuzován prostředí růstu rostlin – tedy z půdy, vody a hnojiva. Mezi druhy, vyskytující se na rostlinných produktech, patří *E. faecium*, *E. mundtii*, *E. casseliflavus*, *E. faecalis* a *E. sulfurous*. Druhy *E. faecium* a *E. casseliflavus* jsou zapojeny do fermentačního procesu oliv. Jsou odolné k vysokému pH a vysokým koncentracím NaCl, mohou tedy přežít v nálevu, ve kterém jsou olivy fermentovány. Využívány jsou také v pivovarnictví. Enterociny jsou využívány jako ochrana před kontaminací jinými mikroorganismy v mnoha zeleninových i ovocných výrobcích, jako jsou džusy, sterilovaná zelenina, fermentovaná zelenina a podobně. Je využíván toxin AS-48 inhibující růst *Listeria monocytogenes* a *Salmonella enterica* (4).

1.2.5 Enterokoky v masných produktech

Enterokoky se využívají při fermentaci masných výrobků, přirozeně se vyskytují i v čerstvém mase, a to druhy *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* a *E. hirae*. Z masa ryb a kuřat pak byly izolovány druhy *E. mundtii* a *E. faecium*. Ve fermentovaných a dalších masných výrobcích se využívají pro svou schopnost redukovat aktivitu metmyoglobinu a schopnost degradovat antinutriční látky, například stachyózu. V masné produkci se uplatňuje i produkce enterocinů, ta je zde však ovlivňována mnoha faktory, jako jsou změny teplot, přítomnost organických látek, NaCl a dusitanů. Přesto už byly bakteriociny úspěšně použity na inhibici bakterií *L. monocytogenes*, *Salmonella* a *Clostridium*. Spolu s dalšími bakteriemi mléčného kvašení může přítomnost enterokoků k nadměrné produkci biogenních aminů (4).

1.3 Možnosti detekce bakterií rodu *Enterococcus*

1.3.1 Fenotypické metody

Bakterie rodu *Enterococcus* rostou i při náročných podmínkách, jako jsou vysoké teploty, UV záření, vysoké pH, v přítomnosti dezinfekčních látek a za vysoké koncentrace NaCl. Rostou na bohatých půdách, jako jsou půdy s krví, s výtažkem mozkové a srdeční tkáně (BHI), či na Toddově-Hewittově agaru a škrobovém agaru v rozmezí teplot 35-37 °C (10).

Enterokoky rostou na selektivně-diagnostické půdě Slanetz-Bartley (SB) agar (obr. 1), jelikož jsou schopny růst v přítomnosti 0,04% koncentrace azidu sodného, jež je v SB agaru obsažen (1). Dále jsou pro selektivní diagnostiku využívány schopnosti enterokoků produkovat enzym pyrrolidonylarylamidázu (PYR test), enzym leucinaminopeptidázu (LAP testy), či schopnosti hydrolyzovat eskulin a růst v přítomnosti žluči (žluč-eskulinový agar). Ne všechny fenotypové testy jsou zcela jednoznačné, mohou identifikovat i jiné gram pozitivní a kataláza negativní koky (10).

Pro identifikaci enterokoků existují také komerční systémy, sloužící především pro identifikaci klinicky významných enterokoků. Jsou to například EN-COCCUS test (Erba Lachema), API 20 Strep (BioMérieux) nebo BBL Crystal Gram-Positive ID System (BD Diagnostic system) (10).

Široké využití pro identifikaci enterokoků, včetně izolovaných z potravin, našla hmotnostní spektrometrie, která analyzuje hmotnostní spektra proteinů z bakteriálních buněk. Tato spektrometrie využívá desorpce a ionizace za účasti matrice s průletovým analyzátozem.

Další významnou chemicko-analytickou metodou je plynová chromatografie analyzující methylestery mastných kyselin v buněčných stěnách (10).



Obrázek 1 Růst bakterií rodu *Enterococcus* na SB agaru (11)

1.3.2 Genotypické metody

Nejčastější genotypická identifikace a klasifikace je prováděna pomocí sekvence genu 16S rRNA. Tato metoda nemusí být ve všech případech zcela přesná, některé druhy vykazují až 100 % podobnost, jako je to v případě *E. crotali* a *E. rotai* (10).

Pro identifikaci enterokoků se využívá detekce i jiných genů specifických pro enterokoky, a to například genů *atpA*, *rpoA*, či *pheS*, kódujících různé podjednotky specifických enzymů. Gen *atpA* kóduje alfa podjednotku ATP syntázy, gen *rpoA* alfa podjednotku RNA polymerázy a gen *pheS* pak alfa podjednotku fenylalanyl-tRNA syntázy (10).

Dále jsou také využívány takzvané fingerprintové metody, které většinou identifikují organismus na úrovni druhu až kmene. Tyto metody využívají polymerázové řetězové reakce (PCR) a jsou to například ITS-PCR, RAPD-PCR, nebo tDNA-PCR. Další využívané metody jsou například analýza restrikčního profilu DNA, ribotypizace založená na selektivní hybridizaci a následné detekci restrikčních fragmentů nesoucí geny kódující ribozomální RNA, nebo hybridizace se specifickými sondami a jejich aplikace ve formě DNA čipů. Míra identifikace bakterií závisí u těchto metod také na podmínkách provedení i na analyzovaném taxonu (10).

2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

Antibiotika jsou léčiva aplikována při léčbě bakteriálních infekcí. Terapii lze chápat jako „nefyziologicky probíhající interakci mezi bakterií a člověkem“ (12). Antibiotická rezistence je chápána jako adaptace mikroorganismů na antibiotická léčiva. Při používání těchto léčiv nejenže roste rezistence, ale dochází také k selekci odolných druhů. Taková selekce pak může mít za následek vyšší úmrtnost jedinců, jež prodělali nemoc způsobenou těmito odolnými mikroorganismy (12). Antibiotická rezistence se tedy stává zdravotním rizikem, komplikuje léčbu nemocí způsobených mikroorganismy, a to má dopad na zdraví jak lidské, tak zvířecí populace (13). Antibiotickou rezistenci lze rozdělit na rezistenci primární, či sekundární. U primární rezistence se jedná o vlastnosti přirozené. Rezistence sekundární je pak rezistencí získanou (14, 15). Z hlediska genetiky lze antibiotickou rezistenci chápat jako mutaci, či jako přenesení rezistenci kódujícího genu pomocí plazmidu, či transpozonu. K získání antibiotické rezistence může mikroorganismu stačit i jediná mutace. Přenášené plazmidy mohou obsahovat geny, které kódují enzymy zodpovědné za antibiotickou rezistenci, tedy mechanismy inhibující antibiotická léčiva (14).

2.1 Antibiotika

Antibiotika jsou antimikrobní látky, jež mohou být buďto přírodního, anebo syntetického původu a jsou využívána jako léčiva. Antibiotika přírodního původu jsou antimikrobní látky produkované mikroorganismy (17). Tato léčiva mají obecně schopnost inhibovat růst mikroorganismu, bez způsobení významné újmy na hostiteli (16). Této újmě předchází vlastnost zvaná selektivní toxicita. Tu vyjadřuje chemoterapeutický index, což je poměr dávky toxické pro hostitele k látce účinné na mikroba. Vysoké hodnoty tohoto indexu vyjadřují bezpečnost pro hostitele (14). Na rozdíl od ostatních chemoterapeutik jsou antibiotika převážně sekundární metabolity živých organismů, a to zejména mikroorganismů, zatímco ostatní chemoterapeutika jsou z většiny syntetického původu (15, 16). Antibiotika inhibují růst mikroorganismů dvěma způsoby, a to bakteriostaticky a baktericidně. Bakteriostatický účinek zastavuje růst zásahem do metabolismu, je to však reverzibilní děj, bakterie se tedy mohou opět rozmnožovat při vrácení do vhodného živného prostředí, či po snížení koncentrace antibiotika pod účinnou dávku. Baktericidní účinek je potom inhibice ireverzibilní, jsou zasaženy životně důležité funkce mikrobů a ti následně hynou (16).

2.1.1 Chemická struktura antibiotik a jednotlivá antibiotika

Antibiotika (ATB) jsou dělena do jednotlivých skupin, dle rozlišných chemických struktur. Za významná antibiotika lze označit beta-laktamová, tetracyklinová a aminoglykosidová.

2.1.1.1 Antibiotika beta-laktamová

Základní strukturou těchto antibiotik je beta-laktamový kruh se třemi atomy uhlíku a jedním atomem dusíku. Na tento kruh mohou být navázány další struktury, čímž se rozliší různé druhy beta-laktamů (9). Mezi antibiotika beta-laktamová jsou řazeny peniciliny, cefalosporiny, monobaktamy, karbapenemy a inhibitory beta-laktamázy. Peniciliny jsou rozlišovány na základní, rezistentní proti stafylokokové beta-laktamáze, širokospektré, peniciliny s rozšířeným spektrem a protipseudomonádové karboxypeniciliny a ostatní peniciliny stabilní pro penicilinázám gramnegativních bakterií (17). Přehled penicilinových antibiotik je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1 Penicilinová antibiotika (17)

základní	benzylpenicilin, fenoxymetylpenicilin, penamecilin
rezistentní proti stafylokokové beta-laktamáze	metycilin, oxacilin, nafcilin, cloxacilin, dicloxacilin, flucloxacilin
širokospektré peniciliny	ampicilin, amoxycilin
peniciliny s rozšířeným spektrem a protipseudomonádové karboxypeniciliny	kabenicilin, tikarcilin, acylureidopeniciliny, azlocilin, mezlocilin, piperacilin
ostatní peniciliny stabilní proti penicilinázám gramnegativních bakterií	amidinopeniciliny mecilinam, pivmecilinam, temocilin

Cefalosporiny jsou rozděleny podle 1. až 4. generace a na cefamyciny. Tato antibiotika jsou uvedena v Tabulce 2.

Tabulka 2 Cefalosporinová antibiotika (17)

1. generace	Cefalotin, cefaloridin, cefazolin, cefalexin, cefaklor, cefadroxil
2. generace	Cefamandol, cefuroxim, cefoxitin, cefuroximaxetil
3. generace	Cefoperazon, cefotaxim, ceftriaxon, cefsulodin, ceftazidim, cefixim, cefpodoxim, cefdinir s imunomodulačním účinkem
4. generace	Cefpirom, cefepim
cefamyciny	Cefoxitin, cefotetan, cefmetazol, moxolaktam

Dalšími beta-laktamovými antibiotiky (ATB) jsou monobaktamy, karbapenemy a inhibitory beta-laktamázy. Z monobaktamových ATB se pak jedná o aztreonam, z karbapenemových ATB o tienamycin, merponem a imipenem, a inhibitory beta-laktamázy jsou kyselina klavulanová, sublaktam a azobaktam (17).

2.1.1.2 Antibiotika tetracyklinová

Molekulu těchto antibiotik tvoří čtyři kondenzované cykly o šesti uhlících, jejich účinky jsou totožné (14). Antibiotika tetracyklinová jsou rozdělována na základní a 2. a 3. generace (17). Některá konkrétní jsou uvedena v Tabulce 3.

Tabulka 3 Antibiotika tetracyklinová (17)

základní	oxytetracyklin, tetracyklin
2. generace	doxycyklin, minocyklin
3. generace	tiacyklin

2.1.1.3 Antibiotika aminoglykosidová

Tato antibiotika mají základní molekulu aminocyklitolový kruh, jinak také inositol substituovaný několika aminoskupinami. K cyklu jsou připojeny dva aminocukry (14). Jsou dělena na základní a novější a popsána v Tabulce 4.

Tabulka 4 Antibiotika aminoglykosidová (17)

základní	streptomycin, kanamycin, neomycin, spektinomycin
novější	gentamicin, netilmicin, amikacin, tobramycin

2.1.1.4 Další antibiotika

Dalšími skupinami antibiotik jsou chloramfenikoly, makrolidy, linkosamidy, polypeptidová antibiotika a rifamyciny (17). Některá jsou uvedena v tabulce níže.

Tabulka 5 Další typy antibiotik (17)

chloramfenikoly	tiamfenikol, chloramfenikol
makrolidy	erytromycin, spiramycin, klaritromycin, josamycin
linkosamidy	klindamycin, linkomycin
polypeptidová antibiotika	bacitracin, gramicidin, tyrocidin, polymyxin

2.2 Mechanismus vzniku antibiotické rezistence

Rezistence mikroorganismů na antimikrobní látky je rozpoznána díky přítomnosti mechanismů odolného mikroba v porovnání s mikrobem neodolným. Tyto mechanismy jsou buďto získány, anebo přítomny díky mutaci. Pojem křížová rezistence popisuje situaci, kdy se mikroorganismus při rezistenci na antibiotikum nebo na biocid stává rezistentním na obě uvedené antimikrobní látky za využití stejného mechanismu. Odolnost na biocid a antimikrobní látku může mikrob získat i pomocí korezistence. K té dochází tehdy, kdy se gen kódující odolnost vůči biocidu nachází na stejné mobilní částici (plazmidu, transpozonu, integronu), jako gen kódující odolnost vůči antibiotiku. Tato korezistence je pak snadno přenášena na ostatní mikroby (18). U vzniku antibiotické rezistence lze popsat čtyři typy vzniku antibiotické rezistence. Aktivní místo působení antibiotika na mikroorganismus může být změněno. Dále může být mikroorganismem ztížen přístup antibiotika do buňky, zrychleno jeho vylučování z buňky, nebo může být antibiotikum inaktivováno (14).

2.2.1 Genetická podstata

Získaná antibiotická rezistence je vlastnost bakterie způsobená mutací, nebo přenosem genu kódujícího rezistenci pomocí transpozonu, či plazmidu (14). U mutací může dojít

k pozměnění genu, a to například odstranění jeho části, nebo náhradu, či přidání párů bází v primární struktuře DNA. Dochází potom k produkci bílkoviny, jež již nedokáže dostatečně antibiotikum navázat. Významná je mutace způsobující rezistenci *Mycobacterium tuberculosis* na streptomycin. Antibiotickou rezistenci lze získat přenosem plazmidu, což je DNA volně uložena v cytoplazmě kódující rezistenci. Plazmidy jsou přenášeny konjugací, tedy vzájemným kontaktem bakterií a cytoplazmatickým propojením. Vzácněji pak transdukcí bakteriofágem. Bakteriofág je virus napadající bakterie a transdukcí je možno přenést jeho genetický materiál na napadenou bakteriální buňku. Přenos plazmidů je rovněž vzácně umožněn i transformací DNA bez nosiče, tedy jako projev získaných vlastností buňky po mezibuněčném přenosu genetické informace. Rezistenci kódují i transpozony, sekvence DNA pohybující se mezi plazmidy a chromozomy (17). Rezistenčním genům je pohyb umožněn i pomocí tzv. genových kazet, ty obsahují právě jeden gen, který kóduje rezistenci. Genová kazeta obsahuje tzv. otevřený čtecí rámec, což je úsek DNA bez promotoru, který je vymezen iniciačním a terminačním kodonem a kóduje řetězec polypeptidů. Genové kazety jsou shlukovány v integronech, tedy se jedná o systém integron/genové kazety. Při přenosu jednotek nesoucích gen ATB rezistence byly identifikovány právě integrony. Tento systém se ukázal jako jeden z nejlepších případů zachycení a exprese nových genů. Podle vlastností těchto částic je usuzováno, že mají dobrý potenciál mít velký význam v evoluci bakterií (19).

2.2.2 Změna cílové molekuly

Důsledkem vzniku rezistence s mechanismem změny cílové molekuly je, že se antibiotikum nenaváže na bakteriální buňku. Bakteriální buňka nese proteiny, které vážou dané antibiotikum. S antibiotikem pak vytváří komplexy a samotné ztratí aktivitu. Aktivita těchto proteinů je ovšem nezbytná k přežití, jelikož jsou mimo jiné také odpovědné za biosyntézu buněčné stěny a za bakteriální růst. Ztráta aktivity tedy obvykle vede ke smrti bakteriální buňky. Při vzniklé rezistenci tímto mechanismem však antibiotikum není navázáno, netvoří tedy komplex a daná bílkovina neztrácí svou funkci. Běžným typem je rezistence na erytromycin a klindamycin u streptokoků, stafylokoků a enterokoků. Zde je zabráněno navázání antibiotika na ribozomy, jelikož bakterie tvoří enzymy methylující RNA (17).

2.2.3 Ztížený průnik do buňky mikroorganismu

Dalším mechanismem antibiotické rezistence je změna permeability buněčné stěny, či plazmatické membrány (16). Díky existujícím rozdílům v buněčných stěnách

grampozitivních a gramnegativních bakterií, lze také popsat rozdíly v průchodnosti látek buněčnými stěnami (15). Grampozitivní bakterie mají buněčnou stěnu silnější než bakterie gramnegativní, přesto ale dochází ke snadnému průniku většiny antibiotik. U gramnegativních bakterií je průchod stěnou pro antibiotika složitější. Gramnegativní bakterie mají na vnějším povrchu molekuly lipopolysacharidů a na vnitřní straně molekuly fosfolipidů. Tyto molekuly společně tvoří fosfolipidovou dvojvrstvu, která stěžuje průnik látkám jak hydrofobním, tak také hydrofilním. Vstup hydrofobních látek je zpomalen hustým uspořádáním lipopolysacharidů, což zamezuje těmto látkám vstup přes lipidovou membránu dovnitř buňky (17). Hydrofilní antibiotika pak mohou prostupovat poriny, což jsou kanálky tvořené membránovými proteiny. Koncentrace porinů je u rezistentních gramnegativních bakterií nižší (15). Mezi antibiotika, k nimž si mikroorganismy tvoří takovou rezistenci, patří zejména aminoglykosidy, tetracykliny a chinolony (14).

2.2.4 Zrychlené vylučování antibiotika

Rezistence mikroba se také může projevit zrychleným vylučováním antibiotika z buňky. Mikroorganismy takto dokážou vylučovat takové typy antibiotik, kterým jsou schopny ztížit průnik do buňky mikroorganismu (14). Aktivního vypuzování se účastní membránové bílkoviny (15). Jedná se tedy zejména o aminoglykosidy, tetracykliny a chinolony (14).

2.2.5 Inaktivace antibiotika bakteriálními enzymy

Mechanismus zneškodnění antibiotika pomocí enzymů, jež produkují mikroorganismy, je nejčastější (14).

2.2.5.1 Enzymy rozkládající beta-laktamy

Tyto enzymy produkované rezistentními mikroorganismy se nazývají beta-laktamázy. Ve své struktuře nesou aminokyselinu serin, která má význam právě pro antibiotickou rezistenci. Serin je navázán na antibiotikum a pomocí něj je otevřen beta-laktamový kruh a je narušena antimikrobní aktivita antibiotika. Jedná se tedy o rezistenci uplatňovanou na antibiotika jako peniciliny, či cefalosporiny (17).

2.2.5.2 Enzymy modifikující aminoglykosidy

U aminoglykosidových antibiotik jsou pomocí specifických enzymů modifikovány aminokyseliny nebo také hydroxylové skupiny antibiotika. Takto pozměněné látky již nejsou nadále schopny se navázat na cílové místo. Takto způsobená rezistence je

uplatňována na antibioticích, jako jsou streptomycin, neomycin a kanamycin. Mezi enzymy způsobující rezistenci u aminoglykosidických antibiotik patří acetyltransferáza, adenyltransferáza a fosfotransferáza (17).

3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE ENTEROKOKŮ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ

Antibiotika mají široké využití pro zvířata, jež jsou využívána k masné a mléčné produkci. Jejich význam spočívá v zabraňování nemocem mikrobiálního původu. Disponují výhodami, jako je zdraví a pohoda zvířete, tzv. welfare, také zajišťují zdravotní nezávadnost potravin a jejich správnou produkci. Nekontrolované užívání však nese negativní následky, mezi něž patří problémy při technologickém zpracování, negativní vliv na zdraví spotřebitele a také vznik rezistence mikroorganismů na tato antibiotika (20).

Antibiotickou rezistenci je možno monitorovat třemi způsoby – kvalitativní diskovou difúzní metodou, metodou minimální inhibiční koncentrace (MIC), nebo metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Disková difúzní metoda je prováděna na Petriho miskách s půdou disponující vhodnými živinami pro mikroorganismy. Po inokulaci mikroorganismu jsou zde umístěny disky s antibiotikem a je sledována inhibice růstu mikroorganismu. Tyto inhibiční zóny jsou měřeny a posuzovány. Metoda MIC sleduje minimální inhibiční koncentraci antibiotika, tedy takovou koncentraci, která inhibuje viditelný nárůst mikroorganismu. Na měření MIC jsou využívány diluční metody, E-testy, či automatizované systémy. U metody PCR je možno identifikovat geny zodpovědné za antibiotickou rezistenci. Data potřebná k provedení PCR je možno najít v literatuře, či v databázích, jako je Databáze antibiotické rezistence. Na sekvenci celého genomu, či pro identifikaci nových genetických elementů nelze použít metodu PCR (8).

3.1 Antibiotická rezistence bakterií izolovaných z potravin a nápojů rostlinného původu – syrové a určené k přímé spotřebě

Potraviny rostlinného původu mohou být kontaminovány mikroorganismy s rezistentními kmeny v různých fázích produkce. Mikroorganismy se nachází v hnojivech, ve vodě i v půdě. Vznik ATB rezistence u těchto mikroorganismů může být způsoben i používáním antibiotik pro ochranu sazenic, tato přímá aplikace je dle Organizace pro výživu a zemědělství (FAO) stále povolena v nejméně 20 zemích (8).

Studie (8) se zabývala rostlinnými vzorky na polských tržištích. Bylo jich odebráno 270 a 4 hodiny od koupě byla provedena analýza a izolace enterokoků. Enterokoky byly nalezeny ve 23,7 % vzorcích, bylo izolováno 72 kmenů z následujících skupin potravin: 38 z čerstvého ovoce a zeleniny, 18 z džusů, 5 z nakládaných výrobků, 5 z klíčků, 2 ze semínek,

2 ze sušeného ovoce a zeleniny, a jeden z koření. Enterokoky byly nejčastěji izolovány z částí, které jsou při růstu v kontaktu s půdou, jako je salát, mrkev, okurky, jahody, nebo ředkvičky. U těchto plodů je i častější výskyt antibiotické rezistence. Tato zjištění mají spojitost také s hnojením půdy (8).

Ve studii byla testována citlivost na antibiotika užívaná v běžné praxi: ampicilin, penicilin, ciprofloxacin, levofloxacin, norfloxacin, gentamicin, streptomycin, teicoplanin, vancomycin, erytromycin, quinupristin/dalfopristin, tetracyklin, tigecyklin, chloramfenikol, fosfomycin, rifampin, linezolid a nitrofurantoin (8).

Prvně byla citlivost na antibiotika testována diskovou difúzní metodou na Mueller Hinton (MH) agaru. Inhibiční zóny byly posuzovány dle norem Institutu klinických a laboratorních standardů (CLSI). 55,6 % kmenů bylo rezistentních na streptomycin, 51,4 % na rifamycin, 38,9 % na erytromycin, 37,5 % na tigecyklin a 27,8 % na fosfomycin. Na ostatní testovaná antibiotika se rezistence projevila v rozmezí 1,4-3,8 % případů. Rezistence na vancomycin, teicoplanin, levofloxacin, ciprofloxacin, linezolid a chloramfenikol nebyla detekována (8).

Genotypově, metodou PCR, bylo odhaleno 22 ukazatelů antibiotické rezistence. Nejvíce bylo odhalených kmenů kódujících enzymy modifikující aminoglykosidy. Rezistenci na tetracykliny se potvrdila přítomnost genů *tetM* a *tetL*, na makrolidy potom přítomnost genů *ermB*, *ermA*, *msrC* a *mefA/E*. U více než poloviny izolátů (51,6 %) byl přítomen konjugativní transpozon ze skupiny transpozonů *Tn916/Tn1545*, této skupině je přiřazována zodpovědnost za antibiotickou rezistenci. Bakterie *E. faecium* vykazovala rezistenci častěji, než *E. faecalis* (8).

Při studii byl zachycen rozpor mezi fenotypovou a genotypovou rezistencí. Růst kolonií některých kmenů enterokoků byl antibiotikem inhibován, přesto u těchto kmenů nebyl prokázán žádný rezistenční gen. Tento jev je vysvětlován tak, že nejsou dostatečně objasněny genetické mechanismy zodpovědné za fenotypovou rezistenci pro jednotlivá antibiotika. Jiné kmeny disponovaly rezistentními geny, avšak fenotypově se tato rezistence neprojevila. To je zdůvodňováno rozdíly v genové expresi mezi kmeny, a také přítomností mutací, které zabraňují transkripci, či translaci. V rostlinných potravinách původem z Polska bylo tedy nalezeno významné množství rezistentních kmenů. Rizikem jsou zejména nalezené multirezistentní kmeny a kmeny odolné na vysokou expozici aminoglykosidům (8).

Studie (33) z České republiky se zabývala zjištěním antibiotické rezistence enterokoků izolovaných z různých druhů ovoce a zeleniny pomocí diskové difúzní metody. Byla sledována rezistence na vancomycin, ampicillin, cefalotin, ofloxacin, erytromycin, chloramfenikol, gentamicin a teikoplanin. Kromě vancomycinu byla rezistence prokázána na všechna ostatní testovaná ATB. Nejčastěji vykazovaly enterokoky rezistenci na ofloxacin, a to 44 % izolátů, pak 31 % bylo rezistentních na cefalotin a 21,3 % na erytromycin. Pro ostatní antibiotika byla zachycena rezistence v méně než 5 % případů (33).

Studie (34) sledovala rezistenci enterokoků izolovaných z rajčat z farmy v USA (Spojených státech amerických). Rezistence se zde potvrdila na 6 z 10 testovaných antibiotik. 70 % kmenů vykazovalo rezistenci na tetracyklin, okolo 40 % kmenů pak vykazovalo rezistenci na ciprofloxacin, levofloxacin, rifampin, daptomycin a quinupristin/dalfopristin (34).

Izoláty ze zeleniny z Polska a z České republiky se shodovaly v rezistenci na erytromycin, gentamicin a ampicillin. Studie z USA měla výsledky shodné pouze s polskou studií, enterokoky izolované z těchto míst vykazovaly rezistenci na tetracyklin a quinupristin/dalfopristin a naopak nebyla ve studii z USA zachycena rezistence na ampicilin a erytromycin. Požívání syrových potravin určených k přímé spotřebě, může vzhledem k předchozím zjištěním vést k přenosu rezistentních kmenů do střevní mikroflóry. Tato skupina potravin je tedy vektorem přenosu antibiotické rezistence do životního prostředí.

Dalším produktem bohatým na přítomnost mikroorganismů jsou fermentované olivy. Olivy jsou významnou fermentovanou zeleninou v potravinářském průmyslu a na jejich fermentaci se podílí několik skupin bakterií, z nichž nejvýznamnější pro kvalitu a organoleptické vlastnosti jsou bakterie mléčného kvašení. Studie (21) sledovala přítomnost bakterií mléčného kvašení ve stolních olivách z Maroka. Nejvíce zastoupeným mikroorganizmem byly bakterie rodu *Enterococcus*. Rezistence byla testována na antibiotika amoxicilin, ampicilin, ciprofloxacin, klindamycin, gentamicin, kanamycin, streptomycin, erytromycin, teikoplanin, vancomycin, chloramfenikol, tetracyklin a trimethoprim. Metodou MIC a PCR byly sledovány geny 11 kmenů enterokoků. U všech byla zaznamenána fenotypická rezistence na erytromycin, tetracyklin, gentamicin a trimethoprim. U 9 pak také rezistence na amoxicilin a u 10 na ciprofloxacin a vancomycin. Genotypicky byla prokázána přítomnost genů *ereA* a *ermF* u dvou různých kmenů, tyto geny kódují mechanismy zodpovědné za odolnost vůči erytromycinu. Rezistence na antibiotika byla fenotypicky prokázána u 9, respektive u 10 kmenů z testovaných. Je to významný výskyt rezistentních kmenů, avšak

nebylo odhaleno velké množství známých genetických determinantů, z hlediska přenosu antibiotické rezistence se olivy nejeví jako příliš rizikové (21).

3.2 Antibiotická rezistence bakterií izolovaných z ryb a mořských plodů

Vodní toky a plochy mohou být kontaminovány cizorodými látkami, často z odpadních vod z průmyslových výroby, nemocnic, či zemědělských ploch. Takové odpady obsahují pesticidy, herbicidy, těžké kovy, ale i antibiotika. To vede k vytváření antibiotické rezistence ve vodním prostředí. Bakterie rodu *Enterococcus* se do vod dostávají také díky odpadním vodám a díky vodám z hnojených zemědělských půd (23).

3.2.1 Ryby

Vzorky malých čerstvých ryb chlazených na ledě z trhů v Saudské Arábii byly testovány na přítomnost bakterií a jejich případnou antibiotickou rezistenci. Byla testována citlivost diskovou difúzní metodou na následující antibiotika: amoxicillin, bacitracin, chloramfenikol, ciprofloxacin, erytromycin, gentamicin a tetracyklin (23).

Z 30 vzorků ryb bylo izolováno 16 kmenů enterokoků. 25 % vykazovalo rezistenci na antibiotikum amoxicillin, 100 % na bacitracin, 31,2 % na chloramfenikol, 12,5 % na ciprofloxacin, 18,7 % na erytromycin a gentamicin a 68,7 % na tetracyklin. 25 % enterokoků vykazovalo multirezistenci (23).

Rezistenci na podobná antibiotika vykazovaly i izoláty z ryb pangasius importovaných do Dánska s Asie. Byla zde detekována rezistence na chloramfenikol, erytromycin a tetracyklin a ciprofloxacin. Multirezistentních enterokoků bylo 13 %, což je o polovinu méně, než v předchozí studii (24).

U izolátů enterokoků ze pstruhů z vodní nádrže Bukovec a z řeky Čierny Váh na Slovensku byla detekována 100 % rezistence na gentamicin a kanamycin, v menších poměrech pak také na streptomycin, azitromycin, tetracyklin, klindamycin a novobiocin. Nebyla pozorována rezistence na ampicilin, penicilin, erytromycin, chloramfenikol, vancomycin a rifampicin (25). Zde se spektrum antibiotik, na která byla testována odolnost enterokoků, liší oproti dvěma předchozím. Tyto odlišnosti mohou být způsobené odlišným zeměpisným původem. U předchozích studií byly ryby odebrány přímo z obchodních pultů a bakterie rodu *Enterococcus* rezistentní na antibiotika se zde mohly vyskytovat také díky sekundární kontaminaci.

3.2.2 Mořské plody určené k přímé spotřebě

Při monitorování antibiotické rezistence z krevet na tržištích v Nigérii, určených k přímé spotřebě, bylo odebráno 720 vzorků z 6 různých tržišť. Bylo detekováno celkem 59 (8,9 %) enterokoků, a to 26 ze vzorků krevet v omáče, 6 ze vzorků vařených krevet a 27 ze vzorků uzených krevet. Převažovaly druhy *E. faecalis* a *E. faecium*, byly však také izolovány druhy *E. gallinarum*, *E. casseliflavus*, *E. hirae*, *E. durans*. Antibiotickou rezistenci vykazovalo 91,5 % enterokoků, přičemž u 62,7 % se jednalo o multirezistenci (22).

U všech druhů enterokoků byla detekována rezistence na penicillin 88,1 %, klindamycin 67,8 % a piperacilin 38,9 %. Dále bylo 49,2 % izolátů rezistentních na erytromycin, 37,3 % na vancomycin, 48,8 % na tetracyklin, 54,2 % na teicoplanin a také na tigecyklin. Dále se také vyskytovala rezistence na ciprofloxacin, rifamycin, kanamycin, norfloxacin a imipenem. Genotypově pak byly prokázány geny kódující rezistenční mechanismy na erytromycin (*ermA*, *ermB*), tetracyklin (*tetA*, *tetM*), vancomycin (*vanA*, *vanB*) a klindamycin (*mphC*) (22).

Z krevet uzených bylo izolováno nejvíce rezistentních kmenů - 25, z nichž 12 bylo multirezistentních, z krevet v omáče bylo rezistentních kmenů 23 a 19 multirezistentních, z krevet vařených bylo všech 6 izolovaných kmenů rezistentních a zároveň multirezistentních (22).

Studie (25) sledovala rezistenci enterokoků izolovaných z krevet určených k přímé spotřebě, a to z Indie, Thajska, Ománu a USA. U všech vzorků byla pozorována rezistence enterokoků na vancomycin, ampicilin a ceftriaxon (25).

Výskyt antibiotické rezistence u krevet určených k přímé spotřebě původem z různých zemí byl velmi značný a lze je považovat jako rizikové pro veřejné zdraví.

3.3 Antibiotická rezistence bakterií izolovaných z masa a masných výrobků

Enterokoky jsou častým zástupcem bakterií nacházejících se v trávicím traktu zvířat, a tak lze očekávat jejich přítomnost v produktech živočišného původu, jako jsou mléko a maso. Rezistence enterokoků v živočišných produktech může být způsobena nadměrným užíváním antibiotických léčiv v krmivech, ale také díky přítomnosti zbytku reziduí léčiv a fekálií v podávané vodě (26).

3.3.1 Syrové maso

V italském Toskánsku byla studována pomocí diskové difúzní metody rezistence na enterokoky izolované ze syrového masa, šunky a sýrů. Vzorků syrového masa bylo odebráno 636, z toho ve 44,3 % vzorcích vepřového masa byly nalezeny enterokoky, dále ve 41,3 % klobásách, ve 30,8 % hovězího masa a 28,6 % drůbežího masa (26).

Byla testována rezistence na následující antibiotika: amoxicilin/klavulanová kyselina, ampicilin, ciprofloxacín, chloramfenikol, erytromycin, gentamicin, linezolid, teicoplanin, penicilin, tetracyklin, vancomycin (26).

Z hovězího masa bylo 32,8 % celkového množství izolovaných enterokoků rezistentních na gentamicin, 31,4 % na tetracyklin a 11,4 % na erytromycin. Rezistence nebyla zaznamenána na amoxicilin/klavulanovou kyselinu a na linezolid (26).

U enterokoků izolovaných z vepřového masa bylo 48,6 % rezistentních na tetracyklin, 22,8 % na erytromycin a nebyla pozorována rezistence na amoxicilin/klavulanová kyselina, ampicilin, linezolid, teicoplanin a vancomycin. 50 % enterokoků izolovaných z klobás bylo rezistentních na tetracyklin, na amoxicilin/klavul., linezolid, teicoplanin a vancomycin nebylo pozorována žádná rezistence (26).

Všechny enterokoky izolované z kuřecího masa vykazovaly rezistenci, v největším zastoupení pak na tetracyklin, a to 51 % kmenů, dále 42,6 % kmenů rezistentních na erytromycin a 15 % na gentamicin (26).

Dle pozorování antibiogramové rezistence enterokoků izolovaných ze syrového masa, se jeví kombinace antibiotik amoxicilin/klavulanová kyselina a antibiotikum linezolid jako nejbezpečnější z hlediska rezistence. Enterokoky vykazovaly také nízkou rezistenci na antibiotika beta-laktamová. Nejvíce bylo zachyceno enterokoků s rezistencí na tetracyklin, erytromycin a gentamicin (26).

Studie (27) pozorovala antibiogramovou rezistenci enterokoků pomocí diskové difúzní metody ze syrového masa na Slovensku. Bylo odebráno 75 vzorků vepřového masa a 53 vzorků kuřecího, všechny byly pozitivní na enterokoky, s nejčastějším výskytem kmenů *E. faecalis* a *E. faecium* (27).

Izoláty z kuřecího masa vykazovaly v 91 % rezistenci na tetracyklin, v 56 % na gentamicin, ve 44 % na erytromycin, ve 26 % na ampicilin a v 19 % na vancomycin. Rezistence se prokázala na všechna testovaná antibiotika a výrazná byla i multirezistence (27).

Enterokoky získané z vepřového masa vykazovaly rovněž rezistenci na všechna testovaná antibiotika. 34 % projevilo rezistenci na tetracyklin, 24 % na gentamicin, 18 % na ampicilin, 14 % na vancomycin a 10 % na erytromycin (27).

V České republice (33) bylo testováno na antibiotickou rezistenci 75 izolátů enterokoků. Na vancomycin nebyla rezistence pozorována, zatímco na cefalotin bylo rezistentních 33,3 % izolátů a na ofloxacin 29,3 % izolátů. Rezistence na ampicilin, erytromycin, chloramfenikol, gentamicin a teikoplanin se pohybovala mezi 1,3-6,6 % (33).

U všech tří studií byla zjištěna antibiotická rezistence enterokoků izolovaných ze vzorků vepřového masa na tetracyklin, gentamicin a erytromycin. Rezistence na vancomycin byla pozorována jen u vzorků z vepřového masa ze Slovenska. U menšího počtu kmenů byla v maso z Itálie detekována rezistence i na další antibiotika, to však nelze porovnat, jelikož studie ze Slovenska testovala rezistence na pět antibiotik. Vzorky z kuřecího masa vykazovaly v obou studiích rezistenci enterokoků na tetracyklin, gentamicin a erytromycin, ampicilin a vancomycin, v případě studie z Itálie i na všechna ostatní testovaná antibiotika. Syrové maso se dá považovat za poměrně významný rezervoár přenosu antibiotické rezistence, a to především maso kuřecí.

3.3.2 Masné výrobky

Studie (26) zaznamenávala antibiotickou rezistenci enterokoků izolovaných z šunky pomocí diskové difúzí metody. Ze 187 vzorků byly v 9,09 % identifikovány enterokoky. 47,1 % enterokoků vykazovalo rezistenci na tetracyklin, 17,6 % na erytromycin, 11,8 % na penicilin G a 5,88 % na amoxicilin/klavulanovou kyselinu a stejně tak na ampicilin. Rezistence nebyla zaznamenána na zbytek testovaných antibiotik: chloramfenikol, ciprofloxacin, gentamicin, linezolid, teicoplanin a vancomycin (26).

Enterokoky byly izolovány i z dalších potravin v Polsku za účelem zkoumání antibiotické rezistence: uzené maso (šunka, slanina, ramínko), klobásy (dušené, vařené), vnitřnosti, konzervované maso a produkty zpracované z různých masných částí. 74,1 % vzorků z 390 testovaných bylo pozitivní na nález enterokoků (28).

45 % izolátů bylo rezistentních na streptomycin, 42,7 % na erytromycin. 36,4 % bylo rezistentních na tetracyklin, 19,9 % na tigecyklin, 27,2 % na fosfomycin, 19,2 % na rifampicin. V menším rozsahu byla také potvrzena rezistence na ampicilin, penicilin, teicoplanin, norfloxacin, levofloxacin, ciprofloxacin, nitrofurantoin, linezolid, chloramfenikol a quinupristin/dalfopristin. Studie také prokázala pomocí PCR metody

přítomnost genů kódující rezistenci na aminoglykosidy (*aph*, *aac*, *ant* geny), tetracykliny (*tet* geny), makrolidy (*erm* geny, *mefA/E*, *msrC*) a glykopeptidy (*vanC2/C3*). Také byla prokázána přítomnost transpozonu *Tn916/Tn1545* (28).

Přestože se jedná o potraviny určené k přímé spotřebě, která prošla tepelnou úpravou, enterokoky mají schopnost přežívat vyšší teploty, a proto jsou v potravinách tohoto typu přítomny. Studie (28) prokázala také přítomnost genů, které mohou rezistenci přenášet.

3.4 Antibiotická rezistence bakterií izolovaných z mléka a mléčných výrobků

3.4.1 Mléko

Ze syrového, nepasterizovaného kravského mléka bylo odebráno 32 vzorků, z ovčího mléka 62 vzorků pro izolaci enterokoků a detekci antibiotické rezistence. Byla zkoumána rezistence na gentamicin, tetracyklin, erytromycin, vancomycin a ampicilin, a to pomocí diskové difúzní metody (27).

Enterokoky izolované z kravského mléka vykazovaly rezistenci na gentamicin ve 27 %, na tetracyklin v 19 % vzorků, na ampicilin a vancomycin v 10 % vzorků a ve 4 % vzorků na erytromycin. Enterokoky izolované z ovčího mléka byly rezistentní v 32 % na tetracyklin a gentamicin, v 16 % na ampicilin a ve 2 % na erytromycin. Vancomycin rezistentní enterokoky nebyly izolovány z ovčího mléka (27).

Při prověřování syrového mléka z automatů byla testována antibiotická rezistence na ampicilin, gentamicin, ciprofloxacin a vancomycin. Byly testovány vzorky z 6 různých míst. Enterokoky ze všech vzorků vykazovaly rezistenci na vancomycin a žádné na gentamicin. Ve 3 případech se projevila rezistence na ciprofloxacin a ve 4 na ampicillin (29).

Izoláty enterokoků ze syrového mléka ze studie (30) vykazovaly rezistenci na vancomycin ve 4,5 % vzorků, na tetracyklin v 15,2 % vzorků, na erytromycin v 6,5 % vzorků, na gentamicin v 8,7 % vzorků a na ampicilin ve 4,4 %. Nebyla zaznamenána rezistence na teikoplanin, celkem bylo testováno 46 izolátů enterokoků (30).

Ve všech třech studiích byla potvrzena rezistence enterokoků na vancomycin a ampicillin. Rezistence na tetracyklin a erytromycin byla prokázána u studií pro obě syrová mléka, studie pro mléko z automatů však tato antibiotika netestovala. Rezistence na gentamicin byla

sledována ve všech studiích a prokázala se pro obě syrová mléka, nikoliv pro syrové mléko z automatu.

3.4.2 Sýry

Ve studii (26) byly izolovány enterokoky z čerstvého měkkého sýra a ze sýra typu mozzarella. Bylo odebráno 110 vzorků měkkého sýra a 168 vzorků sýru mozzarella. Bakterie rodu *Enterococcus* byly izolovány ve 35,6 % vzorcích čerstvého sýra a ve 22 % vzorcích mozzarely. Pomocí diskové difúzní metody byla pozorována antibiotická rezistence enterokoků na následující antibiotika: amoxicilin/klavulanová kyselina, ampicilin, ciprofloxacin, chloramfenikol, erytromycin, gentamicin, linezolid, teicoplanin, penicilin, tetracyklin, vancomycin (26).

V čerstvém měkkém sýru bylo 38,6 % enterokoků rezistentních na erytromycin, 21 % na gentamicin, 18,4 % na ciprofloxacin, 13,2 % na vancomycin a 10,6 % penicilin G, nebyla zaznamenána žádná rezistence na amoxicilin/klavulanová kyselina a linezolid (26).

Enterokoky izolované ze vzorků mozzarely byly ve 13,5 % rezistentní na erytromycin a ve 2,7 % na ciprofloxacin, gentamicin a teicoplanin. Na ostatní testovaná antibiotika nebyla rezistence zjištěna (26).

Ve studii (27) byla zjištěna antibiotická rezistence enterokoků izolovaných ze sýra typu bryza ve 14 % na gentamicin a ampicilin, v 6 % na erytromycin (27).

U enterokoků izolovaných ze všech měkkých sýrů byla detekovaná výrazná rezistence na gentamicin a ampicilin. Tyto bakterie byly rezistentní na širší škálu antibiotik, ne však ve výrazných počtech (26, 27).

V tvrdých sýrech typu pecorino byly izolovány enterokoky vysoce rezistentní na erytromycin a rifampicin, dále také na ampicilin, chloramfenikol, tetracyklin a penicilin. V nízkých procentech byla sledována rezistence na vancomycin (31).

ZÁVĚR

Práce se věnovala antibiotické rezistenci enterokoků izolovaných z potravin, a to potravin rostlinného původu určených k přímé spotřebě, jako je ovoce a zelenina, či fermentované olivy. Dále byla sledována rezistence enterokoků z potravin živočišného původu, tedy z ryb, mořských plodů, masa a masných výrobků a mléka a mléčných výrobků.

U enterokoků izolovaných z potravin rostlinného původu bylo napříč studii zjištěno průměrně 19,7 % rezistentních kmenů. U ryb vykazovalo rezistenci na některé z antibiotik průměrně 30,8 % enterokoků. Rezistence enterokoků izolovaných z masa se lišila podle geografického původu, průměrný záchyt činil 22,5 %. Z masných výrobků bylo izolováno 11 % rezistentních kmenů. Enterokoky izolované z kravského mléka byly rezistentní průměrně v 10,2 %. Z mléčných výrobků byl průměrný záchyt rezistentních kmenů 8,6 %.

Z hlediska přenosu antibiotické rezistence se jeví ryby a maso jako nejvíce rizikové. Významné nebezpečí představují potraviny určené k přímé spotřebě, které dále neprocházejí tepelnou úpravou a nedochází zde k usmrcení enterokoků nesoucí rezistentní geny.

Nejčastěji byla vykazována rezistence na tetracyklin, erytromycin, ciprofloxacin, gentamicin a ampicilin. Často byla pozorována multirezistence.

Potraviny tedy zcela jistě mohou hrát roli v přenosu antibiotické rezistence. Pro zmírnění tohoto problému je nutno, aby byla při produkci potravin dodržována řádná hygienická opatření, aby se při produkci postupovalo dle příslušných vyhlášek a norem a stejně tak, aby léčba chovných zvířat antibiotiky byla kontrolována a správně provedena.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- 1) ROBINSON, Richard K., 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology: Volumes 1-3, Selective cultivation procedures* [online]. Elsevier [cit. 2021-03-05]. ISBN 978-0-08-052359-0. Dostupné z:
<https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051K6OL/encyclopedia-food-microbiology/selective-cultivation>
- 2) FISHER, Katie a Carol PHILLIPS, 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. *Microbiology* [online]. **155**(6), 1749-1757 [cit. 2021-03-05]. ISSN 1350-0872. Dostupné z: doi:10.1099/mic.0.026385-0
- 3) GARNEAU, Sylvie, Nathaniel I MARTIN a John C VEDERAS, 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* [online]. **84**(5-6), 577-592 [cit. 2021-03-05]. ISSN 03009084. Dostupné z: doi:10.1016/S0300-9084(02)01414-1
- 4) HANCHI, Hasna et al., 2018. The Genus *Enterococcus*: Between Probiotic Potential and Safety Concerns—An Update. *Frontiers in Microbiology* [online]. **9** [cit. 2021-03-24]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2018.01791
- 5) BARBIERI, Federica et al., 2019. Biogenic Amine Production by Lactic Acid Bacteria: A Review. *Foods* [online]. **8**(1) [cit. 2021-03-24]. ISSN 2304-8158. Dostupné z: doi:10.3390/foods8010017
- 6) POH, C.H., H.M.L. OH a A.L. TAN, 2006. Epidemiology and clinical outcome of enterococcal bacteraemia in an acute care hospital. *Journal of Infection* [online]. **52**(5), 383-386 [cit. 2021-03-05]. ISSN 01634453. Dostupné z: doi:10.1016/j.jinf.2005.07.011
- 7) JUBEH, Buthaina, Zeinab BREIJYEH a Rafik KARAMAN, 2020. Resistance of Gram-Positive Bacteria to Current Antibacterial Agents and Overcoming Approaches. *Molecules* [online]. **25**(12) [cit. 2021-03-21]. ISSN 1420-3049. Dostupné z: doi:10.3390/molecules25122888

- 8) CHAJEČKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta, Urszula ZARZECKA a Anna ZADERNOWSKA, 2021. Enterococci isolated from plant-derived food - Analysis of antibiotic resistance and the occurrence of resistance genes. *LWT* [online]. **139** [cit. 2021-03-18]. ISSN 00236438. Dostupné z: doi:10.1016/j.lwt.2020.110549
- 9) SADOWSKY, Michael J. a Richard L. WHITMAN, 2011. *Fecal bacteria: 12 - Fecal bacteria and foods* [online]. American Society for Microbiology (ASM), 281-282 [cit. 2021-3-5]. ISBN 978-1-61344-258-6. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0090DG9B/fecal-bacteria/fecal-bacteria-foods>
- 10) ŠVEC, Pavel, 2019. *Systematika rodu Enterococcus*. Brno. Habilitační práce. Masarykova univerzita, Fakulta přírodovědecká. [cit. 2021-04-08].
- 11) Slanetz & Bartley agar: Enterococcus agar. In: *SGL* [online]. [cit. 2021-04-08]. Dostupné z: <https://www.sglab.com/wp-content/uploads/2017/05/9098-1.png>
- 12) KOLÁŘ, Milan, Květen 2007. Vývoj bakteriální rezistence a nová antimikrobní léčiva. *Interní medicína* [online]. **2007**(5), 213-216 [cit. 2020-11-26]. Dostupné z: <https://www.internimedicina.cz/pdfs/int/2007/05/03.pdf>
- 13) HEDMAN, Hayden D., Karla A. VASCO a Lixin ZHANG, Srpen 2020. A Review of Antimicrobial Resistance in Poultry Farming within Low-Resource Settings. *ANIMALS* [online]. 4-9 [cit. 2020-11-26]. ISSN 2076-2615. Dostupné z: doi:10.3390/ani10081264
- 14) VOTAVA, Miroslav, 2005. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun [cit. 2020-11-26]. ISBN 80-868-5000-5.
- 15) BUŇKOVÁ, Leona a Magda DOLEŽALOVÁ, 2007. *Obecná mikrobiologie*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. [cit. 2020-11-26]. ISBN 978-80-7318-516-9.
- 16) HEJZLAR, Miroslav, Miloš TEPLÝ a Bohumil HYLMAR, 1980. *Antibiotika a jejich použití v potravinářství a zemědělství*. Praha: SNTL. Řada potravinářské literatury. [cit. 2020-11-26].

- 17) SPÍŽEK, Jaroslav, 1999. Rezistence na antibiotika: Je třeba hledat nové látky a nové postupy. *Vesmír* [online]. **78**(129), 27-32 [cit. 2021-02-17]. ISSN 0042-4544. Dostupné z: <https://vesmir.cz/cz/casopis/archiv-casopisu/1999/cislo-1/rezistence-antibiotika.html>
- 18) RHOUMA, Mohamed et al., 2020. Antimicrobial resistance associated with the use of antimicrobial processing aids during poultry processing operations: cause for concern? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* [online]. 1-18 [cit. 2021-02-18]. ISSN 1040-8398. Dostupné z: doi:10.1080/10408398.2020.1798345
- 19) HOLMES, Andrew J. et al., 2003. The gene cassette metagenome is a basic resource for bacterial genome evolution. *Environmental Microbiology*. **5**(5), 383-394. [cit. 2021-02-17]. ISSN 1462-2912. Dostupné z: doi:10.1046/j.1462-2920.2003.00429.x
- 20) PENNEY, N., J.W.S. YANCEY a E.J. YANCEY, 2014. PACKAGING | Equipment. *Encyclopedia of Meat Sciences*[online]. Elsevier, 65 [cit. 2021-02-17]. ISBN 9780123847348. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-384731-7.00106-9
- 21) EL ISSAOUI, Kaoutar et al., 2021. Molecular identification and antibiotic resistance of bacteriocinogenic lactic acid bacteria isolated from table olives. *Archives of Microbiology* [online]. **203**(2), 597-607 [cit. 2021-03-28]. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/s00203-020-02053-0
- 22) IGBINOSA, Etinosa O. a Abeni BESHIRU, 2019. Antimicrobial Resistance, Virulence Determinants, and Biofilm Formation of Enterococcus Species From Ready-to-Eat Seafood. *Frontiers in Microbiology* [online]. **10** [cit. 2021-03-31]. ISSN 1664-302X. Dostupné z: doi:10.3389/fmicb.2019.00728
- 23) AL-GHANAYEM, Abdullah et al., 2020. Multidrug Resistance Pattern of Bacteria Isolated from Fish Samples Sold in Retail Market. *JOURNAL OF CLINICAL AND DIAGNOSTIC RESEARCH* [online]. [cit. 2021-03-31]. ISSN 2249782X. Dostupné z: doi:10.7860/JCDR/2020/42847.13436
- 24) ELLIS-IVERSEN, Johanne et al., 2020. Antimicrobial resistant E. coli and enterococci in pangasius fillets and prawns in Danish retail imported from Asia. *Food Control* [online]. **114** [cit. 2021-03-31]. ISSN 09567135. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodcont.2019.106958

- 25) LAUKOVÁ, Andrea et al., 2019. Enterococci Isolated from Trout in the Bukovec Water Reservoir and Čierny Váh River in Slovakia and Their Safety Aspect. *BioMed Research International* [online]. **2019**, 1-7 [cit. 2021-03-31]. ISSN 2314-6133. Dostupné z: doi:10.1155/2019/8051438
- 26) PESAVENTO, G. et al., 2014. Prevalence and antibiotic resistance of Enterococcus spp. isolated from retail cheese, ready-to-eat salads, ham, and raw meat. *Food Microbiology* [online]. **41**, 1-7 [cit. 2021-04-08]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2014.01.008
- 27) KROČKO, M., et al. Antibiotic resistance of Enterococcus species isolated from raw foods of animal origin in South West part of Slovakia. *Czech Journal of Food Sciences*, 2011, 29.6: 654-659. [cit. 2021-04-09]
- 28) CHAJEČKA-WIERZCHOWSKA, Wioleta, Anna ZADERNOWSKA a Łucja ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, 2016. Diversity of Antibiotic Resistance Genes in Enterococcus Strains Isolated from Ready-to-Eat Meat Products. *Journal of Food Science* [online]. **81**(11), M2799-M2807 [cit. 2021-04-09]. ISSN 00221147. Dostupné z: doi:10.1111/1750-3841.13523
- 29) KRAHULCOVÁ, Monika, Kristína LÉPESOVÁ a Lucia BÍROŠOVÁ, 2018. Occurrence of antibiotic resistant bacteria in raw cow milk from vending machines. *Acta Chimica Slovaca* [online]. **11**(1), 55-59 [cit. 2021-04-09]. ISSN 1337-978X. Dostupné z: doi:10.2478/acs-2018-0009
- 30) FABIANOVÁ, Jana, et al. Presence of Enterococci in cow milk and their antibiotic resistance. *Potravinarstvo Slovak Journal of Food Sciences*, 2010, 4.2: 17-21. [cit. 2021-04-09].
- 31) RUSSO, Nunziatina et al., 2018. Enterococcus spp. in Ragusano PDO and Pecorino Siciliano cheese types: A snapshot of their antibiotic resistance distribution. *Food and Chemical Toxicology* [online]. **120**, 277-286 [cit. 2021-04-29]. ISSN 02786915. Dostupné z: doi:10.1016/j.fct.2018.07.023
- 32) SMĚRNICE EVROPSKÉHO PARLAMENTU A RADY č. 2000/54/ES o ochraně zaměstnanců před riziky spojenými s expozicí biologickým činitelům při práci. [cit. 2021-03-24] Dostupný také z: <https://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2000:262:0021:0045:EN:PDF>

- 33) TRIVEDI, K., S. CUPAKOVA a R. KARPISKOVA, 2011. Virulence factors and antibiotic resistance in enterococci isolated from food-stuffs. *Veterinární Medicína* [online]. **56**(7), 352-357 [cit. 2021-5-6]. ISSN 03758427. Dostupné z: doi:10.17221/1584-VETMED
- 34) MICALLEF, Shirley A. et al., 2013. Diversity, distribution and antibiotic resistance of *Enterococcus* spp. recovered from tomatoes, leaves, water and soil on U.S. Mid-Atlantic farms. *Food Microbiology* [online]. **36**(2), 465-474 [cit. 2021-5-6]. ISSN 07400020. Dostupné z: doi:10.1016/j.fm.2013.04.016
- 35) DURÁN, GIANNA M. a DOUGLAS L. MARSHALL, 2005. Ready-to-Eat Shrimp as an International Vehicle of Antibiotic-Resistant Bacteria†. *Journal of Food Protection* [online]. **68**(11), 2395-2401 [cit. 2021-5-6]. ISSN 0362-028X. Dostupné z: doi:10.4315/0362-028X-68.11.2395

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAC	aminoglykosid acetyltransferáza
ANT	aminoglykosid nukleotidyltransferáza
APH	aminoglykosid fosfotransferáza
ATB	antibiotikum
ATP	adenosintrifosfát
BHI	brain heart infusion
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
DNA	deoxyribonukleová kyselina
<i>E.</i>	<i>Enterococcus</i>
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
MH	Mueller-Hinton
MIC	minimální inhibiční koncentrace
NaCl	chlorid sodný
NaN ₃	azid sodný
PCR	polymerázová řetězová reakce
RNA	ribonukleová kyselina
rRNA	ribosomální ribonukleová kyselina
SB	Slanetz-Bartley
USA	Spojené státy americké
VRE	Vancomycin-resistant <i>Enterococcus</i>

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1 Růst bakterií rodu <i>Enterococcus</i> na SB agaru.....	16
---	----

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1 Penicilinová antibiotika (12).....	18
Tabulka 2 Cefalosporinová antibiotika (12)	19
Tabulka 3 Antibiotika tetracyklinová (12).....	19
Tabulka 4 Antibiotika aminoglykosidová (12).....	20
Tabulka 5 Další typy antibiotik (12).....	20