

# Antibiotická rezistence a kolicinogenie u kmenů *Escherichia coli* izolovaných z potravin

Bc. Martina Chuchmová

---

Diplomová práce  
2013



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav analýzy a chemie potravin  
akademický rok: 2012/2013

## ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE (PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Martina Chuchmová**  
Osobní číslo: **T11718**  
Studijní program: **N2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Technologie, hygiena a ekonomika výroby potravin**  
Forma studia: **kombinovaná**

Téma práce: **Antibiotická rezistence a kolicinogenie u kmenů  
Escherichia coli izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování:

### Teoretická část

1. Zpracujte literární rešerši zaměřenou na výskyt kolicinogenie a antibiotické rezistence, včetně multirezistence u bakterie *Escherichia coli*, zejména u izolátů z potravin

### Praktická část

1. Provedte stanovení antibiotické rezistence a produkce kolicinů u získaného souboru kmenů *E. coli* diskovou difúzní metodou
2. Formulujte závěry výsledků, zaměřte se na hledání souvislostí mezi výskytem antibiotické rezistence a kolicinogenie u *Escherichia coli* izolovaných z potravin, do vyhodnocení zahrňte také výsledky z pracoviště z let 2006–2012

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná**

Seznam odborné literatury:

**SEZNAM DOPORUČENÉ LITERATURY** [1] EUCAST guidelines for detection of resistance mechanisms and specific resistances of clinical and/or epidemiological importance.

2012. Icit. 2012-12-05]. Dostupný z:

[http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/EUCAST\\_guidelines\\_d](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_d)

[2] CASCALEC, E. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2007, p. 158-229

[3] HASSAN M. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 2012, 113, p. 723-736

[4] NEČAS, Oldřich. *Obecná biologie pro lékařské fakulty*. 3., přeprac. vyd. Jinočany: H & H, 2000, 341-342 s. ISBN 8086022463

[5] SNUSTAD, D, Michael J SIMMONS, Jiřina RELICHOVÁ a Johann Gregor MENDEL. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, 181-208 s. ISBN 978-80-210-4852-2.

[6] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2., přeprac. vyd. Brno: Neptun, 2005, 235-238 s. ISBN 80-86850-00-5

Vedoucí diplomové práce:

**Mgr. Magda Doležalová, Ph.D.**

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání diplomové práce:

**11. února 2013**

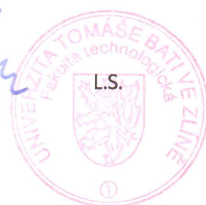
Termín odevzdání diplomové práce:

**17. května 2013**

Ve Zlíně dne 11. února 2013



doc. Ing. Roman Čermák, Ph.D.  
*děkan*





doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: CHUCHIMOVA' MARTINA

Obor: TECHNOLOGIE, HYGIENA A  
EKONOMIKA VÝROBY POTRAVIN

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby<sup>1)</sup>;
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/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<sup>2)</sup>;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60<sup>3)</sup> odst. 2 a 3 mohu užit své dílo – diplomovou/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);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/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.

Ve Zlíně 9.5.2013

Martina Chuchimová

<sup>1)</sup> zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací;

(1) Vysoká škola nevdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

<sup>2)</sup> 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, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacímu zařízení (školní dílo).

<sup>3)</sup> 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, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užit či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlídně k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

## ABSTRAKT

V současnosti se zájem odborné veřejnosti obrací na studium přenosu a šíření antibiotické rezistence u bakterií, které se mohou šířit přímo, potravinami nebo prostředím. *Escherichia coli* je bakterie vyskytující se v zažívacím traktu člověka a teplokrevných živočichů a tudíž se běžně vyskytuje zejména v potravinách živočišného, ale nepřímě i v potravinách rostlinného původu. Produkce bakteriocinů je pro kmeny *E. coli* ekologickou výhodou a umožňuje přežití produkční populace. Cílem praktické části této práce bylo zjistit aktuální stav antibiotické rezistence a kolicinogenie u 20 kmenů *E. coli* izolovaných z potravin a získané informace zahrnout do celkových výsledků 120 izolátů *E. coli* sbírky Fakulty technologické UTB ve Zlíně. U 93 % izolátů *E. coli* byla potvrzena multirezistence a 43 % kmenů *E. coli* produkovalo minimálně jeden typ kolicinu nebo mikrocinu, z nichž většina kmenů byla multirezistentních. Výsledky této práce potvrzují, že izoláty *E. coli* z potravin se mohou podílet na šíření antibiotické rezistence. Předpokládaný trend poklesu výskytu antibiotické rezistence vzhledem k zákazu používání antibiotik jako růstových stimulátorů od 1/2006 byl vyvrácen, s ohledem na získané výsledky rezistentních *E. coli* k ampicilinu a cefalotinu.

Klíčová slova: antibiotická rezistence, koliciny, *Escherichia coli*, potraviny, multirezistence

## ABSTRACT

Nowadays, the interest of researchers is turning to study the transmission and spread of antibiotic resistance in bacteria that can spread directly, by food or environment. *Escherichia coli* is a bacterium occurring in the intestinal tract of humans and warm-blooded animals, therefore is commonly found in particular in the food of animal origin, but indirectly also in the food of plant origin. The production of bacteriocins is environmental benefit for *E. coli* strains and allows survival of the producer. The practical part of this diploma is aimed to determine the current status of antibiotic resistance and colicinogeny in 20 strains of *E. coli* isolated from food. These results encompass into the overall results of 120 isolates of *E. coli* collections Faculty of Technology, Tomas Bata University in Zlín. Antibiotic multiresistance was confirmed in 93% of *E. coli* isolates and 43% of strains produced at least one type of colicin or microcin, most of which were multiresistant

strains. The results of this study confirm that the *E. coli* isolates from food may participate on the spreading of the antibiotic resistance. Expected decline trend of antibiotic resistance, due to the ban of antibiotic usage as growth promoters since 1/2006, has been refuted, in the light of the results of *E. coli* resistant to ampicilin and cephalothin .

**Keywords:** antibiotics resistance, colicins, *Escherichia coli*, food, multidrug resistance

Touto cestou bych velmi ráda poděkovala své vedoucí diplomové práce Mgr. Magdě Doležalové Ph.D., za odbornou pomoc, vedení práce, cenné rady a připomínky při zpracování této diplomové práce.

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



# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>11</b>
<b>I TEORETICKÁ ČÁST</b> .....	<b>12</b>
<b>1 ESCHERICHIA COLI</b> .....	<b>13</b>
1.1 ZDROJE <i>E. COLI</i> V POTRAVINÁCH .....	14
1.1.1 Suroviny a potraviny rostlinného původu .....	15
1.1.2 Suroviny a potraviny živočišného původu.....	16
<b>2 ANTIBIOTIKA</b> .....	<b>17</b>
2.1 MECHANISMUS ÚČINKU ANTIBIOTIK.....	17
2.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny.....	17
2.1.2 Porušení plazmatické membrány .....	18
2.1.3 Inhibice proteosyntézy .....	18
2.1.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin .....	18
2.1.5 Inhibitory metabolismu .....	19
2.1.6 Charakteristika vybraných antibiotik .....	19
<b>3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE</b> .....	<b>21</b>
3.1 VZNIK ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	21
3.1.1 Enzymatická rezistence .....	22
3.1.2 Snížená propustnost buněčné stěny.....	22
3.1.3 Eflux .....	23
3.1.4 Další mechanismy .....	23
3.2 ZÍSKÁNÍ A ŠÍŘENÍ REZISTENCE.....	23
3.2.1 Konjugace .....	24
3.2.2 Transformace.....	24
3.2.3 Transdukce .....	24
<b>4 BAKTERIOCINY</b> .....	<b>25</b>
4.1 KOLICINY .....	25
4.2 MIKROCINY .....	26
4.3 VYUŽITÍ KOLICINŮ A MIKROCINŮ .....	27
<b>II PRAKTICKÁ ČÁST</b> .....	<b>28</b>
<b>5 CÍL PRÁCE</b> .....	<b>29</b>
<b>6 MATERIÁL</b> .....	<b>30</b>
6.1 PŘÍSTROJE .....	30
6.2 KULTIVAČNÍ MÉDIA.....	30
6.3 CHEMIKÁLIE.....	31
6.4 POUŽITÉ BAKTERIÁLNÍ KMENY .....	33
<b>7 METODY</b> .....	<b>35</b>

7.1	STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE DISKOVOU DIFUZNÍ METODOU .....	35
7.2	KVANTITATIVNÍ STANOVENÍ PRODUKCE KOLICINŮ.....	35
<b>8</b>	<b>VÝSLEDKY A DISKUZE .....</b>	<b>36</b>
8.1	STANOVENÍ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE .....	36
8.2	STANOVENÍ KOLICINOGENIE.....	37
8.3	ZPRACOVÁNÍ ZÍSKANÝCH VÝSLEDKŮ ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE A KOLICINOGENIE Z LET 2006 - 2012 .....	38
8.3.1	Antibiotická rezistence u izolátů <i>E. coli</i> pocházející z potravin.....	39
8.3.2	Kolicinogenie u izolátů <i>E. coli</i> z potravin.....	40
8.3.3	Zjištěné souvislosti mezi antibiotickou rezistencí a kolicinogenií u kmenů <i>E. coli</i> izolovaných z potravin.....	41
	<b>ZÁVĚR.....</b>	<b>43</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY .....</b>	<b>45</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>54</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>55</b>
	<b>SEZNAM PŘÍLOH.....</b>	<b>56</b>

## ÚVOD

Bakterie *Escherichia coli* se běžně vyskytuje ve střevech lidí a teplokrevných zvířat. Je to podmíněné patogenní mikroorganismus, který může způsobovat závažná onemocnění lidí a zvířat. Patogenní intestinální kmeny *E. coli* pronikají do organismu alimentární cestou s vodou nebo potravou. Potraviny, které mohou být kontaminovány *E. coli*, jsou živočišného i rostlinného původu, přičemž je zastoupena široká škála komodit (zelené saláty, klíčky, vodní meloun, ananas, maso potravinových zvířat, zvěřina, krabí maso).

Antibiotická rezistence je získaná nebo vrozená vlastnost bakterií, která dovoluje bakteriální buňce vytvořit si mechanismy, kterými si zabezpečí ochranu před účinkem antibiotické látky. Je-li bakterie rezistentní k více antibiotikům je tzv. multirezistentní. Tento fenomén značně komplikuje léčbu lidí i zvířat.

Koliciny jsou antibakteriální toxiny, patřící do skupiny bakteriocinů. Tyto látky bílkovinné povahy jsou produkovány bakteriálními kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae*, zvláště pak druhem *E. coli*. Kolicinogenní kmeny *E. coli* mohou syntetizovat kromě kolicinů také mikrocinů. Zásadní rozdíl mezi koliciny a mikrocinů je ve velikosti a v signálu vyvolávající jejich produkci.

## **I. TEORETICKÁ ČÁST**

## 1 *ESCHERICHIA COLI*

Víděňský lékař a bakteriolog Theodor Escherich v roce 1886 publikoval článek o střevní bakterii *Bacterium coli comunea*. Popisoval skutečnost, že tento typ bakterie je přítomný ve střevech novorozenců trpících průjmami, ale zároveň u zdravých dětí je přirozenou součástí střevní mikroflóry. V roce 1919 byla *Bacterium coli comunea* přejmenována na *Escherichia coli* [1]. Byl u ní poprvé popsán a sledován přenos genetického materiálu konjugací, přičemž definováním konjugace napomohlo objasnit genetické mapování dlouhé řady bakteriálních druhů [2].

Slouží jako modelový organismus v genetickém výzkumu napomáhající např. objasnění rezistence k antibiotikům. *Escherichia* se řadí mezi indikátorové a indexové mikroorganismy. Určením skupiny indikátorových mikroorganismů, lze získat informaci o prostředí, které mohlo způsobit pomnožení nebezpečných mikroorganismů v potravine. *E. coli* přítomná v potravine může signalizovat zdroj fekálního znečištění např. na jatkách. *E. coli* jako indexový organismus informuje o mikrobiologickém stavu a procesech, které v potravine probíhají. Vypracované mikrobiální limity, poskytnou odpovídající údaje, ze kterých lze vyvodit patřičné závěry o zpracovaných surovinách [3].

*Escherichia coli* je mezofilní bakterie, která roste při teplotách 7-10 °C do 50 °C. Optimum je při 37 °C. Roste ideálně v neutrálním prostředí, nicméně je schopna růstu i v kyselé oblasti kolem 4,4. Zkvašuje pentózy, glukózu a laktozu za intenzivní tvorby kyselin (kyseliny mléčné, octové a mravenčí) a plynu [4].

Genetická informace je uložena v nukleoidu, který obsahuje jeden hlavní chromozom. V buňce je nukleoid spojen s plazmatickou membránou na několika místech. U *E. coli* je takové místo označeno jako oblast *oriC*, počátek replikace chromozomové DNA [5].

Plazmidy tvoří kružnicová dsDNA a jsou na nich lokalizovány geny. Existují jako samostatně se replikující genetické elementy a mohou nést od tří do tří set různých genů. Jsou však na buňce závislé a nemohou se mimo ni množit. S membránou jsou pak spojeny v místě označené jako lokus *Inc* [5]. Konjugativní plazmidy vynikají svou specifickou vlastností, přenosu genetické informace z donorové buňky (poskytuje materiál) do buňky recipientní (příjemce), tak může existovat v buňce až tisíc kopií jednoho plazmidu. Geny umožňující přenos se označují jako tzv. transferové. Na povrchu buněk je pak nutná pří-

tomnost pilusů (vláken), kterými se donorové a recipientní buňky spojí s následným přenosem kopie plazmidu.

U *E. coli* lze popsat tři typy plazmidů. Jsou to F - plazmidy, R - plazmidy, Col - plazmidy [6]. Plazmid navozující konjugaci je označován jako tzv. F - plazmid (fertilitní plazmid, který umožňuje přenášet geny do jiných bakterií) [6]. Dalším typ plazmidu tzv. R - plazmid souvisí s antibiotickou rezistencí. Nesou geny pro tuto skutečnost a jsou tak bakterií nápomocny rušit účinnost antibiotik. Geny pro beta - laktamázy (enzymy, které vyvolávají hydrolyzu betalaktamového kruhu) jsou lokalizovány na R - plazmidech a jsou tak typickým příkladem rezistence vůči beta - laktamovým antibiotikům [7]. Col - plazmidy nesou gen pro syntézu antibakteriálních proteinů (kolicinů) produkovaných kolicinogenními bakteriemi *E. coli*. Spolu s ním se vyskytuje gen pro lytický protein, což je malý lipoprotein, jehož hlavní funkcí je uvolnění kolicinu z produkční buňky. Přítomnost genů pro imunitní protein je zásadní z hlediska ochrany vlastních buněk proti toxickému účinku vlastního kolicinu. *E. coli* dokáže inaktivovat např. působení kolicinu M svým imunitním proteinem a zabrání tak vlastní buněčné smrti [8, 10]. Je rozlišována existence dvou typů plazmidů - typ I a typ II. Diferenčním kritériem je velikost a druh kolicinu [9].

### 1.1 Zdroje *E. coli* v potravinách

Bakterie *E. coli* se běžně vyskytuje ve střevech lidí i teplokrevných zvířat. Převážná většina je nepatogenní a navíc je nápomocna při trávení a tvorbě vitamínu B<sub>12</sub>, K<sub>1</sub> a K<sub>2</sub> [11].

Patogenní intestinální bakterie *E. coli* pronikají do organismu alimentární cestou s vodou nebo potravou. Tyto patogenní kmeny se rozdělují do šesti tříd v závislosti na účinku, který vyvolávají v organismu. EPEC - enteropatogenní, ETEC - enterotoxická, EIEC - enteroinvazivní, EAEC - enteroagregativní, EHEC - enterohemoragická, A/EEC - attaching and affacing (nemá jednoznačný český název, u lidí se vyskytuje vzácně, vyvolává průjemy převážně u skotu). EPEC, ETEC, EIEC, EAEC - způsobují průjemy u dětí i dospělých. U potravinových zvířat tyto jmenované skupiny kmenů způsobují závažné průjemy a u novorozenečků selat jsou častou příčinou vysoké úmrtnosti. U 80 shromažděných izolátů, z nichž 64 bylo klinického původu, byla zjišťována přítomnost patogenních kmenů *E. coli*. Tyto izoláty byly získány z exkrementů novorozenečků selat a u 43 izolátů byla potvrzena přítomnost enterotoxigenních (ETEC) a shiga-toxigenních (STEC) kmenů. Kmeny ETEC byly nalezeny v 53,8 % a kmeny STEC v 2,5 % [11, 12].

### 1.1.1 Suroviny a potraviny rostlinného původu

Ovoce a zelenina bývá často kontaminována patogenními kmeny *E. coli*. Chlévská mrva nebo kejda, která je využívána při hnojení polí, bývá rezervoárem těchto patogenních mikroorganismů. Při úniku odpadních vod jsou taktéž potraviny rostlinného původu ohroženy kontaminací. Takové potraviny jsou pak potencionálním zdrojem nákazy. Další možnosti, kde potraviny mohou být kontaminovány, jsou operace v průběhu sklizně, skladování a přeprava [13].

Teplota je významný činitel, který ovlivňuje množení patogenů. Vzájemné souvislosti mezi teplotou a růstem mikroorganismů popisuje studie u kmenů *E. coli* O157:H7, *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, *Listeria monocytogenes*). Množení patogenů bylo sledováno u vybraných salátů - římský salát, ledový salát, Perilla listy (asijská zelenina, která voní po karí a snižuje cholesterol) a u klíčků. Saláty byly uloženy při teplotě 4 a 15 °C a dle určených časových období byla sledována mikroflóra. Ze zjištěných výsledků vyplynulo, že populace *E. coli* a *S. typhimurium* se na ledovém salátě při teplotě 15 °C výrazně zvýšila, naopak zelenina uložená při 4 °C nevykazovala žádné výrazné zvýšení populace. Navíc *E. coli* přítomná na klíčcích nepřežila skladování při 4 °C [14].

Pokud se potraviny uchovávají při chladírenských teplotách a to včetně dopravy, distribuce, skladování a manipulaci v supermarketech, lze tak významně přispět k zachování zdravotní nezávadnosti potravin. Další studie popisující vliv teploty na bakterie, byla provedena ve Španělsku. Čerstvě nařezaný ananas byl uměle zaočkován kmenem *E. coli* O157:H7 a ponechán při teplotě 5 °C/ 8 dnů a 25 °C/ 3 dny. V obou případech nebyl zaznamenán žádný nárůst. Zelenina byla rovněž naočkována a skladována při teplotě 25 °C po dobu 3 dnů. Největší zvýšení počtu *E. coli* O157:H7 byl pozorován u nakrájené mrkve a o něco méně u čekanky. Potravinová fólie využívaná pro balení čerstvých potravin rovněž nemá vliv na snižování počtu patogenů. U vodního melounu byly prokázány zvýšené výskyty *E. coli* O157:H7 bez ohledu na to, zda byl či nebyl zabalen do fólie (s modifikovanou atmosférou) [15].

Acidotolerantní vlastnosti umožňují přežití *E. coli* O157:H7 v kyselých tekutinách jako jsou džusy. Právě tato vlastnost byla potvrzena ve studii, popisující schopnost přežití *E. coli* O157:H7 v čerstvě připraveném džusu z moruší [16].

### 1.1.2 Suroviny a potraviny živočišného původu

Způsoby, jakými lze kontaminovat suroviny živočišného původu je několik. Při manipulaci a zpracování masa hrozí riziko již při evisceraci a stahování kůže, manipulace s masem, skladování, distribuce, nedodržování zásad správné hygienické praxe má zásadní vliv na složení mikroflóry živočišných surovin.

*E. coli* se vyskytuje v mase hovězím, vepřovém, drůbežím, rybím a také byla nalezena v krabím mase. Po sérii výskytu střevních potíží u lidí, bylo zjištěno, že zdrojem nákazy bylo krabí maso pocházející od neregistrovaného dodavatele krabů [17].

Tepelně neupravené produkty z drůbežího masa často představují zdroj patogenních *E. coli*. Mnohé studie popisují způsoby, jak zamezit množení patogenů na mase. Sledovat účinek velmi nízkých teplot na přežití *E. coli* a *Salmonella typhimurium* bylo cílem studie ve Španělsku. Drůbeží maso bylo uloženo při  $-85\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Získané údaje dostatečně neprokázaly přímý účinek nízkých teplot na snižování počtů přítomných mikrobů [18].

Toxigenní kmen STEC *E. coli* bývá příčinou těžkých průjmů u lidí a častým zdrojem bývají suroviny živočišného původu. Maso běžně dostupné v maloobchodní síti bylo testováno pomocí PCR na přítomnost O - skupin STEC kmenů *E. coli*. Izoláty pocházely z masa hovězího, vepřového, drůbežího a zvěřiny (jelenec běloocasý, jelen, divoké prase, bizon a zajíc). V drůbežím mase byla v 75 % prokázána přítomnost genu pro STEC, ve vepřovém v 50 % a v hovězím v 35 %. Nejvyšší potvrzená vnímavost byla u izolátů jelence běloocasého v 100 % a naopak u divokého prasete a zajíce nebyl objeven žádný gen pro STEC [19].



## 2 ANTIBIOTIKA

Antibiotikum je substance biologické, semisyntetické nebo syntetického původu, která vykazuje selektivní toxicitu proti bakteriím [20]. Jiná definice popisuje antibiotikum, jako substanci, která je produkována mikroorganismy. Tato substance v nízké koncentraci působí proti růstu nebo životu mikroorganismů [11]. Antibiotika mohou působit dvojitým účinkem. Baktericidní účinek vykazují takové látky, které zasahují do struktury buněčné stěny nebo cytoplazmy. Takový účinek vykazují např.  $\beta$  – laktamy a jsou příčinou buněčné smrti [21]. Bakteriostatická antibiotika zastavují růst a množení bakteriální buňky. Dochází k inhibici syntézy bílkovin, typické pro aminoglykosidy nebo tetracykliny. A dále k inhibici syntézy kyseliny tetrahydrofólové, typické pro sulfonamidy [22].

Hlavní skupiny antibiotik je následující [23]:

- $\beta$ -laktamy – peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, monobactamy;
- aminoglykosidy;
- tetracykliny;
- makrolidy;
- linkosamidy;
- glykopeptidy;
- chinolony;
- antimykotika;
- sulfonamidy.

### 2.1 Mechanismus účinku antibiotik

Účinek antibiotik závisí na zasažení cílové struktury v buňce. Ovlivňují syntézu buněčné stěny, plazmatické membrány, protosyntézy, nukleových kyselin a inhibují metabolismus bakteriální buňky.

#### 2.1.1 Inhibice syntézy buněčné stěny

Skupiny antibiotik, které zasahují do syntézy buněčné stěny a vyznačují se baktericidním účinkem např. jsou  $\beta$  - laktamy, peniciliny, cefalosporiny. Peptidoglykan je důležitá složka

buněčné stěny a jeho funkcí je zajišťovat integritu buňky. Enzymy podstatné pro syntézu peptidoglykanu disponují transpeptidázovou aktivitou a jsou označovány jako PBPs proteiny (penicilin vázané proteiny).  $\beta$  - laktamy se na PBPs proteiny vážou kovalentní vazbou. Vytvoření vazby zapříčiní blokaci nové tvorby peptidoglykanu. Afinita penicilinů a jiných  $\beta$  - laktamů k PBPs proteinu je dána podobnou strukturou peptidů, především jejich postranním řetězcem terminálního konce (D – alanyl – D – alanyl - dipeptidu). Přítomnost PBPs v buňce je nutná pro vytváření zkřížených vazeb, metabolických drah a dělení buňky [24, 25].

### 2.1.2 Porušení plazmatické membrány

Polypeptidy (kolistin, polymyxin B) účinkují jako detergentia na fosfolipidy, poškozují cytoplazmatikou membránu, která ztrácí svou permeabilitu a integritu [23]. Kolistin vytváří vazbu s anionty lipopolysacharidů. Vazba způsobí vytěsnění vápníku a hořčíku z membrány, což vede ke změnám v propustnosti membrány, úniku iontů a smrti. V klinické praxi jsou kolistin (polymixin E) a polymixin B aplikovány na multirezistentní kmeny gram - negativních bakterií včetně *E. coli* [26].

### 2.1.3 Inhibice proteosyntézy

Antibiotika, která svým působením naruší průběh proteosyntézy, působí baktericidním i bakteriostatickým účinkem na ribozomální jednotku. V závislosti na druhu antibiotické dráhy zasahují do velké (50S), ale i malé (30S) jednotky. Může nastat blokáce enzymů proteosyntézy nebo se proteosyntéza nemusí vůbec rozběhnout [27, 28].

Antibiotika, která ovlivňují syntézu bílkovin, se mezi sebou liší chemickou strukturou. Do této skupiny lze např. zařadit tetracykliny, chloramfenikol, aminoglykosidy.

Tetracykliny se vážou na 30S podjednotku a interferují s aminoacyl – t - RNA v iniciačním komplexu. Brání ve vytvoření vazby na ribosom, což se odrazí v nedostatku aminokyselin pro syntézu peptidového řetězce [23]. Účinek je bakteriostatický tzn. že růst a množení mikrobů přetrvává po dobu podání antibiotika.

### 2.1.4 Inhibice syntézy nukleových kyselin

Preparáty ovlivňující syntézu nukleových kyselin zasahují do replikace nebo transkripce DNA. DNA gyráza je pro buňku nepostradatelný enzym nutný pro tvorbu terciální struktury

ry DNA. Chinolony způsobí blokaci podjednotky DNA gyrázy a zabrání replikaci chromozomu [23, 40]. Mezi látky, které inhibují syntézu nukleových kyselin, patří: chinolony, rifampicin, nitroimidazoly. Účinek těchto látek je baktericidní.

### 2.1.5 Inhibitory metabolismu

Do této skupiny se řadí sulfonamidová antibiotika. Sulfonamidy blokují enzym, který pomáhá přeměně kyseliny para - aminobenzoové na dihydrolistovou. Přičemž kyselina dihydrolistová je prekurzorem kyseliny tetrahydrolistové. Sulfonamidy působí jako kompetitivní inhibitory enzymu DHPS (dihydropteroát syntetáza), který katalyzuje přeměnu kyseliny para-aminobenzoové v počátku probíhající přeměny [29]. Bakterie nejsou schopny využívat preformovanou kyselinu listovou a tudíž jsou závislé na syntéze z para-aminobenzoové [23].

### 2.1.6 Charakteristika vybraných antibiotik

Následující skupiny antibiotik byly vybrány s ohledem na *E. coli* a možným výskytem rezistence k daným skupinám antibiotik.

#### BETA - LAKTAMY

Ve struktuře  $\beta$  - laktamových antibiotik je přítomný  $\beta$  - laktamový kruh. Na ten je připojený další kruh, charakteristický pro konkrétní skupinu – např. peniciliny obsahují pětičlenný kruh s atomem síry (thiazolidin), cefalosporiny mají kruh šestičlenný také s atomem síry (dihydrothiazin). Dochází k inhibici buněčné stěny vytvořením komplexu mezi transpeptidázami (často to jsou např. karboxypeptidázy) a PBP (protein vázající penicilin). Touto vazbou se iniciují autolytické enzymy, způsobující rozvolnění buněčné stěny s následnou buněčnou smrtí [27, 30]. Baktericidní účinek penicilinů a cefalosporinů je vymezený na dobu, kdy bakteriální buňka roste, tzn. je v růstové fázi. Širokospektré peniciliny disponují širokou škálou antibiotických preparátů, kam např. patří ampicillin, amoxicillin, piperacilin, ticarcilin. Cefalosporiny jsou členěny na skupinu I. až IV. generace. Spektrum účinku závisí na způsobu, působení vůči  $\beta$  – laktamázám a průniku přes buněčnou stěnu [27]. I. generace (cefalotin, cefalozin) má úzké spektrum účinku, především na grampozitivní bakterie. II. generace (cefuroxim, cefoxitin, cefamandol) rozšířila účinnost na gramnegativní tyčinky. III. generace (cefaperazon, cefotaxim, ceftazidim, cefsulodin, cefodizim) prakticky nepůsobí na stafylokoky, ale jsou vysoce účinné na gramnegativní bakte-

rie. IV. generace (cefpirom, cefepim) se vyznačuje rychlým proniknutím skrz zevní membránu gramnegativních bakterií [27, 31].

### AMINOGLYKOSIDY

Chemickým základem pro tato antibiotika je aminocyklitolový kruh, na kterém jsou glykosidickou vazbou připojeny dva aminocukry [27]. Působí bakteriocidně tím, že interferují s formylmethionyl - tRNA na ribozomální podjednotce 30S. Baktericidní aktivita je rychlá. Aminoglykosidy jsou transportovány aktivním pohybem a je u nich popisován tzv. postantibiotický efekt. Tento efekt způsobí, že účinek antibiotika, přetrvává i po uplynutí určité doby po podání dávky léku [32]. Aminoglykosidy zahrnují následující antibiotika: streptomycin, neomycin, gentamicin, tobramicin, amikacin [31].

### TETRACYKLINY

Tetracykliny jsou antibiotika s bakteriostatickým účinkem. Molekula tetracyklinů obsahuje čtyři šestičlenné kondenzované cykly [27]. Inhibují proteosyntézu tím, že brání upevnění aminoacyl - tRNA na konkrétní místo dané ribozomální podjednotky 30S. Vykazuje široké spektrum působení u grampozitivních i gramnegativních bakterií [28]. Zástupci patřící do této skupiny jsou: tetracylin, chlortetracyklin, oxytetracyklin, doxycyklin, minocyklin, thiacyklin [28, 31].

### SULFONAMIDY

Sulfonamidy působí v buňce jako konkurenční inhibitory enzymu dihydropteroátu (DHPS), který katalyzuje přeměnu kyseliny p - aminobenzoové (PABA), ta je prekurzorem kyseliny listové. Přičemž přítomnost kyseliny je nezbytná pro syntézu nukleových kyselin [29]. Zástupci skupiny sulfonamidů jsou sulfametoxazol, sulfonamid/trimetoprim. [31].

### 3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE

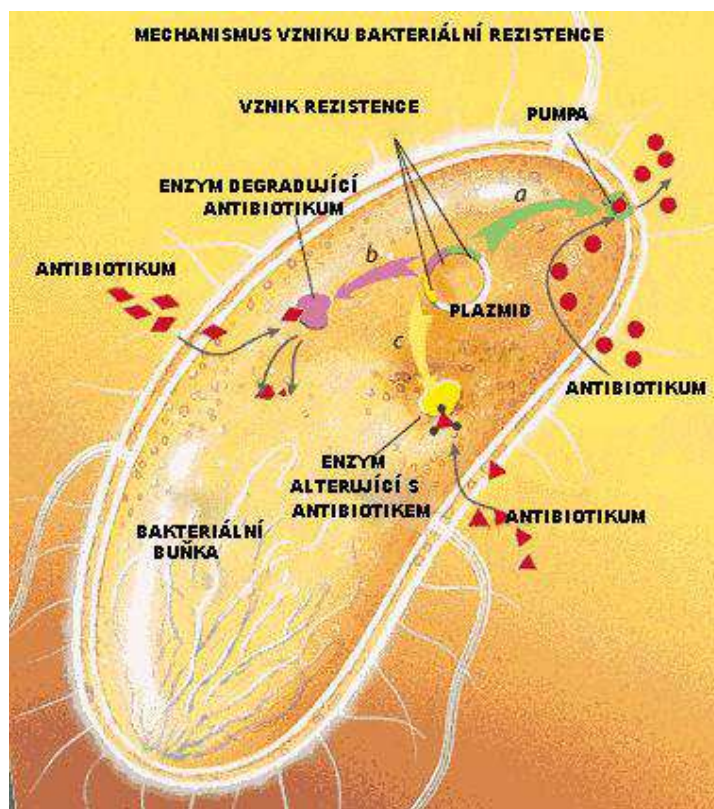
Definovat pojem antibiotické rezistence lze několika způsoby. Je nutné zohlednit mikrobiologické hledisko a taktéž hledisko klinické. Dle klinické definice je původce infekce rezistentní, je-li koncentrace antibiotika potřebná k jeho inhibici vyšší, než je dohodnutý break - point (naměřená hodnota inhibičních zón v mm). Nastane-li tento stav je vysoce pravděpodobné, že selže léčba u tohoto aplikovaného antibiotika [33]. Mikrobiální definice vysvětluje antibiotickou rezistenci jako vlastnost bakterií. Přičemž bakterie je schopná inaktivovat nebo vyloučit mechanismus účinku antibiotické látky tím, že, blokuje její inhibiční nebo letální účinky. To pak vede k přežití mikroba bez ohledu na to, že byl vystaven antimikrobiálnímu účinku [34].

V případě, že bakterie je rezistentní k více antibiotikům označuje se tento stav jako multirezistence. Problém multirezistence spočívá v omezených možnostech při léčbě [13]. Přenos a šíření genů multirezistence je realizován mezi lidmi, mezi zvířaty, mezi lidmi zvířaty a prostředím. Možné šíření genů multirezistence mezi prasaty a drůbeží byl popsán v Číně. Z celkového počtu 592 kmenů *E. coli* izolovaných z prasat a drůbeže (zdravých i nemocných jedinců) se vyskytla v 81 % multirezistence k 5 - 6 antibiotikům. Velká část multirezistence byla zjištěna mezi cefalosporiny, aminoglykosidy a fluorochinony [35].

#### 3.1 Vznik antibiotické rezistence

Pro některé druhy bakterií rezistence přirozený jev a je zakódovaný v chromozomálních genech a je horizontálně nepřenositelná. Uplatňuje se v evoluci mikroorganismů, jako činitel potřebný pro adaptaci na nové životní podmínky [27, 34].

Získaná rezistence má genetický podklad v mutaci nebo přenesení genu pro rezistenci pomocí plazmidu nebo transpozonu [27]. Bakterie si vytváří způsoby, jak inaktivovat antibiotikum (např. tvorbou enzymů) nebo svou specifickou vlastností neumožní proniknout antibiotiku do buňky. Schématické znázornění mechanismů, kterými bakteriální buňka inaktivuje antibiotikum, jsou popsány na obrázku (Obr. 1).



Obr. 1. Mechanismy vzniku bakteriální rezistence[36].

### 3.1.1 Enzymatická rezistence

Enzymy modifikující antibiotikum – nejčastější typ je inaktivace beta - laktamových antibiotik beta-laktamázi a jsou hlavní příčinou rezistence gram - negativních bakterií na tato antibiotika.  $\beta$  - Laktamázy způsobují rozštěpení  $\beta$  - laktamového kruhu. První kmeny produkující ESBLs (extended - spectrum -  $\beta$  - lactamasy) byly popsány již roce 1983 a mohutná expanze horizontálního přenosu genů měla za následek rozšíření po celém světě *de novo* [33, 38]. Přenos  $\beta$  - laktamáz je zprostředkován plazmidy [23]. Jiné druhy enzymů, které dokáží inaktivovat antibiotika, jsou např. chloramfeniklové acetyltransferázy nebo makrolidové esterázy, které způsobují rezistenci na antibiotikum chloramfenikol a erytromycin [37].

### 3.1.2 Snížená propustnost buněčné stěny

Sníženou propustnost buněčné stěny lze navodit častou přítomností antibiotické látky. Buněčná stěna na tuto skutečnost reaguje sníženou permeabilitou a antibiotikum nepronikne k předem danému cíli. Gramnegativní bakterie transportují nutrienty, které potřebují pro život, pomocí přenašečů tzv. porinů. Tyto pasivní přenašeče mohou využívat antibiotika,

jako transportní systém do nitra buňky. Dojde-li však k strukturální změně porinu, antibiotikum má cestu do buňky znemožněnou. Taková buňka pak získá určitý stupeň rezistence. Popisovaný mechanismus rezistence je vyvinutý u tetracyklinů [33].

### 3.1.3 Eflux

Efluxní pumpy jsou transportní proteiny, které umožní zvýšené vylučování metabolitů z bakteriální buňky. V případě antibiotika dochází k cílenému vypuzování z cytoplazmy a v buňce se výrazně sníží koncentrace antibiotické látky. Pumpy pro svou práci potřebují energii. Využívají volnou energii, energii elektrochemického potenciálu nebo využívají hydrolýzu ATP. Počet efluxních pump v jedné buňce může být několik. U *E. coli* je navíc popisována souvislost efluxních pump a vzniku zkřížené rezistence, to je rezistence na více antibiotik podobné chemické struktury [38]. Efluxní pumpy mohou odčerpávat následující skupiny antibiotik: peniciliny, cefalosporiny, aminoglykosidy, tetracykliny, makrolidy a chinolony [28, 39].

### 3.1.4 Další mechanismy

Dalšími mechanismy, kterými se bakterie mohou bránit vůči působení antibiotika jsou např. modifikace cílové struktury nebo mutace v cílových místech.

Modifikace cílové struktury – takovou strukturou mohou být např. polysacharidy v buněčné stěně. Cílenou změnou dochází ke znemožnění vazby antibiotika [33].

Mutace v cílových místech – zmutované geny, které kódují ribozomální RNA, navodí rezistence k tetracyklinům nebo enzymová mutace DNA gyrázy zapříčiní rezistenci k chinolonům [28, 39].

## 3.2 Získání a šíření rezistence

Bakterie vyvíjí mechanismy, kterými získávají antibiotickou rezistenci. Získanou rezistenci bakterie obdrží buď změnou stávajícího genetického materiálu nebo získají nový genetický materiál. Bakterie mohou genetický materiál předávat bakteriím stejného druhu, ale i odlišného druhu. Rekombinace u bakterií probíhá jednosměrně mezi fragmentem jednoho chromozomu (donorové buňky) a kompletním chromozomem (v recipientní buňce). Bakterie má k dispozici tři možné mechanismy přenosu genetické informace. Liší se mezi sebou

tím, jakým způsobem je DNA přenášena z jedné buňky do druhé. Jsou to konjugace, transformace, transdukce [6].

### 3.2.1 Konjugace

Přenos genetického materiálu z jedné buňky (donora) do druhé (recipienta) je uskutečňován tzv konjugací. Při konjugaci je DNA přenášena z donorové do recipientní buňky pomocí konjugáčního kanálu. Obě buňky jsou v přímém kontaktu. Přívěsky označené jako F - pilusy naváží kontakt s recipientní buňkou. Syntéza těchto pilusů je řízena na malé kružnicové DNA označené jako F - faktor (fertilitní). V počátku replikace F - faktoru je jeden řetězec DNA štěpen a mechanismem otáčející kružnice přenášen do recipientní buňky. Přenos F - faktoru je dokončen při vzniku dvou donorových bakterií [6].

### 3.2.2 Transformace

Transformace je proces, při němž bakteriální recipientní buňka přijímá volné molekuly DNA uvolněné z jiné bakterie (z donorové buňky). Frederick Griffith objevil v roce 1928 transformaci u *Streptococcus pneumoniae*. Mechanizmy transformace byly dále detailně prostudovány u *S. pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae*. Bakterie můžou transformací získat geny pro rezistenci k penicilinu od nepatogenních bakterií [34].

### 3.2.3 Transdukce

Transdukce je uskutečňována v případě napadení buňky bakteriofágem, přičemž následuje předání DNA. Tento přenos genetické informace byl objeven v roce 1952 Nortonem Zinderem a Joshuou Lederbergem, kteří studovali auxotrofní kmeny *Salmonella typhimurium* [41]. Existují dva různé druhy transdukce - nespecifická (obecná) a specifická. Nespecificky transdukující fágy mohou přenášet jakýkoliv gen z jedné buňky do druhé. U *E. coli* je nejvíce prostudovaný nespecificky transdukující fág P1 [6]. Specifickou transdukci uskutečňují viry, které přenášejí mezi bakteriemi jen určité geny. Bakteriofág lambda, který infikuje střevní bakterii *E. coli* může využít metabolický aparát *E. coli* k vytváření potomstva a tím buňku bakterie usmrtit. Druhou možností je, vstoupit do specifického vztahu s *E. coli* (hostitelem) a replikovat svůj genom spolu s genomem hostitelských buněk během každého buněčného dělení [6].



## 4 BAKTERIOCINY

Koliciny jsou antibakteriální toxiny, patřící do skupiny bakteriocinů, látek bílkovinné povahy působící proti jiným kmenům *E. coli* nebo blízce příbuzným druhům či rodům. Tyto proteiny jsou produkovány bakteriálními kmeny z čeledi *Enterobacteriaceae* (zvláště pak druhem *Escherichia coli*). Počáteční signál k syntéze kolicinů buňkou je vyslán v případě stresu buňky (SOS systém). Tím může být nedostatek živin, UV záření nebo antitotikum mitomycin C, které je často využíváno v laboratorní praxi [8].

Kolicinogenní kmeny *E. coli* mohou syntetizovat kromě kolicinů také mikrocin. Ve srovnání s koliciny se nevysílá pokyn k syntéze pomocí SOS systému, ale při nutričním vyčerpání (nedostatek uhlíku, fosforečnanu při růstu buňky) nebo při nedostatku uhlíku v prostředí. Mikrocin se projevuje vůči příbuzným bakteriálním druhům silnou antibakteriální aktivitou [42].

Geny pro produkci kolicinů jsou kódovány na Col - plasmidech a tvoří je gen pro aktivní protein kolicinu, gen pro imunitní protein a gen pro lytický protein. Naopak geny pro mikrocin mohou být kódovány na plasmidech, ale i na chromozomech [42].

### 4.1 Koliciny

Koliciny gram - negativních bakterií disponují třemi odlišnými doménami: translokační (N - konec), receptorovou, cytotoxickou (C - konec). Receptorová doména zajišťuje vazbu na specifický receptor citlivé bakteriální buňky, který se liší podle zařazení kolicinu do skupiny. Jakým mechanismem bude zprostředkován transport cytotoxické domény kolicinu přes buněčný obal, zajistí N - terminální sekvence translokační domény [43].

Koliciny se rozdělují do dvou skupin podle vniknutí (translokace) kolicinu do buňky. Skupina A (E1 – E9, K, L, N, S4, U, Y) využívá pro přemístění kolicinu tzv. Tol systém. Je tvořen pěti proteiny TolQ, TolR, TolB, TolA a Pal. Tyto cytoplazmatické proteiny, které jsou lokalizovány ve vnější membráně, v periplazmatickém prostoru i v plazmatické membráně umožní přechod kolicinu do buňky [44]. Proteiny kolicinů E1 - E9 často využívají vazbu na receptor pro přenos vitamínu B12 nebo železa do buňky, neboť jsou vybaveny velkou afinitou pro tento receptor [45].

Skupině B (B, D, Ia, Ib, M, 5 a 10) slouží pro transport proteinů tzv. systém Ton. Skládá se ze tří bílkovin TonB, ExbB a ExbD. Protein TonB je pevně ukotven v plazmatické mem-

bráně jeho N - terminální sekvencí, zbylá část zasahuje do periplazmy aktivní C - terminální sekvencí. ExbB a ExbB jsou součástí plazmatické membrány a vytváří tak celkový funkční Ton systém [46]. Tento systém, slouží jako specifický transportér kolicinů [47].

Dále je možno koliciny rozdělit dle cílového místa letálního účinku C - koncové domény na:

- **koliciny depolarizující plazmatickou membránu** – A, B, E1, Ia, Ib, K, N, S4, U, Y, 5, 10; kolicin N usmrcuje buňky relativně snadným translokačním mechanismem. Translokační cesta je uskutečněna pomocí vnějšího membránového proteinu F (OmpF) [48].
- **koliciny s DNA endonukleázovou aktivitou** – E2, E7, E8, E9; kolicin E8 způsobuje buněčnou smrt tím, že způsobí degradaci chromozomální DNA. Aktivní cytotoxická endonukleázová doména kolicinu E8 hledá H – N - H skupinu s podobnou endonukleázou [49].
- **koliciny blokující proteosyntézu** – D, E3, E4, E5, E6; kolicin E5 štěpí čtyři tRNA obsahující upravené nukleotidové sekvence. Následuje zablokování syntézy bílkovin a buněčná smrt [50].
- **koliciny degradující peptidoglykan** – kolicin M zastavuje syntézu peptidoglykanu tím, že katalyzuje rozklad lipidů, které jsou součástí peptidoglykanu [51].

## 4.2 Mikrociny

Mikrociny jsou antibakteriální peptidy s nízkou molekulovou hmotností. Obecně jsou to hydrofóbní molekuly a vykazují vysokou tepelnou stabilitu. Geny na plazmidech nebo chromozomech kódují mikrocínový prekurzor, imunitní faktor a sekreční proteiny společně s enzymy, které udávají mikrocínu strukturu a mechanismus účinku. Při produkci mikrocínů nedochází k poškození vlastní buňky a bakterie tím získává velkou selekční výhodu, naopak při porovnání s koliciny, kdy produkující buňka je usmrcena [52, 53]. Cílem působení mikrocystinů jsou enzymy zodpovědné za DNA/RNA syntézu či strukturu [42].

Podle molekulové hmotnosti se mikrociny rozdělují do dvou skupin:

- Skupina I. (B17, C7, J25) – všechny tři mikrociny jsou produkovány *E. coli* přičemž genetická informace je nesena plazmidy. Tato skupina s molekulovou hmot-

ností 1 - 3kDa, podstupuje posttranslační modifikaci [53]. Mikrocinů skupiny I. svým silným baktericidním účinkem působí proti širokému spektru bakterií včetně *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* a *Pseudomonas* [54].

- Skupina II. (sk. IIa, sk. IIb) – společným znakem této skupiny je vyšší molekulová hmotnost 4,9 - 8,9 kDa Tyto mikrocinů se dále dělí na dvě podskupiny [42].

### 4.3 Využití kolicinů a mikrocinů

Literatura popisuje uplatnění kolicinů a mikrocinů ve veterinární i humánní medicíně nebo také při konzervaci potravin [55]. Nově popsany mikrocin S, zařazený do skupiny II, je schopen potlačit a snižovat přilnavost enteropatogenních *E. coli* E2348/69. Tento mikrocin S je produkován probiotickým kmenem *E. coli* G3/10. Probiotický přípravek obsahující zmíněný probiotický kmen, byl použit k léčbě gastrointestinálních poruch u dospělých lidí a také malých dětí [57].

Další studie popisuje využití kolicinu M, jako možného antimikrobiálního kandidáta, vzhledem k narůstajícím počtům antibiotické rezistence. Velmi malé koncentrace kolicinu M chrání buněčný obal bakterie a buňka v jeho přítomnosti nespouští SOS reakci, kterou by vyvolala například tradiční antibiotika [58].

Cílem aplikace bakteriocinů v potravinářském průmyslu je ochránit potraviny před patogenními bakteriemi. Komerčně využívaný bakteriocin nisin slouží k ochraně sýrů před nebezpečnou bakterií *Listeria monocytogenes* [56].

## **II. PRAKTICKÁ ČÁST**

## 5 CÍL PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- stanovit antibiotickou rezistenci a kolicinogenii u získaného souboru kmenů *E. coli* izolovaných z potravin;
- zpracovat dostupné výsledky o antibiotické rezistenci, kolicinogenii a bakteriocinotypizaci u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin na Fakultě technologické UTB ve Zlíně v letech 2006 - 2012, hledat souvislosti mezi výskytem obou fenoménů a formulovat obecné závěry.

## 6 MATERIÁL

V praktické části byla u vybraných kmenů provedena disková difuzní metoda ke stanovení citlivosti na antibiotika a vpichová metoda ke zjištění produkce kolicinů.

### 6.1 Přístroje

- digitální váha Kern&Sohn (GmbH, Německo)
- antibiotické disky (Oxoid Ltd., Velká Británie)
- biologický inkubátor (Mettler, Německo)
- denzitometr DENZI-LA-METEREMO (Lachema, ČR)
- automatické mikropipety (Nichyryo, Japonsko)
- homogenizátor Stomacher (Seward Ltd., Velká Británie)
- Biohazard box EUROFLOW (Clean Air, Holandsko)
- parní sterilizátor Varioklav 135S (H+P Labortechnik, Německo)
- běžné laboratorní sklo

### 6.2 Kultivační média

V následujících tabulkách (Tab. 1 - 5) jsou uvedena jednotlivá složení použitých kultivačních pŮd.

*Tab. 1. Složení masopeptonového bujónu (MPB).*

Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	3 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	5 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)	3 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 2. Složení masopeptonového agaru (MPA).

Agar (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	15 g
Masový výtažek (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	3 g
Pepton (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	5 g
NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)	5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 3. Složení Endo agaru (EA).

Živná půda (Endo agar, HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	41,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 4. Složení Mueller – Hinton agaru.

Živná půda (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Indie)	38 g
Destilovaná voda	1000 ml

Tab. 5. Složení fyziologického roztoku.

NaCl (Ing. Petr Lukeš, Uherský Brod)	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

Nejprve byly odváženy jednotlivé složky půd a následně rozpuštěny v předem stanovém objemu. Následujícím krokem byla sterilizace v autoklávu při 121 °C po dobu 15 minut. Potom se půda rozlévala do sterilních Petriho misek nebo zkumavek.

### 6.3 Chemikálie

- chloroform (Penta, Česká republika)

- ATB disky (OXOID, Velká Británie) - v tabulkách (Tab. 6 - 8) jsou uvedeny použité sady antibiotik G1, G2 a G3

Tab. 6. Sada G1.

Zkratka ATB	Název ATB
AMP	Ampicilin
KF	Cefalotin
DO	Doxycyklin
CXM	Cefuroxim
CIP	Ciprofloxacín
SXT	Sulfametoxazol/trimetoprim
OA	Kys. oxolinová

Tab. 7. Sada G2.

Zkratka ATB	Název ATB
CN	Gentamicin
CTX	Cefotaxim
CAZ	Ceftazidim
AMC	Amoxicilin/klavulanát
ATM	Aztreonam
C	Chloramfenikol
CT	kolistin

Tab. 8. Sada G3.

Zkratka ATB	Název ATB
AK	Amikacin
SCF	Cefoperazon/sulbaktam



TZP	Piperacilin/tazobaktam
FEP	Cefepim
IPM	Imipenem
MEM	Meronem
TGC	Tigecyklin

#### 6.4 Použité bakteriální kmeny

Přehled izolovaných kmenů *E. coli* použitých v této diplomové práci jsou shrnuty v Tab. 9. Izoláty kmenů *E. coli* pocházejí z potravin živočišného původu zakoupených pro zpracování diplomových prací Šteklové V., Šoukalové L. a Mikové L. [59, 60, 61] a dále byly použity izoláty sbírky kmenů *E. coli* z Fakulty technologické UTB ve Zlíně. Všechny vzorky uvedené v Tab. 9 byly uchovány v zamrazeném stavu při  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Tab. 9. Identifikace vzorků.

Číslo vzorku	Datum zakoupení	Název, vzorku
62	03/2006	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
66	03/2006	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
87W	2006	vepř. separát, sbírka kmenů F. tech., Zlín
88W	2006	vepř. separát, sbírka kmenů F. tech., Zlín
89W	2006	vepř. separát, sbírka kmenů F. tech., Zlín
90W	01/2007	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
91W	01/2007	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
92W.	2006	vepřový separát, sbírka kmenů F. tech., Zlín
93	01/2007	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
98W	01/2007	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
127W	07/2009	kůže chlaz. kuřat, fa Raciola Jedlička s.r.o
222	11/2010	bažantí prsní svalovina, Bažantnice Svatobo-

223	11/2010	bažantí stehenní svalovina, Bažantnice Svatobořice - Mistřín
224	11/2010	bažantí játra, Bažantnice Svatobořice - Mistřín
225	11/2010	bažantí játra, Bažantnice Svatobořice – Mistřín
226	11/2010	bažantí prsní svalovina, Bažantnice Svatobořice – Mistřín
227	11/2010	bažantí játra, Bažantnice Svatobořice – Mistřín
228	11/2010	bažantí játra, Bažantnice Svatobořice – Mistřín
229	11/2010	bažantí prsní svalovina, Bažantnice Svatobořice – Mistřín
230	11/2010	bažantí játra, Bažantnice Svatobořice-Mistřín

## 7 METODY

### 7.1 Stanovení antibiotické rezistence diskovou difuzní metodou

K provedení metody, kterou se stanoví citlivost k antibiotikům, je zapotřebí mít k dispozici čerstvou bakteriální kulturu. Ta byla získána zaočkováním na MPA a kultivací při 37 °C/24hodin. Z této kultury bylo připraveno inokulum ve sterilním fyziologickém roztoku odpovídající zákalu 1. stupně McFarladovy stupnice. Jeden mililitr inokula byl přenesen na povrch Mueller - Hintonova agaru. Nadbytečné množství bylo odpipetováno a po zaschnutí byly kladeny jednotlivé antibiotické disky na povrch půdy. Petriho misky byly vloženy do termostatu při 37 °C/24 hodin. Po uplynutí doby byla měřena inhibiční zóna s následným porovnáním dle doporučených standardů.

Použity byly antibiotické disky Oxoid, v sadách G1, G2 a G3. Antibiotikum Cefalotin (KF) patřící do sady G1 nebylo u testovaných vzorků použito, z důvodu nedostupnosti antibiotických disků stejného výrobce. Antibiotické disky Ciprofloxacin (CIP) a Sulfametoazol/trimetoprim (SXT) byly užity jen u dvou vzorků, Cefoperazon/sulbaktam (SCF) a Piperacillin/tazobaktam (TZP) byly aplikovány u pěti vzorků ze stejných důvodů jako antibiotický disk KF.

### 7.2 Kvantitativní stanovení produkce kolicinů

Pro stanovení kolicinogenních *E. coli* byla použita vpichová metoda. Testované kmeny byly vpichem očkovány do MPA a kultivovány při 37 °C/24 hodin. Bakterie přítomné na plotnách agaru byly usmrceny parami chloroformu (30 minut). Suspenze tvořená 3 ml MPA agaru (1,05%) a 100 µl čerstvého indikátorového kmene byla použita k vytvoření horní vrstvy agarové plotny. Jako indikátorové kmeny pro produkci kolicinů byly aplikovány *E. coli* φ, *E. coli* P400, *E. coli* Sabina 40, *E. coli* K 12 Row, *E. coli* B1 [62]. Při vyhodnocení byla zjišťována přítomnost inhibičních zón.

## 8 VÝSLEDKY A DISKUZE

### 8.1 Stanovení antibiotické rezistence

Antibiotická rezistence byla zjišťována u 9 izolátů *E. coli*, u kterých nebyla provedena disková difuzní metoda. U těchto izolátů byla realizována bakteriocinotypizace [61]. Kmeny *E. coli* byly izolovány z bažantí svaloviny a jater. Naměřené hodnoty inhibičních zón v mm (tzv. break - pointy) byly srovnány se standardy stanovené Biologickým ústavem Lékařské fakulty Masarykovy univerzity (MU), standardem EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) a standardem BSAC (British Society for Antimicrobial Chemotherapy) [63]. Pokud jsou break - pointy vyhodnocovány podle jednotlivých standardů (MU, EUCAST, BSAC), je nutné respektovat odlišnou koncentraci některých antibiotických disků a odlišnosti týkající se nedefinování standardů některých antibiotik [64].

Přehled rezistentních kmenů, zahrnující vyhodnocení výsledků podle všech tří standardů je shrnutý v *Tab. 10*. Pro nedostupnost dalších antibiotických disků stejného výrobce, nebyla testována citlivost na antibiotikum cefalotin (KF). Tam, kde není uveden celkový počet testovaných vzorků (9), byly antibiotické disky použity jen u popsaného počtu vzorků z důvodu nedostupnosti antibiotických disků.

*Tab. 10. Počty rezistentních kmenů, vyhodnocené dle MU, EUCAST, BSAC.*

	MU	EUCAST	BSAC
<b>ATB</b>	Počet získaných rezistentních kmenů/celkový počet testovaných kmenů	Počet získaných rezistentních kmenů/celkový počet testovaných kmenů	Počet získaných rezistentních kmenů/celkový počet testovaných kmenů
<b>AMP</b>	9/9	9/9	9/9
<b>KF</b>	-	-	-
<b>DO</b>	9/9	není definován standard	9/9
<b>CXM</b>	9/9	9/9	8/9
<b>CIP</b>	0/2	0/2	0/2
<b>SXT</b>	0/2	0/2	0/2
<b>OA</b>	1/9	není definován standard	není definován standard

<b>CN</b>	1/9	1/9	1/9
<b>CTX</b>	0/9	0/9	9/9
<b>CAZ</b>	0/9	4/9	3/9
<b>AMC</b>	8/9	8/9	8/9
<b>ATM</b>	2/9	4/9	1/9
<b>C</b>	0/9	0/9	1/9
<b>CT</b>	0/7	není definován standard	7/7
<b>AK</b>	0/9	0/9	0/9
<b>SCF</b>	0/6	není definován standard	6/6
<b>TZP</b>	0/6	0/6	6/6
<b>FEP</b>	0/9	9/9	9/9
<b>IMP</b>	0/9	0/9	0/9
<b>MEM</b>	0/9	0/9	3/9

Všech 9 izolátů *E. coli* z bažantího masa a jater bylo rezistentní na ampicilin (AMP), cefuroxim (CXM) a amoxicilin/klavulanát (AMC). Jak z *Tab. 10* vyplývá, tato shodná rezistence byla nalezena při porovnání a vyhodnocení všech tří standardů (MU, EUCAST, BSAC). Procentuální vyjádření nebylo popsáno vzhledem k malému počtu zkoumaných kmenů, nicméně informace o rezistenci budou zahrnuty a zohledněny do celkového zpracování výsledků z let 2006 - 2012, zahrnuto v příloze PI.

## 8.2 Stanovení kolicinogenie

Pro stanovení produkce kolicinů byly vybrány izoláty *E. coli* z drůbežího masa pocházející z diplomové práce V. Šteklové a vepřové izoláty ze sbírky kmenů Fakulty technologické UTB ve Zlíně [59]. Tyto zmíněné izoláty nebyly testovány na produkci kolicinů a chyběly do celkové hodnocení sesbíraných kmenů z let 2006 - 2012. *Tab. 11.* popisuje zaznamenané výsledky vpichového pokusu. Při testování 11 vzorků byla zjištěna kolicinogenie u 7 vzorků. U 7 kolicinogenních vzorků byla provedena také bakteriocinotypizace [65]. Z výsledků bylo zjištěno, že izoláty produkují 5 typů kolicinů a žádné mikrociny. Všechny

analyzované izoláty *E. coli* produkují nejméně jeden typ kolicinu a nejčastějším typem kolicinu byl kolicin E8. Ten byl zjištěn u 5 izolátů.

Tab. 11. Vyhodnocení vpichového pokusu

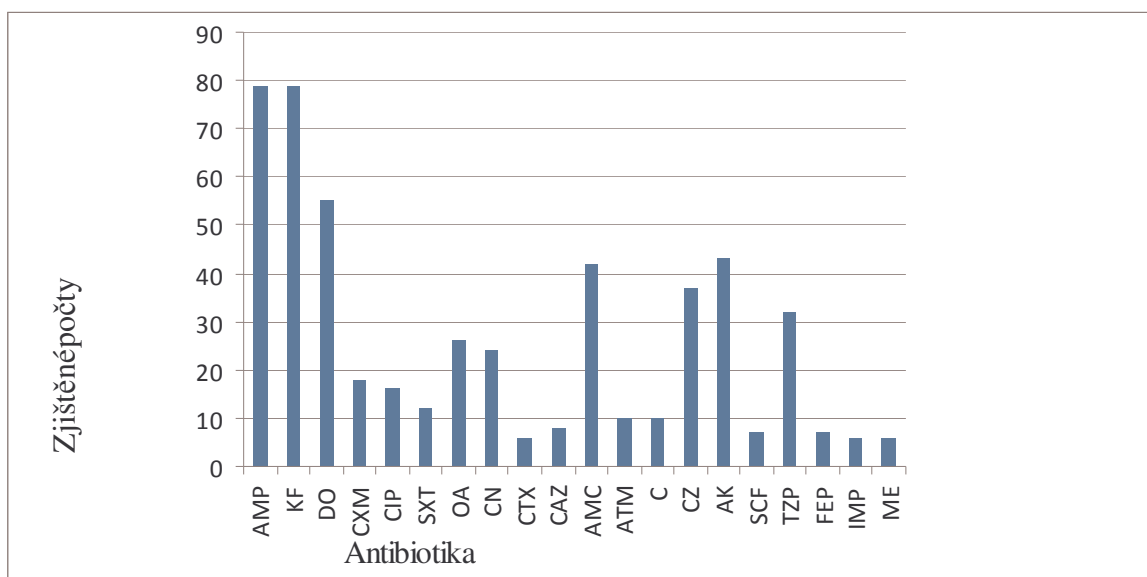
Označení testovaného kmene	<i>E. coli</i> φ	<i>E. coli</i> P 400	<i>E. coli</i> Sab 40	<i>E. coli</i> Row	<i>E. coli</i> B1	Bakteriocinotypizace [65]
62	-	-	-	-	-	
66	-	-	-	-	-	
87W	+	+	+	+	+	E7, E8
88W	+	+	+	+	+	E7, E8
89W	+	+	+	+	+	E1
90W	-	-	-	-	-	
91W	+	+	+	+	+	Y
92W	+	+	+	+	+	U, Y, E8
93	+	+	+	-	+	E8
98W	+	+	+	+	+	E7, E8
127W	-	-	-	-	-	

### 8.3 Zpracování získaných výsledků antibiotické rezistence a kolicinogenie z let 2006 - 2012

Všechna dostupná data získaná o antibiotické rezistenci a kolicinogenii u izolátů *E. coli* z let 2006 - 2012 jsou uvedena v Příloze PI [59, 60, 61, 65, 66, 67, 68, 69], včetně výsledků získaných v této práci. Celkem byly shromážděny údaje o 120 izolátech *E. coli* pocházejících převážně z drůbežního masa (89 izolátů), jiných potravin (13 izolátů), vepřového masa (9 izolátů), bažantích jater (5 izolátů) a bažantího masa (4 izoláty).

### 8.3.1 Antibiotická rezistence u izolátů *E. coli* pocházející z potravin

Všech 120 kmenů bylo testováno diskovou difuzní metodou ke zjištění rezistence vůči antibiotikům. Nejvyšší rezistence byla zaznamenána na cefalotinu (KF) u 79 kmenů (66 %) a ampicilinu (AMP), kde bylo rezistentních taktéž 79 kmenů (66 %). Rezistenci u aminopenicilinů v České republice má neustále zvyšující se tendenci. Podle údajů z databáze EARS Net se zvýšil výskyt rezistentních kmenů *E. coli* v České republice v letech 2001 - 2011 na aminopeniciliny, fluorochinolony a cefalosporiny III. generace. Nejvyšší nárůst byl zaznamenán u aminopenicilinů z 42 % (2001) na 61 % (2011) [70]. Výsledky zjištěné touto prací potvrzují vysokou míru rezistence vůči ampicilinu v České republice. Obrázek (Obr. 2) popisuje zjištěné souhrné počty rezistentních kmenů z let 2006 – 2012 na jednotlivá antibiotika.



Obr. 2. Popisuje zjištěné celkové počty rezistentních kmenů u jednotlivých antibiotik

Drůbeží izoláty tvořily největší skupinu (89) zkoumaných kmenů. U 89 kmenů *E. coli* byla zjištěna nejvyšší rezistence k cefalotinu (KF) a to u 66 (74 %) kmenů a k ampicilinu (AMP) 54 (61 %) kmenů. Při monitorování stavu rezistence *E. coli* v českých drůbežárnách bylo shromážděno 239 kmenů *E. coli* s 29 % výskytem rezistence k ampicilinu (AMP), což je v porovnání s výsledky získanými touto prací o polovinu nižší incidence [71]. Možným vysvětlením takového rozdílu tkví v rozdílném původu izolátů. Vzorky z chovu pocházely z exkrementů drůbeže, na rozdíl od vzorků sbírky Fakulty technologické, které byly izolovány z masa drůbeže. Drůbeží maso mohlo být sekundárně kontaminováno, kdy při porážce, přepravě nebo prodeji nebyly dodrženy zásady správné hygienické

praxe (HACCP). V letech 2010 - 2011 probíhal sběr vzorků drůbeže z maloobchodní sítě a ekologických farem ve Španělsku. Bylo získáno 120 drůbežích izolátů s pozitivním náležením *E. coli*. Pomocí diskové difuzní metody provedli test na citlivost antibiotik s výsledkem 75 % rezistenci k ampicilinu (AMP) [72]. Tento údaj koresponduje s údaji o rezistenci ampicilinu v této práci. Naopak v Číně byla zjištěna vysoká incidence k ampicilinu 99%, doxycyklinu 93% a tetracyklinu 91%. Izoláty kmenů *E. coli* taktéž pocházely z kuřat a citlivost k antibiotikům byla testována diskovou difuzní metodou [35].

Překvapivým výsledkem u 43 drůbežích kmenů (48 %) byla rezistence k amikacinu (AK). Průměrný výskyt rezistence amikacinu (AK) v České republice v roce 2011 byl 9 % a v českých drůbežích chovech se rezistence objevila pouze v 1 % [70, 71]. Při tak velkém zaznamenaném rozdílu by bylo vhodné opětovné provedení tohoto stanovení k ověření rezistence vůči tomuto antibiotiku.

Pokud je bakterie rezistentní k více antibiotikům, pak je tzv. multirezistentní. Léčba nemocí, které jsou vyvolané multirezistentními kmeny je pak značně komplikovaná. Geny rezistence se šíří pomocí R - plazmidů mezi různými bakteriemi, odlišnými geneticky i vývojevě [13]. Multirezistence byla potvrzena u 112 kmenů (93 %) na 2 až 8 antibiotik. Nejčastější kombinace byla cefalotin/ampicilin/doxycyklin. Multirezistenci napomáhá neustálé zvyšování spotřeby antibiotik v celé Evropě. To dokazuje publikace vydaná v roce 2010 ECDC v souhrnu nejnovějších údajů o spotřebě antibiotik v evropských zemích [73]. V ČR jsou nejvíce podávána antibiotika peniciliny, následují makrolidy, linkosamidy, a tetracykliny [73]. Zjištěná vysoká rezistence k antibiotiku ampicilinu (74 %) v této práci pravděpodobně potvrzuje skutečnost vysoké spotřeby penicilinů v humánní i veterinární medicíně.

### 8.3.2 Kolicinogenie u izolátů *E. coli* z potravin

Při testování 120 izolátů *E. coli* byla zjištěna kolicinogenie u 51 kmenů, což představuje 43 % (Příloha I). U produkčních kmenů byla provedena také bakteriocinotypizace [61, 65]. Bylo zjištěno 11 druhů kolicinů a 5 druhů mikrocinů. Pouze 12 (24 %) kmenů produkuje jeden typ bakteriocinů. U ostatních 23 (44 %) kmenů byla zjištěna vícenásobná produkce, tzn. 3 a více druhů kolicinů a mikrocinů. Míra incidence kolicinogenie u drůbežího a vepřového masa v literatuře je popisována v 39 % [74]. Původ kolicinogenních vzorků *E. coli* a údaje o nich, popisované v literatuře jsou převážně z exkrementů (humánních i zvíře-



cích). Studium kmenů *E. coli* pocházející z gastrointestinálního traktu lidí, bylo započato v 20. letech minulého století s 20 % incidencí kolicinogenie [75]. Byl izolován kolicinogenní kmen *E. coli* (C6 =  $\phi$ ), dnes využívaný jako jeden z indikátorových kmenů při vpičovém pokusu. V roce 2006 byla publikována studie výskytu bakteriocinů (zahrnující koliciny i mikrocin) již v 38 %, pocházejících z 266 lidských fekálních izolátů [52]. V Bangladeši uskutečněná analýza vzorků pocházející z drůbežního masa, pekařských výrobků a lidských, kravích, drůbežích výkalů zjistila přítomnost kolicinogenních kmenů v 46 %, z toho nejvyšší procento bylo z lidských (83 %) a kravích (67 %) výkalů [76]. Vyšší procentuální výsledky kolicinogenních kmenů z výkalů, pravděpodobně mohou mít přímou souvislost s přítomností *E. coli* ve střevech savců, která je součástí bakteriální mikroflóry.

### 8.3.3 Zjištěné souvislosti mezi antibiotickou rezistencí a kolicinogenií u kmenů *E. coli* izolovaných z potravin

Ze 120 izolátů *E. coli* bylo 51 (43 %) kolicinogenních producentů, přičemž alespoň na jedno antibiotikum byly rezistentní 4 kmeny (8 %) izolátů. Tabulka (Tab. 12) uvádí, jak jsou kmeny produkující koliciny citlivé či rezistentní (1, 2, 3 a více) na antibiotika. Velmi málo kolicinogenních kmenů je citlivých či rezistentních vůči maximálně dvěma antibiotikům. U velké většiny (83 %) se vyskytla multirezistence vůči 3 a více antibiotikům, což je již možno považovat za významné zjištění.

Tab. 12. Souvislost výskytu kolicinogenie s výskytem citlivosti a rezistence na antibiotika.

Kolicinogenie (počet kmenů)	Antibiotická rezistence (počet ATB)
4	1
3	2
43	3 a více

Nejvyšší rezistence kolicinogenních kmenů se vyskytla u cefalotinu (KF) v 50 %, doxycyklinu (DO) 39 % a 21 % u ampicilinu (AMP). Jelikož je rezistence i kolicinogenie kódována geny, lze vyvodit možnou souvislost mezi produkcí kolicinů a typem rezistentního antibiotika. Studie mapující stav antibiotické rezistence u indiánů pocházející z Bolívie

s nízkou antibiotickou expozicí, shromáždila 113 kmenů *E. coli*. Z provedené analýzy vyplynulo, že v přítomnosti genu kódující rezistenci k ampicilinu byla potvrzena produkce kolicinů. Taktéž tomu bylo i u tetracyklinu [77]. Z výsledků této práce lze částečně potvrdit skutečnost u rezistence ampicilinu. U kmenů produkujících koliciny byla zjištěna rezistence k ampicilinu v 21 %.

Nejčastější zastoupení měly kolicin E8 (16 kmenů) a mikrocin V (16 kmenů), Ia (15 kmenů), kolicin E7 a B (14 kmenů), kolicin Ib (11 kmenů), kolicin E1 a mikrocin B17 (8 kmenů). Současně se u kolicinu E7 a E8 vyskytla rezistence na cefalotin (KF), piperacilin/tazobaktam (TZP) a kolistin (CT). U kolicinu Ia a Ib byla přítomná rezistence na ampicilin (AMP), amoxicilin/klavulát (AMC), cefuroxim (CXM) s doxycyklin (DO). Mikrocin V měl nejvíce rezistencí k ampicilinu, doxycyklinu, cefuroximu. Jiných výsledků bylo dosaženo u izolovaných kmenů *E. coli* pocházejících od pacientů trpících infekcí močových cest. U kmenů produkujících mikrocinu nebyla významně prokázána multirezistence k antibiotikům [78]. Podobný závěr byl formulován ve studii provedené v Argentině. Zjištěná míra rezistence nebyla nijak významná [79].

## ZÁVĚR

U získaného souboru kmenů *E. coli* byla provedena disková difuzní metoda ke stanovení citlivosti na antibiotika a vpichová metoda ke zjištění produkce kolicinů.

Antibiotická rezistence byla zjišťována u 9 kmenů *E. coli* izolovaných z bažantí svaloviny a jater. Tyto izoláty byly vybrány s ohledem na skutečnost, že izolované bažantí kmeny *E. coli* jsou součástí celkové sbírky kmenů *E. coli* z potravin a informace o výskytu rezistence zde chyběly. Získané výsledky ukázaly, že všechny bažantí kmeny *E. coli* byly rezistentní na ampicilin, cefuroxim a amoxicilin/klavulanát.

Kvantitativní stanovení produkce kolicinů bylo testováno pomocí vpichového pokusu. Získané izoláty byly rovněž vybrány z důvodů, chybějících výsledků potřebných pro zahrnutí do celkového vyhodnocení. Testováno bylo 11 kmenů *E. coli* a 7 z nich bylo produkčních. Bakteriocinotypizací bylo zjištěno, že kmeny produkují 5 typů kolicinů a žádný mikrocin. Všechny produkční kmeny vytvářejí nejméně jeden typ kolicinu a nejčastěji byl detekován kolicin E8.

Všechny získané výsledky byly zahrnuty do celkového seznamu sbírky izolátů *E. coli* z potravin z let 2006 – 2012. Bylo nashromážděno 120 izolátů kmenů *E. coli*, pocházející nejčastěji z drůbežího masa, jiných potravin (sýry, zákusky), vepřového masa, bažantího masa a jater. V průběhu let byla provedena stanovení kmenů *E. coli* k rezistenci antibiotik, produkce bakteriocinů a bakteriocinotypizace. Z metod byly použity disková difuzní metoda k určení citlivosti k antibiotikům, vpichový pokus pro produkci kolicinů a metoda PCR pro určení typu bakteriocinu.

Zjištěné výsledky týkající se antibiotické rezistence ukázaly, že nejvíce kmenů *E. coli* bylo rezistentních na antibiotikum cefalotin a ampicilin. Tyto rezistentní kmeny byly izolovány v každém roce vytvořené sbírky. Naopak nejméně rezistentních kmenů bylo na cefepim, cefotaxim, imipenem a meronem, přičemž většina těchto rezistentních izolátů byla získána v prvním roce vznikající sbírky. Trend nárůstu v dalších letech nebyl pozorován. Dále byla v celé sbírce zaznamenána vysoká míra multirezistentních kmenů.

Kolicinogenní kmeny produkovaly 11 druhů kolicinů a 5 druhů mikrocinů. Dále kmeny vykazovaly multiprodukcí bakteriocinů na 3 a více druhů.

Z dostupných výsledků vyplynula vzájemná souvislost mezi kolicinogenií a multirezistencí. U kolicinogenních kmenů byla zaznamenána největší míra rezistence k antibiotikům

cefalotinu doxycyklinu a ampicilinu. U produkčních kmenů byly nejčastěji detekovány koliciny Ia, E8, E7, B a mikrociny V, B17 a C7. Dalším společným znakem u kmenů produkující koliciny typu E7 a E8 byl poznatek ke společné rezistenci k cefalotinu, piperacilinu/tazobaktamu a kolistinu. Společná antibiotická rezistence k ampicilinu, amoxicilinu/klavulanátu, cefuroximu a doxycyklinu byla detekována u kmenů produkující kolicin Ia a Ib.

## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] *Escherichia coli* In: [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Theodor\\_Escherich](http://cs.wikipedia.org/wiki/Theodor_Escherich)
- [2] LEDBERGER Joshua In: [online]. [cit. 2013-04-15]. Dostupné: z [http://cs.wikipedia.org/wiki/Joshua\\_Lederberg](http://cs.wikipedia.org/wiki/Joshua_Lederberg)
- [3] Význam bakterií v potravinářském průmyslu. In: [online]. [cit. 2013-04-11]. Dostupné z: [www.mendelu.org/upload//mikra%206.doc](http://www.mendelu.org/upload//mikra%206.doc)
- [4] ŠILHÁNKOVÁ, Ludmila. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Vyd. 3., Praha: Academia, 2008, ISBN 9788020017031.
- [5] ROSYPAL, Stanislav. *Úvod do molekulární biologie*. 2., rozš. vyd. Brno: Stanislav Rosypal, 1997, 270 s.
- [6] SNUSTAD, D, Michael J SIMMONS, Jiřina RELICHOVÁ a Johann Gregor MENDEL. *Genetika*. Vyd. 1. Brno: Masarykova univerzita, 2009, xxi, 871 s. ISBN 978-80-210-4852-2.
- [7] SCHEFFERS Dirk-Jan, Mariana G. PINHO. Bacterial cell wall synthesis: new insights from localization studies. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* roč. 2005, č. 69(4), s. 586-607, DOI: 10.1128/MMBR.69.4.585-607.2005
- [8] ŠMARDA, J., ŠMAJS, D. Colicins – exocellular lethal proteins. *Folia Microbiologica*. roč. 1998, č. 43, s. 563-582.
- [9] CASCALES, E., BUCHANAN, S., DUCHÉ, D., KLEANTHOUS, C., LLOUBES, R., POSTLE, K., RILEY, M., SLATIN, S., CAVARD, D. Colicin biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. roč. 2007, č. 71 (1), s. 158-229, DOI: 10.1128/MMBR.00036-06
- [10] USÓN I., S. I. PATZER, D. D. RODRÍGUEZ., V. BRAUN, K. ZETH. The crystal structure of the dimeric colicin M immunity protein displays a 3D. *Journal of Structural Biology*. roč. 2012, sv. 178, s. 45-53, DOI: 10.1016/j.jsb.2012.02.004
- [11] Máme se obávat bakterií *escherichia coli*? In: [online]. [cit. 2013-03-11]. Dostupné z: <http://www.vyzivaspol.cz/clanky-casopis/mame-se-obavat-bakterii-escherichia-coli.html>

- [12] COSTA M. M, G. DRESCHER, F.MABONI, S.S. WEBER, A. SCHRANK, M.H. VAINSTEIN, I.S. SCHRANK, A.C. VARGAS. Virulence factors, anti-microbial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, roč. 2010, sv.62 (1), s. 30-36
- [13] LEVY, Stuart B. *Antibiotický paradox: jak se nesprávným používáním antibiotik ruší jejich léčebná moc*. Vyd. 1. Praha: Academia, 2007, 312 s. ISBN 978-80-200-1485-6.
- [14] TIAN Jun-Qi, Young-Min BAE, Na-Young CHOI, Dong-Hyun KANG, Sunggi HEU, Sun-Young LEE. Survival and growth of foodborne pathogens in minimally processed vegetables at 4 and 15 °C. *Journal of food Science* roč. 2012, sv. 77 (1), s. 48 – 50. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2011.02457.x
- [15] ABADIAS Maribel, Isabel ALEGRE, Marcia OLIVEIRA, Rosa ALTISENT, Inmaculada VIÑAS. Growth potential of *Escherichia coli* O157:H7 on fresh-cut fruits (melon and pineapple) and vegetables (carrot and escarole) stored under different conditions. *Food control* roč. 2012, sv. 27, s. 37-44. DOI: 10.1016/j.foodcont.2012.02.032
- [16] KARABIYIKLI Seniz, Huseyin DEGIRMECI, Mehmet KARAPINAR. The survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium in black mulberry (*Morus nigra*) juice. *African Journal of Microbiology Research* , roč. 2012, sv. 6(48), s.7464-7470, ISSN 1996-0808, DOI: 10.5897/AJMR12.1869
- [17] MATULKOVA P., M. GOBIN, J. TAYLOR, F. OSHIN, K. O'CONNOR, I. OLIVER. Crab meat: a novel vehicle for *E. coli* O157 identified in an outbreak in South West England, August 2011. *Epidemiology and Infection*, roč. 2012, sv. 1, s. 1-8 , DOI: <http://dx.doi.org.proxy.k.utb.cz/10.1017/S0950268812002816>
- [18] CHAVES B. D., I. Y. HAN , P. L. DAWSON, J. K. NORTHCUTT . Survival of artificially inoculated *Escherichia coli* and *Salmonella* Typhimurium on the surface of raw poultry products subjected to crust freezing. *Poultry Science*, roč. 2011, sv. 90, s. 2874–2878. DOI: 10.3382/ps.2011-01640
- [19] MAGWEDERE Kudakwashe, Huu Anh DANG, Edward W. MILLS, Catherine N. CUTTER, Elisabeth L. ROBERTS, Chitrita DEBROY. Incidence of Shiga toxin – producing *Escherichia coli* strains in beef, chicken, deer, boar, bison, and

- rabbit retail meat. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, roč. 2013, sv. 25(2), s. 254–258. DOI: 10.1177/1040638713477407 <http://jvdi.sagepub.com>
- [20] Terapie infekčních nemocí. In: [online]. [cit. 2013-01-11]. Dostupné z: <http://www1.lf1.cuni.cz/~hrozs/atb1.htm>
- [21] WALSH, Christopher. *Antibiotics: actions, origins, resistance*. Washington: ASM Press, c2003, x, 335 s. ISBN 1-55581-254-6.
- [22] Antimikrobiální léčiva In: [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: [www.vfu.cz/farmvpp/soubory/.../Prednaska5peniciliny-cefalosporiny.docx](http://www.vfu.cz/farmvpp/soubory/.../Prednaska5peniciliny-cefalosporiny.docx)
- [23] BEDNÁŘ, Marek. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Vyd. 1. Praha: Marvil, 1996, 558 s. ISBN 80-238-0297-6.
- [24] SKOOG Karl, Filippa Stenberg BRUZELL, Aure' lie DUCROUX, Marten HELLBERG, Henrik JOHANSSON, Janne LEHTIÖ, Martin HÖGBOM, Daniel O. DALEY. Penicillin-binding protein 5 can form a homo-oligomeric complex in the inner membrane of *Escherichia coli*. *The protein society*, roč. 2011, sv. 20, s. 1520-1529. DOI: 10.1002/pro.677
- [25] VOLLMER Waldemar, Ute BERTSCHE. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, roč. 2008, sv. 1778, s. 1714–1734, DOI: 10.1016/j.bbamem.2007.06.007
- [26] FALAGAS Matthew, Sofia K. KASIAKOU. Colistin: The Revival of Polymyxins for the Management of Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacterial Infections. *Clinical Infectious Diseases*, roč. 2005, sv. 40, s. 1333–1341
- [27] VOTAVA, Miroslav. *Lékařská mikrobiologie obecná. 2., přeprac. vyd.* Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [28] CHOPRA Ian, Marilyn ROBERTS. Tetracycline antibiotics: mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, roč. 2001, sv. 65 (2), s. 232-260. DOI: 10.1128/MMBR.65.2.232–260.2001
- [29] BARAN Wojciech, Ewa ADAMEKA, Justyna ZIEMIŃSKA, Andrzej SOBCZAK. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and the-

- ir influence on human health. *Journal of Hazardous Materials*, roč. 2011, sv. 196, s. 1– 15. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2011.08.082
- [30] Antibiotika. In: [online]. [cit. 2013-04-03]. Dostupné z: <http://www.med.muni.cz/dokumenty/pdf/atb.pdf>
- [31] Přehled antibiotik ve veterinární medicíně. In: [online]. [cit. 2012-12-27]. Dostupné z: [www.ulozto.cz/xDmVNJs/antibiotika-p-ehled-veterinari-nove-pdf](http://www.ulozto.cz/xDmVNJs/antibiotika-p-ehled-veterinari-nove-pdf)
- [32] MANGONIA Emanuele Durante, Alexandros GRAMMATIK, Riccardo UTILI, Matthew E. FALAGAS. Do we still need the aminoglycosides? *International Journal of Antimicrobial Agents*, roč. 2009, sv. 33, s. 201–205, DOI: 10.1016/j.ijantimicag.2008.09.001
- [33] EUCAST In: [online]. [cit. 2012-12-27]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST\\_files/Consultation/EUCAST\\_guidelines\\_detection\\_of\\_resistance\\_mechanisms\\_121222.pdf](http://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Consultation/EUCAST_guidelines_detection_of_resistance_mechanisms_121222.pdf)
- [34] Antibiotická rezistence bakterií – hrozba selhání léčby infekcí neustále sílí. In: [online]. [cit. 2012-12-17]. Dostupné z: <http://www.tribune.cz/clanek/25673-antibioticka-rezistence-bakterii-hrozba-selhani-lecby-infekci-neustale-sili>
- [35] JIANG Hong-Xia, Dian-Hong LÜ, Zhang-Liu CHEN, Xiu-Mei WANGA, Ji-Rong CHEN, Ya-Hong LIU, Xiao-Ping LIAO, Jian-Hua LIU, Zhen-Ling ZENG. High prevalence and widespread distribution of multi-resistant *Escherichia coli* isolates in pigs and poultry in China. *The veterinary Journal*. roč. 2011, sv. 187, s. 99-103. DOI: 10.1016/j.tvjl.2009.10.017
- [36] Mechanismy vzniku bakteriální rezistence In: [online]. [cit. 2012-12-27]. Dostupné z: <http://media0.webgarden.cz/files/media0:5105e4aa49e14.gif.upl/bacteria3.gif>
- [37] WRIGHT Gerard D. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Advanced Drug Delivery Reviews* roč. 2005, sv. 57, s. 1451–1470. DOI: 10.1016/j.addr.2005.04.002
- [38] BRADFORD Patricia A. Extended-spectrum  $\beta$ -Lactamases in the 21st century: characterization, epidemiology, and detection of this important resistance threat. *Clin. Microbiol. Rev. October*, roč. 2001, sv. 14 (4), s. 4 933-951. DOI: 10.1128/CMR.14.4.933-951.2001



- [39] WEBER M. A., L. J. V. PIDDOCK. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J. Antimicrob. Chemother.* roč. 2003, sv. 51(1) s: 9-11. DOI: 10.1093/jac/dkg050
- [40] RUIZ Joaquim. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* roč. 2003, sv. 51, s. 1109–1117. DOI: 10.1093/jac/dkg222
- [41] ZINDERE Norton. Forty years ago the discovery of bacterial transduction. *Genetics* roč. 1992, sv. 132, s.291-294
- [42] DUQUESNE Sophie, Delphine DESTOUMIEUX-GARZ'ON, Jean PEDUZZI, Sylvie REBUFFAT. Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural product report.* roč. 2007, sv. 24, s. 708-734. DOI: 10.1039/b516237h
- [43] LAZDUNSKI CLAUDE J., Emmanuelle BOUVERET, Alain RIGAL, Laure JOURNET, Roland LLOUBE'S, Héléne BÉNÉDETTI. Colicin Import into *Escherichia coli* Cells. *Journal of Bacteriology.* roč. 1998, sv. 180 (19), s. 4993-5002
- [44] LAZZARONI Jean-Claude, Jean-François DUBUISSON, Anne VIANNEY. The Tol proteins of *Escherichia coli* and their involvement in the translocation of group A colicins. *Biochimie*, roč. 2002, sv. 84, s. 391–397. PII: S 0 3 0 0 - 9 0 8 4 ( 0 2 ) 0 1 4 1 9 - 0
- [45] JAMES R., C. KLEANTHOS, G. R. MOORE. 1996. The biology of E colicins: paradigms and paradoxes. *Microbiology*, roč. 1996, sv. 142, s. 1569–1580.
- [46] PILSL Holger, Volkmar BRAUN. The Ton system can functionally replace the TolB protein in the uptake of mutated colicin U. *FEMS Microbiology Letters.* roč. 1998, sv. 164, s. 363-367. PII: S 0 3 7 8 - 1 0 9 7 ( 9 8 ) 0 0 2 4 0 - 7
- [47] BRAUN, V. Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiol.Rev.* roč. 1995, sv. 16, s. 295-307.
- [48] BABOOLAL Thomas G., Matthew J. CONROY, Katrina GILL, Helen RIDLEY, Virak VISUDTIPHOLE, Per A. BULLOUGH, Jeremy H. LAKEY.

- Colicin N Binds to the Periphery of Its Receptor and Translocator, Outer Membrane Protein F. *Structure*. roč. 2008, sv. 16(3), s. 371-379. DOI: 10.1016/j.str.2007.12.023
- [49] WALKER David C., Theonie GEORGIU, Ansgar J. POMMER, Daniel WALKER, Geoffrey R. MOORE, Colin KLEANTHOUS, Richard JAMES. Mutagenic scan of the H-N-H motif of colicin E9: implication for the mechanistic enzymology of colicins, homing enzymes and apoptotic endonucleases. *Nucleic acid research*. roč. 2002, sv. 30, s. 3225-3234.
- [50] LI Yi-Lun, Youssef ELIAS, Raven H. HUANG. Structural and Mutational Studies of the Catalytic Domain of Colicin E5: A tRNA-Specific Ribonuclease. *Biochemistry*. roč. 2005, sv. 44, s. 10494-10500.
- [51] BARRETEAU Hélène, Meriem El GHACHI, Aurélie BARNÉROUD-ARNOULET, Emmanuelle SACCO, Thierry TOUZÉ, Denis DUCHÉ, Fabien GÉRARD, Mark BROOKS, Delphine PATIN, Ahmed BOUHSS, Didier BLANOT, Herman van TILBEURGH, Michel ARTHUR, Roland LLOUBÈS, Dominique MENGIN-LECREULX. Characterization of colicin M and its orthologs targeting bacterial cell wall peptidoglycan biosynthesis. *Microbial Drug Resistance*. roč. 2012, sv. 18 (3), s. 222-229. DOI: 10.1089/mdr.2011.0230
- [52] GORDON David M., Claire L. O'BRIEN. Bacteriocin diversity and the frequency of multiple bacteriocin production in *Escherichia coli*. *Microbiology*, roč. 2006, sv. 152, s. 3239–3244. DOI: 10.1099/mic.0.28690-0
- [53] SOUČEK Ondřej. *Mikrociny čeledi Enterobacteriaceae: typy, syntéza, regulace, export a letální účinek*. Brno 2010. Bakalářská práce. Masarykova Univerzita Brno, Fakulta přírodovědecká, Ústav experimentální biologie, Oddělení mikrobiologie. Vedoucí bakalářské práce David Šmajš.
- [54] DESTOUMIEX – GARZÓN Delphine, Jean PEDUZZI, Sylvie REBUFFAT. Focus on modified microcins: structural features and mechanisms of action. *Biochimie*, roč. 2002, sv. 84, s. 511–519. PII: S 0 3 0 0 - 9 0 8 4 ( 0 2 ) 0 1 4 1 1 - 6
- [55] BAQUERO F., F. Moreno. The microcins. *FEMS Microbiology Letters*. roč. 1984, sv. 23, s. 117- 124.

- [56] RILEY, M a Osnat GILLOR. *Research and applications in bacteriocins*. Wymondham: Horizon Bioscience, c2007, vi, 218, A-1 s. ISBN 978-1-904933-23-6.
- [57] ZSCHÜTTIG Anke, Kurt ZIMMERMANN, Jochen BLOM, Alexander GOESMANN, Christoph PÖHLMANN, Florian GUNZE. Identification and Characterization of Microcin S, a New Antibacterial Peptide Produced by Probiotic *Escherichia coli* G3/10. *Plos one*. roč. 2012, sv. 7 (3), s. e33351. DOI: 10.1371/journal.pone.0033351
- [58] KAMENŠEK S. , Darja Žgur-BERTOK. Global transcriptional responses to the bacteriocin colicin M in *Escherichia coli*. *BMC Microbiology*. roč. 2013, sv.13, s 42. DOI 10.1186/1471-2180-13-42 <http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2180-13-42.pdf>
- [59] ŠTEKLOVÁ Veronika *Antimikrobiální účinek kyseliny kaprylové na mikroflóru chlazené drůbeže*. Zlín, 2006. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Eva Lukášková.
- [60] ŠOUKALOVÁ Lenka. *Analýza a zkoušky dekontaminace mikroflóry chlazených kuřat*. Zlín, 2007. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [61] MIKOVÁ Kristýna. *Bakteriocinotypizace kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2011. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [62] ŠMARDA J., David ŠMAJS, Hana LHOTOVÁ. Three recently acknowledged *Escherichia* species strikingly differ in the incidence of bacteriocinogenic and lysogenic strains. *J. Basic Microbiol.* roč. 2002, sv. 42(6), s. 429–433
- [63] EUCAST In: [online]. [cit. 2013-04-18]. Dostupné z: [http://www.eucast.org/clinical\\_breakpoints/](http://www.eucast.org/clinical_breakpoints/)
- [64] URBÁŠKOVÁ Pavla, Helena ŽEMLIČKOVÁ, Jaroslav HRABÁK. Jaké breakpointy používat pro interpretaci výsledků vyšetření citlivosti bakterií k antibiotikům? *Zprávy epidemiologie a mikrobiologie* (SZÚ Praha), roč. 2010, sv. 19(9), s. 266-267

- [65] OVEČKA Martin. *Genotypizace Escherichia coli z potravin*. Zlín, 2013. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [66] MOLATOVÁ Zuzana. *Bezpečnost potravin živočišného původu – Mikrobiologická analýza povrchu drůbežího masa a následná dekontaminace*. Zlín, 2006. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství a chemie. Vedoucí diplomové práce Pavel Březina.
- [67] ROZUMKOVÁ Jana. *Výskyt antibiotické rezistence u kmenů E. coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2010. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [68] TOMÁŠOVÁ Zuzana. *Rozdělení kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin do fylogenetických skupin*. Zlín, 2012. Diplomová práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav technologie potravin. Vedoucí diplomové práce Magda Doležalová.
- [69] KREJČÍŘIKOVÁ Tereza. *Výskyt kolicinogenie u kmenů Escherichia coli izolovaných z potravin*. Zlín, 2008. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Fakulta technologická, Ústav potravinářského inženýrství. Vedoucí bakalářské práce Magda Doležalová.
- [70] ECDC. In: [online]. [cit. 2013-04-01]. Dostupné z: [http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-et/database/Pages/tables\\_report.aspx](http://ecdc.europa.eu/en/activities/surveillance/EARS-et/database/Pages/tables_report.aspx)
- [71] KOLÁŘ M., BARDOŇ J., SAUER P., KESSELOVÁ M., ČEKANOVÁ I., VÁGNEROVÁ I., KOUKALOVÁ D., HEJNAR P. Fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* in poultry of middle Moravia, Czech Republic. *Acta vet. Brno*, roč. 2005, sv. 74, s. 249-253
- [72] ÁLVAREZ-FERNANDEZ Elena, Amaya CANCELO, Carmen DIAZ-VEGA, Rosa CAPITA, Carlos ALONSO-CALLEJA. Antimicrobial resistance in *E. coli* isolates from conventionally and organically reared poultry: A comparison of agar disc diffusion and Sensi Test Gram-negative methods. *Food control*. roč. 2013, sv. 30, s. 227-234.
- [73] EUCAST In: [online]. [cit. 2013-04-18]. Dostupné z:

<http://www.ecdc.europa.eu/en/eaad/documents/eaad-2011-summary-antimicrobial-consumption-data.pdf>

- [74] JANALÍKOVÁ M., ŠMAJS. Bakteriocinotypizace kmenů *Escherichia coli* izolovaných z masa, 2007. Dostupné z: <http://www.muni.cz/research/publications/720007>
- [75] ŠMARDA Jan, Vlastimil OBDRŽÁLEK. Incidence of colicinogenic strains among human *Escherichia coli*. *J. Basic Microbiol.* roč. 2001, sv. **41** (6), s. 367–374
- [76] HOSSNEARA A. A., M.S.R. KHAN, M.J. ISLAM, K.H.M.N.H. NAZIR, M.T. RAHMAN. Detection of colicinogenic *Escherichia coli* isolates and interrelatedness with their enteropathogenicity and antibiotic resistant pattern. *J. Bangladesh Soc. Agric. Sci. Technol.*, roč. 2007, sv. 4(1,2), s. 173-176. ISSN 1811-6221
- [77] PALLECCHI Lucia, Chiara LUCCHETTI, Alessandro BARTOLONI, Filippo BARTALESI, Antonia MANTELLA, Herlan GAMBOA, Alessandra CARATTOLI, Franco PARADISI, Gian Maria ROSSOLINI. Population structure and resistance genes in antibiotic-resistant bacteria from a remote community with minimal antibiotic exposure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, roč. 2007, sv. 51 (4), s. 1179–1184. DOI: 10.1128/AAC.01101-06
- [78] BUDIČ Maruška, RIJAVEC Matija, PETKOVŠEK Živa, ŽGUR – BERTOK Darja. *Escherichia coli* bacteriocins: antimicrobial efficacy and prevalence among isolates from patients with bacteraemia. *PLoS ONE* . roč. 2011, sv. 6(12). e28769. DOI: 10.1371/journal.pone.0028769
- [79] ETCHEVERRÍA A.I., G.H. ARROYO, G. PERDIGÓN, A.E. PARMA. *Escherichia coli* with anti-O157:H7 activity isolated from bovine colon. *Journal of Applied Microbiology*, roč. 2006, sv. 100, s. 384-389. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2005.02779.x

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

EPEC	Enteropatogenní kmen <i>E. coli</i>
ETEC	Enterotoxický kmen <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvazivní kmen <i>E. coli</i>
EAEC	Enteroagregativní kmen <i>E. coli</i>
EHEC	Enterohemoragický kmen <i>E. coli</i>
A/EEC	Attaching and affacing kmen <i>E. coli</i>
STEC	Shiga – toxigenní kmen <i>E. coli</i>
PBPs	Penicilin vázaný protein
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
RNA	Ribodeoxynukleová kyselina
DHPS	Dihydroptorát syntetáza
PABA	Para – aminobenzoová kyselina
ESBLs	Extended spectrum beta – lactamase
MPB	Masopeptonový bujón
MPA	Masopeptonový agar
EA	Endův agar
MH	Mueller – Hinton agar
EUCAS	European committee on antimicrobial suscetibility testing
BSAC	British society for antimicrobial chemoterapy
MU	Masarykova Univerzita
EARST - Net	European surveillance of antimicrobial consumption network
HACCP	Hazard analysis and critical control poits
ECDC	European centre for disease praventio and control
PCR	Polymerázová řetězová reakce

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

Obr. 1 Mechanismy vzniku bakteriální rezistence	22
Obr. 2 Zjištěné celkové počty rezistentních kmenů u jednotlivých antibiotik	39

## SEZNAM PŘÍLOH

Příloha PI Souhrnné výsledky antibiotické rezistence, kolicinogenie a bakteriocinotypizace u 120 izolátů <i>Escherichia coli</i> z potravin	57
---	----



**PŘÍLOHA P I: SOUHRNNÉ VÝSLEDKY ANTIBIOTICKÉ  
REZISTENCE, KOLICINOGENIE A BAKTERIOCINOTYPIZACE U  
120 IZOLÁTŮ *ESCHERICHIA COLI* Z POTRAVIN**

Číslo kmenů	G1										G2										G3						Produktce kořtenů	Bakteriocinotypizace
	AMP	KF	DO	CXMI	CIP	SXT	OA	CN	CTX	CAZ	AMC	ATM	C	CT	AK	SCF	TZP	FEP	IMP	MEM	MEM							
17	C	I	I	I	C	C	C	I	I	C	I	C	C	C	R13	C	C	C	C	C*	+	la, mL						
59	C	I	R0	I	R12	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	+	mV						
62	C	R13	I	I	R8	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	-							
64	R	I	I	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	R14	C	C	C	C	C	+	la, Y						
66	C	I	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	-							
87W	C	I	I	I	I	C	I	R10	I	C	I	R14	I	R9	R10	R14	I	C	I	C	+	E7, E8						
88W	I	R14	I	I	C	C	I	R10	I	C	I	R12	I	R8	R10	I	I	C	C	C	+	E7, E8						
89W	I	R14	I	I	C	C	C	R8	I	C	C	I	C	R8	R8	R14	R14	C	C	C	+	E1						
90W	I	R14	I	I	C	C	C	R10	R8	I	C	C	R12	R8	R11	I	R14	C	I	I	+	Y						
91W	I	R14	I	I	R10	C	C	R10	I	R14	C	I	C	C	R13	I	R17	C	I	C	+	Y						
92W	I	R14	I	I	C	C	C	R12	I	C	I	R14	I	R8	R10	I	R16	I	C	C	+	U, Y, E8						
92	C	C	I	I	I	C	C	R8	I	C	C	C	C	C	I	I	I	C	C	C	-							
93W	I	R10	I	I	C	C	C	I	I	R12	I	I	C	R8	R10	R15	R14	R14	C	I	+	E8						
93	C	R14	I	I	I	C	C	I	C	C	I	R14	C	C	I	C	I	C	C	C	+	E1, E2, E6, E7, E8, mV, mM						
94W	I	R11	I	I	I	C	C	I	R10	I	C	I	C	C	R8	I	R12	C	I	I	+	E7, mC7						
95W	C	I	I	I	C	C	C	I	I	C	I	I	C	R8	R10	I	I	C	C	C	+	E1, E7, M						
96W	I	I	C	I	I	C	C	C	R12	I	R13	I	C	R8	R8	I	R16	C	C	C	+	la						
97W	I	I	R13	I	I	C	C	R0	R10	I	I	I	C	R8	R10	I	R12	R12	I	I	+	mC7						
98W	I	R12	I	I	C	C	C	R10	I	C	C	I	C	C	R10	R15	R14	R14	R12	I	+	E7, E8						
99 W	I	R0	I	I	I	C	C	R0	R10	C	C	C	C	C	R12	C	R20/14	C	R8	R0	-							
99	R0	I	I	I	I	C	C	R7	C	C	C	C	C	R14	C	I	C	C	C	C	-							
101W	C	R12	I	I	R15	C	C	R0	I	C	C	I	C	R8	R12	I	R16	C	C	C	+	E5, mC7						
102W	C	I	I	I	I	C	C	R10	I	C	I	I	C	R9	R8	R15	R14	I	C	C	+	la, mC7, mV						
102	R0	I	R8	I	C	R0	I	I	C	C	C	C	C	C	I	C	I	C	C	C	-							
103W	R0	R12	R7	I	R10	C	R0	R12	I	C	I	I	C	C	R12	I	I	R14	I	I	+	mV						
104W	I	R12	I	I	I	C	C	R12	I	C	C	I	C	R8	R10	I	R16	C	C	C	+	la						
104	C	I	I	I	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	C	C	R17	C	C	C	-	E1, E2, E6, E7, E8, mV, M						
105W	I	R7	I	R14	R10	C	R0	R12	I	C	C	I	I	R8	R10	I	R12	C	C	C	+	la						
106W	I	R10	I	I	I	C	C	R12	I	C	C	I	C	C	R8	I	R14	I	C	C	+	nebyl detekován žádný typ**						
107W	I	I	I	I	I	C	C	R12	I	C	C	I	C	C	R0	I	R14	C	C	C	+	E5, E9, B, M, Y						

Číslo kmenů	G1										G2							G3							Produktce koficimů	Bakteriocinotypizace
	AMP	KF	DO	CXM	CIP	SXT	OA	CN	CTX	CAZ	AMC	ATM	C	CT	AK	SCF	TZP	FEP	IMP	MEM						
	R14	R14	R14	I	C	C	I	C	C	C	I	I	C	C	R12	C	R15	C	C	C						
109W	I	R14	I	I	C	C	I	C	C	C	I	C	C	C	R12	C	R15	C	C	C	E7, E8					
110W	I	R14	I	I	C	I	I	C	C	I	I	C	C	C	R12	C	R16	I	C	C	E7, E8					
111W	C	R10	I	I	R0	C	I	R10	I	C	C	C	C	C	R12	C	R17	I	C	C	E8					
112W	C	I	I	C	C	C	C	I	C	C	C	C	C	C	R10	I	R15	C	C	C	E7, E8					
113W	C	C	I	I	C	C	I	I	C	C	C	C	C	C	R11	I	R16	C	C	C	E7, E8					
114W	C	I	I	I	C	C	C	R12	I	C	C	I	C	C	R10	I	R10	I	C	C	E7, E8					
115W	R0	R14	C	I	C	R0	C	R8	I	C	I	I	C	R8	C	I	R20/16	C	C	I	-					
116W	R0	R14	I	I	I	I	R0	R12	I	C	I	C	R0	C	R13	R15	I	C	C	C	lb, E1, E2					
117W	R0	R12	I	I	R14	R0	R0	I	I	C	I	I	R0	C	R14	I	R15	C	C	C	la, lb, E1					
118W	R7	R0	C	I	I	C	C	C	I	C	C	I	C	C	C	I	I	I	I	R10	-					
119W	R0	R12	I	I	R8	R0	R0	I	I	C	I	R15	C	C	R13	I	I	C	I	C	-					
120W	C	R12	C	I	R13	C	R0	I	I	C	C	I	C	C	R12	C	I	C	C	C	B, M, E1					
121W	C	C	I	I	R14	C	R0	I	I	C	I	I	C	C	R10	I	C	C	R13	C	B, M, E1					
122W	C	R14	C	I	I	C	R0	R10	I	C	I	I	I	C	R10	I	I	C	C	C	-					
123W	C	C	C	I	R12	C	R0	I	C	C	C	I	C	C	R12	I	R10	I	I	C	-					
124W	R0	R0	C	I	C	C	C	I	I	C	R10	I	C	C	C	I	I	C	C	R10	-					
125W	C	I	I	C	C	C	C	I	C	C	C	R0	C	C	R11	I	R13	I	C	C	-					
126W	R0	R14	I	R14	I	R14	I	R0	I	C	C	I	C	C	R10	I	R14	C	C	C	-					
127W	R0	R8	I	R10	R0	R0	R12	C	C	R12	C	C	C	C	C	R15	R14	I	I	C	-					
148																					B, M, E1					
152																						mV				
222	R0	X	R0	R13	X	X	C	C	C	C	R0	C	C	C	C	X	X	C	C	C	B, la, lb, M, mB17, mV					
223	R0	X	R0	R12	X	X	C	C	C	C	R0	C	C	C	C	X	X	C	C	C	B, la, lb, M, mB17, mV					
224	R0	X	R0	R14	X	X	C	I	I	R0	C	C	C	C	C	I	I	I	C	C	B, la, lb, M, mB17, mV					
225	R0	X	R0	R11	C	C	C	C	I	C	R0	C	C	C	C	I	I	I	C	C	B, E1, la, lb, M, mB17					
226	R0	X	R0	R13	C	C	R0	R0	C	C	R0	C	C	C	C	I	I	I	C	C	B, la, lb, M, mB17, mV					
227	R0	X	R0	R13	X	X	C	C	I	C	R0	R0	C	X	C	I	I	C	C	C	-					
228	R0	X	R0	R14	X	X	C	C	C	I	R0	C	C	X	C	I	C	I	C	C	B, la, lb, M, mB17, mV					
229	R0	X	R0	R13	X	X	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	B, la, lb, M, mB17					
230	R0	X	R0	R12	X	X	C	C	C	I	R0	R0	C	C	C	X	X	C	C	C	B, M, mB17					

nabyla stanovena rezistence\*\*\*





- \* C....citlivý, R....rezistentní, I....intermediální, X....nebylo testováno;
- \*\* nebyl detekován žádný z bakteriocinů B, M, Y, V, C7, L, B17, Ia, Ib, E1, E2, E5, E6, E7, E8, E9;
- \*\*\* vzorky 148 a 152 nebyly testovány na rezistenci z důvodu nemožné opětovné kultivace, kmeny nebyly oživeny.