

***Escherichia coli* v potravinách rostlinného původu**

Naděžda Knoflíčková

Bakalářská práce
2018

 Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická

Ústav analýzy a chemie potravin

akademický rok: 2017/2018

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Naděžda Knoflíčková**
Osobní číslo: **T15837**
Studijní program: **B2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor: **Technologie a řízení v gastronomii**
Forma studia: **prezenční**

Téma práce: **Escherichia coli v potravinách rostlinného původu**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část:

1. **Escherichia coli – základní charakteristika druhu**
2. **Výskyt E. coli v potravinách**
3. **Typizace a charakteristika kmenů E. coli**

II. Praktická část

1. **Izolace E. coli z potravin rostlinného původu**
2. **Charakteristika izolovaných kmenů – produkce bakteriocinů, antibiotická rezistence a faktory virulence**

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] GORDON, David M., Olivier CLERMONT, Heather TOLLEY a Eric DENAMUR. Assigning *Escherichia coli* strains to phylogenetic groups: multi-locus sequence typing versus the PCR triplex method. *Environmental Microbiology*. 2008, vol. 10, issue 10, s. 2484 - 2496. DOI: 10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1462-2920.2008.01669.x>.

[2] LEVIN, Robert E. Rapid detection and characterization of foodborne pathogens by molecular techniques. Boca Raton: CRC Press, c2010, xv, 592 s. ISBN 978 - 1- 4200 - 9242 - 4.

[3] ŠMAJS, David, Lenka MICENKOVÁ, Jan ŠMARDÁ, Martin VRBA, Alena ŠEVČÍKOVÁ, Zuzana VALIŠOVÁ a Vladana WOZNICOVÁ. Bacteriocin synthesis in uropathogenic and commensal *Escherichia coli*: colicin E1 is a potential virulence factor. *BMC Microbiology*. 2010, vol. 10, issue 1, s. 288-. DOI: 10.1186/1471 - 2180 - 10 - 288. Dostupné z: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/10/288>.

[4] KUHNERT, P., BOERLIN, P., FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, roč. 24, č. 1, s. 107-117. ISSN 1574-6976.

[5] SKOČKOVÁ, A., KARPÍŠKOVÁ, R., KOLÁČKOVÁ, I., CUPÁKOVÁ, Š. Characteristics of *Escherichia coli* from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. *International Journal of Food Microbiology*. 2013, roč. 167, č. 2, s. 196-201. ISSN 01681605.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Magda Janalíková, Ph.D.

Ústav inženýrství ochrany životního prostředí

Datum zadání bakalářské práce:

2. února 2018

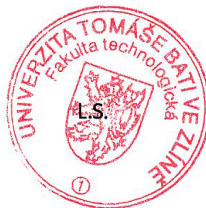
Termín odevzdání bakalářské práce:

4. května 2018

Ve Zlíně dne 2. února 2018



doc. Ing. František Buňka, Ph.D.
děkan



doc. Ing. Jiří Miček, Ph.D.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: MAŘEŽKA KROFLÍČKOVÁ

Obor: TRG

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 ¹⁾;
- 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 ²⁾;
- beru na vědomí, že podle § 60 ³⁾ 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 ³⁾ 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 7.5.2018

Kroflíčková

¹⁾ 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 nevydělečně 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 nahlázení 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.

²⁾ 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).

³⁾ 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 užít 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 přihlídí k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Tato bakalářská práce pojednává o bakterii *Escherichia coli*, která byla izolována z potravin rostlinného původu. U 16 kmenů izolovaných ze zeleniny zakoupených v obchodní síti byla zkoumána jejich antibiotická rezistence pomocí diskové difúzní metody, produkce bakteriocinů pomocí vpichového testu a byla zjišťována přítomnost faktorů virulence metodou PCR. Bylo zjištěno, že žádný izolovaný kmen není producentem bakteriocinů a nemá sledované faktory virulence. Antibiotická rezistence byla prokázána u 15 ze 16 testovaných kmenů. Tyto kmeny byly citlivé k baktericidní antibiotikům převážně patřící do skupiny betalaktamových antibiotik.

Klíčová slova: *Escherichia coli*, zelenina, faktory virulence, bakteriociny, antibiotická rezistence

ABSTRACT

This bachelor thesis deals with the bacterium *Escherichia coli*, which was isolated from food of plant origin. In 16 strains isolated from vegetables, which were obtained in the supermarkets, their antibiotic resistance was investigated using a disk diffusion method, bacteriocin production by means of virulent factors by PCR was investigated. It has been found that no isolated strains is a bacteriocin product and has no virulence. Antibiotic resistance was demonstrated in 15 of the 16 strains tested. These strains were susceptible to bactericidal antibiotics, which predominantly belong to the group of betalactam antibiotics.

Keywords: *Escherichia coli*, vegetables, virulence factors, bacteriocins, antibiotic resistance

Touto cestou bych ráda poděkovala Mgr. Magdě Janalíkové, Ph.D., za pomoc při zpracování tématu bakalářské práce.

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

OBSAH

ÚVOD.....	9
I TEORETICKÁ ČÁST.....	10
1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i>.....	11
1.1 MORFOLOGIE	12
1.2 KULTIVACE BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.3 PATOGENITA <i>ESCHERICHIA COLI</i>	12
1.3.1 Preventivní opatření proti nálezům	13
1.3.2 Antibiotická rezistence	13
1.4 VÝZNAM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	15
1.5 FYLOGENETICKÉ SKUPINY	16
2 VÝSKYT <i>ESCHERICHIA COLI</i> V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU	17
2.1 BAKTERIE <i>ESCHERICHIA COLI</i> IZOLOVANÁ ZE ZELENINY	17
2.2 RIZIKOVÉ POTRAVINY	18
II PRAKTICKÁ ČÁST	19
3 CÍL PRÁCE	20
4 MATERIÁL A METODY	21
4.1 MATERIÁL.....	21
4.1.1 Vzorke zeleniny	21
4.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky	22
4.1.3 Chemikálie	22
4.1.4 Kultivační média	23
4.1.5 Roztoky	25
4.1.6 Antibiotika.....	27
4.2 METODY.....	28
4.2.1 Fenotypizační metody	28
4.2.2 Genotypizační metody	29
5 VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
5.1 IDENTIFIKACE BAKTERIÁLNÍCH IZOLÁTŮ.....	32
5.2 PRODUKCE BAKTERIOCINŮ	33
5.3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE	34
5.4 FAKTORY VIRULENCE.....	40
6 ZÁVĚR.....	42
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	43
SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	48
SEZNAM OBRÁZKŮ	49
SEZNAM TABULEK.....	50

ÚVOD

Escherichia coli je bakterie běžně se vyskytující ve střevním traktu teplokrevných zvířat a lidí. Ve střevním traktu slouží k udržování rovnováhy mezi mikroorganismy, ovšem ne všechny její kmeny jsou prospěšné. Je zařazována mezi podmíněně patogenní mikroorganismy a je schopna vyvolávat různé druhy onemocnění. Mezi tyto onemocnění je možné zařazovat nozokomiální infekce, průjemová onemocnění a infekce močových cest. Tuto bakterii je ovšem možné nalézt i mimo střevní trakt teplokrevných živočichů.

Escherichia coli je často izolována ze vzorků masa hovězího, vepřového i drůbežího. Je možné ji nalézt také v potravinách rostlinného původu. Ke kontaminaci zeleniny touto bakterií dochází nejčastěji při předsklizňovém opracování. Výskyt *E. coli* je možný i při sklizni či kulinárních úpravách surovin. Kontaminaci mikroorganismy je možné častěji nalézt u zeleniny s porušeným pletivem. Častý výskyt bakterie *Escherichia coli* byl zaznamenán u různých druhů naklíčených semen a listové zeleniny. Bakterie *Escherichia coli* je označována jako indikátor fekálního znečištění. Kontaminace se rozšiřuje díky hnojení mrvou hospodářských zvířat. Díky tomuto hnojení dojde ke kontaminaci i vody, která se dále využívá k zalévání pěstované zeleniny a ovoce.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIE *ESCHERICHIA COLI*

Jedná se o fakultativně anaerobní gramnegativní nesporulující tyčinky náležící do čeledi *Enterobacteriaceae* [1].

Dříve byla nazývána *Bacillus coli*, ale od tohoto názvu se upustilo a v dnešní době je známá pod názvem *Escherichia coli*. *Escherichia coli* je jednou z nejlépe prostudovaných bakterií, a proto je častým modelovým mikroorganizmem pro různé pokusy v mikrobiologické praxi. Je hojně využívána v různých biotechnologických procesech a genetických manipulacích [2].

Vlastnosti této bakterie jsou považovány za prototyp enterobakterií. Za vzniku plynů štěpí glukózu, produkuje indol a až na výjimky je laktóza pozitivní [2].

Její výskyt je běžný v dolním zažívacím traktu teplokrevných organismů. Je nejznámější i nejdůležitější složka mikrobiologické flory v tlustém střevě u lidí a samozřejmě i u ostatních savců [3]. Nevyskytuje se ovšem jen ve střevech, ale daří se jí dobře i mimo tělo. Díky této vlastnosti je možné ji využívat jako indikátor fekálního znečištění okolního prostředí, vody a potravin [4].

Bakterie *E. coli* osídlí zažívací trakt novorozence do 40 hodin po porodu a bývá první bakterií, která zažívací trakt osídlí. Tyto bakterie pochází z potravy, z vody anebo z ošetřujících osob. Pokud tyto bakterie nenesou genetickou informaci kódující některý z faktorů virulence, tak se stávají neškodnými a prospěšnými komenzály. Komenzální *E. coli* jsou indikátorem fekálního znečištění vody a potravin. Je pravidelnou a nezbytnou součástí střevní mikroflóry. Kde díky svému symbiotickému účinku produkuje vitamin K a potlačuje osídlení střevními patogeny [2; 4; 5].

Ovšem virulentní kmeny *E. coli* způsobují gastroenteritidy, močové infekce a v menším počtu i novorozenecké meningitidy, hemolytický syndrom, peritonitidu, mastitidu, septikemii a pneumonii. U některých kmenů *E. coli* byla zjištěna produkce toxinů, které mohou být letální. K infekci těmito kmeny dochází např. po konzumaci neomyté zeleniny a nedostatečně tepelně opracovaného masa [4].

1.1 Morfologie

Bakterie *E. coli* je gramnegativní, fakultativně anaerobní pohyblivá tyčinka, která je uspořádána jednotlivě nebo po dvojicích za sebou. Její pohyb je umožňován přítomností peritrichálních bičíků. Velikost vegetativních buněk se udává 1 - 1,5 x 2 - 6 μm [6].

Na povrchu bakteriální buňky se vyskytují různé druhy fimbrií, které bakteriím umožňují adherenci k hostitelským buňkám. U *E. coli* se v menší míře vyskytují i sex pili, které umožňují vazbu mezi donorem a recipientní buňkou při konjugaci. U některých kmenů *E. coli* se tvoří polysacharidová pouzdra a jejich kolonie mají hlenovitý charakter [6].

1.2 Kultivace bakterie *Escherichia coli*

Bakterie *E. coli* je na kultivaci nenáročná. Její kultivace ideálně probíhá při teplotě 37 °C po minimální dobu 24 hodin. Je schopná růst v rozmezí teplot 7 – 45 °C. Optimální teplota růstu je 37 °C. *E. coli* je citlivá k zářevu, ale naopak dobře snáší zmrazení. Roste v rozmezí pH 4 – 10 a její optimum se nachází v rozmezí 6 – 7. Mezi její fyziologické znaky patří, že je kataláza pozitivní a oxidáza negativní. Laktózu fermentuje za tvorby kyseliny mléčné, octové a plynů [2].

E. coli dobře roste na běžných kultivačních půdách, které obsahují laktózu a příslušný indikátor pro tvorbu kyseliny. Často se ke kultivaci používá Endo agar, který je selektivní a diferenční půdou na které se provádí izolace bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* a několika dalších gramnegativních tyčinek. Bakterie *E. coli* je zde rozeznávána díky typickým koloniím, které mají tmavě růžové zbarvení se zlatězeleným kovovým leskem. V okolí kolonií se vyskytuje zčervenání půdy [7].

1.3 Patogenita *Escherichia coli*

E. coli patří mezi intestinální patogeny a je podmíněně patogenní v závislosti na přítomnosti adhezivních fimbrií, produkci toxinů atd. [2]. Mezi podmínky, které bakterie *E. coli* potřebuje k vyvolání infekce patří i snížená odolnost hostitele [3]. Bakterie poškozují hostitele pomocí různých mechanismů. Jako příklad těchto mechanismů je možné uvést invazi do buněk, která buňkám bakterie umožňuje průnik, kolonizaci a množení [8].

Patogenní kmeny vyvolávají různá onemocnění a je možné je rozdělit do čtyř hlavních skupin [2]:

- **Enterotoxigenní kmeny (ETEC)** – tyto kmeny nejsou invazivní a jsou charakterizovány produkcí proteinových enterotoxinů;
- **Enteropatogenní kmeny (EPEC)** – můžeme je také nazývat dyspeptické nebo enteroadherentní, neprojevují se produkcí enterotoxinů, ale jsou schopné pevné vazby na povrch buněk epitelu tlustého střeva pomocí antigenních adhezínů;
- **Enteroinvasivní kmeny (EIEC)** – tyto kmeny se mohou také nazývat Shigella – like, podobají se shigellám (nemají bičíky a jsou nepohyblivé);
- **Enterohemoragické kmeny (EHEC)** – tyto kmeny je možné nazývat verotoxigenní (VTEC) nebo shiga – like toxigenní (STEC) tyto kmeny jsou ty nejnebezpečnější. Produkují toxin zvaný shiga – like toxin nebo Vero – toxin, protože je podobný shigellovému toxinu a působí cytotoxicky na Vero buňky [2].

Bakterie *Escherichia coli* je zařazována také mezi extraintestiální patogeny (ExPEC) – uplatňuje se především při močových infekcích, pneumoniích, infekcích ran a sepsích. Tyto infekce mohou mít nosokomiální charakter. Při léčení těchto infekcí se používá léčba antibiotiky [2].

1.3.1 Preventivní opatření proti nálezům

Nejdůležitější faktor při prevenci je rozhodně důsledné dodržování hygienických pravidel.

Některá z hygienických pravidel:

- Účinným opatřením je důsledné tepelné opracování surovin a potravin
- Omývání zeleniny pod tekoucí pitnou vodou
- Řádná hygiena pracovníků
- Kořenovou zeleninu zbavit slupky
- Dbát na minimalizaci křížové kontaminace (nepoužívat kuchyňské náčiní na syrové maso a zároveň zeleninu) [9]

1.3.2 Antibiotická rezistence

Při použití většiny antimikrobních látek, které se využívají v medicíně, a to jak humánní, tak i veterinární, dochází k inhibici růstu bakterií nebo i k jejich usmrcení. K usmrcení bakterií dochází i při velmi nízkých koncentracích. Bakterie mají schopnost vytvářet si rezistenci na antibiotické látky, a tím komplikují léčbu infekcí, které jsou způsobeny

bakteriemi [10; 11; 12]. V Tabulce 1 je uvedena doba, za kterou se objevila antibiotická rezistence na vybraná antibiotika.

Je možné rozlišovat dva základní typy rezistence:

- **Rezistence primární** odpovídá geneticky podmíněné necitlivosti bakterie na dané antibiotikum bez ohledu na její předchozí kontakt s antibiotikem.
- **Rezistence sekundární** je závažným problémem. Tento pojem znamená, že původní citlivý bakteriální kmen se během léčby stane vůči tomuto antibiotiku rezistentní. Tato rezistence vzniká při dlouhodobém a nekontrolovaném používání antibiotik [18].

Sekundární typ rezistence je dále rozdělován na:

- penicilinový typ – vzniká po dlouhodobém podávání některých antibiotik (penicilinu, chloramfenikolu, bacitracinu);
- streptomycinový typ – u tohoto typu rychle vznikají vysoce rezistentní kmeny (streptomycin, erytromycin, linkomycin, rifampicin) [18].

Jednotlivé kmeny *E. coli* se výrazně liší svou citlivostí na různá antibiotika. Jelikož je *E. coli* gramnegativní bakterie, tak je rezistentní na mnoho antibiotik proti grampozitivním bakteriím. Při léčbě infekčního onemocnění, které bylo způsobeno bakterií *E. coli* se nejčastěji používá ampicilin a další polysyntetické peniciliny, některé cefalosporiny, karbapenemy, aztreonam a další [18].

Patogenní kmeny bakterie *E. coli*, které jsou rezistentní vůči antibiotikům byly ve většině případů izolovány ze vzorků živočišného původu. A to zejména z masa vepřového, hovězího a drůbežího [13; 14; 15]. Antibiotická rezistence byla zaznamenána i u izolátů z mořských organismů a ryb, které jsou chovány ve farmách a jsou preventivně léčeny antibiotiky [16]. Ovšem výskyt antibiotické rezistence byl prokázán i u kmenů bakterie izolovaných ze zeleniny a ovoce a jejich produktů [17].

Geny pro rezistenci se mohou z *E. coli* šířit i mezi jiné bakteriální druhy (*Staphylococcus aureus*). Protože rezistence bývá často kódována na plasmidech a ty jsou při stresu rychle přenášeny na jiné druhy. Tento přenos je usnadněn především tím, že *E. coli* často žije v biofilmech. Tyto biofilmy jsou v bezprostřední blízkosti nebo dokonce v kontaktu s ostatními bakteriemi. A protože *Escherichia coli* je obdařena fimbriemi, je tedy vzájemný

přenos mezi bakteriemi velmi snadný. *E. coli* a ostatní enterobakterie můžeme považovat za významný rezervoár antibiotické rezistence [4].

Stále častější rezistenci vůči antibiotikům můžeme připisovat jak jejich nadužívání při léčbě lidí, tak jejich přidáváním do potravy zvířat na podporu jejich růstu [4].

Tab. 1. Data nasazení a objevení rezistence na jednotlivá antibiotika [19].

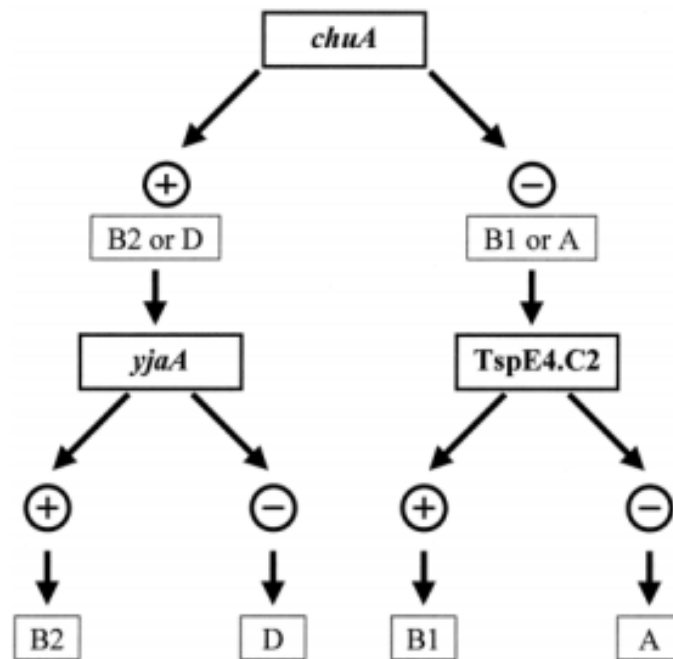
Antibiotikum	Rok nasazení antibiotika	Rok objevení rezistence
Sulfonamidy	1930	1940
Penicilin	1943	1946
Streptomycin	1943	1959
Chloramfenikol	1947	1959
Tetracyklin	1948	1953
Erytromycin	1952	1988
Vankomycin	1956	1988
Methicilin	1960	1961
Ampicilin	1961	1973
Cefalosporiny	1960	1960

1.4 Význam *Escherichia coli*

E. coli je velmi významná v moderním bioinženýrství a průmyslové mikrobiologii, a to díky snadné manipulaci. Je velmi důležitým modelovým mikroorganizmem prokaryotických organismů. Na *E. coli* byla prokázána bakteriální konjugace, replikace DNA a další buněčné procesy. Na masivně naočkovaném agaru touto bakterií dochází k pěstování některých améb. Do jejího genomu byly vneseny geny pro produkci nejrozmanitějších látek, jako je například lidský inzulin nebo interferon. Rekombinantní *E. coli*, která vznikla přenosem genů na plasmidech je velmi všestranný hostitel, který je ve velkém měřítku využíván při produkci heterologních proteinů průmyslovými fermentačními procesy [20].

1.5 Fylogenetické skupiny

Kmeny *E. coli*, které běžně najdeme ve střevní mikroflóře teplokrevných živočichů jsme schopni zařadit do čtyř hlavních fylogenetických skupin (Obr. 1). Tyto skupiny se dělí na skupiny A, B1, B2 a D. Kmeny patřící do jedné skupiny mají stejné vlastnosti [21].



Obr. 1. Rozdělení bakterie *Escherichia coli* pomocí dichotomického klíče do fylogenetických skupin [21].

E. coli se do fylogenetických skupin zařazuje pomocí multilokusové enzymové elektroforézy nebo ribotypizací. Avšak tyto metody jsou velmi složité a časově náročné a vyžadují velkou databázi kmenů pro vyhodnocení výsledků. Roku 2000 byla popsána rychlá metoda, která je založená na detekci genů *chuA*, *yjaA* a úseku DNA TSPE4.C2 pomocí PCR. Tuto metodu je možné provádět v uspořádání triplex PCR díky, které se *E. coli* rozděluje do fylogenetických skupin pomocí dichotomického klíče [21; 22].

2 VÝSKYT *ESCHERICHIA COLI* V POTRAVINÁCH ROSTLINNÉHO PŮVODU

Bakterie *E. coli* se normálně vyskytuje v koncové části střevního traktu živočichů, kde působí pozitivně na trávení. Svým působením v trávicím traktu znemožňuje průnik patogenů, protože produkuje antimikrobiálně působící bakteriociny. Kmeny, které se běžně nachází v dolní části trávicího traktu teplokrevných živočichů, jsou nepatogenní. Přispívají k fyziologickým poměrům tím, že udržují vyvážené ekologické poměry ve střevní flóře, odbourávají některé nestravitelné zbytky, produkují vitamín K a částečně i komplex vitamínu B. Bakterie *Escherichia coli* je v přírodě v hojném zastoupení a běžně ji můžeme najít v půdě, prachu, povrchových a odpadních vodách.

Ovšem v roce 2011 se vyskytla v Německu epidemie, jejíž příčinou byla právě bakterie *Escherichia coli* a to konkrétně shigatoxigenní typ [23]. Zdravotní potíže jako akutní průjem zasáhly tisíce lidí v Německu i v okolních státech. Jelikož tato bakterie způsobuje akutní střevní potíže, jako i krvácivé průjemy a u některých jedinců vyvolává postižení ledvin a anémii, tak se bohužel tato epidemie neobešla bez ztrát na životech. Podezření na zdroj nákazy padlo na okurky, na kterých byla potvrzena přítomnost bakterie *E. coli* ovšem tento typ netvořil shigatoxin. Až po té když šest nakažených uvedlo, že konzumovali naklíčená semena pískavice, která byla původem z Egypta, bylo možné epidemii zastavit. Kontaminace semen byla nejspíše způsobena nevhodnou závlahou [23].

2.1 Bakterie *Escherichia coli* izolovaná ze zeleniny

Dle studií bylo zjištěno, že výskyt bakterie *E. coli* je nejčastější u listové zeleniny a klíčících různých semen [21]. Častější výskyt *E. coli* u klíčků mungo může být způsoben podmínkami, které jsou vhodné pro klíčení semen, jako vysoká vlhkost prostředí a vhodné živiny. Tyto podmínky zároveň podporují růst mikroorganismů [24; 25].

Kontaminace zeleniny bakteriemi *E. coli* je možná při její produkci, při sklizni, anebo při úpravách ke konzumaci. Za nejčastější způsob kontaminace je považováno předsklizňové období. Mikroorganismy se běžně vyskytují v hnojivech, půdách i ve vodě a proto je možné, že dochází ke kontaminaci zeleniny různými druhy mikroorganismů včetně *E. coli*. Pokud se u zeleniny objeví porušené pletivo, tak takto porušená zelenina je náchylnější k mikrobiální kontaminaci [25]. Zdrojem patogenní *E. coli* O157:H7 mohou být nepasterované ovocné šťávy a samozřejmě i čerstvé ovoce [27].

2.2 Rizikové potraviny

Mezi rizikové potraviny běžně zařazujeme syrové hovězí maso a mléko. Ovšem dá se nalézt i v syrovém ovoci a zelenině, nepasterovaných šťávách, salátech ze syrové a krájené zeleniny. Mezi časté zdroje je možné zařadit i naklíčená semena a výhonky rostlin [24]. Dle studie bylo zjištěno, že nejčastěji se bakterie *E. coli* vyskytuje u vzorků listové zeleniny a klíčících semen. Totéž prokázal i výzkum, který provedl Tzschope. Ten detekoval bakterii *E. coli* v 5 případech ze 40 vzorků různých klíčků semen a listové zeleniny [24]. Ke kontaminaci zeleniny a ovoce dochází obvykle z půdy, která je přihnojována organickými hnojivy. Výskyt bakterie byl zaznamenán i v nepasterovaném jablečném moštu, po použití závlahové vody, která byla kontaminována výkaly hospodářských zvířat. Dalším zdrojem výskytu může být neošetřená voda, která pochází z nekontrolovaných zdrojů [26].

II. PRAKTICKÁ ČÁST

3 CÍL PRÁCE

Cílem této práce bylo zjistit výskyt bakterie *Escherichia coli* u různých druhů zeleniny. Dále bylo cílem podrobit tyto kmeny testování na produkci bakteriocinů, faktory virulence a antibiotickou rezistenci.

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Materiál

4.1.1 Vzorčky zeleniny

Celkem bylo zakoupeno v roce 2016 v maloobchodních sítích ve Zlíně 98 vzorků zeleniny. Rozpis zakoupené zeleniny je uveden v Tabulce 2. Navíc byl zakoupen v roce 2017 jeden vzorek kuřecího masa, konkrétně kuřecího křídla, v masně ve Zlíně pro účely porovnání základní charakteristiky příp. izolovaného kmene *E. coli* s vlastnostmi izolátů ze zeleniny.

Tab. 2. Seznam zakoupených druhů zeleniny

Druh zeleniny	Počet zakoupených kusů
Salát (různé druhy)	30
Hlíva ústříčná	6
Pekingské zelí	4
Žampion	6
Brokolice	6
Rajče	6
Rukola	5
Okurka	5
Kapusta	7
Ředkvička	8
Mungo klíčky	8
Paprika	7

4.1.2 Laboratorní přístroje a pomůcky

Automatické mikropipety	Eppendorf Research, Německo
Denzitometr (Densi – La – metr)	Erba Lachema, Česká republika
Digitální váha	Kern & Sohn GmbH, Německo
Homogenizátor Stomacher	Labsystem Kft, Maďarsko
Souprava mikrotestů Enterotest 24	Erba Lachema, Česká republika
Termostat BT 120	Laboratorní přístroje Praha, Česká republika
Elektroforéza horizontální HU10	EV 243, Belgie
Centrifuga – MinSpin plus	Eppendorf Research, Německo
Aura PCR pracovní box	BioAir Instruments, Itálie
Bio Vortex V1	Biotech, Česká republika

4.1.3 Chemikálie

Ethanol	Lach Ner s.r.o., Česká republika
Agaróza	Sea Kem LE Agarose, Lonza, USA
100 bp DNA marker	New England Biolabs, USA
dNTP Mix – 12,5 mM	Roche Diagnostics GmbH, Německo
EDTA (0,5 mol/l roztok EDTA)	Lachema a.s., Česká republika
Etidium bromid	Sigma Aldrich, Německo
Chloroform	Sigma, St. Louis, USA
Nanášecí pufr 6x	TopBio, Česká republika
PCR pufr 10x	New England Biolabs, USA
Primery	KRD Česká republika
TAE pufr	Sigma – Aldrich, USA
Taq DNA polymeráza	New England Biolabs, USA
Kyselina octová	Lachema a.s., Česká republika

4.1.4 Kultivační média

Endo agar (41,5 g živné půdy + 1000 ml destilované vody)

Složení živné půdy (g/l):

	[g]
Pepton	10
Laktóza	10
Difosforečnan draselný	3,5
Siřičitan sodný	2,5
Agar	12

Masopeptonový agar (MPA) (28 g živné půdy + 1000 ml destilované vody)

Složení živné půdy (g/l):

	[g]
Agar	15
Masový výtažek	10
Pepton	10
Chlorid sodný	5

Masopeptonový bujón (13 g živné půdy + 1000 ml destilované vody)

Složení bujónu (g/l):

	[g]
Masový výtažek	3
Pepton	5
Chlorid sodný	3

Mueller Hinton agar (38 g živné půdy + 1000 ml destilované vody)

Složení živné půdy (g/l):

	[g]
Dehydrovaná infuze z hovězího masa	300
Hydrolyzát kaseinu	17,5
Škrob	1,5
Agar	17

Soft agar (1000 ml destilované vody)

Složení (g/l):

	[g]
Pepton	5
Masový výtažek	3
Chlorid sodný	5
Agar	10,5

Plate Count Agar (23,5 g živné půdy + 1000 ml destilované vody)

Složení (g/l):

	[g]
Trypton	5
Kvasinkový extrakt	2,5
Glukóza	1
Agar	15

4.1.5 Roztoky

Fyziologický roztok

Složení:

Chlorid sodný	8,5 g
Destilovaná voda	1000 ml

TAE pufr 50x koncentrovaný

Složení:

TRIS	242 g
0,5 M EDTA	100 ml
Kyselina octová	57,1 ml
Destilovaná voda	800 ml

TAE pufr 1x koncentrovaný

Složení:

TAE 50x	20 ml
Destilovaná voda	980 ml

1,5% agarózový gel

Složení:

1x TAE pufr	8,5 g
Agaróza	1000 ml
Ethidium bromid (1 µg/ml)	10 µg

100bp DNA marker

Složení:

Voda	180 μ l
Nanášecí pufr	50 μ l
DNA ladder	20 μ l

4.1.6 Antibiotika

V Tabulce 3 je uveden seznam použitých antibiotických disků a jejich koncentrace na jeden disk.

Tab. 3. Seznam použitých antibiotik.

ANTIBIOTIKUM	ZKRATKA	KONCENTRACE [µg]
Amikacin	AK30	30
Ceftazidim	CAZ30	30
Cefotaxim	CTX30	30
Cefsulodin	CFS	
Meropenem	MEM10	10
Piperacillin/tazobactam	TZP36	36
Amoxicilin/clavulanat	AMC30	30
Chloramphenicol	C30	30
Ampicilin	A10	10
Imipenem	IPM10	10
Cefuroxim	CXM30	30
Aztreonam	AT30	30
Ciprofloxacin	CIP5	5
Doxycyklin	DO30	30
Cefepim	FEP30	30
Sulfamethoxazol/trimethoprim	SXT25	25
Gentamicin	CN10	10
Kys.oxolinová	OA2	2
Colistin	CT10	10

4.2 Metody

4.2.1 Fenotypizační metody

Izolace kmenů bakterie *E. coli* z potravin zeleninového původu

Ze zeleniny bylo odebráno 5 g a následně zředěno 45 ml fyziologického roztoku a pomocí stomacheru došlo ke zhomogenizování vzorku. Tato zhomogenizovaná suspenze byla následně vyočkována na Endo agar, a kultivována po dobu 24 hodin v termostatu při 37 °C.

Po kultivaci a nárůstu typických kolonií s kovovým leskem se tyto kolonie přeočkují křížovým roztěrem na MPA, a po kultivaci při 37 °C a 24 hodinách se kmeny identifikují pomocí mikrotestu Enterotestu 24.

Identifikace kmenů bakterie *E. coli* pomocí Enterotestu 24

Po izolaci kmenů ze zeleniny byl použit Enterotest 24. Tato souprava je určena pro identifikaci střevních bakterií z čeledi *Enterobacteriaceae*. Tento mikrotest je složen z 24 biochemických testů, které prokazují biochemické aktivity (arginin ARG, ureáza URE, ornitin ORN, lysin LYS, sirovodík H₂S, simmons citrát SCI, malonát MAL, β-galaktosidáza ONP, salicin SAL, inositol INO, sorbitol SOR, celobióza CEL, laktóza LAC, melibióza MLB, trehalóza TRE, mannitol MAN, β-glukuronidáza GLR, β-xylosidáza bXY, dulcitol DUL, adonitol ADO, arabitól ART, sacharóza SUC, rafinóza RAF, esculin ESL), specifické pro daný druh bakterií. Tyto testy jsou umístěny do mikrotitrační destičky. Diagnostika této metody je založena na změně barvy testovacího média. K této změně barvy dochází díky příslušným indikátorům.

Enterotest 24 byl prováděn dle pokynů, které udává výrobce. Byla připravena suspenze kultury ve fyziologickém roztoku o zákalu, který odpovídá 1. stupni zákalu McFarlandovy stupnice. Následně se pipetuje do každé jamky 100 µl této suspenze. V této soustavě testů jsou i testy pro anaerobní kultivaci. Tyto jamky s testy URE, ARG, ORN, LYS a H₂S jsou zakapány parafinovým olejem. Tato destička je vložena do sáčku a inkubuje se při 37 °C na 24 hodin. Výsledky Enterotestu 24 se vyhodnocují pomocí barevné srovnávací stupnice, která je dodána výrobcem. Výsledky jsou vyhodnocovány pomocí softwaru TNW Lite (Erba Lachema).

Stanovení antibiotické rezistence pomocí diskové difúzní metody

Pro tuto metodu se používají Petriho misky s půdou Mueller – Hinton agar, na kterou se rovnoměrně naočkuje testovaný mikroorganismus. Při této metodě se používá suspenze, která odpovídá 0,5 McFarlandovy zákalové stupnice. Po přiložení papírových disků na povrch agaru se misky inkubují při teplotě 37 °C po dobu 24 hodin. Za tuto dobu účinné antibiotikum vytvoří kolem disku průzračnou zónu, kde není pozorován nárůst kolonií. Hodnocení antimikrobiálního působení se vyhodnocuje pomocí měření průměru inhibičních zón kolem antibiotických disků v milimetrech. Tato inhibiční zóna byla vyhodnocena dle tabulky EUCAST dostupné na webových stránkách [28]. Seznam antibiotik, jejich koncentrací a vyhodnocení dle EUCAST je uveden v Tabulce 6.

Stanovení aktivity bakteriocinů pomocí vpichového pokusu

Kmeny bakterie *E. coli* byly naočkovány na misky s masopeptonovým agarem a kultivovány při 37 °C po dobu 48 hodin. Po uplynulé době kultivace byly tyto bakterie usmrceny pomocí par chloroformu, které na bakterie působily po dobu 30 minut. Po usmrcení se misky přelijí 3 ml 1,05 % soft agaru a 100 µl indikátorového kmene. Tyto indikátorové kmeny byly den předem zaočkovány do masopeptonového bujónu a byly kultivovány při 37 °C po dobu 24 hodin. Za indikátorové kmeny byly použity sbírkové kmeny *E. coli* - Row, P400, B1, φ, Sabina 40 a Ss 17, získané ze sbírky Biologického ústavu, Lékařské fakulty, Masarykovy univerzity. Takto nachystané misky se vloží do termostatu, a po dobu 24 hodin se kultivují za teploty 37 °C. Vyhodnocení se provádí sledováním přítomnosti inhibičních zón, které se vytváří kolem jednotlivých kmenů bakterií. Hodnocena je jejich velikost.

4.2.2 Genotypizační metody

Příprava matricové DNA

Izolace DNA z izolovaných kmenů *E. coli* ze zeleniny byla provedena pomocí kitu High Pure PCR Template Preparation Kit (ROCHE, Francie). Při izolaci se postupovalo dle návodu přiloženého výrobcem.

PCR metoda

Polymerázová řetězová reakce je založena na zmnožení vybraného úseku DNA. Tento vybraný úsek DNA vymezují tzv. primery. Primery jsou krátké úseky DNA o známém počtu a sekvenci nukleotidů. Tyto primery přisedají ke koncům vybraného úseku. Od míst nasednutí primerů probíhá syntéza DNA.

Syntéza DNA je umožněna působením termostabilní DNA polymerázy, která je označována *Taq* polymeráza. Je využíváno cyklických změn teplot a ty umožňují denaturaci DNA, přisedání primerů a syntézu DNA [29].

Detekce faktorů virulence pomocí metody PCR

Seznam primerů, které byly použity pro detekci faktorů virulence a velikosti PCR produktů jsou uvedeny v Tabulce 4.

Tab. 4. Seznam použitých primerů.

primer	sekvence (5' - 3')	Velikost PCR produktu (bp)	Teplota annealingu [°C]	reference
sfaS-R	CCGCCAGCATTCCCTGTATTC	240	64	Johnson and Stell, 1998
sfaS-F	GTGGATACGACGATTACTGTG			
afa/draBC-R	CCCGTAACGCGCCAGCATCTC	559	63	
afa/draBC-F	GGCAGAGGGCCGGCAACAGGC			
fimH-R	GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA	508	57	
fimH-F	TGCAGAACGGATAAGCCGTGG			
hlyA-R	ACCATATAAGCGGTCATTCCCGT CA	1177	63	
hlyA-F	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGG CT			

Složení amplifikační směsi pro PCR reakci:

PCR pufr	2,5 µl
dNTP mix	0,5 µl
<i>Taq</i> DNA – polymeráza	0,1 µl
Primer F	0,25 µl
Primer R	0,25 µl
Templátová DNA	0,5 µl

Voda 21 μ l

Podmínky klasické PCR:

Úvodní denaturace	94 °C/ 3 min
Denaturace	94 °C/ 30 s
Annealing	57 – 64 C/ 30s
Extenze	68 °C/ 3min
Závěrečná extenze	72 °C/ 10 min
Opakování cyklu	30x
Chlazení	4 °C/ ∞

Teploty pro fázi annealing u jednotlivých primerů jsou uvedeny v Tabulce 4.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

V této práci bylo testováno 98 vzorků zeleniny zakoupené v maloobchodní síti prodejců potravin ve městě Zlín. Druhy testované zeleniny jsou uvedeny v Tabulce 2. Vzorky byly homogenizovány a suspenze byla vyočkována na živný agar. Pokud byl nárůst pozitivní, byla provedena izolace a identifikace kmenů a jejich testování na produkci bakteriocinů, přítomnost faktorů virulence a antibiotickou rezistenci.

Z testovaných 98 vzorků byla u 16 vzorků zeleniny nalezena a identifikována bakterie *Escherichia coli*. Kmeny bakterie *Escherichia coli* byly nalezeny u čtyř vzorků naklíčených semen fazolí mungo a ve dvou případech salátů. Výskyt byl zaznamenán i u vzorků mrkve, petržele, ředkve a jarní cibule. Kompletní seznam těchto kmenů je uveden v Tabulce 5. Dle literatury je výskyt bakterie *Escherichia coli* nejčastěji zaznamenán u naklíčených semen a listové zeleniny [17]. Bakterie *Escherichia coli* byla izolována i ze vzorku kuřecího masa. Tento izolát byl testován na přítomnost faktorů virulence z důvodu porovnání s kmeny izolovanými ze zeleniny.

5.1 Identifikace bakteriálních izolátů

Vzorky, které byly identifikovány pomocí typických kolonií byly dále přečištěny křížovým roztěrem na půdu MPA. Takto izolovaná kultura byla identifikována pomocí Enterotestu 24.

Kmeny, které byly identifikovány jako *Escherichia coli* jsou uvedeny v Tab. 5, byly dále testovány na produkci bakteriocinů, byla stanovena antibiotická rezistence a přítomnost faktorů virulence. Jak je ukázáno v Tab. 5, bakterie *Escherichia coli* se nacházela především na klíčcích a dále na cibuli, rajčatech salátu, mrkvi, ředkvích, cuketě, petrželi. Tento seznam koreluje s daty, která získal Ingham, jež prováděl detekci přítomnosti *Escherichia coli* na zelenině (ředkev, mrkev a salát) pěstované na půdě obohacené živinami z hnoje [38]. S rostoucím intervalem od posledního hnojení půdy s pěstovanou zeleninou se logaritmičtí snižuje počet nalezených bakterií *Escherichia coli* [38].

Tab. 5. Seznam izolovaných kmenů *E. coli* a jejich původ

Označení kmene	Zelenina	Země původu
F10	mungo klíčky	Itálie
F52	mungo klíčky	ČR
F53	mungo klíčky	ČR
F77	jarní cibule	ČR
F78	Rajčata	Maroko
F81	salát little gem	ČR
F84	baby karotka	Holandsko
F87	mungo klíčky	ČR
F94	Rajčata	ČR
F103	Petržel	ČR
F104	Ředkev	ČR
F105	Mrkev	ČR
F106	Ředkev	ČR
F107	jarní cibule	ČR
F108	Cuketa	ČR
LS1	ledový salát	ČR

5.2 Produkce bakteriocinů

Pomocí vpichového pokusu byla sledována produkce bakteriocinů. Dle literatury by se mělo jednat o schopnost většiny bakterií produkovat tyto látky jako ochranu před ostatními zástupci mikroorganismů. Bývají kodovány na plazmidech tj. mimo hlavní genetickou informaci a jsou schopné snadného přenosu do jiné buňky a tak se šířit. Mezi nejfrekventovanější bakteriociny patří koliciny, mikrocinu produkované *Escherichia coli*. Pro detekci bakteriocinogenie byly použity indikátorové kmeny (Row, P400, B1, ϕ , Sabina 40 a Ss 17), které indikují produkci všech známých kolicinů a mikrocinů u *E. coli*. Bylo zjištěno, že žádný ze studovaných izolátů *Escherichia coli* netvoří inhibiční zóny vůči žádnému z indikátorových kmenů, tudíž žádný z kmenů izolovaných ze zeleniny není producentem bakteriocinů. Tato data se neshodují s daty z literatury, a proto je v dalším rozvoji práce nutné, tento test zopakovat příp. provést analýzu pomocí metody PCR. Studie Pavlíčkové uvádí, že 51% kmenů *E. coli* izolovaných z kuřecího masa jsou producenty bakteriocinů, izolátů divoké zvěře pouze ve 34 % případů, značná část kmenů jsou multiproducenty bakteriocinů [38].

5.3 Antibiotická rezistence

Všech 16 kmenů *E. coli* izolovaných ze zeleniny bylo testováno na antibiotickou rezistenci k 15 antibiotikům. Rezistence byla prokázána u 15 kmenů z 16 a to k 9 antibiotikům (aztreonam, cefepim, imipenem, amikacin, cefuroxim, piperacillin, ceftazidim, sulfamethoxazol, cefotaxim), seznam testovaných antibiotik nalezneme v Tabulce 6. Tato rezistence byla stanovena pomocí diskové difúzní metody. Výsledky testování ukazují na nejvyšší incidenci rezistence vůči antibiotiku aztreonam, která byla zaznamenána u 10 kmenů. Rezistence byla prokázána i k antibiotiku cefepim a to u 9 kmenů, dále bylo 8 kmenů rezistentních vůči imipenemu a amikacinu. Rezistence šesti bakteriálních kmenů byla zaznamenána k cefuroximu, dva kmeny vykazovaly rezistenci vůči piperacillinu a ceftazidimu. Rezistenci k sulfamethoxazolu a cefotaximu vykazoval jeden kmen. Pomocí diskové difúzní metody nebyla potvrzena rezistence k ostatním antibiotikům.

V průběhu posledních let je pozorován vyšší nárůst rezistentních patogenních kmenů bakterií *E. coli*, které jsou izolovány zejména z prasat [31; 32; 33; 34], drůbeže [33; 34; 35] a skotu [32; 34]. Pro porovnání je nutno napsat, že v případě bakteriálních kmenů izolovaných z těchto zvířat byla zaznamenána rezistence na ampicilin, trimetoprim/sulfamethoxazol, tetracyklin, sulfonamidy a streptomycin [33; 34; 36; 37] a též tetracykliny [38].

Velikosti inhibičních zón jsou zaznamenány v Tab. 7 a jejím pokračování v Tab. 8. Výsledné počty rezistentních kmenů jsou zapsány na Obr. 2. V případě kmenů izolovaných ze zeleniny bylo zjištěno, že 9 kmenů je multirezistentních. Seznam těchto multirezistentních kmenů je uveden v Tab. 10.

Tab. 6. Seznam antibiotik, jejich koncentrací a vyhodnocení průměru inhibičních zón dle EUCAST.

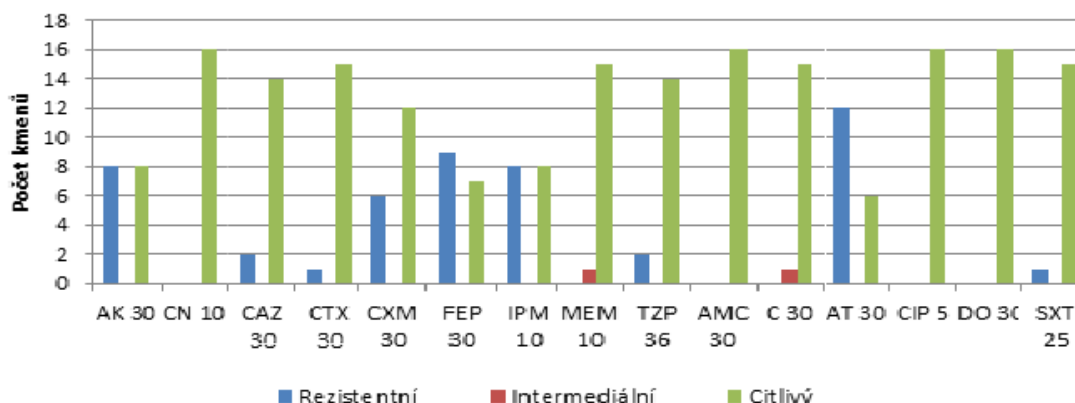
Antibiotika	Zkratka	Koncentrace [μg]	Citlivý [mm]	Rezistentní [mm]
Amikacin	AK 30	30	≥18	≤15
Ceftazidim	CAZ 30	30	≥22	≤19
Cefotaxim	CTX 30	30	≥20	≤17
Meropenem	MEM 10	10	≥22	≤16
Piperacillin/ tazobactam	TZP 36	36	≥20	≤17
Amoxicilin / Clavulanat	AMC 30	30	≥19	≤19
Chloramphenicol	C 30	30	≥18	≤17
Imipenem	IPM 10	10	≥22	≤16
Cefuroxim	CXM 30	30	≥19	≤19
Aztreonam	AT 30	30	≥26	≤21
Ciprofloxanin	CIP 5	5	≥26	≤24
Doxycyklin	DO 30	30	≥14	≤10
Cefepim	FEP 30	30	≥27	≤21
Sulfamethoxazol/ Trimethoprim	SXT 25	25	≥16	≤13
Gentamicin	CN 10	10	≥17	≤14

Tab. 7. Velikost inhibičních zón při diskové difúzní metodě [mm] – (červená = rezistentní, žlutá = intermediální, zelená = citlivé)

Antibiotický disk	Izolované kmeny bakterie <i>Escherichia coli</i>							
	F 10	F 52	F53	F77	F78	F81	F84	F87
AK 30	23	27	28	24	22	26	27	26
CAZ30	19	23	24	22	20	16	21	24
CTX 30	29	25	28	23	16	25	22	28
CFS	25	19	24	25	20	20	24	28
MEM10	28	36	36	30	32	22	36	31
TZP36	24	18	23	20	20	17	20	25
AMC30	22	25	19	20	20	22	22	20
C30	36	35	34	30	30	26	34	32
A10	12	8	0	12	0	0	8	10
IPM10	32	32	29	31	30	40	30	30
CXM30	17	15	19	16	12	0	12	18
AT30	30	26	24	20	22	17	20	26
CIP5	34	40	39	29	34	27	38	38
DO30	20	16	20	19	20	28	20	20
FEP30	29	31	32	30	28	24	30	22
SXT25	19	25	26	22	20	14	22	24
CN10	23	26	24	23	25	24	24	26
OA2	21	28	24	20	24	18	22	26
CT10	11	12	12	11	12	12	12	13

Tab. 8. Velikost inhibičních zón při diskové difúzní metodě [mm] – pokračování
(červená = rezistentní, žlutá = intermediální, zelená = citlivé)

Antibiotický disk	Izolované kmeny bakterie <i>Escherichia coli</i>							
	F94	F103	F104	F105	F106	F107	F108	LS1
AK 30	12	13	12	11	11	14	12	12
CAZ30	24	26	28	22	26	26	26	22
CTX 30	22	24	20	22	20	22	26	22
CFS	26	24	24	24	28	26	26	24
MEM10	24	22	20	24	24	24	18	22
TZP36	32	30	28	30	34	34	30	36
AMC30	22	28	18	24	20	22	22	25
C30	20	13	20	20	18	24	24	22
A10	35	32	26	30	24	35	34	34
IPM10	11	11	10	10	10	8	8	12
CXM30	36	34	28	34	24	36	36	40
AT30	16	18	6	15	16	22	18	14
CIP5	26	26	23	24	22	24	26	22
DO30	34	32	32	30	34	34	34	32
FEP30	20	18	18	18	16	20	20	22
SX925	26	24	30	28	30	34	32	30
CN10	22	20	28	24	26	24	24	24
OA2	24	20	22	22	24	24	24	28
CT10	24	20	26	22	24	22	26	26



Obr. 2. Výskyt antibiotické rezistence u kmenů izolovaných ze zeleniny (AK – amikacin, CN – gentamicin, CAZ – ceftazidim, CTX – cefotaxim, CXM – cefuroxim, FEP – cefepim, IPM – imipenem, MEM – meropenem, TZP – piperacillin/tazobactam, AMC – amoxicilin/clavulanat, C – chloramphenicol, AT – aztreonam, CIP – ciprofloxacin, DO – doxycyklin, SXT – sulfamethoxazol/trimethoprim).

Seznam antibiotik, u kterých byla zaznamenán vyšší míra rezistence je uveden v Tab. 9. V Tab. 9 je uvedeno zařazení, mechanismus a typ použitého antibiotika.

Tab. 9. Zařazení antibiotik [38]

Antibiotikum	Zkratka antibiotika	Zařazení	Mechanismus účinku	Typ antibiotika
Cefuroxim	CXM30	Cefalosporin (2. generace) tj. betalaktamová antibiotika	Inhibice syntézy buněčné stěny	Baktericidní
Amikacin	AK30	Aminoglykosidy	Inhibice syntézy bílkovin ireverzibilní vazbou na 30S podjednotku ribozomu	Baktericidní
Imipenem	IPM10	Betalaktamová antibiotika	Inhibice syntézy buněčné stěny	Baktericidní
Aztreonam	AT30	Betalaktamová antibiotika	Inhibice syntézy buněčné stěny	Baktericidní
Ciprofloxacin	CIP5	Chinolony	Inhibice syntézy DNA	Baktericidní
Cefepim	FEP30	Cefalosporiny tj. betalaktamová antibiotika	Inhibice syntézy buněčné stěny	Baktericidní

Získané bakteriální kmeny jsou bez výjimky citlivé k baktericidním antibiotikům, nikoli bakteriostatickým. Konkrétní antibiotika spadají do skupiny betalaktamových antibiotik, aminoglykosidů a chinolonů. Každá skupina antibiotik je specifická svým účinkem – inhibice vzniku buněčné stěny, inhibice transkripce a inhibice vzniku DNA. Jako antibiotika, která jsou bakterií *Escherichia coli* nejvíce překonána, jsou betalaktamová antibiotika – historicky první typ antibiotik. Dle Tabulky 10 se vysoká míra rezistence vyskytla i u chinolonu ciprofloxacinu (50 % kmenů), jež patří k antibiotikům novějšího druhu. Ve srovnání s izoláty bakterie ze vzorků masa se jedná o pozitivní výsledek, jelikož bakterie nacházející se na mase, zejména brojlerech kuřat, jsou kontaminovány *Escherichia coli* rezistentní k norfloxacinu – chinolon, už 96% [40]. Dále se u kuřat objevila dle studie rezistence k dalším zástupcům chinolonů resp. fluorchinolonů (pefloxacin, enrofloxacin), betalaktamových antibiotik (amoxicilin), aminoglykosidů (gentamicin) a tetracyklinům [38; 41]. Ze srovnání této práce se studií Mohameda a kol. plyne, že rezistence jak u bakterie *Escherichia coli* izolované ze vzorků zeleniny, tak ze vzorků kuřecího masa, existuje pro stejné typy antibiotik, avšak s tím rozdílem, že se jedná o opačný seznam – u izolátů ze zeleniny se jedná o rezistenci primárně k betalaktamových antibiotikům, následně k tetracyklinům, aminoglykosidům a následně k chinolonům [41]. Pro vzorky kuřat platí opačné pořadí – nejvyšší míra rezistence k účinku je pro chinolony, následně aminoglykosidy a betalaktamová antibiotika [40]. Toto ukazuje na vyšší míru rizika masného průmyslu, kde dochází ke vzniku rezistence k antibiotikům poslední záchrany v oblasti humánní medicíny, či antibiotikům nedávno syntetizovaným. S tím souvisí i opatření pro potlačení a inaktivaci povrchových struktur bakterie např. záhřevem. KaWang Li a kol. ukázali, že záhřev masa (hovězí a telecí) je nutný min. po dobu 3,5 minuty při teplotě 55 °C, což odpovídá přípravné teplotě pro steak typu rare. Pokud je doba zahřátí kratší – dle studie pouhá 0,5 min je zde riziko výskytu bakterie mnohem vyšší – v počtech CFU dokonce o 1 až 3 log řády CFU/g vzorku [39].

Vzhledem k míře rezistence analyzovaných antibiotik byla zhotovena Tab. 10. Ta ukazuje, nakolik jsou získané izoláty multirezistentní. Ze získaných 16 izolátů bakterie má 13 kmenů rezistenci ke čtyřem a více antibiotikům viz Tab. 10.

Tab. 10. Multirezistence izolovaných bakteriálních kmenů

Kmen <i>Escherichia coli</i>	Počet antibiotik s rezistencí
F81	4
F94	4
F103	5
F104	6
F105	5
F106	5
F107	4
F108	4
LS1	4

Vzhledem k výskytu antibiotické multirezistence, která byla pozorována v případě testovaných kmenů, je možné spekulovat o tom jak narůstající spotřeba antibiotik ve veterinární tak i humánní medicíně zvyšuje záchyť rezistentních kmenů izolovaných z potravin a to včetně zeleniny [21; 30].

5.4 Faktory virulence

Faktory virulence byly zjišťovány pomocí metody PCR za použití čtyř párů primerů, které zkoumají přítomnost genů kódujících adheziny a toxiny. V této práci byly zkoumány geny kódující S fimbrie (*sfaS*), hemolyzin (*hlyA*), fimbrie typu 1 (*fimH*) a afimbriální adheziny (*afa/draBC*). Nejčastěji se jedná o geny kolistinové rezistence *mcr-1* atd. jejichž produkt má hmotnost 723 bp [41; 43], dále o geny *iss-F-15/iss – R-15* s produktem 290 bp či *TSH-F-15/TSH-R-15* s produktem 825 bp. Riziko případné rezistence ke kolistinu spočívá v jeho užívání jednak v medicíně veterinární, jednak v častém použití v medicíně humánní [42; 43].

Faktory virulence bývají přítomné u kmenů *Escherichia coli* pocházejících ze vzorků masa, především kuřat [39] následně hovězího dobytka, kde se jedná především o *Escherichia coli* O157:H7 [44].

V této práci byly kmene testovány na přítomnost produktu o velikosti 240 bp, který vzniká při detekci genu *sfaS*. U bakteriálních kmenů izolovaných ze zeleniny v této práci nebyla prokázána přítomnost tohoto faktoru virulence.

Na Obrázku 3 jsou uvedeny výsledky pro detekci genu *sfaS*. Z Obrázku 3 je patrné, že u testovaných kmenů není přítomný PCR produkt o velikosti 240 bp. V této práci byly

faktory virulence zkoumány i u jednoho vzorku kuřecího masa, ovšem pouze za použití páru primerů sfaS-R a sfaS-F, proto se k porovnání se vzorky ze zeleniny dále nehodí. Na přiloženém obrázku z elektroforézy je možné pozorovat i vzorek z kuřecího masa.



Obr. 3. Výsledek gelové elektroforézy pro pár primerů sfaS-R a sfaS-F. (1 – 100bp DNA marker, 2 – F10, 3 – F52, 4 – F53, 5 – F77, 6 – F78, 7- F81, 8 – F84, 9 – F87, 10 – F94, 11 – F103, 12 – F104, 13 – F105, 14 – F106, 15 – F107, 16 – F108, 17 – LS1, 18 – izolát z kuřecího masa, 19 – izolát z kuřecího masa).

Jak je uvedeno, vzorky byly testovány na přítomnost faktorů virulence s negativním výsledkem. Tato práce by mohla být dále rozvíjena v oblasti PCR analýzy dle práce Mohameda [42], který testoval čtyři hlavní faktory virulence u vzorků kuřat – *tsh*, *papC*, *colV* a *iss* geny a dle Pavlíčkové [39]. U kmenů testovaných v práci Pavlíčkové byl nejčastěji prokázán gen *iss*, na jehož přítomnost vzorky této práce testovány nebyly. Dále by bylo vhodné získané izoláty testovat na přítomnost genu *mcr-1* a rezistenci ke kolistinu dle Shena Z. [45].

Z výše uvedeného plyne, že zelenina dostupná v potravinářských maloobchodních řetězcích, je kontaminována presumptivním patogenem – *Escherichia coli*. Bod kontaminace není možné vysledovat, avšak nejčastěji se jedná o druh zálivky rostlin přítomných na poli ve vegetačním období a příp. při dopravě ke konečnému zákazníkovi.

6 ZÁVĚR

Cílem této práce bylo zjistit výskyt bakterie *Escherichia coli* v různých druzích běžně dostupné zeleniny. V této práci byl největší záchyt této bakterie zjištěn u naklíčených semen a v salátu. Dále byl záchyt zaznamenán u mrkve, petržele, ředkve a u jarní cibule. V případě naklíčených mungo fazolí je možné spekulovat o tom, že při klíčení semen je vytvořeno příznivé prostředí jak pro klíčení, tak i pro růst mikroorganismů. U salátu, mrkve, petržele, ředkve a jarní cibule je možné zamyslet se nad tím, jaká voda byla použita při zavlažování. Z tohoto důvodu je důležité zeleninu před přípravou řádně omýt čistou vodou a samozřejmě minimalizovat riziko nákazy je možné důkladným tepelným ošetřením. V případě naklíčených semen je nutno obzvláště dbát na omytí, jelikož tato potravina bývá konzumována čerstvá a často je kontaminována bakterií *Escherichia coli*.

Izolované bakteriální kmeny byly dále studovány na produkci bakteriocinů, rezistenci vůči antibiotikům a přítomnost faktorů virulence (adhezinů, toxinů). Bylo zjištěno, že žádný z těchto kmenů není producentem bakteriocinů a u žádného nebyla prokázána přítomnost čtyř faktorů virulence. Antibiotická rezistence byla prokázána k 9 antimikrobiálním látkám. Vyšší míra rezistence byla zaznamenána u baktericidního typu antibiotika. Konkrétně tato antibiotika náleží do skupiny betalaktamových antibiotik, chinolonů a aminoglykosidů. Betalaktamová antibiotika jsou historicky prvním typem antibiotik a to je nejspíše důvod, že bakterie *Escherichia coli* je vůči nim rezistentní v nejvyšší míře.

Pro minimalizaci rizika infekce konzumenta zeleniny patogenní bakterií *Escherichia coli* je nutné dbát na hygienu nejen osob, ale také surovin, prostředí a nářadí při přípravě potravin. Důležité je koupenu zeleninu pořádně omýt pod proudem tekoucí vody. Riziko nákazy se minimalizuje zejména tepelným ošetřením surovin, a pokud není možné zeleninu dostatečně zahřát, tak je důležité zeleninu omýt, v případě naklíčených semen je nutno na omytí obzvláště dbát.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] TANCREDE, C. (1992): Role of human microflora in health and diseases. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 11
- [2] JULÁK, J. *Úvod do lékařské bakteriologie*. Praha: Karolinum, 2006. ISBN 80-246-1270-4.
- [3] KUHNERT, P., BOERLIN, P., FREY, J. *Target genes for virulence assessment of Escherichia coli isolates from water, food and the environment*. *FEMS Microbiology Reviews*. 2000, roč. 24, č. 1, s. 107-117. ISSN 1574-6976.
- [4] JUHAŇÁK, S., 2012. *Klinicky významné bakterie*. Issue 1. Praha Triton ISBN 978-807-3875-886.
- [5] BEDNÁŘ, M., FRAŇKOVÁ, V., SCHINDLER, J., SOUČEK, A., VÁVRA, J. (1999): *Lékařská mikrobiologie*. Nakladatelství Marvil, Praha
- [6] VAŘEJKA, F., MRÁZ, O., SMOLA, J. (1989). *Speciální veterinární mikrobiologie* str. 147- 149
- [7] ARPAI, J., BARTL, V. (1977). *Potravinářská mikrobiologie* str. 247-247
- [8] BEDNÁŘ, M. *Lékařská mikrobiologie: bakteriologie, virologie, parazitologie*. Praha: Marvil, 1996, s. 137-155. ISBN 80-238-0297-6.
- [9] Informace k prevenci průjmových onemocnění se zvláštním zaměřením na Shiga toxin produkující *E. coli* (STEC), která se také nazývá verotoxin – produkující *E. coli* (VTEC) nebo enterohemoragická *E. coli* (EHEC). *Státní zdravotní ústav* [online]. 3.6.2011 [cit. 2018-05-05]. Dostupné z: <http://www.szu.cz/tema/prevence/informace-k-prevenci-prujmovych-onemocneni-se-zvlastnim?highlightWords=escheria%20coli%20prevence>
- [10] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. vyd. Brno: Neptun, 2005, 351 s. ISBN 80-86850-00-5.
- [11] SCHWARZ, S. a E. CHASLUS-DANCLA. *Use of antimicrobials in veterinary medicine and mechanisms of resistance*. *Veterinary Research*. 2001, roč. 32, s. 201-225. ISSN 1297-9716

- [12] TENOVER, Fred C. *Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. American Journal of Infection Control.* 2006, roč. 34, č. 5, s. 3-10. ISSN 01966553
- [13] MAYRHOFER, S., PAULSEN, P., Frans J. M. SMULDERS a HILBERT, F. *Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry. International Journal of Food Microbiology.* 2004, roč. 97, č. 1, s. 23-29. ISSN 01681605.
- [14] VAN DEN BOGAARD, A. E. *Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 2001, roč. 47, č. 6, s. 763-771. ISSN 14602091.
- [15] SCHROEDER, Carl M., WHITE, D. G. a MENG, J. *Retail meat and poultry as a reservoir of antimicrobial-resistant Escherichia coli. Food Microbiology.* 2004, roč. 21, č. 3, s. 249-255. ISSN 07400020.
- [16] RYU, Seung-Hee, Seog-Gee PARK, Sung-Min CHOI, et al. *Antimicrobial resistance and resistance genes in Escherichia coli strains isolated from commercial fish and seafood. International Journal of Food Microbiology.* 2012, roč. 152, č. 1-2, s. 14-18. ISSN 01681605.
- [17] SKOČKOVÁ, A., KARPÍŠKOVÁ, R., KOLÁČKOVÁ, I., CUPÁKOVÁ, Š. *Characteristics of Escherichia coli from raw vegetables at a retail market in the Czech Republic. International Journal of Food Microbiology.* 2013, roč. 167, č. 2, s. 196-201. ISSN 01681605
- [18] LOCHMANN, O. *Základy antimikrobní terapie*, TRITON, Praha 1999.
- [19] WALSH, Christopher. *Antibiotics Actions, origins, resistance.* USA: ASM press, 2003. ISBN 15555812546.
- [20] VOTAVA, M. *Lékařská mikrobiologie speciální.* Brno: Neptun, 2003, 495 s. ISBN 80-902-8966-5.
- [21] CLERMONT O., S. BONACORSI a E. BINGEN. *Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. Applied and Environmental Microbiology.* 2000, roč. 66, č. 10, s. 4555-4558. ISSN 0099-2240.

- [22] GORDON, David M., CLERMONT, O., TOLLEY, H., DENAMUR, E. *Assigning Escherichia coli strains to phylogenetic groups: multilocus sequence typing versus the PCR triplex method. Environmental Microbiology.* 2008, roč. 10, č. 10, s. 2484-2496. DOI: :10.1111/j.1462-2920.2008.01669.
- [23] Rok 2011 velká epidemie z kontaminovaných potravin v Německu [online]. [cit. 2018-01-25]. Dostupné z: <http://www.chemieapotravyiny.cz/2016/03/30/rok-2011-velka-epidemie-z-kontaminovanych-potravin-v-nemecku/>
- [24] TZSCHOPPE, M., MARTIN, A., BEUTIN, L. *A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic Escherichia coli (EHEC) serogroup O26, O103, O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. International Journal of Food Microbiology.* 2012, roč. 152, č. 1-2, s. 19-30. ISSN 01681605.
- [25] GABRIEL, A. A., BERJA, M. C., ESTRADA, A. M. P., Ma. Gracia Angelica A. LOPEZ, John Gilbert B. NERY a Edwin Jaimes B. VILLAFLORES. *Microbiology of retail mung bean sprouts vended in public markets of National Capital Region, Philippines. Food Control.* 2007, roč. 18, č. 10, s. 1307-1313. ISSN 09567135
- [26] HARAPAS, D., PREMIER, R., TOMKINS, B., FRANZ, P. a AJLOUNI, S. *Persistence of Escherichia coli on injured vegetable plants. International Journal of Food Microbiology.* 2010, roč. 138, č. 3, s. 232-237. ISSN 01681605.
- [27] BEUCHAT, L. R. *Ecological factors influencing survival and growth of human pathogens on raw fruits and vegetables. Microbes and Infection.* 2002, roč. 4, č. 4, s. 413-423. ISSN 12864579.
- [28] The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 7.1, 2017. <http://www.eucast.org>
- [29] ŠMARDA, Jan. *Metody molekulární biologie.* Brno: Masarykova univerzita, 2005. ISBN 80-210-3841-1.
- [30] JOHNSON, Timothy J., Catherine M. LOGUE, James R. JOHNSON, et al. *Associations Between Multidrug Resistance, Plasmid Content, and Virulence Potential Among Extraintestinal Pathogenic and Commensal Escherichia coli from Humans and Poultry. Foodborne Pathogens and Disease.* 2012, roč. 9, č. 1, s. 37-46. ISSN 1535-3141.

- [31] TESHAGER, Tirushet, Inmaculada A. HERRERO, M. Concepción PORRERO, Julian GARDE, Miguel A. MORENO a Lucas DOMÍNGUEZ. *Surveillance of antimicrobial resistance in Escherichia coli strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses. International Journal of Antimicrobial Agents*. 2000, roč. 15, č. 2, s. 137-142. ISSN 09248579.
- [32] LIM, Suk-Kyung, Hee-Soo LEE, Hyang-Mi NAM, Yun-Sang CHO, Jong-Man KIM, Si-Wook SONG, Yong-Ho PARK a Suk-Chan JUNG. *Antimicrobial resistance observed in Escherichia coli strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003–2004. International Journal of Food Microbiology*. 2007, roč. 116, č. 2, s. 283-286. ISSN 01681605.
- [33] LEI, Tao, Wei TIAN, Liu HE, et al. *Antimicrobial resistance in Escherichia coli isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. Veterinary Microbiology*. 2010, roč. 146, č. 1-2, s. 85-89. ISSN 03781135.
- [34] LU, Liming, Lei DAI, Yang WANG, et al. *Characterization of antimicrobial resistance and integrons among Escherichia coli isolated from animal farms in Eastern China. Acta Tropica*. 2010, roč. 113, č. 1, s. 20-25. ISSN 0001706x.
- [35] GARCIA-MIGURA, Lourdes, Rene S. HENDRIKSEN, Lorenzo FRAILE a Frank M. AARESTRUP. *Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in Europe: The missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. Veterinary Microbiology*. 2014, roč. 170, č. 1-2, s. 1-9. ISSN 03781135.
- [36] RAMOS, Sonia, Nuno SILVA, Manuela CANIC, José Luiz CAPELO-MARTINES, Francisco BRITO, Gilberto IGREJAS a Patrícia POETA. *High prevalence of antimicrobial-resistant Escherichia coli from animals at slaughter: a food safety risk. Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2012, roč. 93, s. 517-526. ISSN 1097-0010.
- [37] TADESSE, Daniel A., Shaohua ZHAO, Emily TONG, Sherry AYERS, Aparna SINGH, Mary J. BARTHOLOMEW a Patrick F. MCDERMOTT. *Antimicrobial Drug Resistance in Escherichia coli from Humans and Food Animals. United States, 1950–2002. Emerging Infectious Diseases*. 2012, roč. 18, č. 5, s. 741-749. ISSN 1080-6040.

- [38] Y. Qin, Y. Zhang a S. Boddu. *Rapid and Specific Detectin of Escherichia coli O157:H7 in Ground Beef Using Immunomagnetic Separation Combined with Loop-Mediated Isothermal Amplification,*“ *Polish Journal of food and nutritionscience. sv. 2, pp. 115 – 123, 2018.*
- [39] S. Pavličková, *Charakterizace kmenů Escherichia coli izolovaných*, Zlín: UTB Zlín, 2016.
- [40] C. Ingham, J. Losinki, P. Andrews, J. Breuer, T. Wood. *Escherichia coli Contamination of Vegetables Grown in Soils Fertilized with Noncomposted Bovine Manure: Garden-Scale Studies. APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY;*, sv.11, pp. 6420-6427, 11 2004.
- [41] D. Ljubojevic, M. Pelic, N. Puvača a D. Milanov. *Resistance to tetracycline in Escherichia coli isolates from poultry meat: epidemiology, policy and perspective. World's Poultry Science Journal*, sv. 2, pp. 409-417, 6 2017.
- [42] A. Mohamad, M. Shehata a E. Rafeek. *Virulence Genes Content and Antimicrobial Resistance in Escherichia coli from Broiler Chickens. Veterinary Medicine Internatonal*, 11 2014.
- [43] K. Zurfluh a N. Kieffer. *Features of the mcr-1 Cassette Related to Colistin Resistance.* sv. 10, pp. 6438-6439, 23 9 2016.
- [44] A. G. M. ., C. S. ., M. KaWang Li. *A Comparison Study of Quality Attributes of Ground Beef and Veal Patties and Thermal Inactivation of Escherichia coli O157:H7 after Double Pan-Broiling Under Dynamic Conditions. Food*, sv. 1, 2018.
- [45] Z. Shen, Y. Wang, J. Shen a C. Wu. *Early emergence of mcr-1 in Escherichia coli from food-producing animals, The Lancet - infectious disease.* sv. 3, p. 293, 3 2016.

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ETEC Enterotoxigenní kmeny.

EPEC Enteropatogenní kmeny.

EIEC Enteroinvazivní kmeny.

EHEC Enterohemoragické kmeny.

PCR Polymerázová řetězová reakce.

MPA Masopeptonový agar.

SEZNAM OBRÁZKŮ

<i>Obr. 1. Rozdělení bakterie Escherichia coli pomocí dichotomického klíče do fylogenetických skupin.</i>	16
<i>Obr. 2. Výskyt antibiotické rezistence u kmenů izolovaných ze zeleniny</i>	38
<i>Obr. 4. Výsledek gelové elektroforézy pro pár primerů sfaS-R a sfaS-F.</i>	41

SEZNAM TABULEK

<i>Tab. 1. Data nasazení a objevení rezistence na jednotlivá antibiotika [19]</i>	15
<i>Tab. 2. Seznam zakoupených druhů zeleniny</i>	21
<i>Tab. 3. Seznam použitých antibiotik</i>	27
<i>Tab. 4. Seznam použitých primerů</i>	30
<i>Tab. 5. Seznam izolovaných kmenů E. coli a jejich původ</i>	33
<i>Tab. 6. Seznam antibiotik, jejich koncentrací a vyhodnocení průměru inhibičních zón dle EUCAST.</i>	35
<i>Tab. 7. Velikost inhibičních zón při diskové difúzní metodě.</i>	36
<i>Tab. 8. Velikost inhibičních zón při diskové difúzní metodě – pokračování.</i>	37
<i>Tab. 9. Zařazení nepůsobících antibiotik [37]</i>	38
<i>Tab. 10. Multirezistence izolovaných bakteriálních kmenů</i>	40