

Skríning antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků izolovaných z potravin

Bc. Ivana Huňová

Diplomová práce
2022



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně

Fakulta technologická
Ústav technologie potravin

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: **Bc. Ivana Huňová**
Osobní číslo: **T20081**
Studijní program: **N0721A210004 Technologie potravin**
Forma studia: **Prezenční**
Téma práce: **Skríning antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků izolovaných z potravin**

Zásady pro vypracování

I. Teoretická část

1. Mechanizmy a příčiny vzniku antibiotické rezistence.
2. Antibiotická rezistence vybraných grampozitivních koků izolovaných z potravin a nápojů.

II. Praktická část

1. Mikrobiologický rozbor vybraných potravin textendash izolace grampozitivních koků.
2. Skríning antibiotické rezistence izolovaných grampozitivních koků.
3. Vyhodnocení výsledků a formulace závěrů práce.

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

Seznam doporučené literatury:

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

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

Datum zadání diplomové práce: **31. prosince 2021**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2022**

L.S.

prof. Ing. Roman Čermák, Ph.D.
děkan

Ing. Robert Gál, Ph.D.
ředitel ústavu

Ve Zlíně dne 18. února 2022

PROHLÁŠENÍ AUTORA DIPLOMOVÉ PRÁCE

Beru na vědomí, že:

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

Prohlašuji,

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

Ve Zlíně dne:

Jméno a příjmení studenta:

.....
podpis studenta

ABSTRAKT

Antibiotická rezistence je problémem dnešní doby, jelikož ohrožuje lidské zdraví. Bakterie mohou antibiotickou rezistenci získat několika mechanismy, které mohou být přirozené nebo způsobené prostředím. Tyto bakterie se také mohou vyskytovat v potravinách. Přenosem z potravin se mohou dostat do lidského těla. Jedny z významných bakterií, které se vyskytují v potravinách, jsou bakterie rodu *Staphylococcus*.

Tato diplomová práce se zabývá výskytem rezistentních kmenů bakterií rodu *Staphylococcus* v potravinách, které jsou běžně dostupné v obchodní síti. Potravin byly živočišného i rostlinného původu v syrovém stavu i tepelně opracované. Z těchto potravin byly izolovány bakterie rodu *Staphylococcus*. Převážná většina izolovaných grampozitivních bakterií se vyskytovala v potravinách živočišného původu. Antibiotická rezistence na vybraná antibiotika byla u izolovaných bakterií rodu *Staphylococcus* testována pomocí diskové difúzní metody. Rezistence byla zjišťována na základě naměřených inhibičních zón, které byly porovnány dle tabulky breakpointů systému EUCAST. Byly zjištěny rezistentní kmeny. U čtyř kmenů bakterií byla zjištěná nulová inhibice daným antibiotikem. Tyto bakterie byly rezistentní. Mezi tato antibiotika patřil tobramycin, amikacin a ampicilin. Antibiotikum s největším inhibičním účinkem byl ceftazidim. K tomuto antibiotiku byla rezistentní pouze jedna bakterie *S. vitulinus*, která byla izolovaná z vepřového mletého masa.

Klíčová slova: antibiotická rezistence, antibiotika, *Staphylococcus*, diskový difúzní test, grampozitivní bakterie, potraviny

ABSTRACT

Antibiotic resistance is a problem of our time as it threatens human health. Bacteria can acquire antibiotic resistance by several mechanisms, which may be natural or environmentally induced. These bacteria can also be present in food. They can enter the human body through transmission from food. Some of the important bacteria found in food are bacteria of the genus *Staphylococcus*.

This diploma thesis is concerned with the occurrence of resistant strains of *Staphylococcus* bacteria in foods that are commonly available commercially. The foodstuffs were of animal and vegetable origin in raw state and cooked. Bacteria of the genus *Staphylococcus* were isolated from these foods. The vast majority of the isolated Gram-positive bacteria were present in foods of animal origin. Antibiotic resistance to the selected antibiotics was tested for the isolated *Staphylococcus* bacteria using the disc diffusion method. Resistance was determined on the basis of measured inhibition zones, which were compared according to the EUCAST breakpoint table. Resistant strains were detected. Four bacterial strains were found to have zero inhibition to the antibiotic. These bacteria were resistant. These antibiotics included tobramycin, amikacin and ampicillin. The antibiotic with the greatest inhibitory effect was ceftazidime. Only one bacterium, *S. vitulinus*, isolated from pork mince, was resistant to this antibiotic.

Keywords: antibiotic resistance, antibiotics, *Staphylococcus*, disc diffusion test, gram-positive bacteria, food

Ráda bych tímto poděkovala prof. RNDr. Leoně Buňkové Ph.D. za pomoc při realizaci této diplomové práce, za její odborné vedení, cenné rady a za možnost pracovat v mikrobiologické laboratoři. Mé poděkování patří též laborantkám v mikrobiologické laboratoři Ústavu inženýrství ochrany životního prostředí, které mi umožnily a pomohly zrealizovat tuto diplomovou práci. Dále bych chtěla poděkovat Ing. Marice Lhotské s pomocí při identifikaci bakterií metodou MALDI-TOF. A nakonec mé poděkování patří i mému tatínkovi za morální a finanční podporu při studiu.

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

OBSAH

ÚVOD	10
I TEORETICKÁ ČÁST	11
1 ANTIBIOTIKA	12
1.1 CHARAKTERISTIKA ANTIBIOTIK.....	12
1.2 HISTORIE OBJEVU ANTIBIOTIK.....	12
1.3 VYUŽITÍ ANTIBIOTIK	13
1.4 ROZDĚLENÍ ANTIBIOTIK	13
1.4.1 Laktamová antibiotika.....	14
1.4.2 Aminoglykosidy	14
1.4.3 Chinolony	15
1.4.4 Sulfonamidy	15
1.4.5 Tetracykliny	15
1.4.6 Makrolidy.....	16
2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	17
2.1 CHARAKTERISTIKA ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	17
2.2 VZNIK ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE.....	17
2.3 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE	18
2.4 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE V POTRAVINÁCH	19
3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE VYBRANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ	21
3.1 CHARAKTERISTIKA BAKTERIÍ RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	21
3.2 ONEMOCNĚNÍ ZPŮSOBENÁ BAKTERIEMI RODU <i>STAPHYLOCOCCUS</i>	21
3.3 <i>STAPHYLOCOCCUS</i> V POTRAVINÁCH.....	22
3.4 PATOGENNÍ STAFYLOKOKY	22
3.5 REZISTENCE STAFYLOKOKŮ K ANTIBIOTIKŮM.....	23
II PRAKTICKÁ ČÁST	24
4 CÍLE PRÁCE	25
5 MATERIÁL	26
5.1 POTRAVINY	26
5.2 ANTIBIOTIKA.....	26
5.3 CHEMIKÁLIE, ROZTOKY, KULTIVAČNÍ PŮDY	27
5.3.1 Fyziologický roztok	27
5.3.2 Kultivační média	27
5.3.3 Sterilace materiálu.....	27
5.4 POMŮCKY A VYBAVENÍ	27

6	METODIKA	29
6.1	IZOLACE GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	29
6.2	IDENTIFIKACE GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ	29
6.2.1	Selektivně-diagnostické půdy	29
6.2.2	Mikroskopický preparát – Gramovo barvení	29
6.2.3	STAPHYTEST	30
6.2.4	MALDI-TOF	30
6.3	DISKOVÝ DIFÚZNÍ TEST	30
7.1	IDENTIFIKACE MIKROORGANISMŮ	32
7.2	VLIV PENICILINOVÝCH ANTIBIOTIK NA TESTOVANÉ BAKTERIE	34
7.2.1	Benzylpenicilín	34
7.2.2	Ampicilín.....	37
7.2.3	Amoxicilín.....	39
7.2.4	Methicilin	41
7.3	VLIV CEFALOSPORINŮ NA TESTOVANÉ BAKTERIE	43
7.3.1	Cefotaxim	43
7.3.2	Ceftazidín	45
7.4	VLIV KARBAPENEMŮ NA TESTOVANÉ BAKTERIE.....	47
7.5	VLIV CHINOLONŮ NA TESTOVANÉ BAKTERIE	49
7.5.1	Ciprofloxacin.....	49
7.5.2	Kyselina nalidixová.....	51
7.5.4	Ofloxacin.....	53
7.6	VLIV AMINOGLYKOSIDŮ NA TESTOVANÉ BAKTERIE	55
7.6.1	Amikacin	55
7.6.2	Tobramycin	57
7.7	VLIV MAKROLIDŮ NA TESTOVANÉ BAKTERIE	59
7.8	VLIV TETRACYKLINU NA TESTOVANÉ BAKTERIE	61
7.9	VLIV CHLORAMFENIKOLU NA TESTOVANÉ BAKTERIE	63
8	DISKUZE	65
	ZÁVĚR	73
	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	74
	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	82
	SEZNAM OBRÁZKŮ	83
	SEZNAM TABULEK.....	84

ÚVOD

Antibiotika jsou látky, které zamezují růstu mikroorganismů, zejména bakterií. Antibiotika se získávají z mikroorganismů nebo hub (zejména plísní) nebo se syntetizují. Mezi běžná antibiotika patří peniciliny, streptomycin a tetracykliny. Používají se k léčbě různých infekcí, ale mají tendenci oslabovat přirozené obranné mechanismy těla a mohou způsobit alergie. Nadužívání antibiotik může vést k rozvoji rezistentních kmenů mikroorganismů. Alexander Fleming byl britský mikrobiolog, který v roce 1928 objevil penicilín. [1]

Antibiotická rezistence je schopnost mikroorganismu odolávat působení antibiotika. Rezistence může vyplývat z řady mechanismů, včetně snížené permeability organismu pro lék, modifikace léku nebo receptoru a produkce modifikovaného proteinu, který není ovlivněn antibiotikem. Organismy se mohou stát odolnými buď tím, že projdou spontánními mutacemi, nebo získají geny rezistence z jiných odolných organismů prostřednictvím procesů konjugace a transdukce. Grampozitivní bakterie jsou vůči antibiotikům citlivější. [1]

Stafylokoková otrava jídlem je intoxikace jedním nebo více enterotoxiny produkovanými primárně bakterií *S. aureus* z potravin. Kontaminace vzniká v důsledku nesprávné přípravy nebo skladování. Vzhledem k tomu, že *S. aureus* se vyskytuje především na kůži a sliznicích lidí primárním zdrojem kontaminace potravin jsou pracovníci, kteří manipulují s potravinami. [3]

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ANTIBIOTIKA

1.1 Charakteristika antibiotik

Antibiotika jsou látky, které inhibují růst mikroorganismů. Nejčastějšími producenty antibiotik jsou bakterie a plísně. [1]

Antibiotika se využívají k léčbě bakteriálních, případně houbových infekcí u lidí a zvířat. Některé druhy se vyrábí synteticky. Nejrozšířenější antibiotika jsou peniciliny, které se využívají k léčbě nejrozličnějších nemocí, avšak u některých jedinců mohou peniciliny vyvolat alergickou reakci. [1], [4], [5]

1.2 Historie objevu antibiotik

Objev antibiotik byl zásadním krokem v léčbě infekčních chorob, zejména těch, které byly způsobeny bakteriemi. Dnes se ročně vyrobí asi 50 000 tun antibiotik. Asi třetinu z toho tvoří peniciliny, zatímco tetracykliny tvoří přibližně čtvrtinu trhu. [6], [7], [8]

Prvním z antibiotik, které našlo praktické využití jako terapeutikum, byl penicilin. Úspěch penicilinu zahájil rozsáhlý screeningový proces po celém světě, který vyústil v izolaci velkého počtu antibiotických látek z různých zdrojů. Mnoho z těchto sloučenin bylo produkováno mikroorganismy a ukázalo se, že jsou smrtelné pro jiné mikroorganismy. Velká část těchto sloučenin byla také velmi toxických pro člověka a nemohly být použity samostatně. [7]

První známka použití antibiotik není přesně doložena. Při bádání se našla velká dávka tetracyklinu uloženého v kostech Núbijské mumie (350-550 n. l.) ze starověkého Súdánu. Nedávno byly vzorky kostí analyzovány hmotnostní spektrometrií. Výsledky ukázaly, že tetracyklin ve vzorcích kostí nebyl důsledkem kontaminace ze životního prostředí, ale spíše z potravy súdánské núbijské populace. Potrava súdánské núbijské populace se skládala ze zkvašeného piva nebo kaše, které obsahovalo velké množství tetracyklinu. Tato strava jim poskytovala současně ochranu proti infekčním chorobám, aniž by znali pojem bakterie. [9]

Za další antibiotikum se považovalo stříbro. Stříbro bylo jedním ze sedmi kovů starověku. Ve starověkém Řecku, Římě a Makedonii bylo stříbro používáno k zabránění infekcí. Hippokrates hlásal, že jemný prášek stříbra bude hojit rány. Herodotos popsal, jak perský

král s sebou nesl převařenou vodu ve stříbrných nádobách, aby se zabránilo nemoci. Použití stříbra na přípravu čisté pitné vody z řek a potoků bylo široce využíváno v 19. století. [10]

Dr. J. Marion Sims v roce 1852 použil stříbrné dráty jako stehy. Dr. Carl Siegmund Franz patřil mezi průkopníky v používání očních kapek s dusičnanem stříbrným. První hlášené použití koloidního stříbra pro antisepsi ran bylo připisáno Carlu Benno Credému v roce 1891. Poté se běžně využívala aplikace stříbrných solí pro léčbu infekcí a popálenin. [10], [11]

V prvních letech dvacátého století desítky pacientů konzumovali koloidní stříbro až do objevu účinnějších a bezpečnějších organických antimikrobiálních sloučenin. [10]

V roce 1928 bylo objeveno Alexandrem Flemingem první antibiotikum s názvem penicilín. Od té doby bylo objeveno mnoho antibiotik. Avšak časté používání antibiotik v medicíně vede k větší rezistenci patogenních mikroorganismů, což má za následek větší zdravotní riziko. [9], [10]

Naprostá většina dnes používaných antibiotických sloučenin pochází z půdy nebo hub. Poté, co vznikla rezistence vůči původnímu antibiotiku, bylo často vyvinuto antibiotikum „nové generace“ manipulací s chemickou strukturou původní sloučeniny. Následující generace byly vyvíjeny obdobným způsobem. Jakmile se však vyvinula rezistence na nejnovější generaci antibiotik v dané třídě antibiotik, byla rezistence obvykle udělena také všem nižším generacím antibiotik ve stejné třídě. To může učinit celou třídu antibiotik neúčinnou proti určitým bakteriálním populacím nebo bakteriálním kmenům. [5]

1.3 Využití antibiotik

Antibiotika mohou být vyvinuta proti konkrétnímu mikroorganismu nebo širokému spektru mikroorganismů v humánní nebo veterinární medicíně. Bez ohledu na jejich aktivitu jsou antibiotika označována a uváděna na trh pro konkrétní použití. To může být pro konkrétní onemocnění související s jednou bakterií, více bakteriemi, s komplexem onemocnění nebo nějaké jiné použití. Antibiotikum po použití nezničí jen patogenní bakterie, ale i ostatní citlivé bakterie nacházející se v organismu nebo prostředí. [5]

1.4 Rozdělení antibiotik

V závislosti na způsobu účinku lze antibiotika rozdělit na baktericidní a bakteriostatická. Baktericidní antibiotika se běžně zaměřují na klíčové buněčné struktury a pochody

v mikroorganismu, jako je biosyntéza buněčné stěny a DNA. Bakteriostatická antibiotika se běžně spojují se syntézou proteinů a inhibují proliferaci bakteriálních buněk.

Mezi nejčastější tři typy používaných antibiotik s baktericidním účinkem řadíme:

- Laktamová antibiotika
- Aminoglykosidy
- Chinolony

Mezi nejčastější typy antibiotik s bakteriostatickým účinkem řadíme:

- Makrolidy
- Telithromycin
- Sulfonamidy
- Tetracykliny

Nejrozšířenější skupina antibiotik jsou antibiotika laktamová (včetně penicilinů a cefalosporinů). [4], [12]

1.4.1 Laktamová antibiotika

Laktamová antibiotika se nejčastěji používají v klinické léčbě infekcí. Laktamová antibiotika zasahují do biosyntézy peptidoglykanové vrstvy v bakteriálních buněčných stěnách tím, že nevratně blokují penicilin vázající proteiny, včetně karboxypeptidáz, endopeptidáz a transpeptidáz. Proteiny vázající penicilin jsou skupinou proteinů, které usnadňují zesílení nově syntetizovaného peptidoglykanu se stávající strukturou buněčné stěny. Při léčbě laktamovými antibiotiky se vytvoří slabá buněčná stěna, která následně podléhá buněčné lýze. Do skupiny laktamových antibiotik patří peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy a monobaktamy. [12], [13]

1.4.2 Aminoglykosidy

Aminoglykosidy jsou dalším typem baktericidního antibiotika. Aminoglykosidy zahrnují ve struktuře aminocyklitolový kruh s různými glykosidickými vazbami a postranními řetězci. Aminoglykosidy ovlivňují bakteriální buňky vytěšňováním kationtů, jako jsou Mg^{2+} a Ca^{2+} na vnější bakteriální membráně, čímž narušují permeabilitu membrány. Kromě toho mohou být aminoglykosidy také bakteriostatickým typem, protože narušují růst bakteriálních buněk vazbou na 30S podjednotku bakteriálního ribozomu, čímž inhibují

syntézu proteinů. Vnímavé bakterie na toto antibiotikum jsou primárně aerobní gramnegativní bakterie, jako je *Klebsiella* spp. a *Pseudomonas aeruginosa*, zatímco většina grampozitivních bakterií není vůči této třídě antibiotik citlivá. Mezi zástupce této skupiny patří gentamicin, kanamycin, neomycin a streptomycin. Tato skupina antibiotik se primárně používá k léčbě infekcí na povrchu kůže a v dýchacím systému. [12], [14]

1.4.3 Chinolony

Chinolony se řadí mezi chemoterapeutika. Chinolony inhibují syntézu DNA v bakteriálních buňkách vazbou na DNA gyrázu a DNA topoizomerázu, které se obě podílejí na replikaci, transkripci a opravných systémech DNA. Chinolony jsou účinné proti mnoha typům gramnegativních bakterií, včetně *Klebsiella* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. a *Shigella* spp. Mezi chinolony patří antibiotika ciprofloxacin, gemifloxacin, moxifloxacin a trovafloxacin. [12], [15]

1.4.4 Sulfonamidy

Sulfonamidy jsou kompetitivními inhibitory enzymu, který hraje klíčovou roli v syntéze kyseliny listové. Nedostatek kyseliny listové nakonec vede k ukončení syntézy nukleotidů a přerušování buněčného množení. Byly definovány čtyři skupiny sulfonamidů na základě jejich způsobů absorpce a vylučování. Patří mezi ně krátkodobě až střednědobě působící sulfonamidy, dlouhodobě působící sulfonamidy, sulfonamidy gastrointestinálního traktu a topické sulfonamidy. Mezi běžně používané sulfonamidy patří sulfamethoxazol, sulfadoxin, sulfasalazin a sulfadiazin stříbrný. [12], [16]

1.4.5 Tetracykliny

Tetracykliny se liší od sulfonamidů v tom, že inhibují růst bakterií narušováním syntézy proteinů. Tento typ antibiotik blokuje aminoacyl tRNA vazbou na 30S podjednotku bakteriálních ribozomů. Tetracykliny mohou inhibovat široké spektrum bakterií, včetně většiny grampozitivních a gramnegativních bakterií, aerobů a anaerobů. Tetracykliny jsou rozděleny do tří skupin podle jejich farmakokinetických vlastností. Patří mezi ně krátkodobě působící tetracykliny (oxytetracyklin a tetracyklin), střednědobě působící tetracykliny (demeclocyklin) a dlouhodobě působící tetracykliny (doxycyklin a minocyklin). [12], [17]

1.4.6 Makrolidy

Makrolidy neboli ketolidy jsou dalším typem bakteriostatických antibiotik a jsou schopné vázat se na podjednotky ribozomu 50S, čímž inhibují transpeptidaci a translukaci během syntézy proteinů. Makrolidy mají poměrně široké antibakteriální spektrum, zejména proti grampozitivním bakteriím. Mezi zástupce makrolidů patří erythromycin, klarithromycin, dirithromycin a telithromycin a často se používají k léčbě infekcí dýchacích cest. [12]

2 MECHANIZMY A PŘÍČINY VZNIKU ANTIBIOTICKÉ REZISTENCE

2.1 Charakteristika antibiotické rezistence

Antibiotická rezistence je odolnost daného mikroorganismu na dané antibiotikum. Rezistence na antibiotika je nově vznikajícím problémem moderní medicíny: 70 % kmenů bakterií je rezistentní na alespoň jedno antibiotikum, takže léčba běžných bakteriálních infekcí stále obtížnější. [4]

Antibiotická rezistence je přirozený jev, který bakterie používají k zajištění svého přežití proti několika faktorům v měnícím se prostředí. Rezistencí na antibiotika se zabývá Světová zdravotnická organizace (WHO). Tento problém je považován za globální. [9], [18]

Rezistenci můžeme rozdělit na přirozenou a získanou. Přirozená neboli vrozená, je dána strukturou a vlastnostmi bakterie. Získaná rezistence se přijme z jiné bakterie. [19]

2.2 Vznik antibiotické rezistence

V bakteriích jsou obsaženy geny, které způsobují rezistenci vůči antibiotikům. Tyto geny se v přírodě vyskytují ve velmi malé koncentraci. Vlivem antibiotik se vyselektuje populace, které tyto geny rezistence obsahuje. K rezistenci napomáhá časté používání antibiotik v nízkých dávkách. Díky tomu nedojde k likvidaci všech bakterií a dochází k přežití rezistentních kmenů. [21], [20]

Důkazem vniku rezistentních kmenů mikroorganismů, které se podílejí na mikroklimatu ryb, je vypouštění odpadních vod se zbytky antibiotik. Mořské prostředí je rezervoárem antibiotické rezistence, jelikož byly bakterie rezistentní na antibiotika detekovány v mořských organismech, jako jsou ryby, sépie, chobotnice, dokonce i u mořských ptáků a savců. Mořští ptáci a savci jsou dalším kanálem pro přenos antibiotické rezistence z pobřeží do suchozemí. Mezinárodní obchod s produkty mořských organismů může usnadnit celosvětové šíření genů rezistence, jelikož multirezistentní bakterie byly izolovány z komerčně dostupných zdrojů. [18]

2.3 Mechanismy a příčiny vzniku antibiotické rezistence

Bakterie se mohou stát odolnými vůči specifickým typům antibiotik mnoha různými způsoby, které lze shrnout jako:

- vrozená rezistence,
- snížení intracelulární koncentrace odpovídajících antibiotik,
- inaktivaci odpovídajících antibiotik,
- mutace ve vazebných místech odpovídajících antibiotik,
- tvorba dalších metabolických drah, které kompenzují ztrátu klíčových enzymů nebo substrátů (způsobenou odpovídajícími antibiotiky).

Bakteriální buňky s vrozenou rezistencí vůči určitému antibiotiku přirozeně postrádají molekulu nebo dráhu, na kterou je léčivo zacíleno, proto lék nemá žádný vliv na přežití mikrobů. Bakterie se také mohou stát rezistentními vůči antibiotikům snížením intracelulární koncentrace antibiotika, čehož lze dosáhnout snížením permeability membrány a zavedením efluxních pump. [12], [21]

Gramnegativní bakterie mají obecně lepší kontrolu nad importovanými molekulami, protože jejich vnější membrány mají menší vylučovací limit velikosti než peptidoglykanová vrstva obklopující grampozitivní bakterie. Hydrofilní rozpuštěné látky pronikají do gramnegativních bakterií primárně prostřednictvím porinů na vnější membráně. [4], [12]

U grampozitivních *Staphylococcus epidermidis* může glykopeptidová rezistence vyplývat z nadprodukce vazebných míst pro glykopeptidy v peptidoglykanu buněčné stěny. [12]

Odolnost na antibiotikum se vyvíjí jako genová síť v patogenu, který se šíří spolu s přenosem infekce. Některé bakterie jsou kompetentní pro začlenění rezistentní DNA ze živých a mrtvých buněk z jiných druhů bakterií. Nejčastěji bakterie přijme rezistentní gen z prostředí, jako je trávicí trakt nebo biofilm na povrchu. [22]

Antibiotická rezistence může vyplývat z řady mechanismů, včetně snížené propustnosti organismu na lék, modifikace léku, nebo na zvýšené produkci modifikovaného proteinu, který následně není ovlivněn antibiotikem. K antibiotické rezistenci může dojít i v případě, že je bakterie vystavena nízkým koncentracím antimikrobních látek [4], [18]

Daný mikroorganismus se následně může stát rezistentní tím, že projde spontánními mutacemi, nebo získá geny, které nesou rezistenci, z jiných odolných mikroorganismů prostřednictvím procesů konjugace a transdukce. [4]

Nejběžnějším způsobem vzniku rezistence je rozklad plazmidu za pomoci enzymu. V plazmidech bývají zakódovány geny nesoucí rezistenci. Po rozpadu mohou být tyto geny konjugativně přeneseny do genomu buněk stejného nebo různého kmenu, druhu a rodu, včetně potenciálních lidských a zvířecích patogenů. [23], [24], [25]

Jak již bylo zmíněno, rezistence na antimikrobiální látky může být způsobena genetickými a strukturálními změnami nebo dočasnou úpravou metabolického aparátu. Antibiotická rezistence v důsledku genetických změn se může přenášet vertikálním přenosem na potomstvo nebo horizontálním přenosem na jiné vnímavé bakterie. [12]

2.4 Antibiotická rezistence v potravinách

Používání antibiotik v produkci potravin a zvířat vyvolává mezi vědci velkou debatu. Bez ohledu na diskusi jsou antibiotika, která se používají nezbytná v humánní a veterinární medicíně, včetně potravinářské a živočišné výroby. V oboru lékařských a veterinárních profesích byly vytvořeny směrnice, které zdůrazňují potřebu informovat pacienty o správném používání antibiotik. [5]

Veřejnost zvýšila poptávku po zvířecím mase, kdy v krmivu nebyla použita antibiotika. V zemích Evropské unie se antibiotika nesmějí přidávat do krmných směsí hospodářských zvířat [5]

Antibiotika byla poprvé vyvinuta pro použití v humánní medicíně. Související aplikace nebo sloučeniny byly vyvinuty později pro použití ve veterinární medicíně. Jako příklad byl v humánní medicíně poprvé použit tetracyklin. V současné době se ve veterinární medicíně nejčastěji používají oxytetracyklin a chlortetracyklin, v humánní medicíně doxycyklin a minocyklin. Ceftriaxon, cefalosporin třetí generace, byl vyvinut pro použití v humánní medicíně a veterinární medicíně. [5], [26]

Mikroorganismy přítomné ve fermentovaných potravinách mohou být nositeli genů, které jsou zodpovědné za vznik antibiotické rezistence. Geny pro rezistenci k antibiotikům mohou být z gastrointestinálního traktu přeneseny na jiné bakterie, včetně patogenů, prostřednictvím potravního řetězce. Ve skutečnosti může původní mikroflóra, která je přítomna ve fermentovaných potravinách, představovat riziko, protože v kultivovatelných

bakteriích může být přítomno mnoho genů, které nesou antibiotickou rezistenci, avšak nejsou jednoduše zjistitelné. [9]

V zemích s nízkými a středními příjmy se používají antibiotika častěji. Z tohoto důvodu může být v potravinách produkovaných v těchto zemích zjištěna vyšší míra bakterií nesoucích rezistenci k antibiotikům. Do značné míry neregulované používání antibiotik v živočišné výrobě naznačuje, že mezinárodní obchod s chovnými zvířaty, krmivy a masnými výrobky s potravinovými patogeny odolnými vůči antibiotikům, může přispět k rychlému celosvětovému šíření těchto bakterií. [27]

3 ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE VYBRANÝCH GRAMPOZITIVNÍCH KOKŮ IZOLOVANÝCH Z POTRAVIN A NÁPOJŮ

V posledním desetiletí byla izolována a charakterizována celá řada potravinových patogenů, které náleží k rezistentním bakteriím, což naznačuje, že potravní řetězec může sloužit jako cesta pro přenos antibioticky rezistentních bakterií na lidi. Rezistence na antibiotika se postupem času vyskytují častěji. Rezistentní kmeny se vyskytují u bakterií rodů *Staphylococcus*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Bacteroides*, *Mycobacterium* a *Salmonella*. [12], [22]

3.1 Charakteristika bakterií rodu *Staphylococcus*

Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou grampozitivní, nesporotvorné, fakultativně anaerobní, nepohyblivé, koaguláza pozitivní nebo negativní bakterie. Můžeme je najít v různém uspořádání, ať už jednotlivě, v párech nebo v tetradách. Mezi jejich nejčastější uspořádání patří hrozen (odkud pochází název stafylokok; staphyle, což znamená hrozen a coccus, což znamená bobule.) Bakterie rodu *Staphylococcus* jsou přítomny v potravinách, ve vodě, na povrchu a na sliznicích u zvířat i lidí. Roste v rozmezí teplot 7-41 °C s optimem při 35 °C. *Staphylococcus* roste při pH 7,0-7,5, avšak některé kmeny mohou růst i při pH 4,5. Řadí se mezi halotolerantní bakterie. Je vysoce tolerantní vůči solím a cukru a nízké koncentraci vody. [28], [29], [30]

3.2 Onemocnění způsobená bakteriemi rodu *Staphylococcus*

Z hlediska onemocnění jsou některé druhy bakterií rodu *Staphylococcus*, zejména *S. aureus* nebezpečné, jelikož produkují tepelně stabilní enterotoxiny. Tyto toxiny způsobují gastroenteritidu u lidí (nevolnost, zvracení, břišní křeče a průjem). Inkubační doba tohoto onemocnění se pohybuje od 30 minut po 8 hodin. Nástup příznaků závisí na odolnosti jednotlivce k toxinu a na množství pozřeného kontaminovaného jídla. Pacienti se obvykle uzdraví do 2 dnů, ale v závažných případech může tato nemoc trvat déle a pacient může vyžadovat hospitalizaci. Úmrtí na stafylokokovou otravu jídlem jsou vzácná. [29]

Staphylococcus aureus a *S. epidermidis*, jsou patogenní, respektive podmíněně patogenní bakterie. Při proniknutí do řezných ran a oděrek vytváří hnis v ráně a u člověka vyvolávají horečku. Pyogenní bakterie tvořící horečku a hnis jsou přítomny na povrchu kůže. Díky tomu se mohou u člověka objevit vředy a kožní léze, které mohou vést až k toxickému šoku.

Staphylococcus saprophyticus, je bakterie, která u člověka vyvolává onemocnění močových cest. [31]

3.3 *Staphylococcus* v potravinách

Stafylokoková otrava jídlem je intoxikace jedním nebo více enterotoxiny produkovanými primárně *S. aureus* z potravin kontaminovaných v důsledku nesprávné přípravy nebo skladování. Vzhledem k tomu, že *S. aureus* se vyskytuje především na kůži a sliznicích teplokrevných živočichů, není divu, že primárním zdrojem kontaminace potravy jsou pracovníci manipulující s potravinami. [31]

Stafylokoky byly izolovány z řady odrůd sýrů a tvoří významnou část povrchové flóry některých sýrů, kde přispívají k vývoji chuti. [32]

Stafylokoky se vyskytují u masa drůbeže, skotu, ryb a jiného syrového masa. Podobně může být *Staphylococcus* izolován ze syrového mléka, kde mohou být počty někdy zvýšené v důsledku mastitidy. Obvykle nepředstavuje žádné problémy, jelikož je usmrcen pasterací nebo sterilací. Objevila se však ohniska nemoci způsobena mléčnými výrobky, jako je sušené mléko, sušená syrovátka a čokoládové mléko. Došlo k růstu stafylokoků a produkci enterotoxinů v syrovém mléce a enterotoxin, nikoli však organismus, nebyl inaktivován následnou pasterizací. [30]

Jídla formou bufetu jsou často místem propuknutí epidemie, protože jídlo je připraveno nějaký čas předem a příliš často skladováno při okolní teplotě nebo nedostatečně zchlazeno. Dalšími ohnisky mohou být tvrdé sýry, pudinky a pekařské výrobky plněné smetanou. V Japonsku jsou častým ohniskem rýžové kuličky, které se formují ručně, zatímco v Maďarsku je nejběžnějším ohniskem zmrzlina. [30]

3.4 Patogenní stafylokoky

Význam některých druhů stafylokoků jako lidských patogenů podnítil značné studium těchto bakterií, zejména bakterie *Staphylococcus aureus* (zlatý stafylokok). V důsledku toho je nyní jasné, že genetická výměna hraje významnou roli v evoluci stafylokoků a vzniku antibioticky rezistentních a patogenních variant. Například lysogenní stafylokokový bakteriofág může předat svým hostitelům schopnost produkovat toxiny. Kromě toho jsou plazmidy u stafylokoků spojovány se vznikem kmenů rezistentních na antibiotika ve zdravotnických zařízeních. Zástupci třídy plazmidů RCR objevených stafylokoků, jsou schopné replikace

v široké škále grampozitivních bakterií, a proto byly vyvinuty jako nástroje pro genetickou manipulaci u mnoha dalších druhů. [33]

Methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus* (MRSA) byl poprvé popsán v roce 1961 a od té doby se stal důležitou příčinou primárních infekcí u lidí. Zpočátku to byly primárně nemocniční infekce, ale v poslední době se výskyt komunitních infekcí zvyšuje. Řada studií uvádí výskyt MRSA na zvířatech a potravinách. [5], [34]

3.5 Rezistence stafylokoků k antibiotikům

Pro léčbu infekcí způsobených stafylokoky jsou důležitá β -laktamová antibiotika. Kromě klinického významu se u bakterií rodu *Staphylococcus* vyskytují určité kmeny, které nesou geny kódující rezistenci k antibiotikům. Mezi nejčastěji nacházený rezistentní kmen patří methicilin rezistentní *Staphylococcus aureus*. Jeho mechanismus spočívá v produkci penicilin vázajícího proteinu, který je produktem genu *mecA*. MRSA je rezistentní kromě methicilinu i na oxacilin. [22]

Některé kmeny *Staphylococcus sciuri* obsahují ve svém genomu taktéž rezistentní gen *mecA*, avšak rezistentní jsou pouze kmeny s vyšší úrovní transkripce. Rezistence k tetracyklinovým antibiotikům je způsobena přítomností genu *tetK* a *tetL*. Tyto geny kódují proteiny, které mají za následek vylučování tetracyklinových antibiotik ven z bakteriální buňky. Rezistence vůči aminoglykosidům je způsobena přítomností genů *aacA* a *phD*, které kódují enzym umožňující rezistenci vůči kanamycinu, gentamicinu a tobramycinu. Proti makrolidům byla zajištěna rezistence specifickou metylázou kódovanou geny skupiny *erm*. [35], [36]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

4 CÍLE PRÁCE

Cílem této diplomové práce bylo:

- vypracovat rešerši týkající se mechanismů a příčin antibiotické rezistence a popsat antibiotickou rezistencí vybraných grampozitivních koků izolovaných z potravin a nápojů,
- izolovat grampozitivní koky z potravin a nápojů, které jsou běžně dostupné v obchodní síti,
- identifikovat tyto mikroorganismy za pomoci selektivně diagnostických půd a následně za pomoci metody MALDI-TOF,
- vybrané koky rodu *Staphylococcus* podrobit testům na antibiotickou rezistenci,
- rozpoznat rezistentní kmeny,
- vyhodnotit výsledky a formulovat závěry této práce.

5 MATERIÁL

5.1 Potraviny

V této diplomové práci byly použity potraviny běžně dostupné v obchodní síti, ze kterých byly izolovány grampozitivní bakterie rodu *Staphylococcus*. Potraviny byly živočišného i rostlinného původu v syrovém i tepelně upraveném stavu.

Celkem bylo testováno více než 40 vzorků potravin. Potraviny, ve kterých byly identifikovány grampozitivní koky, byly: chlazený pstruh, chlazené krevety, fermentované masné výrobky (lovecký salám, poličan), kuřecí maso prsní chlazené, kuřecí křídla chlazená, vepřové a hovězí maso mleté, plec z hovězího masa, kombucha, balkánský sýr, hellman's česnekový a BBQ dip, sušené a lyofilizované mango, lyofilizované kiwi, paprikové koření a plněná špička.

5.2 Antibiotika

Diplomová práce byla zaměřena na skríníng antibiotické rezistence bakterií rodu *Staphylococcus*. Pro tento účel byla použita následná antibiotika, která byly aplikována v podobě papírových disků:

- Peniciliny – benzylpenicilin (P), ampicilin (AMP), amoxicilin (AMX) a penicilin rezistentní vůči stafylokokové penicilináze – methicilin (MET)
- Cefalosporiny 3. generace – cefotaxim (CX) a ceftazidin (CAZ)
- Karbapenemy – meropenem (MRP)
- Fluorochinolony – ciprofloxacín (CIP), kyselina nalidixová (NA) a ofloxacin (OF)
- Aminoglykosidy – amikacin (AK) a tobramycin (TOB)
- Makrolidové ATB – erytromycin (E)
- Tetracykliny – tetracyklin (TE)
- Širokospektré ATB chloramfenikol (C)

5.3 Chemikálie, roztoky, kultivační půdy

5.3.1 Fyziologický roztok

Fyziologický roztok byl použit za účelem naředění bakteriální suspenze a pro rozmělnění vzorku potravin.

Postup přípravy:

Fyziologický roztok byl připraven rozpuštěním daného množství chloridu sodného v destilované vodě za účelem přípravy 0,9% roztoku chloridu sodného.

5.3.2 Kultivační média

5.3.2.1 *Plate count agar (PCA)*

Toto kultivační médium bylo připraveno dle pokynů výrobce, které jsou uvedeny na obalu. Tato kultivační půda byla využita pro záchyt dalších bakterií.

5.3.2.2 *Baird-Parker agar (BP)*

Kultivační médium bylo připraveno dle pokynů výrobce. Tato půda byla využita jako selektivně diagnostická pro kultivaci grampozitivních bakterií rodu *Staphylococcus*.

5.3.2.3 *Mannitol salt agar*

Toto kultivační médium bylo připraveno dle pokynů výrobce uvedených na obalu. Půda byla využita pro kultivaci grampozitivních bakterií tolerantních vůči soli, především rodu *Staphylococcus*.

5.3.2.4 *Mueller Hinton agar*

Toto kultivační médium bylo rovněž připraveno dle pokynů výrobce. Tato půda byla použita pro stanovení rezistence izolovaných kmenů na daná antibiotika.

5.3.3 Sterilizace materiálu

Fyziologický roztok a kultivační média byly sterilovány při teplotě 125 °C po dobu 15 minut.

5.4 Pomůcky a vybavení

Analytické váhy

Autokláv

Biohazard box

Vortex

Densilametr

Mikropipety

Sterilní klíčky, sterilní hokejky, sterilní jehly na aplikaci antibiotik, sterilní zkumavky, sterilní špičky na mikropipety a další spotřební laboratorní materiál

6 METODIKA

6.1 Izolace grampozitivních koků

Nejprve byla provedena homogenizace vzorku potravin za pomoci fyziologického roztoku. Následně byl vzorek rozředěn pomocí desítkového ředění a 0,2ml vzorku byly sterilní pipetou přeneseny na kultivační půdu a rozetřeny po povrchu kultivační půdy. Následovala kultivace při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin.

Pro izolaci čisté kultury byl použit křížový roztěr. Křížový roztěr se používá pro získání kolonií jednoho druhu. Principem je postupné ředění vzorku za pomoci sterilní kličky, aby zůstaly uniformní (bakterie jednoho kmene). Pro správné hodnocení se sleduje velikost, barva, tvar, okraje, povrch, konzistence kolonie. [37]

6.2 Identifikace grampozitivních koků

Pro identifikaci mikroorganismu bylo použito několik metod, jako je naočkování mikroorganismu na selektivně diagnostickou půdu, použití biochemické identifikační řady (Staphytest) a v neposlední řadě použití spektrofotometrické metody MALDI-TOF.

6.2.1 Selektivně-diagnostické půdy

Kultivační půdy zajišťují vhodné životní podmínky pro růst mikroorganismů. Dají se použít pro určení vlastností některých mikroorganismů. Selektivně diagnostické půdy slouží k izolaci daného druhu mikroorganismu, který chceme izolovat. Obsahují inhibitory a indikátory růstu konkrétního druhu. [38] Pro stanovení stafylokoků byly použity půdy Baird-Parker agar a Mannitol salt agar.

6.2.2 Mikroskopický preparát – Gramovo barvení

Pro rozlišení bakterií na grampozitivní a gramnegativní se používá Gramovo barvení. Zkoumaná kultura se nanese na podložní sklíčko. Následně jsou nanášeny barvicí roztoky (krystalová violet, Lugolův roztok, alkohol, safranin). Toto dělení je založeno na rozdílné struktuře bakteriální stěny. [38]

Bakteriální stěna grampozitivních bakterií je tvořena peptidoglykanem a oligosacharidy, kterými prochází kyselina teichoová. Během barvení se krystalová violet dostává do struktury buněk a společně s Lugolovým roztokem tvoří modrou barvu. Alkohol není

schopný prostoupit buněčnou stěnu a odbarvit komplex. Díky tomu se stěna zbarví na tmavě fialovou. [39]

6.2.3 STAPHYTEST

STAPHYTEST se využívá k identifikaci bakterií rodu *Staphylococcus*. Jedná se o komerční systém, který obsahuje šestnáct jamek ve dvou řádcích. V každé jamce je obsažen jiný test. Nejprve byla destička s testy vyjmuta z aluminiového obalu. Poté byla sejmuta ochranná fólie, která kryje jamky s příslušnými testy. Kulturu byla zhomogenizovaná a následně v objemu 0,1ml očkovaná do každé jamky. Při inokulaci je potřeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci mezi jednotlivými jamkami a destičkami. Do jamek H, G a F byly přidány 2 kapky sterilního parafinového oleje. Do homogenizované směsi o denzitě 2. stupně McFarlanda byl vložen proužek VP testu. Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při teplotě 37 °C. Po odečtení výsledků bylo vyhodnocení provedeno za pomoci počítačového software. [39]

6.2.4 MALDI-TOF

Identifikace mikroorganismů pomocí metody MALDI-TOF je velmi rychlá. Jedná se o spektrofotometrickou metodu, která využívá proteiny přítomné v buňce. Vzorek se nanese na ocelové spoty, poté je překryt kyselou organickou maticí a následně ozářen laserem. Dojde k lýze buněk a tím k uvolnění intracelulárních proteinů. Tyto proteiny jsou poté porovnány s ostatními referenčními vzorky a podle porovnání s knihovnou spekter je určen daný mikroorganismus. [40] MALDI-TOF analýza byla provedena ve spolupráci s Ing. Marikou Lhotskou v laboratoři mikrobiologie ve Vaše laboratoře s.r.o.

6.3 Diskový difúzní test

Diskový difúzní test je metoda stanovující citlivost daného bakteriálního kmene na dané antibiotikum. Výsledkem je zjištění, jestli je daný kmen citlivý nebo rezistentní na dané antibiotikum podle velikosti inhibiční zóny. Pokud byla inhibiční zóna menší, než je stanovena hranice, znamená to, že antibiotikum nebylo účinné (kmen byl rezistentní). Pokud byla větší, daný kmen byl citlivý na dané antibiotikum. V této práci jsme se zaměřili na bakterie rodu *Staphylococcus*. Pracovní postup byl v souladu s metodikou EUCAST (Evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti; European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). [41]

Sterilní kličkou byla v bujonu resuspendována kolonie bakterií. Vzniklá suspenze byla změřena za pomoci přístroje densilometr tak, aby výsledný zákal odpovídal 1° McFarland. Následně bylo 0,2ml suspenze přeneseno na Mueller-Hintonův agar a hokejkou rozetřeno rovnoměrně po povrchu. Sterilní jehlou byla nakladena antibiotika. Poté se vzorek nechal inkubovat při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Po inkubaci byla změřena velikost inhibiční zóny. Výsledky byly vyhodnoceny dle tabulek uvádějících inhibiční zóny pro jednotlivá antibiotika v metodice EUCAST.

7 VÝSLEDKY

7.1 Identifikace mikroorganismů

Celkem bylo izolováno 57 kmenů grampozitivních bakterií (tabulka 1), z toho:

- 37 kmenů *Staphylococcus* spp.:
 - Koaguláza negativní: *S. pasteurii*, *S. sciuri*, *S. carnosus*, *S. xylosus*, *S. epidermis*, *S. vitulinus*, *S. warneri* – celkem 35 kmenů
 - Koaguláza pozitivní: *S. aureus* – celkem 2 kmeny
- 3 kmeny rodu *Enterococcus*

22 kmenů ostatních grampozitivních bakterií:

Rothia kristinae, *Macrococcus caseolyticus*, *Lactococcus garvieae*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Carnobacterium divergens*, *Corynebacterium xerosis*, *Corynebacterium testudinoris*

Tabulka 1: Izolované mikroorganismy

Zdroj (Potravina)	Izolát	Identifikace podle MALDI-TOF
Pstruh chlazený	R1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	R2	<i>Carnobacterium divergens</i>
	R2	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
	R4	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
Krevety chlazené	M1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	M2	<i>Lactococcus garvieae</i>
	M3	<i>Enterococcus faecalis</i>
	M4	<i>Corynebacterium testudinoris</i>
	M5	<i>Corynebacterium testudinoris</i>
	M6	<i>Enterococcus faecalis</i>
Fermentovaný masný výrobek - lovecký salám	F1	<i>Staphylococcus carnosus</i>
	F2	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	F3	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	F4	<i>Staphylococcus carnosus</i>
	F5	<i>Staphylococcus xylosus</i>
	F6	<i>Staphylococcus xylosus</i>

Tabulka 2: Izolované mikroorganismy - pokračování

Zdroj (Potravina)	Izolát	Identifikace podle MALDI-TOF
Fermentovaný masný výrobek - poličan	P1	<i>Staphylococcus carnosus</i>
	P2	<i>Staphylococcus carnosus</i>
	P3	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
	P4	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
	P5	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
	P6	<i>Macrococcus caseolyticus</i>
Kuřecí maso prsní chlazené	D1	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	D2	<i>Corynebacterium testudinatoris</i>
	D3	<i>Corynebacterium testudinatoris</i>
Kuřecí křídla chlazená	Ř1	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř2	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř3	<i>Staphylococcus epidemii</i>
	Ř4	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř5	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř6	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř7	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
	Ř8	<i>Staphylococcus pasteurii</i>
Vepřové maso mleté	V1	<i>Staphylococcus vitulinus</i>
	V2	<i>Staphylococcus aureus</i>
	V3	<i>Staphylococcus sciuri</i>
	V4	<i>Corynebacterium testudinatoris</i>
	V5	<i>Carnobacterium divergens</i>
Hovězí maso mleté	H1	<i>Corynebacterium xerosis</i>
Hovězí maso - plec	E1	<i>Enterococcus faecalis</i>
Kombucha	K1	<i>Staphylococcus warneri</i>
	K2	<i>Staphylococcus warneri</i>
	K3	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
Balkánský sýr	B1	<i>Staphylococcus xylosum</i>
	B2	<i>Staphylococcus carnosus</i>
	B3	<i>Staphylococcus carnosus</i>
Česnekový dip hellmans	G1	<i>Staphylococcus warneri</i>
	G2	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
BBQ dip hellmans	S1	<i>Staphylococcus warneri</i>
	S2	<i>Carnobacterium maltaromaticum</i>
Mango sušené	A1	<i>Rothia kristinae</i>
	A2	<i>Rothia kristinae</i>

Tabulka 3: Izolované mikroorganismy - pokračování

Zdroj (Potravina)	Izolát	Identifikace podle MALDI-TOF
Mango lyofilizované	C1	<i>Staphylococcus warneri</i>
	C2	<i>Staphylococcus xylosus</i>
Kiwi lyofilizované	W1	<i>Staphylococcus warneri</i>
	W2	<i>Staphylococcus warneri</i>
Paprikové koření	Ch1	<i>Staphylococcus carnosus</i>
Plněná špička	Š1	<i>Staphylococcus aureus</i>

7.2 Vliv penicilinových antibiotik na testované bakterie

Bakterie rodu *Staphylococcus* izolované z potravin byly testovány na citlivost k následujícím penicilinovým antibiotikům: benzylpenicilin, ampicilin, amoxicilin a methicilin. Pro bakterie rodu *Staphylococcus* byla disková difúze spolehlivější než stanovení minimální inhibiční koncentrace (MIC). Většina *S. aureus* patří mezi producenty penicilinázy a někteří jsou rezistentní na methicilin. Oba mechanismy je činí odolnými vůči benzylpenicilinu, fenoxymethylpenicilinu, ampicilinu, amoxicilinu, piperacilinu a tikarcilinu. [42]

7.2.1 Benzylpenicilín

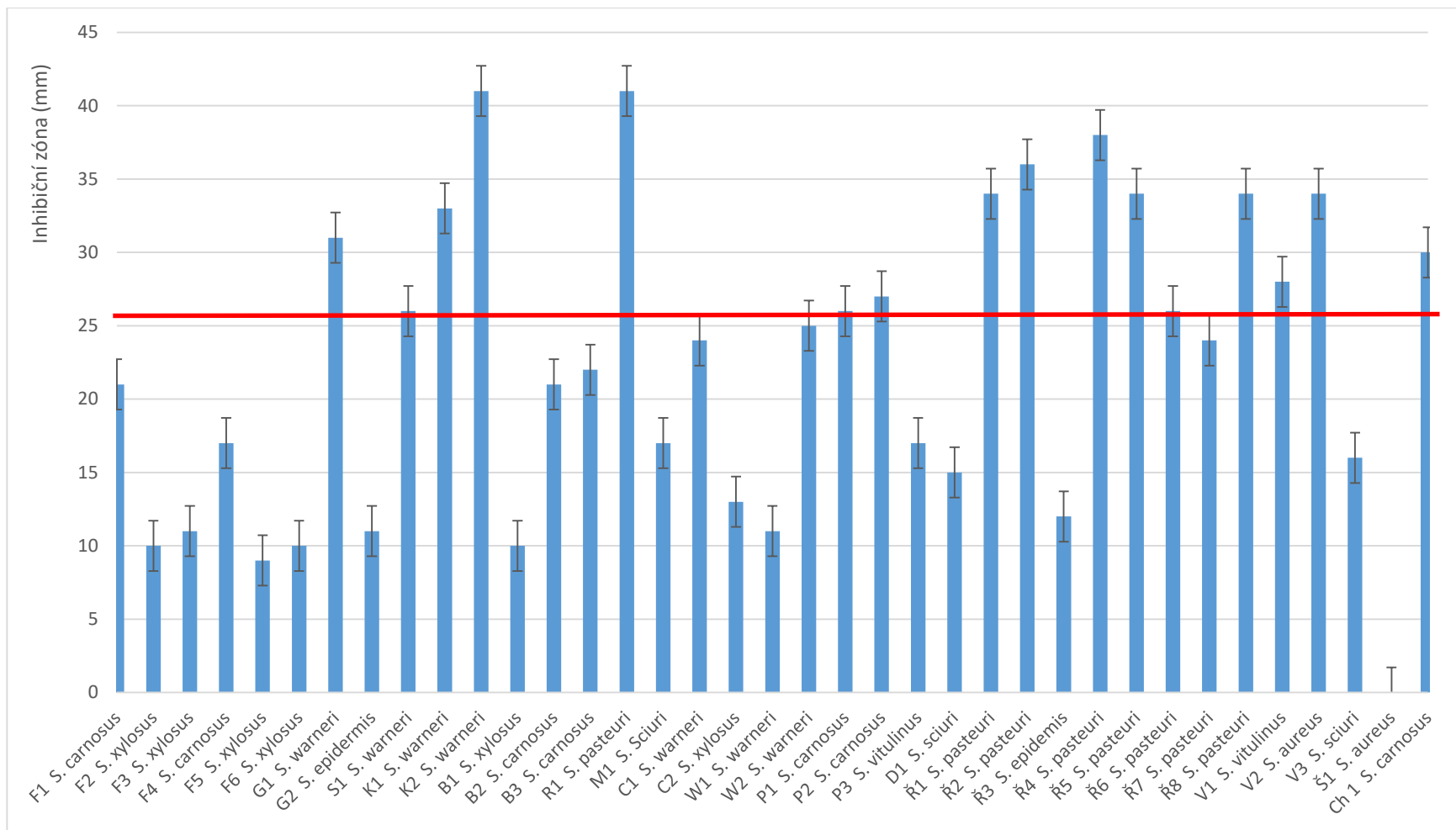
Při použití benzylpenicilinu neboli penicilinu G byla zjištěna rezistence u kmenů bakterií, které měly inhibiční zónu ≥ 26 mm. Pokud byla inhibiční zóna < 26 mm, je možné konstatovat, že izoláty bakterií byly vůči tomuto antibiotiku citlivé.

Vůči benzylpenicilínu byly rezistentní následující kmeny (Obrázek 1):

- *S. warneri* G1 izolovaný z česnekového dipu
- dva kmeny *S. warneri* K1, K2 izolované z kombuchy
- *S. pasteurii* R1, který byl izolován z chlazeného pstruha
- pět kmenů *S. pasteurii* Ř1, Ř2, Ř4, Ř5, Ř8 izolovaných z kuřecích křídel
- *S. aureus* a *S. vitulinus* V1, V2, které byly izolovány z mletého vepřového masa
- *S. carnosus* Ch1, který byl izolován z mleté papriky.

Největší inhibiční účinek byl pozorován u kmene *S. warneri* K2 (41mm), který byl izolován z kombuchy a *S. pasteurii* R1 (41mm), který byl izolovaný z kuřecích křídel.

Na toto antibiotikum neměla rezistenci bakterie *S. aureus* Š1, která byla izolována z plněné špičky. Nejmenší inhibiční zóna byla pozorována u kmene *S. xylosus* F5 (9mm), který byl izolován z loveckého salámu.



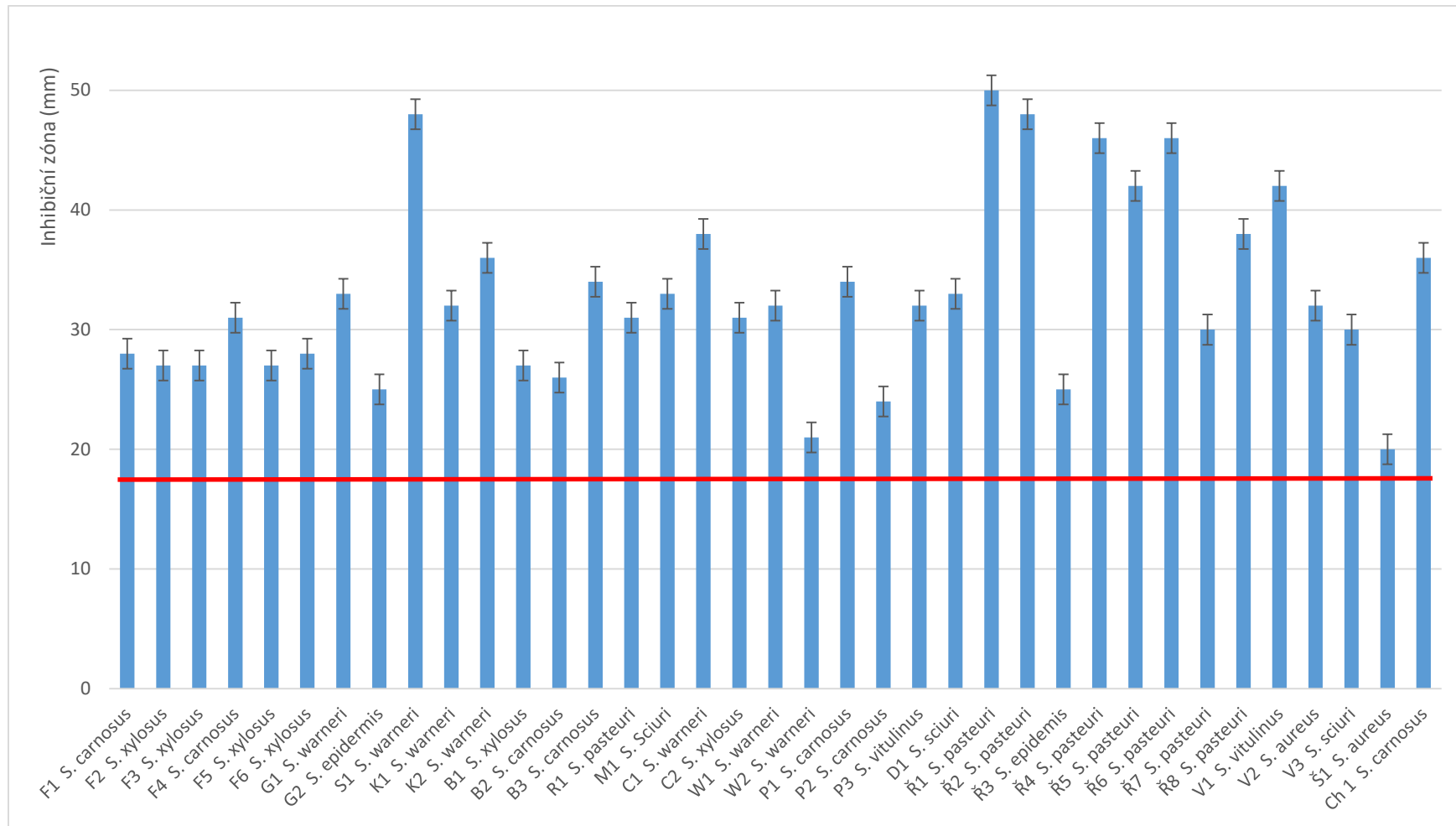
Obrázek 1: Vliv benzylpenicilinu na testované bakterie rodu Staphylococcus

7.2.2 Ampicilin

Při použití ampicilinu byla zjištěna rezistence u kmenů bakterií rodu *Staphylococcus*, které měly inhibiční zónu $\geq 18\text{mm}$. Pokud byla inhibiční zóna $< 18\text{mm}$, můžeme testované kmeny bakterií považovat za citlivé k tomuto antibiotiku.

Vůči ampicilinu byly rezistentní všechny testované bakterie (Obrázek 2). Největší inhibiční účinek byl zaznamenán u bakterie *S. pasteurii* Ř1 (50mm) izolované z kuřecích křídel.

Nejmenší inhibiční zóna byla zaznamenána u kmene *S. aureus* Š1 (20mm) izolovaného ze špičky.



Obrázek 2: Vliv ampicilinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

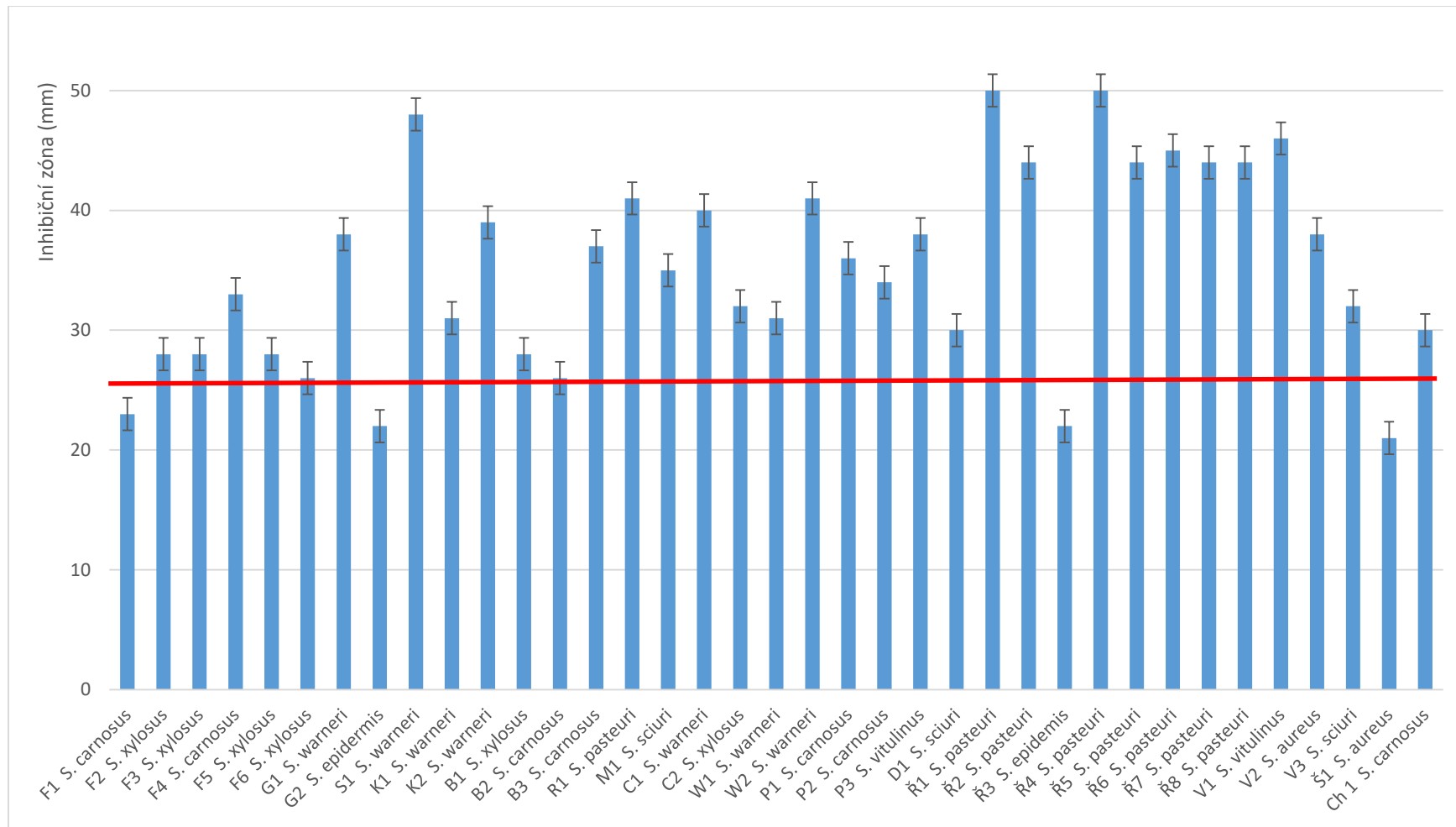
7.2.3 Amoxicilín

U antibiotika amoxicilínu byla zvolena stejná zóna inhibice jako u benzylpenicilinu (26mm). Avšak většina koaguláza negativních stafylokoků tvoří penicilázu a některé jsou rezistentní na methicilin. Oba mechanismy je činí odolnými vůči benzylpenicilinu, fenoxymethylpenicilinu, ampicilinu, amoxicilinu, piperacilinu a tikarcilinu. [13]

Většina testovaných bakterií vykazovala rezistentní účinky na amoxicilín. Bakterie, které nevykazovaly rezistenci, byly (Obrázek 3):

- *S. carnosus* F1, který byl izolovaný z loveckého salámu
- *S. epidermis* G2 izolovaný z česnekového dipu
- *S. epidermis* Ř3 z kuřecích křídel
- *S. aureus* Š1, který byl izolován z plněné špičky

Největší inhibiční zóna byla naměřena u dvou kmenů *S. pasteurii* Ř1, Ř4 (50mm), izolovaných z kuřecích křídel a nejmenší inhibiční zóna byla naměřena u *S. aureus* Š1 (21mm), který byl izolovaný z plněné špičky.



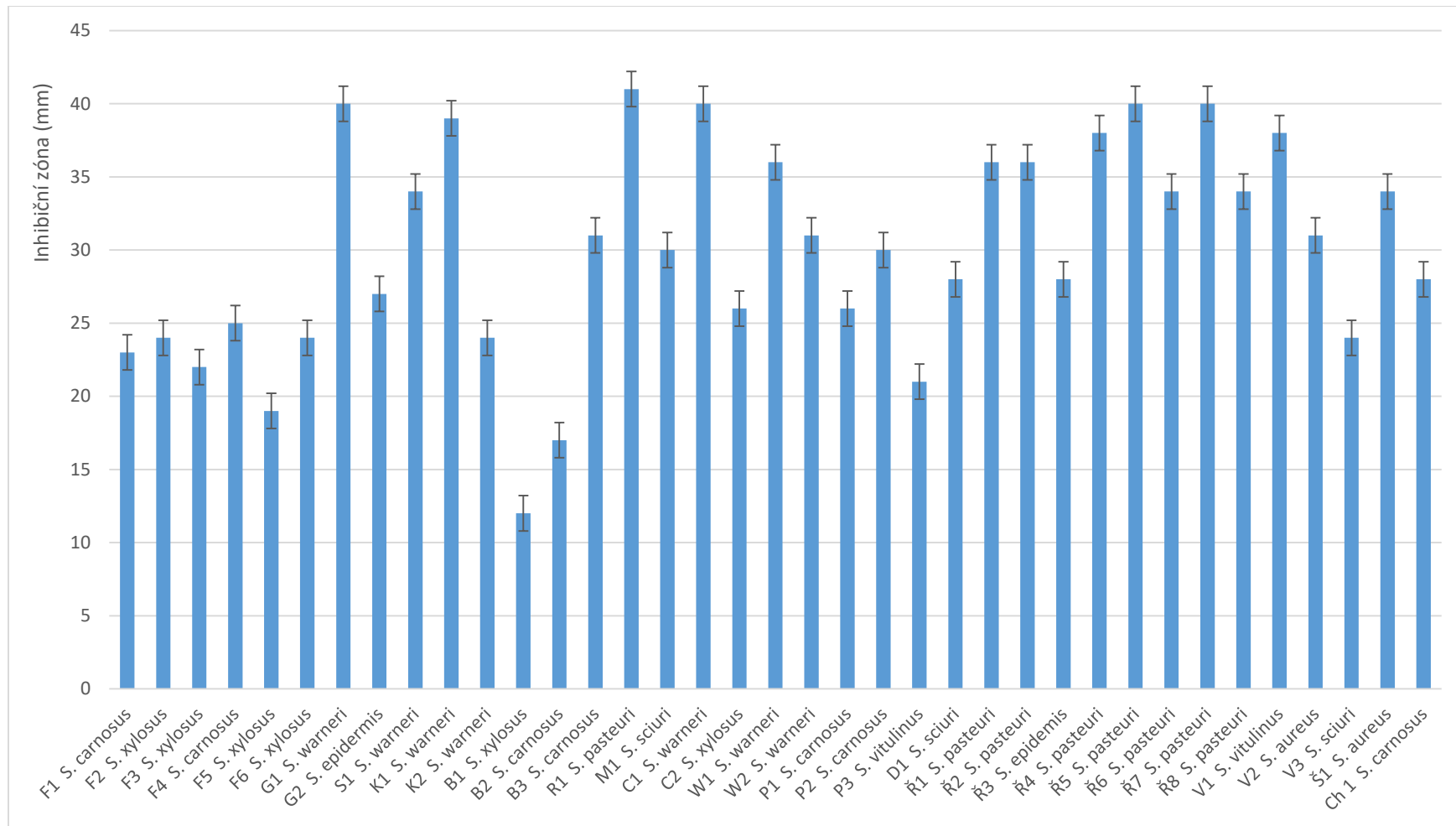
Obrázek 3: Vliv amoxicilinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.2.4 Methicilin

Většina koaguláza-negativních stafylokoků byla producenty penicilinázy a některé byly rezistentní na methicilin. Žádná v současnosti dostupná metoda nemůže spolehlivě detekovat produkci penicilinázy u všech druhů stafylokoků, ale pomocí cefoxitinu lze detekovat rezistenci na methicilin.

Většina bakterií vykazovala inhibiční zónu, která měřila ± 30 mm (Obrázek 4).

Nejmenší inhibiční zóna (12mm), byla naměřena u bakterie *S. xylosus* B1, která byla izolovaná z kombuchy. Bakterie *S. pasteurii* R1 izolovaná ze pstruha nesla největší rezistenci, inhibiční zóna byla o průměru 41mm.



Obrázek 4: Vliv methicilinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.3 Vliv cefalosporinů na testované bakterie

Testovaná antibiotika ceftazidin a cefotaxim jsou zařazena do skupiny cefalosporinů 3. generace.

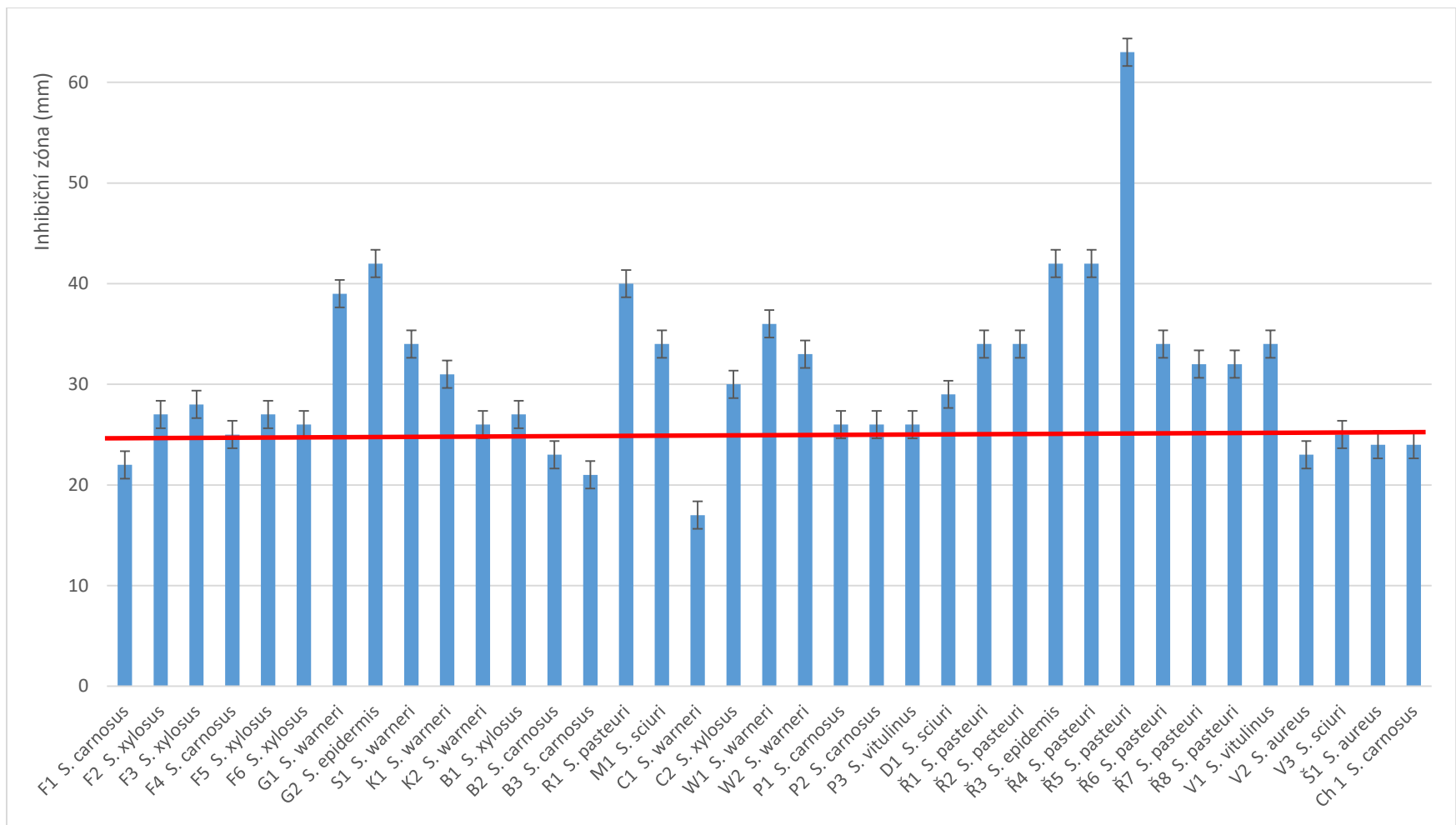
7.3.1 Cefotaxim

Při použití cefalosporinu 3. generace cefotaximu byla zjištěna rezistence u testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus*, které měly inhibiční zónu ≥ 25 mm. Pokud byla zjištěna inhibiční zóna < 25 mm, byly testované stafylokoky k tomuto kmenu citlivé.

Většina testovaných bakterií měla velikost inhibiční zóny ± 25 mm. (Obrázek 5) Mezi bakterie, které byly citlivé vůči cefotaximu patřily:

- *S. carnosus* F1 izolovaný z loveckého salámu
- dva kmeny *S. carnosus* B2, B3, které byly izolovány z balkánského sýru
- *S. warneri* C1 izolovaný z lyofilizovaného manga
- *S. aureus* V2, který byl izolován z vepřového masa mletého

Největší inhibiční zóna (63mm) byla zaznamenána u kmene *S. pasteurii* Ř5, který byl izolován z kuřecích křídel. Naopak nejmenší inhibiční zóna (17mm) byla naměřena u bakterie *S. warneri* C1 izolované z lyofilizovaného manga.



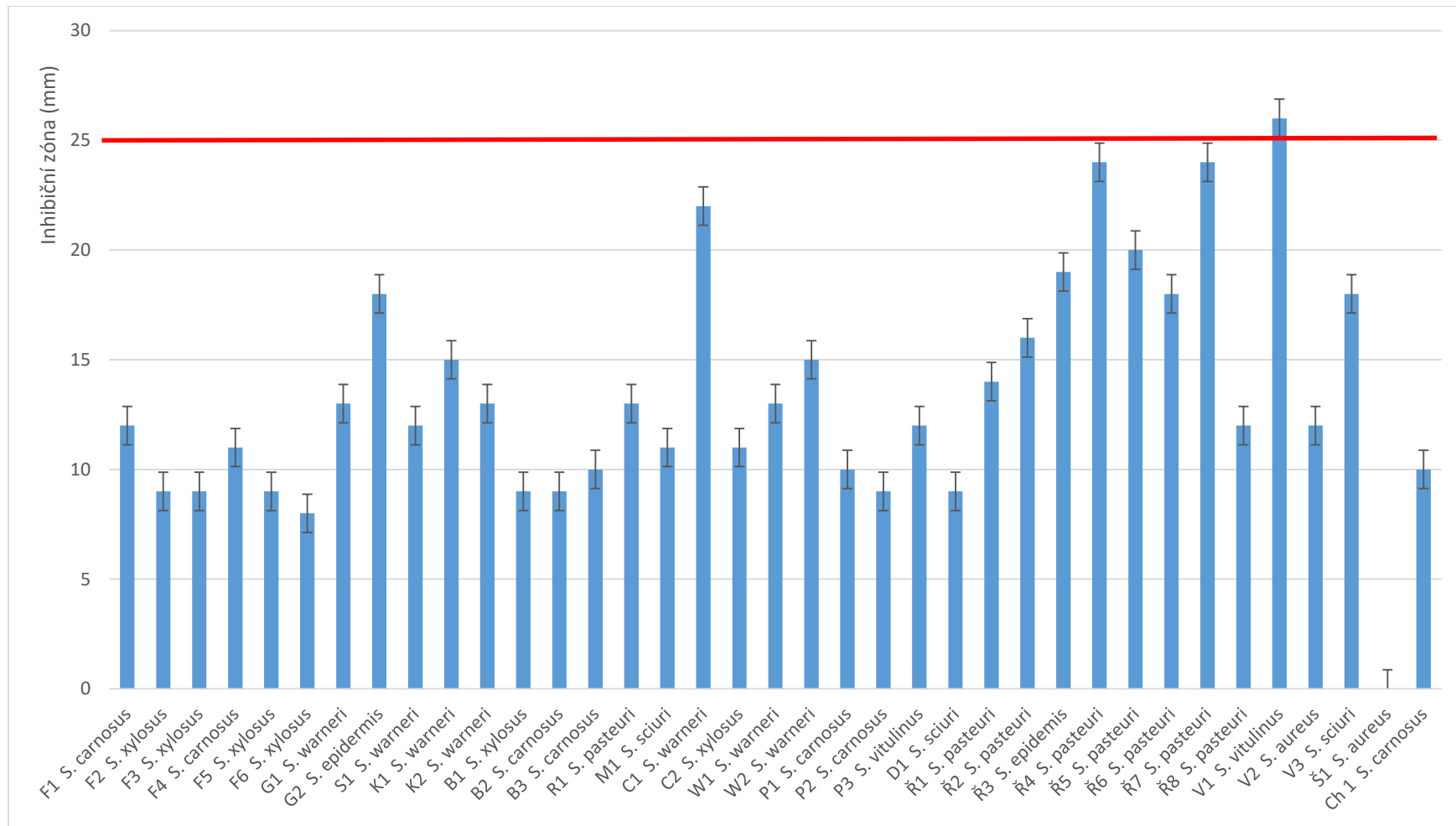
Obrázek 5: Vliv cefotaximu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.3.2 Ceftazidin

Po použití ceftazidinu, který je rovněž řazen do skupiny cefalosporinů 3. generace, byla zjištěna rezistence u bakterií, jejichž inhibiční zóna byla $\geq 25\text{mm}$. Při velikosti zóny $< 25\text{mm}$, nebyla u testovaných bakterií pozorována rezistence na toto antibiotikum.

Rezistence na toto antibiotikum bylo zaznamenáno pouze u bakterie *S. vitulinus* V1, která byla izolována z vepřového mletého masa. (Obrázek 6)

Na toto antibiotikum byla nejvíce citlivá bakterie *S. aureus* Š1, která byla izolována z plněné špičky.



Obrázek 6: Vliv ceftazidinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.4 Vliv karbapenemů na testované bakterie

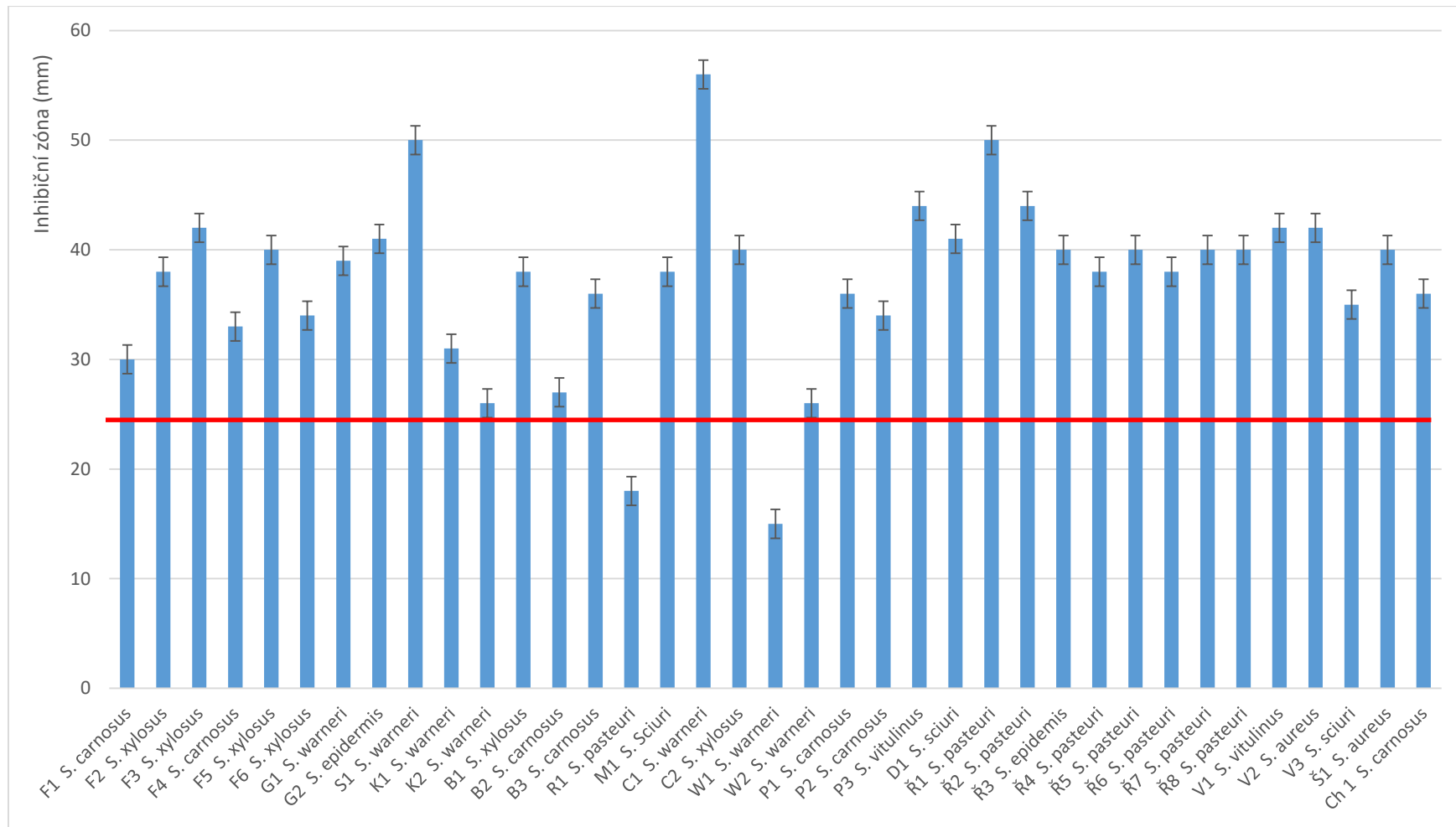
Z karbapenemů bylo použito antibiotikum meropenem.

Při použití meropenemu byla zjištěna rezistence u testovaných bakterií rodu *Staphylococcus* s inhibiční zónou $\geq 25\text{mm}$. V případě, že byla inhibiční zóna $< 25\text{mm}$, byly testované bakterie vůči meropenemu citlivé.

Bakterie, které byly na toto antibiotikum rezistentní, tvořily většinu (Obrázek 7). Mezi izoláty stafylokoků, které nebyly rezistentní k meropenemu, patřily:

- *S. pasteurii* R1 izolovaný ze pstruha
- *S. warneri* W1, který byl izolovaný lyofilizovaného kiwi

Bakterie *S. warneri* C1 izolovaná z lyofilizovaného manga nesla největší rezistenci, inhibiční zóna byla o průměru 56mm. Nejmenší inhibiční zóna byla naměřena u bakterie *S. warneri* W1 izolované z lyofilizovaného kiwi.



Obrázek 7: Vliv meropenemu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.5 Vliv chinolonů na testované bakterie

Z chinolonů byla použita antibiotika ciprofloxacin, ofloxacin a kyselina nalidixová.

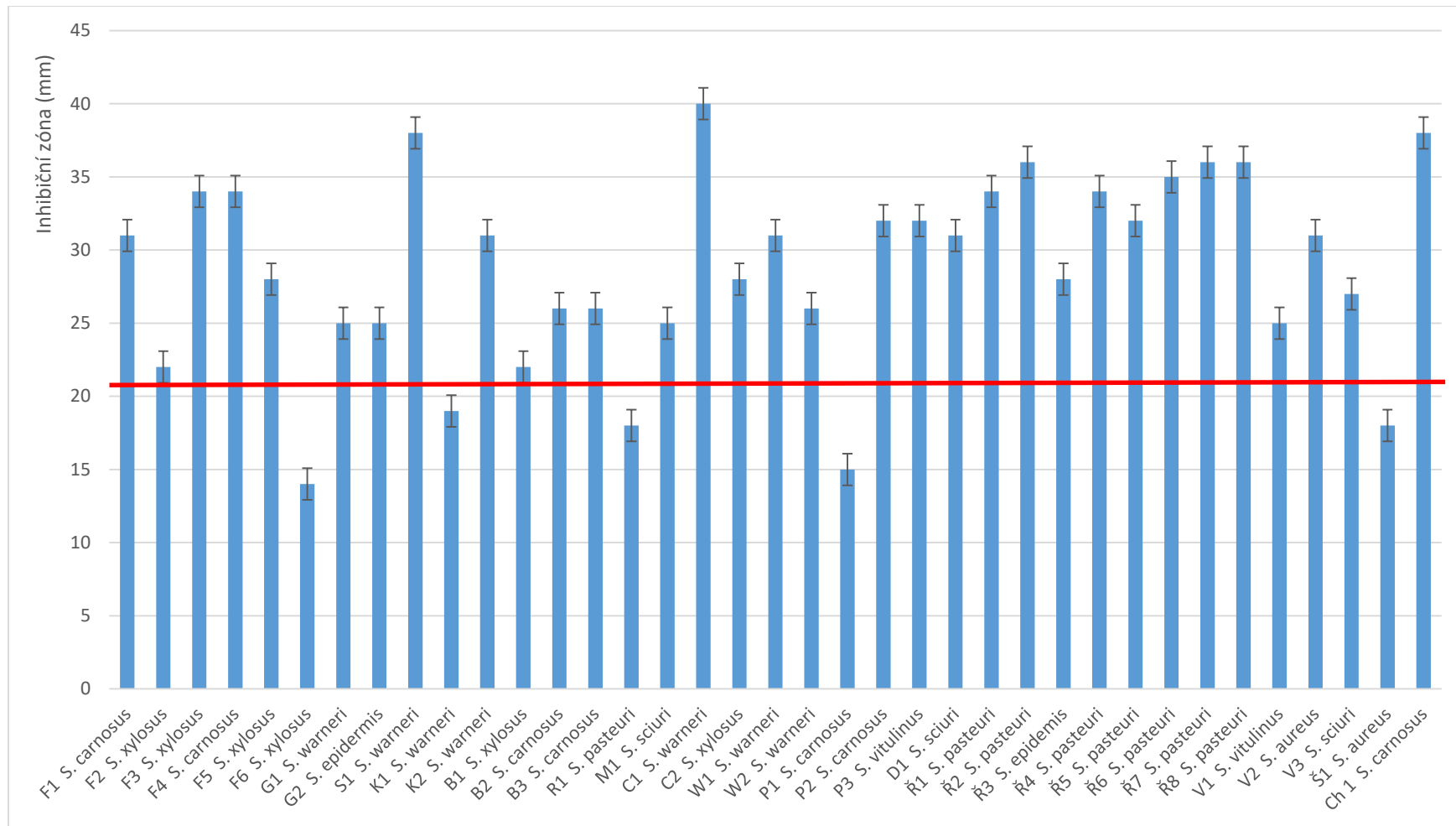
7.5.1 Ciprofloxacin

Po použití ciprofloxacinu byla zjištěna rezistence u bakterií, jejichž inhibiční zóna byla ≥ 21 mm. V případě, kdy byla inhibiční zóna < 21 mm, daný mikroorganismus neměl rezistenci vůči ciprofloxacinu. Většina bakterií vykazovala rezistenci vůči ciprofloxacinu.

Bakterie, které inhibovalo toto antibiotikum, to znamená, že byly citlivé vůči němu, byly následující: (Obrázek 8)

- *S. xylosus* F6 izolovaný z loveckého salámu
- *S. warneri* K1, který byl izolován z kombuchy
- *S. pasteurii* R1 z chlazeného pstruha
- *S. carnosus* P1, který byl izolován z fermentovaného masného výrobku typu poličan
- *S. aureus* Š1 z plněné špičky

Největší inhibiční zóna (40mm) byla zjištěna u bakterie *S. warneri* C1, která byla izolována z lyofilizovaného manga. Bakterie *S. xylosus* F6 izolovaná z fermentovaného masného výrobku typu lovecký salám nesla největší rezistenci, inhibiční zóna byla o průměru 14mm.



Obrázek 8: Vliv ciprofloxacinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

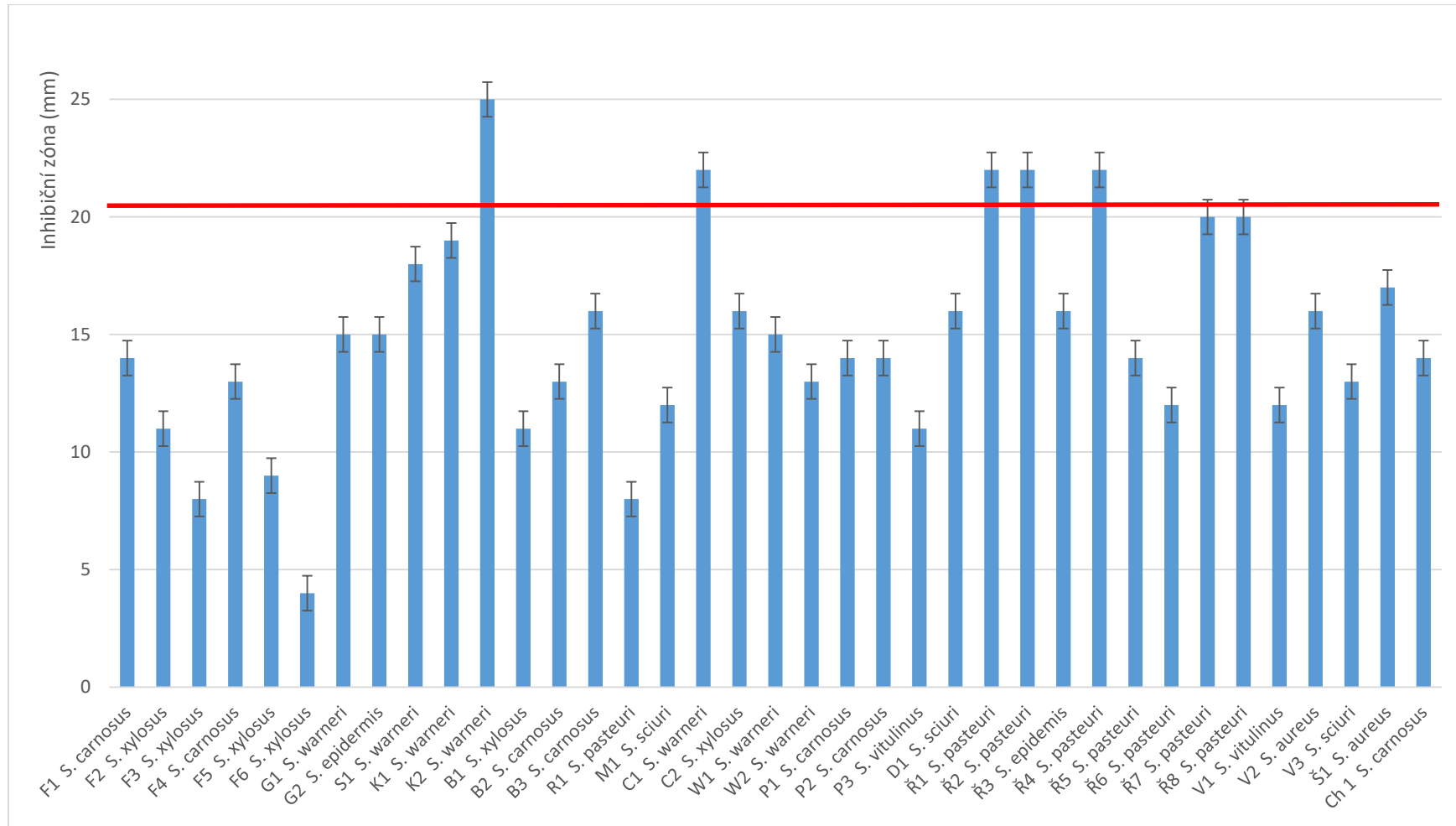
7.5.2 Kyselina nalidixová

U kyseliny nalidixové byla zvolena stejná zóna inhibice jako u ciprofloxacinu. Při použití kyseliny nalidixové byla zjištěna rezistence u testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus*, které měly inhibiční zónu ≥ 21 mm. Pokud byla zjištěna inhibiční zóna < 21 mm, byly testované stafylokoky k tomuto antibiotiku citlivé.

Z obrázku 9 je patrné, že k tomuto antibiotiku bylo rezistentních pouze 5 kmenů. Mezi izoláty, které byly rezistentní vůči kyselině nalidixové, patřily:

- *S. warneri* K2 izolovaný z kombuchy
- *S. warneri* C1 izolovaný z lyofilizovaného manga
- tři kmeny *S. pasteurii* Ř1, Ř2, Ř4, které byly izolovány z kuřecích křídel

Největší inhibiční zóna byla naměřena u kmene *S. warneri* K2 (25mm), izolovaného z kombuchy a nejmenší inhibiční zóna byla zjištěna u *S. xylosus* F6 (4mm), který byl izolován z loveckého salámu.



Obrázek 9: Vliv kyseliny nalidixové na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

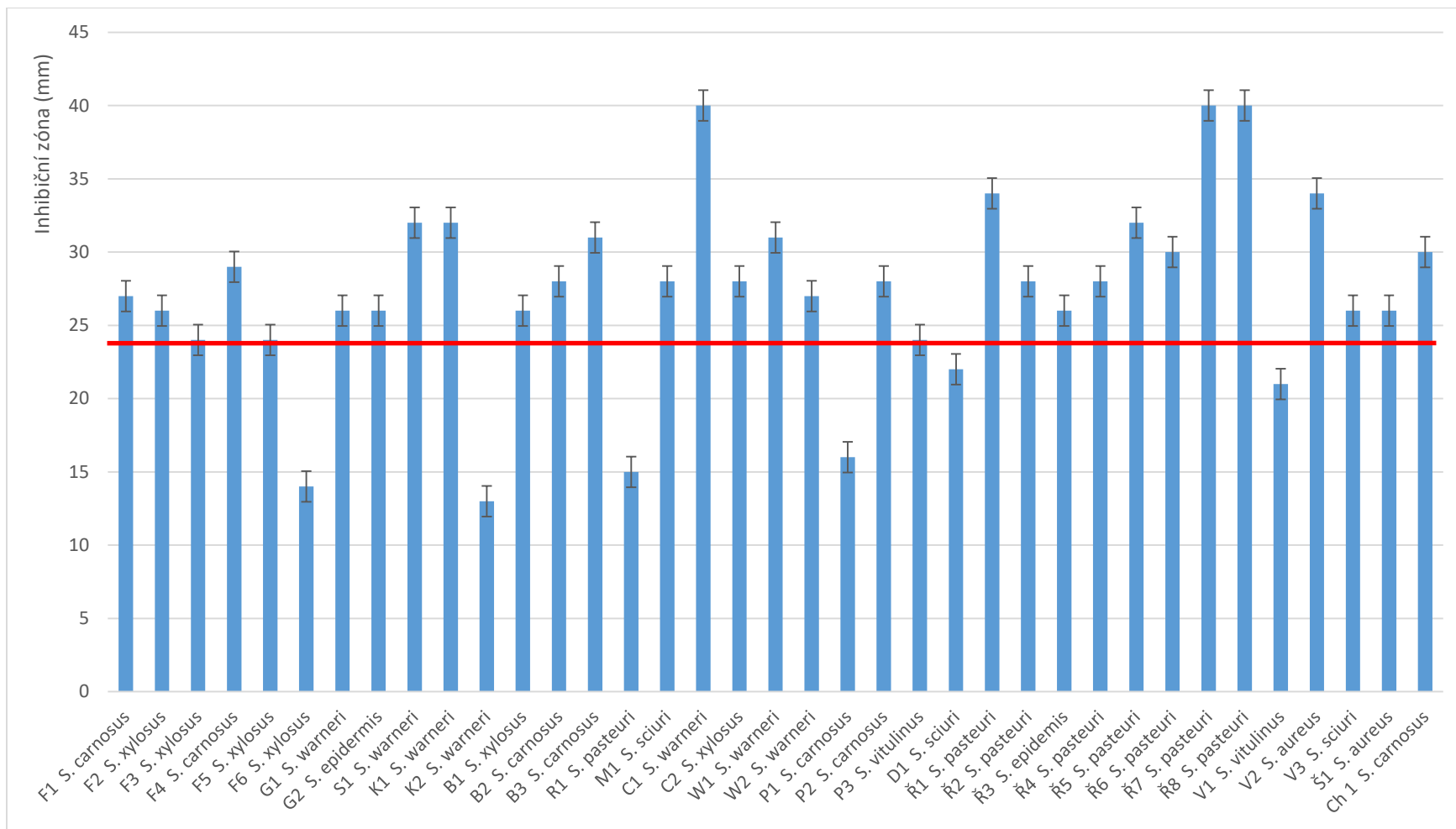
7.5.4 Ofloxacin

Po aplikaci ofloxacinu byla zjištěna rezistence u bakterií *S. aureus*, jejichž inhibiční zóna byla $\geq 20\text{mm}$. V případě, kdy byla inhibiční zóna, u bakterie *S. aureus* $< 20\text{mm}$, daný mikroorganismus neměl rezistenci vůči ofloxacinu. Koaguláza negativní stafylokoky jsou vůči tomuto antibiotiku rezistentní v případě, že inhibiční zóna je $\geq 24\text{mm}$.

Většina bakterií vykazovala rezistenci vůči ofloxacinu. (Obrázek 10) Bakterie, které inhibovalo toto antibiotikum, to znamená, že byly citlivé vůči němu, byly následující:

- *S. xylosum* F6 izolovaný z loveckého salámu
- *S. warneri* K2, který byl izolován z kombuchy
- *S. pasteurii* R1 z chlazeného pstruha
- *S. carnosus* P1, který byl izolován z fermentovaného masného výrobku typu poličan
- *S. vitulinus* V1 z vepřového masa mletého

Největší inhibiční zóna (40mm) byla zjištěna u 3 kmenů, *S. warneri* C1, který byl izolován z lyofilizovaného manga a u dvou kmenů *S. pasteurii* Ř7, Ř8 izolovaných z kuřecího křídla. Bakterie *S. warneri* K2 izolovaná z kombuchy byla vůči ofloxacinu nejvíce citlivá, inhibiční zóna byla o průměru 13mm.



Obrázek 10: Vliv ofloxacinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

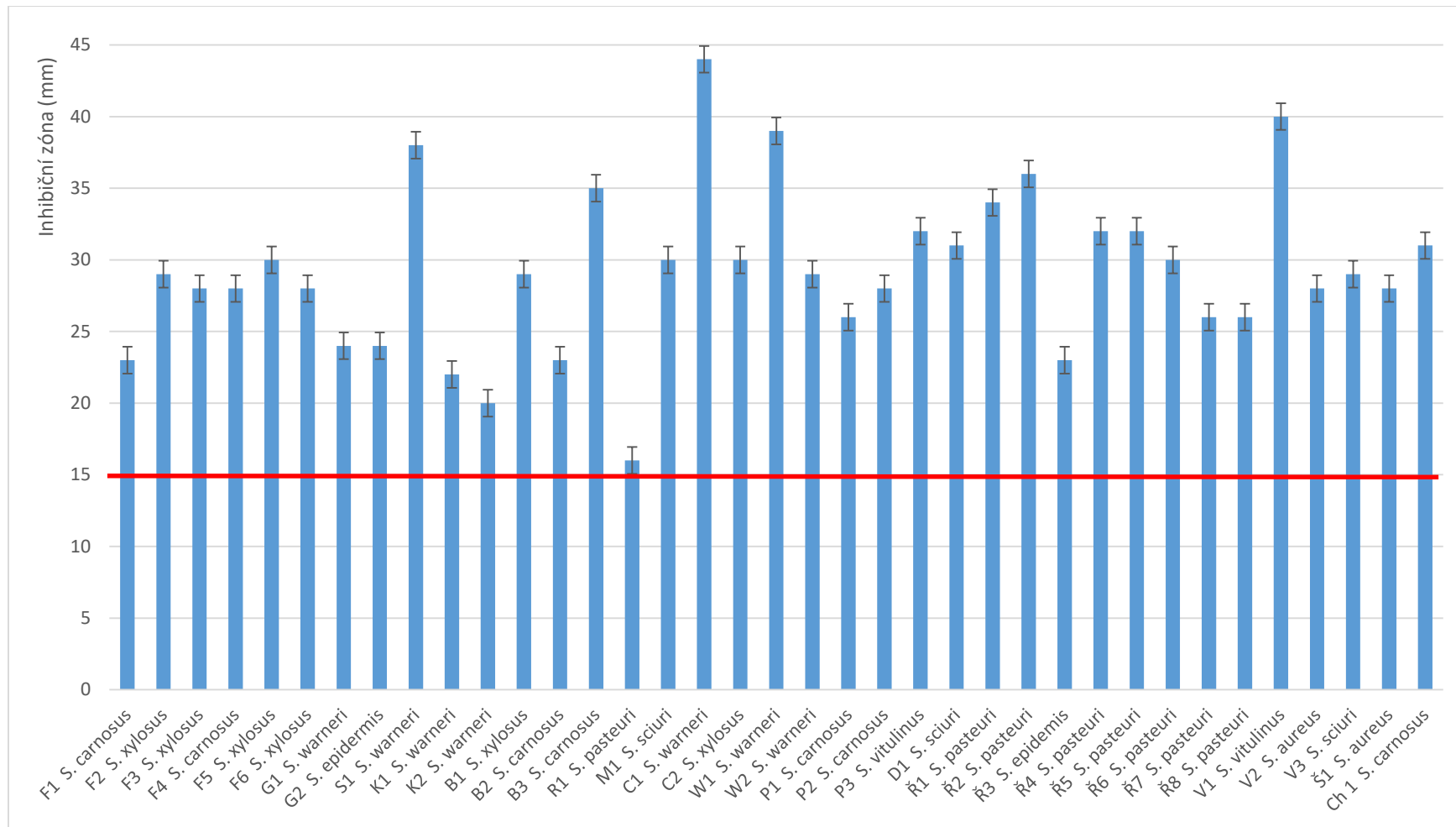
7.6 Vliv aminoglykosidů na testované bakterie

Z aminoglykosidových antibiotik byly použity amikacin a tobramycin.

7.6.1 Amikacin

Rezistence na amikacin u testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus* byla prokázána v případě, že velikost inhibiční zóny byla $\geq 15\text{mm}$. Pokud zóna měla velikost $< 15\text{mm}$, u daného kmenu nebyla prokázána rezistence na amikacin.

U amikacinu byly všechny kmeny rezistentní (Obrázek 11). Největší míra rezistence (44mm) byla zaznamenána u *S. warneri* C1 izolovaného z lyofilizovaného manga. Nejmenší inhibiční zóna (16mm) byla u bakterie *S. pasteurii* R1, která byla izolovaná z chlazeného pstruha.

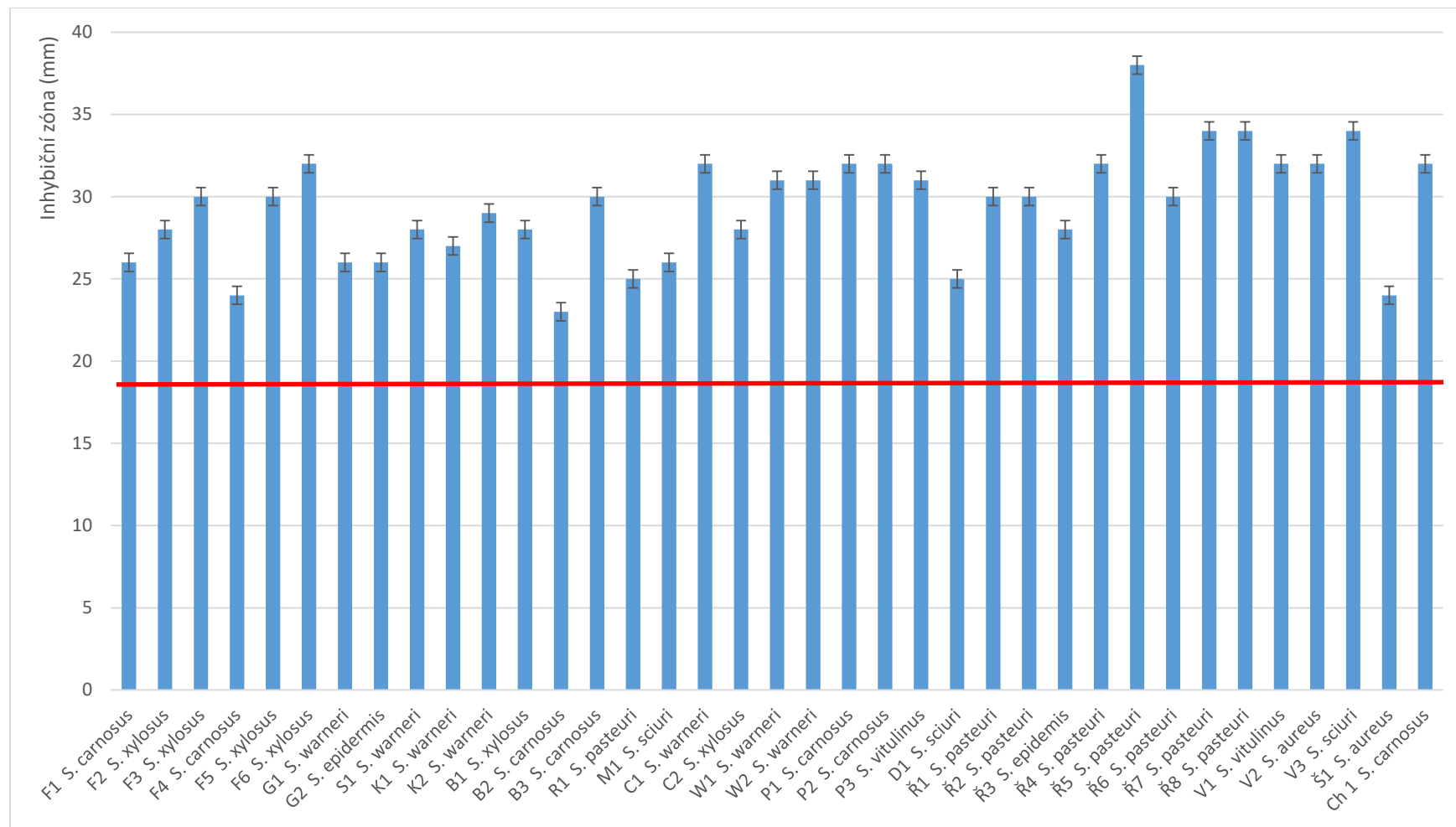


Obrázek 11: Vliv amikacinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.6.2 Tobramycin

Mezi aminoglykosidová antibiotika je řazen také tobramycin. Rezistence u testovaných bakterií rodu *Staphylococcus* byla prokázána v případě, že velikost inhibiční zóny byla $\geq 18\text{mm}$. Pokud zóna měla velikost $< 18\text{mm}$, u daného kmene nebyla prokázána rezistence na dané ATB.

Rezistence na antibiotikum tobramycin byla zjištěna u všech testovaných kmenů stafylokoků. (Obrázek 12) Největší míra rezistence byla zaznamenána u *S. pasteurii* Ř5 izolovaného z kuřecího křídla, u kterého byla zjištěna inhibiční zóna o velikosti 38 mm.



Obrázek 12: Vliv tobramycinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.7 Vliv makrolidů na testované bakterie

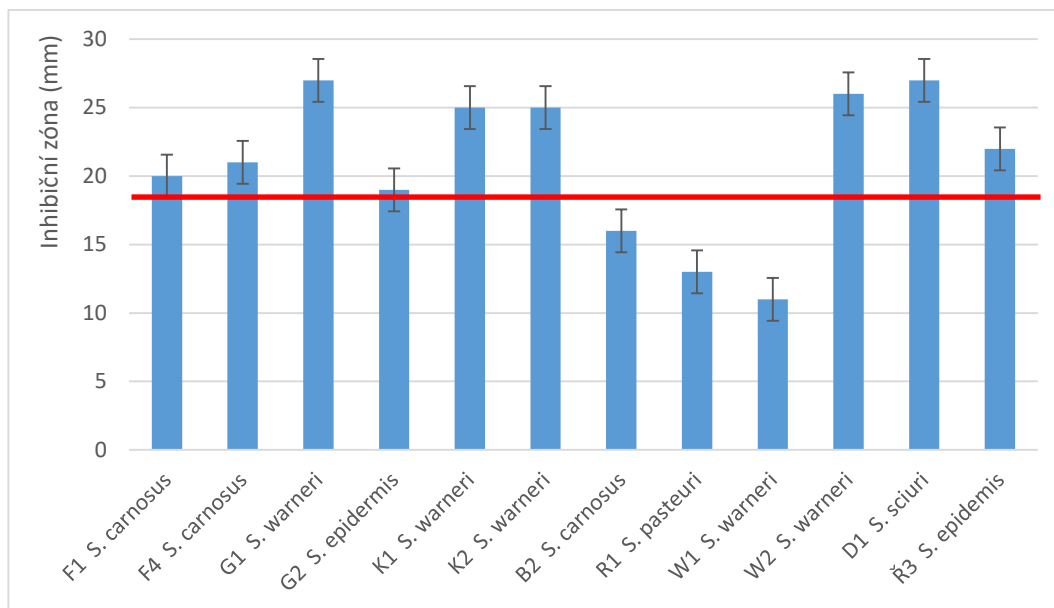
Ze skupiny makrolidů bylo použito antibiotikum erytromycin.

Po použití erytromycinu byla zjištěna rezistence u bakterií, jejíž inhibiční zóna byla ≥ 18 mm. V případě, kdy byla zjištěna inhibiční zóna < 18 mm, daný mikroorganismus neměl rezistenci vůči erytromycinu.

Z obrázku 13 je patrné, že testované kmeny bakterií, které vykazovaly rezistentní účinek na erytromycin, byly:

- *S. warneri* G1, který byl izolován z česnekového dipu
- dva kmeny *S. warneri* K1, K2 izolované z kombuchy
- *S. warneri* W2 izolované z lyofilizovaného kiwi
- *S. sciuri* D1, který byl izolován z kuřecího prsa
- *S. epidermidis* Ř3 izolovaného z kuřecího křídla

Největší míra rezistence (27mm) byla pozorována u kmenů *S. warneri* G1, který byl izolován z česnekového dipu a *S. sciuri* D1, který byl izolován z kuřecího prsa. Nejmenší zóna inhibice byla u bakterie *S. warneri* W1, která byla izolovaná z lyofilizovaného kiwi.



Obrázek 13: Vliv erytromycinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

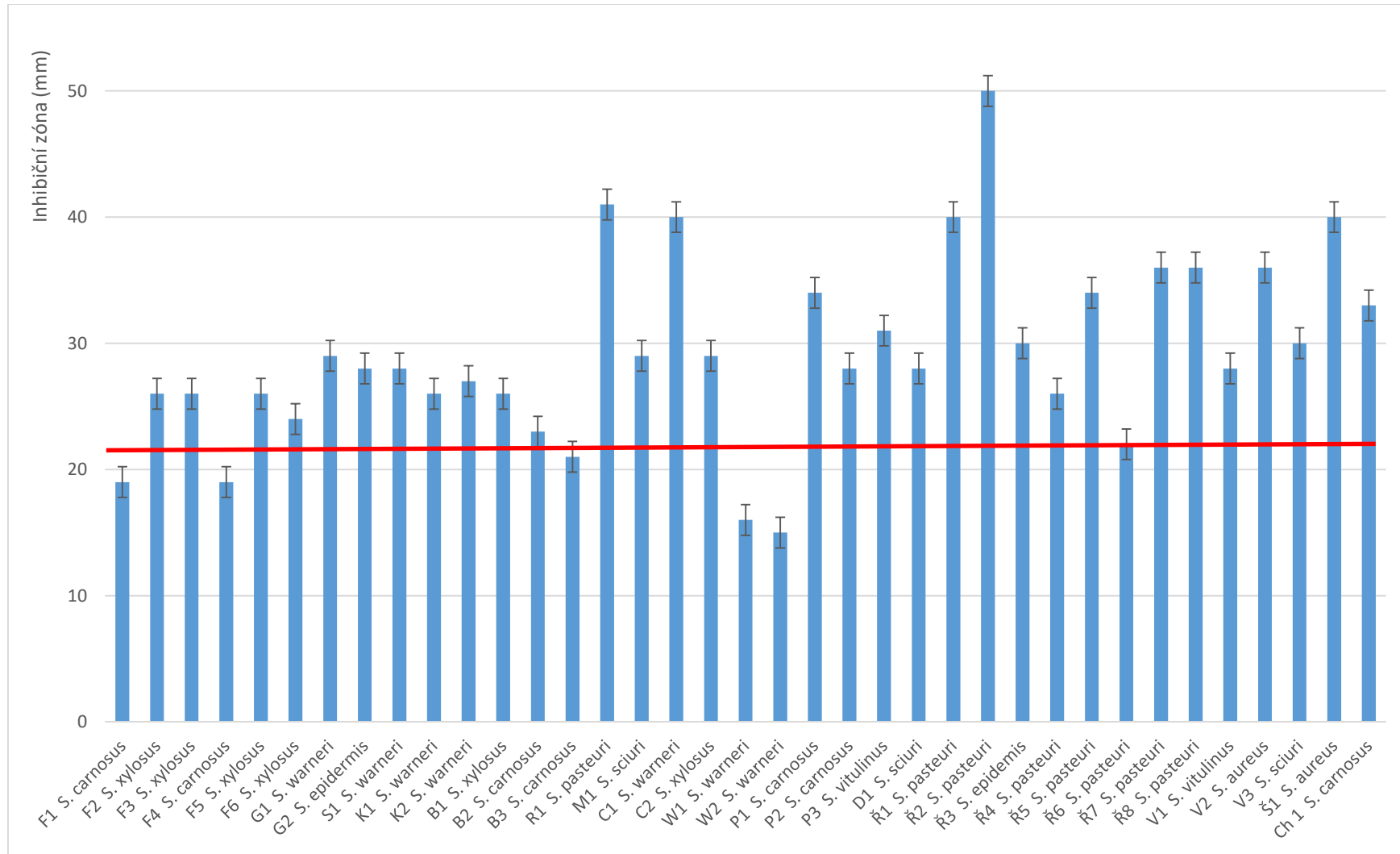
7.8 Vliv tetracyklinu na testované bakterie

Tetracyklin vykazoval rezistentní účinek v případě, že inhibiční zóna byla $\geq 22\text{mm}$. V případě, kdy byla inhibiční zóna $< 22\text{mm}$, daný mikroorganismus nevykazoval rezistenci vůči tetracyklinu.

Většina testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus* vykazovala rezistentní účinek vůči tetracyklinu. (Obrázek 14) Mezi bakterie, které tento účinek nevykazovaly, patřily:

- dva kmeny *S. carnosus* F1, F4 izolované z loveckého salámu
- dva kmeny *S. warneri* W1, W2 izolované z lyofilizovaného kiwi

Největší inhibiční zóna (50mm) byla zjištěna u kmene *S. pasteurii* Ř2, který byl izolován z chlazeného kuřecího křídla. Naopak nejmenší inhibiční zóna (15mm) byla u kmene *S. warneri* W2 izolovaného z lyofilizovaného kiwi.



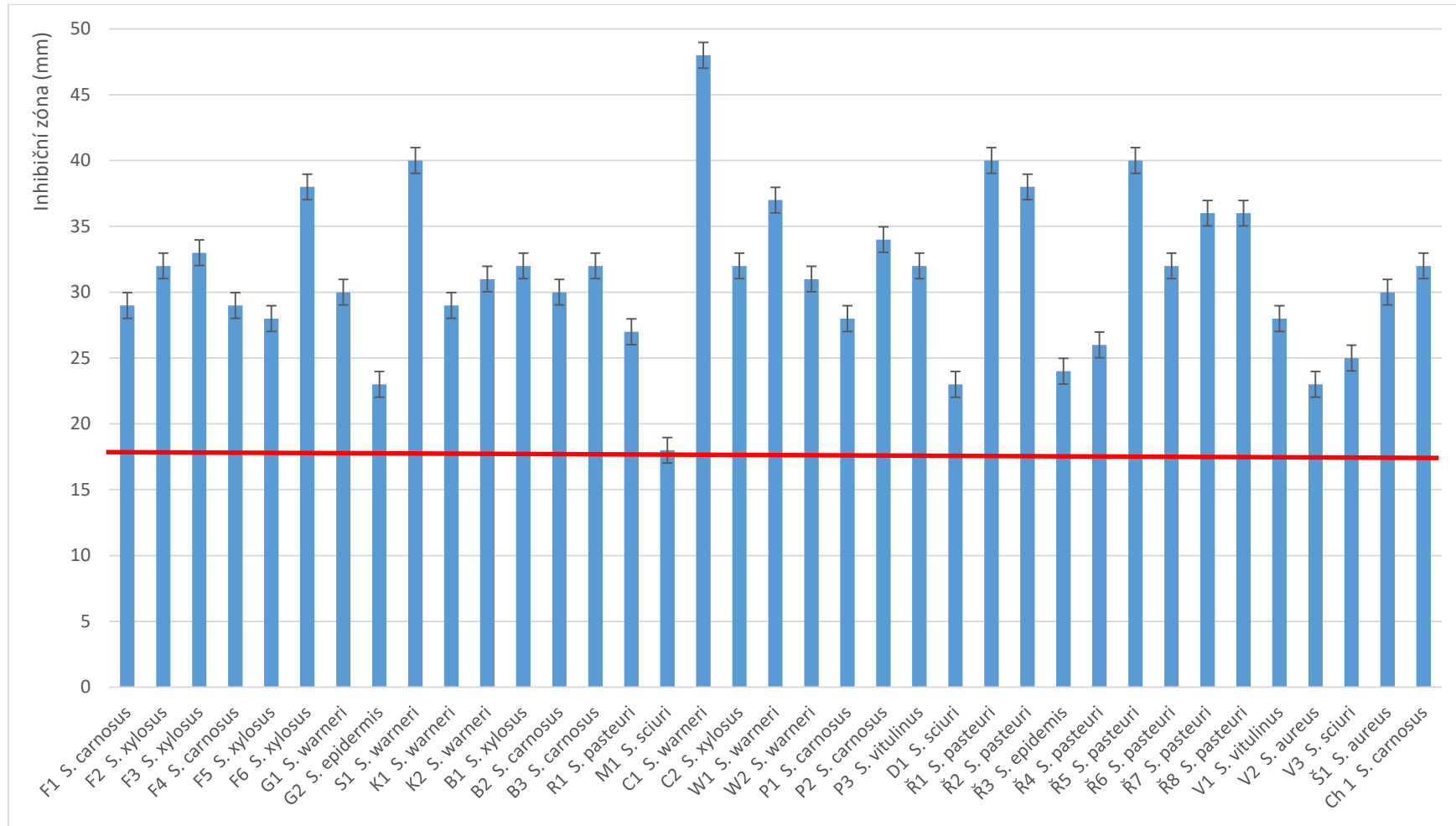
Obrázek 14: Vliv tetracyklinu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

7.9 Vliv chloramfenikolu na testované bakterie

Testované bakterie byly vůči chloramfenikolu rezistentní v případě, že se kolem antibiotického disku vytvořila inhibiční zóna o velikosti $\geq 18\text{mm}$. V případě, kdy byla inhibiční zóna $< 18\text{mm}$, testovaná bakterie rodu *Staphylococcus* nevykazovala rezistenci vůči chloramfenikolu.

Většina testovaných kmenů bakterií rodu *Staphylococcus* vykazovala rezistenci na chloramfenikol. Jediný kmen, který nevykazoval rezistentní účinek, byl *S. sciuri*, který byl izolován z krevety. (Obrázek 15)

Největší míra rezistence byla zaznamenána u kmene *S. warneri* C1, který byl izolován z lyofilizovaného manga.



Obrázek 15: Vliv chloramfenikolu na testované bakterie rodu *Staphylococcus*

8 DISKUZE

V roce 1928, Alexander Fleming popsal antibakteriální účinek plísně rodu *Penicillium* na kmen *Staphylococcus aureus*, a tím zahájil používání antibiotik k léčbě onemocnění.[9]

Antibiotická rezistence je v dnešní době velkým problémem a je předmětem velkého počtu studií. Antibiotická rezistence může být přirozená nebo získaná. [12] Hlavní příčinou vzniku bakteriální rezistence je selekční tlak antibiotik. Nadměrná spotřeba antibiotik má negativní vliv na vývoj rezistence bakterií, ale současně vede ke vzniku dalších bakteriálních druhů odolných vůči používaným antibiotikům. [43], [44], [45]

V současné době patří grampozitivní bakterie mezi významné původce infekcí. K nejvýznamnějším původcům patří kmeny koaguláza-pozitivního *Staphylococcus aureus*. V dnešní době je také kladen veliký důraz na nárůst koaguláza-negativních stafylokoků. [46], [47]

Koaguláza-negativní stafylokoky jsou součástí přirozené mikroflóry člověka. Vyskytují se převážně na kůži. Tak jako nález koaguláza-negativních stafylokoků, tak i nález druhu *Staphylococcus aureus* neznamená, že musí být patogenní, neboť může poměrně často kolonizovat nosní sliznici a kůži zdravého člověka. Při jejich izolaci z jiných lokalit je nutné odlišit pouhou kolonizaci nebo kontaminaci bez klinického významu. [48]

Případy bakteriální rezistence byly do nedávna soustředěny spíše do zdravotnických institucí s negativním dopadem u nozokomiálních nákaz. Tyto infekce lze definovat jako nákazy exogenního i endogenního původu vznikající při pobytu osob ve zdravotnickém zařízení. V současnosti dochází k šíření bakteriálních kmenů s nebezpečným rozsahem rezistence vůči antibiotikům i mezi původci komunitních infekcí. [49], [50]

Vankomycin je nejčastěji užívaným antibiotikem k léčbě infekcí vyvolaných rezistentními grampozitivními bakteriemi. Avšak jeho použití nese určitá rizika. Jeho hlavní nevýhodou je značná toxicita, potřeba neustálého monitorování, nutnost intravenózního podávání a hrozbu narůstající rezistence. Proto v dnešní době jeho používání ustává. [51]

Nejčastějšími bakteriálními původci nemocí krevního řečiště jsou koaguláza-negativní stafylokoky (36 %), enterokoky (16 %) a kmeny *Staphylococcus aureus* (13 %). Ve fakultní nemocnici Olomouc je onemocnění podmíněno zavedenými umělými materiály, především katétry, stenty, srdečními chlopněmi, kloubními náhradami. [52]

Diplomová práce byla zaměřena na izolaci grampozitivních koků z potravin, které jsou běžně dostupné v obchodních řetězcích. Při mikrobiologickém rozboru byl kladen důraz na izolaci bakterií rodu *Staphylococcus*. Každá bakterie byla podrobena diskovým difúzním testům. Byla použita řada antibiotik náležících do různých skupin – peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, fluorochinolony, aminoglykosidy, makrolidová antibiotika, tetracykliny a širokospektré antibiotikum chloramfenikol.

Z potravin bylo celkem izolováno 57 kmenů grampozitivních bakterií, z toho 37 kmenů patřilo rodu *Staphylococcus*., 3 kmeny rodu *Enterococcus*, 22 kmenů patřilo ostatním grampozitivním kokům. Potraviny byly jak živočišného, tak rostlinného původu. Některé byly v syrovém stavu, jiné po tepelném opracování.

Z chlazených kuřecích křídel bylo izolováno osm kmenů bakterií rodu *Staphylococcus*. Následně dalším výrobkem s největším počtem izolovaných kmenů byl lovecký salám se šesti kmeny.

Z potravin rostlinného původu bylo izolováno méně kmenů. Např. z lyofilizovaného kiwi byly izolovány dva kmeny bakterií rodu *Staphylococcus*, z kombuchy 3 kmeny a z plněné špičky, která spadá mezi cukrářské výrobky, pouze jeden kmen bakterie rodu *Staphylococcus*.

Kmeny bakterie rodu *Staphylococcus* byly identifikovány v různých typech potravin v Africe ve velmi rozdílném procentuálním zastoupení. Míra výskytu zjištěná v syrovém mase, masných výrobcích a vařeném mase se pohybovala od 3 % do 81,8 %. V jedné studii provedené v Libyi byly analyzovány vařené a nevařené vzorky potravin a prevalence byla vyšší u syrového kuřecího masa (29,6 %) než u vařeného masa (3,12 %). V tomto případě bylo prokázáno, že proces vaření snížil přítomnost tohoto mikroorganismu. Nejvyšší prevalence (81,8 %) ve vzorcích masa však byla zjištěna v jedné studii provedené v Kamerunu, v níž byly analyzovány vzorky vařeného vepřového masa. [53], [54], [55], [56], [57]

Studie provedená v Ugandě analyzovala přítomnost různých mikroorganismů ve vzorcích vajec a zjistila vyšší prevalenci *S. aureus* na povrchu skořápky (18 %) než uvnitř vajec (4 %). Mezi další druhy potravin, které byly analyzovány, patří fazole, kukuřičná mouka, kobliha, rybí roláda, solená ryba, kaše z kukuřičné mouky, mango, masový koláč, salát, pawpaw a maniok. [58]

Kmeny MRSA byly identifikovány ve vzorcích masa, ryb a mléka zdravých zvířat v Africe. Kmeny MRSA byly nalezeny v syrovém mase, v masných výrobcích a ve vařeném mase v Pobřeží slonoviny, v Nigérii a Tunisku. V Egyptě byly analyzovány vzorky solených ryb. [59], [60]

Izoláty MRSA obecně vykazovaly kromě rezistence k methicilinu rezistenci i k dalším látkám, zatímco izoláty ostatních bakterií rodu *Staphylococcus* vykazovaly citlivost k většině testovaných antimikrobiálních látek. Ve studiích, v nichž byly získány izoláty MRSA, byla zjištěna rezistence k tetracyklinu (5-84 %), erytromycinu (1,7-100 %), klindamycinu (9-97 %), trimethoprim-sulfametoxazolu (1,7-97 %), tobramycinu (0-36 %), ciprofloxacinu (0-42 %) nebo vankomycinu (9-46 %). Pokud jde o izoláty ostatních bakterií rodu *Staphylococcus*, ve většině studií byly tyto izoláty citlivé k jiným než beta-laktamovým antimikrobiálním látkám. Pouze některé z těchto izolátů vykazovaly rezistenci k penicilinu, tetracyklinu, erytromycinu nebo klindamycinu. [61], [62], [63]

S těmito studii se naše výsledky shodovaly u benzylpenicilinu, kdy z 37 testovaných bakterií vykazovalo rezistenci 13 bakterií. U tetracyklinu z 37 bakterií vykazovalo rezistenci 31.

Další studie [64] byla zaměřena nejen na produkty živočišného původu, ale také na jiné kategorie potravin s vysokou spotřebou na Tchaj-wanu, včetně čerstvě krájeného ovoce a zeleniny, ledových dezertů, rýžových výrobků a potravin s nízkou aktivitou vody. Celkem bylo izolováno 111 kmenů *Staphylococcus aureus* a 709 koaguláza-negativních stafylokoků, které zahrnovaly 23 druhů. Celková kontaminace stafylokoky byla nejvyšší u čerstvě krájeného ovoce a zeleniny (62,2 %), u kterého bylo často zjištěno více izolátů.

Ze 111 izolátů *S. aureus* bylo 65 (58,6 %) rezistentních alespoň k jednomu antibiotiku, z toho 15 (13,5 %) bylo multirezistentních (rezistentních k 3 a více třídám antibiotik). U *S. aureus* byla častá rezistence na penicilin (55,0 %), následovaná rezistencí na tetracyklin (31,5 %). Rezistence k erytromycinu (10,8 %), gentamycinu (9,0 %), oxacilinu (3,6 %), kyselině fusidové (1,8 %) a trimethoprimu a sulfametoxazolu (0,9 %) byla relativně nízká. [64]

V této diplomové práci byly identifikovány dva izoláty bakterie *S. aureus* a to ve vepřovém mase mletém a plněné špičce. Oba tyto kmeny byly rezistentní alespoň k jednomu z testovaných antibiotik. *S. aureus* V2 izolovaný z vepřového masa byl rezistentní vůči benzylpenicilinu a tetracyklinu, *S. aureus* Š1 (izolovaný z plněné špičky) k tetracyklinu.

V další studii bylo izolováno celkem 1 150 izolátů z 27 000 maloobchodních potravin odebraných v roce 2015 z maloobchodních trhů z 203 měst 24 provincií v Číně. Vzorky zahrnovaly nebalené syrové maso (5 000 kusů masa hospodářských zvířat a 4 500 kusů drůbežního masa), výrobky z rýže a mouky (3 000), zeleninové saláty (3 000), sendviče (3 000), maso a masné výrobky (2 500), vejce a vaječné výrobky (2 500), mléčné výrobky (2 000), koření (500), fazolové výrobky (500) a ovocné dezerty (500). [65]

Z 27 000 vzorků maloobchodních potravin z různých oblastí Číny bylo získáno přibližně 1 150 izolátů *S. aureus*. Z těchto 1 150 izolátů bylo 803 (69,8 %) izolováno ze syrového masa, včetně 445 izolátů z drůbežního masa (302 z kuřecího masa a 143 kachního masa) a 358 z masa hospodářských zvířat (195 vepřové, 83 skopové a 80 hovězí). 90 kmenů bylo izolováno z produktů z rýže a mouky, 85 ze zeleninových salátů, 69 ze sendvičů, 46 bylo izolováno z masa a masných výrobků, 43 z vajec a vaječných výrobků, 14 z 6 různých mléčných výrobků, 3 z koření, 3 z ovocných dezertů a 2 z fazolových produktů. Současně bylo 69,4 % kmenů izolováno z produktů nabízených na farmářských trzích nebo od pouličních prodejců, zatímco 30,6 % kmenů bylo izolováno z výrobků prodávaných v obchodech. Kromě toho míra prevalence *S. aureus* v syrovém mase byla vyšší než u ostatních maloobchodních potravin a míra prevalence *S. aureus* mezi syrovým kuřecím a vepřovým masem byla vyšší než mezi ostatními druhy syrového masa. [66]

Výsledky publikované ve výše uvedené studii ukazují, že celkově 97,6 % izolátů *S. aureus* vykazovalo rezistenci na alespoň jedno z testovaných antibiotik. Nejvyšší úroveň rezistence byly pozorovány u penicilinu (83,7 %), následoval linezolid (67,7 %) a erytromycin (52,1 %), tetracyklin (38,2 %) a klindamycin (31,0 %). Některé izoláty vykazovaly rezistenci na trimethoprim-sulfamethoxazol, oxacilin, cefoxitin, chloramfenikol, gentamycin a ciprofloxacin. Všechny testované izoláty byly citlivé na vankomycin a na daptomycin bylo citlivých 93,8 %. Izoláty kultivované ze syrového masa navíc vykazovaly významně vyšší odolnost vůči tetracyklinu (42,8 %), ciprofloxacinu (17,4 %) a chloramfenikolu (12,0 %) než izoláty z vajec a vaječných výrobků, rýže a moučných výrobků, zeleninových salátů a sendvičů. [67]

V této diplomové práci byly identifikovány dva izoláty bakterie *S. aureus*, a to ve vepřovém mase mletém a plněné špičce. Oba tyto kmeny byly rezistentní alespoň k jednomu z testovaných antibiotik. *S. aureus* V2 izolovaný z vepřového masa byl rezistentní vůči benzylpenicilinu a tetracyklinu, *S. aureus* Š1 (izolovaný z plněné špičky) k tetracyklinu. Oba tyto kmeny byly mimo jiné rezistentní vůči chloramfenikolu.

"Krvavá klobása" neboli "černý pudink" je druh klobásy, která se vyrábí z krve, tuku a kůže skotu nebo prasete, plněné do přírodních nebo syntetických obalů. Tento druh klobásy je velmi oblíbený v zemích Jižní Ameriky, v Brazílii, Argentině a Uruguayi. Z dvaceti vzorků krvavé klobásy zakoupených v jižní Brazílii bylo izolováno 82 kmenů stafylokoků. [68]

V této a dalších studiích vykazovalo cca 60 % koaguláza-negativních a koaguláza-positivních kmenů stafylokoků rezistenci k antibiotikům. Rezistence k erytromycinu (cca 25 %) a tetracyklinu (cca 23 %) byly nejčastěji zjištěnými profily. Všechny kmeny byly citlivé vůči vankomycinu, cca 94 % bylo citlivých vůči chloramfenikolu a ~91% ke gentamycinu. Mnohé kmeny (cca 16 %) vykazovaly multirezistenci. [68], [69], [69] V porovnání s výsledky uvedenými v této diplomové práci vykazovalo 31 kmenů (83,8 %) rezistenci na tetracyklin a 36 kmenů (97,3%) rezistenci na chloramfenikol.

Všechny kmeny bakterie *Staphylococcus* izolované v rámci této diplomové práce vykazovaly rezistenci alespoň k jednomu z testovaných antibiotik.

V této diplomové práci byla stanovena rezistence na sedm antibiotik pouze u kmene *S. carnosus* F1, který byl izolován z loveckého salámu. *S. carnosus* F1 byl rezistentní vůči ampicilinu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu a chloramfenikolu.

Rezistence k osmi antibiotikům byla stanovena u osmi izolátů bakterií rodu *Staphylococcus*. *S. pasteurii* R1 byl rezistentní na všechna penicilínová antibiotika, cefotaxim, amikacin, tobramycin, tetracyklin a chloramfenikol. Rezistence k osmi antibiotikům byla zjištěna u kmene *S. carnosus* F4 izolovaného z loveckého salámu, který byl rezistentní na ampicilin, amoxicilin, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, amikacin, tobramycin a chloramfenikol. Z loveckého salámu byla rezistentní vůči osmi antibiotikům (ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, meropenem, amikacin, tobramycin, tetracyklin a chloramfenikol) bakterie *S. xylosum* F6. Dva kmeny rodu *S. carnosus* B2, B3 izolované z balkánského sýru vykazovaly také rezistenci vůči osmi antibiotikům. *S. carnosus* B2 byl rezistentní vůči ampicilinu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. *S. carnosus* B3 nevykazoval oproti *S. carnosus* B2 rezistenci vůči tetracyklinu, avšak vykazoval rezistenci vůči amoxicilinu. Bakterie *S. warneri* W1 izolovaná z lyofilizovaného kiwi vykazovala rezistenci vůči osmi antibiotikům (ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, ciprofloxacin, amikacin, ofloxacin, tobramycin a chloramfenikol). *S. carnosus* P1 izolovaný z poličanu vykazoval rezistenci vůči ampicilinu, amoxicilinu, cefotaximu, meropenemu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. Rezistence k osmi

antibiotikům byla také detekována u mikroorganismů *S. aureus* Š1 (ampicilin, amoxicilin, meropenem, ofloxacinu, amikacin, tobramycin, tetracyklin, chloramfenikol) izolovaného z plněné špičky.

U jedenácti kmenů byla zaznamenána rezistence na devět antibiotik. *S. carnosus* Ch1, který byl izolovaný z paprikového koření, vykazoval rezistenci na benzylpenicilin, ampicilin, meropenem, ofloxacinu, amikacin, tobramycin, tetracyklin, chloramfenikol. Dva kmeny *S. xylosus* F3 a F5 byly izolované z loveckého salámu vykazovaly rezistenci vůči ampicilinu, amoxicilinu, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. Vůči devíti antibiotikům vykazovala rezistenci bakterie *S. epidermis* G2, která byla izolována z česnekového dipu (ampicilin, cefotaxim, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacinu, amikacin, tobramycin, tetracyklin, chloramfenikol). Jediný stafylokok izolovaný z krevety (*S. sciuri* M1) vykazoval rovněž rezistenci vůči devíti antibiotikům (ampicilinu, amoxicilinu, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu a tetracyklinu). *S. warneri* W2 izolovaný z lyofilizovaného kiwi vykazoval taktéž rezistenci vůči osmi antibiotikům (ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacin, amikacin, tobramycin a chloramfenikol). K devíti antibiotikům byla rezistentní bakterie *S. vitulinus* P3, která byla izolovaná z fermentovaného masného výrobku typu poličan. *S. sciuri* D1, který byl rezistentní vůči devíti antibiotikům, byl izolován z chlazených kuřecích prsou. Obě tyto bakterie, i když každá pocházela z jiné potraviny, byly rezistentní vůči stejným antibiotikům. (ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, meropenem, ciprofloxacin, amikacin, tobramycin, tetracyklin a chloramfenikol). Dva kmeny izolované z kuřecích křídel (*S. epidermidis* Ř3, *S. pasteurii* Ř6) vykazovaly rezistenci vůči ampicilinu, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, a chloramfenikolu. Rozdíl u nich byl ten, že bakterie *S. epidermidis* Ř3 byla rezistentní vůči tetracyklinu a bakterie *S. pasteurii* Ř6 byla rezistentní vůči amoxicilinu. Bakterie *S. sciuri* V3 izolovaná z mletého vepřového masa vykazovala rezistenci vůči ampicilinu, amoxicilinu, meropenemu, ciprofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. Bakterie *S. carnosus* izolovaná z paprikového koření byla rezistentní vůči benzylpenicilinu, ampicilinu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu.

Rezistence vůči deseti antibiotikům byla stanovena u osmi bakterií. Z loveckého salámu to byl *S. xylosus* F2, který byl rezistentní k ampicilinu, amoxicilinu, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu.

K deseti antibiotikům (ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, meropenem, ciprofloxacin, ofloxacinu, amikacin, tobramycin, tetracyklin, chloramfenikol) měla rezistenci i bakterie *S. warneri* S1 z BBQ dipu. Z kombuchy byla rezistentní k deseti antibiotikům bakterie *S. warneri* K1. Bakterie *S. warneri* vykazovala rezistenci vůči všem penicilinům, cefotaximu, meropenemu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu tetracyklinu a chloramfenikolu. Rezistenci na deset antibiotik vykazovala bakterie *S. xylosus* B1 izolovaná z balkánského sýru. Tato bakterie vykazovala rezistenci vůči ampicilinu, amoxicilinu, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu, ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. Rezistenci vůči deseti antibiotikům vykazovaly obě izolované z lyofilizovaného manga bakterie (*S. warneri* C1 a *S. xylosus* C2). Tyto bakterie byly rezistentní na ampicilin amoxicilin, meropenem ciprofloxacin, ofloxacin, amikacin, tobramycin, tetracyklin a chloramfenikol. Bakterie *S. warneri* C1 vykazovala navíc rezistenci ke kyselině nalidixové a bakterie *S. xylosus* C2 vykazovala rezistenci k cefotaximu. K deseti antibiotikům vykazovaly rezistenci ještě další dvě bakterie. *S. pasteurii* Ř7 izolovaný z kuřecích křídel nevykazoval rezistenci k benzylpenicilinu, ceftazidinu a kyselině nalidixové. Bakterie izolovaná z mletého vepřového masa *S. aureus* V2 vykazovala jako jedna z mála inhibici na benzylpenicilin. Tato bakterie byla citlivá na cefotaxim, ceftazidin a kyselinu nalidixovou.

U 5 bakterií byla zaznamenána rezistence na jedenáct testovaných antibiotik. Kmen *S. carnosus* P2 izolovaný z fermentovaného masného výrobku typu poličan, vykazoval taktéž rezistenci vůči jedenácti antibiotikům. Tato bakterie pouze nevykazovala rezistenci vůči ceftazidinu a kyselině nalidixové. Rezistenci vůči jedenácti antibiotikům vykazovaly dva kmeny *S. pasteurii* Ř5, Ř8, tyto dva kmeny vykazovaly rezistenci vůči penicilinům, cefotaximu, meropenemu, ciprofloxacinu ofloxacinu, amikacinu, tobramycinu, tetracyklinu a chloramfenikolu. K jedenácti antibiotikům vykazovala rezistenci bakterie *S. vitulinus* V1, která byla izolována z mletého vepřového masa. Tato bakterie byla citlivá na ofloxacin a kyselinu nalidixovou. K jedenácti antibiotikům měla rezistenci i bakterie *S. warneri* G1 izolovaná z česnekového dipu, která nevykazovala rezistenci pouze u ceftazidinu a kyselině nalidixové.

Zbýlé 4 kmeny vykazovaly rezistenci k dvanácti antibiotikům. Kmen *S. warneri* K2 izolovaný z kombuchy a tři kmeny *S. pasteurii* Ř1, Ř2, Ř4 izolované z kuřecího křídla. Bakterie *S. warneri* K2 byla rezistentní na benzylpenicilin, ampicilin, amoxicilin, cefotaxim, meropenem, ciprofloxacin, kyselinu nalidixovou, ofloxacin, amikacin, tobramycin,

tetracyklin a chloramfenikol. Zbylé tři kmeny Ř1, Ř2, Ř4, vykazovaly citlivost vůči ceftazidinu. Vůči ostatním testovaným antibiotikům vykazovaly rezistenci.

Nejlépe účinné antibiotikum, ze skupiny penicilínů, byl benzylpenicilin. Na toto antibiotikum bylo rezistentních pouze 13 testovaných bakterií, na rozdíl od ampicilinu, kde bylo rezistentních 37 kmenů a amoxicilinu, kdy bylo vůči tomuto antibiotiku rezistentních 32 bakterií.

Při porovnání chinolonových antibiotik ciprofloxacinu a ofloxacinu byly výsledky téměř podobné. Proti ciprofloxacinu bylo rezistentních 32 bakterií a proti ofloxacinu 29 bakterií. U antibiotik tobramycinu a amikacinu, které patří do skupiny aminoglykosidů, vykazovaly rezistenci všechny bakterie.

Tři antibiotika vykazovala nejmenší inhibiční účinek vůči testovaným stafylokokům. Tato antibiotika nebyla účinná proti 37 bakteriím. Mezi tato antibiotika patřily tobramycin, amikacin a ampicilin.

Antibiotikum s největším inhibičním účinkem proti stanovovaným stafylokokům byl ceftazidin. Vůči tomuto antibiotiku byla rezistentní pouze bakterie *S. vitulinus* V1, která byla izolovaná z mletého vepřového masa. Jako druhé nejvíce účinné antibiotikum byla určena kyselina nalidixová, u které bylo zaznamenáno pouze pět rezistentních bakterií, přičemž tři z těchto bakterií byly izolovány z kuřecích křídel.

ZÁVĚR

Tato diplomová práce se zabývá sledováním antibiotické rezistence u vybraných grampozitivních koků, a to bakterií rodu *Staphylococcus*, izolovaných z potravin a nápojů. Vybrané koky rodu *Staphylococcus* byly podrobeny diskové difúzní metodě na antibiotickou řadu, do které byly zařazeny peniciliny, cefalosporiny, karbapenemy, fluorochinolony, aminoglykosidy, makrolidová antibiotika, tetracykliny a širokospektré antibiotikum chloramfenikol. Důvodem bylo najít a rozpoznat rezistentní kmeny.

- Potraviny, které byly v této diplomové práci zkoumány, byly rostlinného (kombucha, mango, kiwi, paprikové koření, plněná špička, česnekový a BBQ dip) i živočišného původu (kuřecí, vepřové, hovězí i rybí maso, krevety, sýr)
- Většina testovaných grampozitivních bakterií byla izolována z potravin živočišného původu. Největší počet kmenů rodu *Staphylococcus* bylo izolováno z loveckého salámu.
- Všechny izolované kmeny bakterie *Staphylococcus* spp. vykazovaly rezistenci alespoň k jednomu antibiotiku. U čtyř izolátů byla zjištěna největší míra rezistence, a to ke 12 antibiotikům. Tuto rezistenci vykazovaly kmeny: *S. warneri* K2 izolovaný z kombuchy a tři kmeny *S. pasteurii* Ř1, Ř2, Ř4 izolované z kuřecího křídla
- Tři antibiotika měla nejmenší účinek vůči testovaným bakteriím rodu *Staphylococcus*. Mezi tato antibiotika patřily tobramycin, amikacin a ampicilin. Antibiotikum s největším inhibičním účinkem bylo ceftazidim, vůči kterému byla rezistentní pouze jedna bakterie *S. vitulinus* V1 izolovaná z vepřového mletého masa. Druhé nejvíce účinné antibiotikum byla kyselina nalidixová, u které bylo zaznamenáno pouze pět rezistentních bakterií. Tři z těchto bakterií byly izolovány z kuřecích křidel.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] Daintith, John. (2008). *Dictionary of Chemistry (6th Edition) - antibiotics*. Oxford University Press. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008IFO36/dictionary-chemistry/antibiotics>
- [2] Robinson, Richard K.. (2000). *Encyclopedia of Food Microbiology, Volumes 1-3 - Antibiotics*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0051LAF3/encyclopedia-food-microbiology/antibiotics>
- [3] BENEŠ, Jiří. (2009). *Infekční lékařství*. Praha: Galén. ISBN 978-80-7262-644-1.
- [4] International Food Information Service. (2009). *Dictionary of Food Science and Technology (2nd Edition) - Antibiotics*. International Food Information Service (IFIS Publishing). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006QA7Z2/dictionary-food-science/antibiotics>
- [5] Dikeman, Michael Devine, Carrick. (2014). *Encyclopedia of Meat Sciences (2nd Edition) - Antibiotic Resistance by Microorganisms*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00U6GLTO/encyclopedia-meat-sciences/antibiotic-resistance>
- [6] Daintith, John Martin, Elizabeth. (2010). *Dictionary of Science (6th Edition) - antibiotics*. Oxford University Press. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt007X43QD/dictionary-science-6th/antibiotics>
- [7] Brian, Currell R.C. Van Dam, Mieras Biotol Partners Staff. (1997). *Biotechnological Innovations in Chemical Synthesis - 6.1 An Introduction to Antibiotics*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt005BQ30S/biotechnological-innovations/an-introduction-antibiotics>
- [8] DAVIES, Gill. (2013). *Komplexní historie medicíny*. Brno: CPress. ISBN 978-80-264-0099-8
- [9] Frias, Juana Martinez-Villaluenga, Cristina Peñas, Elena. (2017). *Fermented Foods in Health and Disease Prevention - 29.1 Overview of History of Antibiotic Resistance*. Elsevier. Dostupné z:

- <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0112U2Z2/fermented-foods-in-health/overview-history-antibiotic>
- [10] Boateng, Joshua. (2020). *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications - 8.1.1 Brief History of Silver as an Antibiotic*. John Wiley & Sons. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt012JLZ03/therapeutic-dressings/brief-history-silver>
- [11] BERANOVÁ, Erika. (2012). *Antibiotika a bakteriální rezistence - možnosti prevence*. Praha, Univerzita Karlova v Praze. Vedoucí práce MUDr. Filip Prusík
- [12] Doyle, Michael P. Buchanan, Robert L.. (2013). *Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers (4th Edition) - 2.1.1.1 Types of Antibiotics*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C3KAB1/food-microbiology-fundamentals/types-of-antibiotics>
- [13] LINCOVÁ, Dagmar a Hassan FARGHALI, et al. (2002). *Základní a aplikovaná farmakologie*. 1. vydání. Praha: Galén. ISBN 80-7262-168-8.
- [14] MARTÍNKOVÁ, Jiřina, et al. (2018). *Farmakologie pro studenty zdravotnických oborů*. 2. vydání. Praha: Grada. ISBN 978-80-271-0929-6.
- [15] JAN, Švihovec a A KOLEKTIV. *Farmakologie* (2018). Grada Publishing a.s. 1008 s. [ISBN 9788027121502](https://www.isbn-international.org/number/9788027121502).
- [16] HAVLÍK, Jiří, et al. *Infektologie*. (1990). 2. vydání. Praha: Avicenum. 393 s. [ISBN 80-201-0062-8](https://www.isbn-international.org/number/8020100628).
- [17] LOBOVSKÁ, Alena. (2001). *Infekční nemoci*. 1. vydání. Praha: Karolinum. 263 s. [ISBN 80-246-0116-8](https://www.isbn-international.org/number/8024601168).
- [18] Hester, R. E. Harrison, R. M. (2016). *Pharmaceuticals in the Environment, Volume 41 - 3.3 Conclusions*. Royal Society of Chemistry. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010VJIM1/pharmaceuticals-in-environment/pharmaceut-conclusions>
- [19] MAYERS, Douglas L. et al., (2009). *History of drug-resistant microbes. Antimicrobial Drug Resistance* [online]. č. 1 [cit. 2017-04-16]. DOI: 10.1007/978-1-59745-180-2. Dostupné z: <http://www.scribd.com/doc/35573303/Antimicrobial-Drug-Resistance-V-1-Mechanisms-of-Drug-Resistance-2009>.

- [20] HOLUB, Michal et al. (2013). *Infekční nemoci ve standardní a intenzivní péči*. Praha: Karolinum, ISBN 978-80-246-2197-5
- [21] SCHINDLER, Jiří. (2014). *Mikrobiologie: pro studenty zdravotnických oborů*. 2., dopl. a přeprac. vyd. Praha: Grada, ISBN 978-80-247-4771-2.
- [22] Wooley, Dawn P. Byers, Karen B. (2017). *Biological Safety - Principles and Practices (5th Edition) - 8.2.1 Inflammation*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011EE6PJ/biological-safety-principles/inflammation>
- [23] Lewis, Andrew. (2010). *Drug-Device Combination Products - Delivery Technologies and Applications - 8.4.4 Availability*. Woodhead Publishing. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00A826B2/drug-device-combination/availability>
- [24] Watson, Ronald Ross Preedy, Victor R.. (2010). *Bioactive Foods in Promoting Health - Probiotics and Prebiotics - 2.7.1 In vitro Evidence*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00BWMU91/bioactive-foods-in-promoting/in-vitro-evidence>
- [25] Watson, Ronald Ross Preedy, Victor R.. (2016). *Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics - Bioactive Foods in Health Promotion - 1.8.2 Animal Models*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt010QHM75/probiotics-prebiotics/animal-models>
- [26] Ricke, Steven C. Donaldson, Janet R. Phillips, Carol A.. (2015). *Food Safety - Emerging Issues, Technologies, and Systems - 11.7 Coccidiostat Usage and Arsenic Resistance*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00UCWVR6/food-safety-emerging/coccidiostat-usage-arsenic>
- [27] Baquero, Fernando Bouza, Emilio Gutiérrez-Fuentes, J. A. Coque, Teresa M. (2019). *Microbial Transmission - 9.4.3 Transmission of Clinically Relevant Antibiotic Resistance Genes on Mobile Genetic Elements and/or Antibiotic-Resistant Clones of Zoonotic Pathogens and Commensal Bacteria from Producing Animals and Food to Humans*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011VUDK8/microbial-transmission/transmission-clinically>

- [28] VOTAVA, Miroslav. (2005). *Lékařská mikrobiologie obecná*. 2. přeprac. vyd. Brno: Neptun. ISBN 80-868-5000-5.
- [29] Motarjemi, Yasmine Moy, Gerald Todd, Ewen. (2014). *Encyclopedia of Food Safety - 7.27.4 Epidemiology*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00C6CBS1/encyclopedia-food-safety/encycoped-epidemiology-4>
- [30] Adams, Martin R. Moss, Maurice O.. (2008). *Food Microbiology (3rd Edition) - 7.14.4 Isolation and Identification*. Royal Society of Chemistry (RSC). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt00AAJCYM/food-microbiology-3rd/staphylococcus-isolation-identification>
- [31] Fleming, Diane O. Hunt, Debra L.. (2006). *Biological Safety - Principles and Practices (4th Edition) - 6.2.1 Staphylococci*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008X9Z01/biological-safety-principles/staphylococci>
- [32] Fox, Patrick F. McSweeney, Paul L. H. Cogan, Timothy M. Guinee, Timothy P.. (2004). *Cheese - Chemistry, Physics and Microbiology (3rd Edition) - 12.9 Moulds*. Elsevier. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt004QZXJ9/cheese-chemistry-physics/microbiolo-moulds>
- [33] Reddy, C. A. Beveridge, T. J. Breznak, J. A. Marzluf, G. A. Schmidt, T. M. Snyder, L. R.. (2007). *Methods for General and Molecular Microbiology (3rd Edition) - 32.2.2.3 Bacteriophage and Transduction*. American Society for Microbiology (ASM). Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt0090KROD/methods-general-molecular/staphylococci-bacteriophage>
- [34] Blackburn, Clive de W. McClure, Peter J.. (2009). *Foodborne Pathogens - Hazards, Risk Analysis and Control (2nd Edition) - 22.2.1 The Organism and its Characteristics*. Woodhead Publishing. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt006M4R8C/foodborne-pathogens-hazards/organism-its-characteristics>
- [35] Gibson, Glenn R.. (2006). *Food Science and Technology Bulletin - Functional Foods, Volume 2 - 7.3 Biological Activity of Tea Components*. International Food Information Service (IFIS Publishing). Dostupné z:

- <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt003YNE21/food-science-technology-5/biological-activity-tea>
- [36] Cammack, R. Attwood, T. K. Campbell, P. N. Parish, J. H. Smith, A. D. Stirling, J. L. Vella, F. (2006). *Oxford Dictionary of Biochemistry and Molecular Biology (2nd Edition)* - *MRSA*. Oxford University Press. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt008O9PNI/oxford-dictionary-biochemistry/mrsa>
- [37] VESELÁ, Mária. (2004). *Praktikum z obecné mikrobiologie*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická. 99 s. ISBN 80-214-2567-9.
- [38] RYŠKOVÁ, Olga, et al.. (1997). *Návody k praktickým cvičením z lékařské mikrobiologie*. 1. vydání. Praha: Karolinum. ISBN 80-7184-307-5.
- [39] JULÁK, Jaroslav. (2009). *Praktická cvičení a semináře z lékařské mikrobiologie*. 2. vydání. Praha: Karolinum. 113 s. ISBN 978-80-246-1141-9.
- [40] BÖHME K., FERNÁNDEZ-NO I., BARROS-VELÁZQUEZ J., GALLARDO M. J., CANAS B., CALO-MATA P. (2012). *Species Identification of Food Spoilage and Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting*. Food Quality, Kostas Kapiris, IntechOpen: <https://www.intechopen.com/books/food-quality/species-identification-of-food-spoilage-and-pathogenic-bacteria-by-maldi-tof-mass-fingerprinting>
- [41] EUCAST (2008): *EUCAST Definitive Document Edef 7.1: method for the determination of broth dilution MIC of antifungal agents for fermentative yeasts*. C. M. I., 14: 398-405
- [42] Mehta, S. C. Kar, Ashutosh. (2014). *Pharmaceutical Pharmacology - 15.1.2 Mechanism of Action*. New Academic Science. Dostupné z: <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011NOEVC/pharmaceutical-pharmacology/penicillin-mechanism-action>
- [43] Ballou CH, Schentag JJ. (1992). *Trends in antibiotic utilization and bacterial resistance*. Report of the national nosocomial resistance surveillance group. D. M. D.; 15: 37–42.
- [44] Kolář M, Urbánek K, Látal T. (2001). *Antibiotic selection pressure and development of bacterial resistance*. Intern J Antimicrob Agents; 17: 357–363

- [45] Medeiros AA. (1997). *Evolution and dissemination of β -lactamases accelerated by generations of β -lactam antibiotics*. Clin Inf Dis; 24: 19–45
- [46] Neu HC. (1992). *The crisis in antibiotic resistance*. Science; 257: 1064–1073.
- [47] Weinstein MP, Towns ML, Quartey SM, et al.. (1997). *The clinical significance of positive blood cultures in the 1990s: A prospective comprehensive evaluation of the microbiology, epidemiology, and outcome of bacteremia and fungemia in adults*. Clin Infect Dis; 24: 584–602
- [48] Kolář M, Heinigeová B, Bartoníková N, et al. (2003). *Grampozitivní patogeny při infekcích krevního řečiště – multicentrická studie*. Klin Mikrobiol Inf Léč; 9: 244–252.
- [49] Haley RW, Culver DH, White JW, et al. (1985). *The nationwide nosocomial infection rate. A new need for vital statistics*. Am J Epidemiol; 121: 159–167.
- [50] Haley RW, Schaberg DR, Crossley KB, et al.. (1981). *Extra charges and prolongation of stay attributable to nosocomial infections: a prospective interhospital comparison*. Am J Med; 70: 51–58
- [51] Wood MJ. (1996). *The comparative efficacy and safety of teicoplanin and vancomycin*. J Antimicrob Chemother; 37: 209–222
- [52] Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP (1999). *Nosocomial infections in medical intensive care units in the United States. National Nosocomial Infections Surveillance System*. Crit Care Med; 27: 887–892
- [53] Lozano, C.; Gharsa, H.; Ben Slama, K.; Zarazaga, M.; Torres, C. (2016). *Staphylococcus aureus in Animals and Food: Methicillin Resistance, Prevalence and Population Structure. A Review in the African Continent*. Microorganisms , 4, 12. <https://doi.org/10.3390/microorganisms4010012>
- [54] El Shrek, Y. M.; Ali, M. R. (2012). *Microbiological study of spiced chicken burgers in Tripoli City, Libya*. East Mediterr. Health J., 18, 653–662. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- [55] Yannick, N.; Rawlings, N.; Emmanuela, A. (2013). *Assessment of bacteriological quality of cooked pork meat sold along the commercial streets of Nkwen through Bambili Metropolis, Cameroon*. Afr. J. Food Sci. 7, 441–445. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

- [56] Ombui, J.N.; Kimotho, A.M.; Nduhiu, J.G. (2000). *Antimicrobial resistance patterns and plasmid profiles of Staphylococcus aureus isolated from milk and meat*. East Afr. Med. J. 77, 463–467. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [57] Isara, A.R.; Isah, E.C.; Lofor, P.V.; Ojide, C.K. (2010). *Food contamination in fast food restaurants in Benin City, Edo State, Nigeria: implications for food hygiene and safety*. Public Health. 124, 467–471. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [58] Higenyi, J.; Kabasa, J.D. (2014) *Microbial contamination load of hatching eggs in Butaleja, eastern Uganda*. Anim. Vet. Sci. 2, 22–30. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- [59] Olatu, O.; Junaidu, K.; Chukwudi, O.E.; Jarlath, U.V. (2011). *Multi-drug resistant coagulase positive Staphylococcus aureus from live and slaughtered chickens in Zaria, Nigeria*. Int. J. Poult. Sci. 10, 871–875. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- [60] Chairat, S.; Gharsa, H.; Lozano, C.; Gómez-Sanz, E.; Gómez, P.; Zarazaga, M.; Boudabous, A.; Torres, C.; Ben Slama, K. (2015). *Characterization of Staphylococcus aureus from raw meat samples in tunisia: Detection of clonal lineage ST398 from the African Continent*. Foodborne Pathog. Dis. 12, 686–692. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [61] Schaumburg, F.; Pauly, M.; Anoh, E.; Mossoun, A.; Wiersma, L.; Schubert, G.; Flammen, A.; Alabi, A.S.; Muyembe-Tamfum, J.J.; Grobusch, M.P.; et al. (2015). *Staphylococcus aureus complex from animals and humans in three remote African regions*. Clin. Microbiol. Infect. 21, e1–e8. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- [62] Schaumburg, F.; Mugisha, L.; Kappeller, P.; Fichtel, C.; Köck, R.; Köndgen, S.; Becker, K.; Boesch, C.; Peters, G.; Leendertz, F. (2013). *Evaluation of non-invasive biological samples to monitor Staphylococcus aureus colonization in great apes and lemurs*. PLoS ONE , 8, e78046. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
- [63] Elbir, H.; Feil, E.J.; Drancourt, M.; Roux, V.; El Sanousi, S.M.; Eshag, M.; Colque-Navarro, P.; Kühn, I.; Flock, J.I. (2010). *Ovine clone ST1464: A predominant genotype of Staphylococcus aureus subsp. anaerobius isolated from sheep in Sudan*. J. Infect. Dev. Ctries. 4, 235–238. [[Google Scholar](#)] [[PubMed](#)]
- [64] L.L. Founou, R.C. Founou, S.Y. Essack. (2016). *Antibiotic resistance in the food chain: a developing country-perspective Front Microbiol*, 7, p. 1881

- [65] Byrd-Bredbenner, C., Berning, J., Martin-Biggers, J., and Quick, V. (2013). *Food safety in home kitchens: a synthesis of the literature*. Int. J. Environ. Res. Public Health 10, 4060–4085. doi: 10.3390/ijerph10094060
- [66] Chu, H., Zhao, L., Zhang, Z., Gui, T., Han, L., and Ni, Y. (2013). *Antibiotic resistance and molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from lower respiratory tract: multi-resistance and high prevalence of SCC mec III type*. Cell Biochem. Biophys. 67, 795–801. doi: 10.1007/s12013-013-9542-7
- [67] Ge, B., Mukherjee, S., Hsu, C. H., Davis, J. A., Tran, T. T. T., Yang, Q., et al. (2017). *MRSA and multidrug-resistant Staphylococcus aureus in U.S. retail meats, 2010-2011*. Food Microbiol. 62, 289–297. doi: 10.1016/j.fm.2016.10.029
- [68] Brito DVD, Brito CS, Resende DS, do Ó JM, Abdallah VOS, Gontijo Filho PP. (2010). *Nosocomial infections in a Brazilian neonatal intensive care unit: a 4-year surveillance study*. Rev Soc Bras Med Trop; 43:633-637
- [69] Resch M, Nagel V, Hertel C. (2008). *Antibiotic resistance of coagulase-negative staphylococci associated with food and used in starter cultures*. Int J Food Microbiol; 127:99-104
- [70] Udo EE, Al-Bustan MA, Jacob LE. (1999). *Enterotoxin production by coagulase-negative staphylococci in restaurant works from Kuwait city may be a potential cause of food poisoning*. J Med Microbiol; 48:819-823

SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AK	amikacin
AMP	ampicilin
AMX	amoxicilin
ATB	antibiotikum
C	chloramfenikol
CAZ	ceftazidin
CIP	ciprofloxacín
CX	cefotaxim
E	erytromycin
EUCAST	evropský výbor pro testování antimikrobiální citlivosti (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing)
MET	methicilin
MIC	minimální inhibiční koncentrace
MRP	meropenem
MRSA	methicilin-rezistentní <i>Staphylococcus aureus</i>
NA	kyselina nalidixová
OF	ofloxacinu
P	benzylpenicilin
TE	tetracyklin
TOB	tobramycin
WHO	světová zdravotnická organizace

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Vliv benzylpenicilinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	36
Obrázek 2: Vliv ampicilinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	38
Obrázek 3: Vliv amoxicilinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	40
Obrázek 4: Vliv methicilinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	42
Obrázek 5: Vliv cefotaximu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	44
Obrázek 6: Vliv ceftazidinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	46
Obrázek 7: Vliv meropenemu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	48
Obrázek 8: Vliv ciprofloxacinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	50
Obrázek 9: Vliv kyseliny nalidixové na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	52
Obrázek 10: Vliv ofloxacinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	54
Obrázek 11: Vliv amikacinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	56
Obrázek 12: Vliv tobramycinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	58
Obrázek 13: Vliv erytromycinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	60
Obrázek 14: Vliv tetracyklinu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	62
Obrázek 15: Vliv chloramfenikolu na testované bakterie rodu <i>Staphylococcus</i>	64

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Izolované mikroorganismy	32
Tabulka 2: Izolované mikroorganismy - pokračování	33
Tabulka 3: Izolované mikroorganismy - pokračování	34

