

VÝSKYT ENTEROKOKOV V KRAVSKOM MLIEKU A ICH REZISTENCIA NA ANTIBIOTIKÁ

PRESENCE OF ENTEROCOCCI IN COW MILK AND THEIR ANTIBIOTIC RESISTANCE

Jana Fabianová, Viera Ducková, Margita Čanigová, Miroslav Kročko

ABSTRACT

Enterococci represent an important part of contaminate microflora in raw milk and dairy products. They constitute significant part of nosocomial pathogens with a remarkable capacity of expressing resistance to several antimicrobial agents. We aimed to assess occurrence and antibiotic resistance of enterococci in the raw milk samples and pasteurized milk samples. In this study total bacterial count, psychrotrophic count and count of enterococci were determine in raw milk cistern samples, storage tank milk samples and milk samples after pasteurization. A collection of 46 enterococcal isolates were identified and screened for their antibiotic resistance. Isolates of *E. faecalis* were dominant in raw milk samples (56.5 %). Sensitive to teicoplanine (30 mcg/disk) were 97.9 % of enterococcal isolates and 15.2 % isolates were resistant to vankomycin (30 mcg/disk).

Keywords: enterococci, raw milk, antibiotic resistance

ÚVOD

Enterokoky patria medzi ubiquitné mikroorganizmy. Za ich prirodzené miesto výskytu sa najčastejšie označuje tráviaci trakt cicavcov (Franz et al., 1999; Ortigosa et al., 2008). Prítomnosť enterokokov v mlieku a mliečnych výrobkov sa spája predovšetkým s nedodržaním hygienických a sanitačných zásad pri získavaní, manipulácii s mliekom a pri jeho spracovaní (Cogan et al., 2001). Do surového mlieka sa môžu dostať z viacerých zdrojov primárnej alebo sekundárnej kontaminácie. Zdrojom kontaminácie mlieka enterokokmi môže byť povrch vemená, krmivo, výkaly, voda, prach ale aj ruky a odev dojičov. Ďalší zdroj predstavujú plochy zariadení a nástrojov používaných v prvovýrobe mlieka alebo v spracovateľskom závode. Greifová et al. (2003) uvádzajú, že enterokoky sa pravidelne nachádzajú v dojacích strojoch alebo na inom náradí a zariadení. Priemerné zastúpenie enterokokov v surovom mlieku je v rozpätí 0-50 % z celkovej mikroflóry mlieka, pričom medzi prevládajúcimi druhmi enterokokov v kravských výkaloch a v surovom kravskom mlieku nie je žiadna spojitosť (Görner a Valík, 2004). Tiež výsledky iných autorov (Gelsomino et al., 2002; Kagkli et al., 2007) potvrdzujú, že ich prítomnosť sa nie vždy spája s fekálnou kontamináciou. Vďaka ich psychrotrofnému charakteru, termorezistencii a schopnosti prežívať v rôznych substrátoch a podmienkach, sa môže počet enterokokov v mlieku počas jeho chladenia, skladovania a prepravy zvýšiť a taktiež môžu prežiť pasterizačnú teplotu. Práve preto sa enterokoky stávajú súčasťou mikroflóry nielen surového ale aj pasterizovaného mlieka (Giraffa, 2003). Počty enterokokov, tak ako aj iných mikroorganizmov v surovom mlieku, kolíšu aj v závislosti od teploty a doby skladovania mlieka (Panfili et al., 2008). Na základe dosiahnutých výsledkov Riboldi et al. (2009) konštatovali, že enterokoky môžu prežívať teploty pasterizácie. Ako najviac zastúpeným druhom v pasterizovanom mlieku zistili *E. faecium* (26 %). Termorezistenciu niektorých druhov enterokokov dokazujú aj výsledky autorov Batish et al. (2006), ktorí zistili, že z celkovo 224 izolátov deoxyribonukleáza pozitívnych enterokokov 21,9 % prežilo teplotu pasterizácie. Takéto enterokoky (n=37) sa

izolovali z odtučneného sušeného mlieka, dojčenských mliečnych výrobkov a zo sladeného kondenzovaného mlieka. Ako dominantné termorezistentné druhy identifikovali *E. faecalis*, *E. faecium* a *E. faecalis* var. *zymogenes*. Z doposiaľ publikovaných výsledkov vyplýva, že pre mliekarenský priemysel tvoria druhy *E. faecalis* a *E. faecium* najvýznamnejšie druhy enterokokov (Zago et al., 2009).

Nebezpečenstvo enterokokov spočíva v ich patogenite, ktorá je daná rezistenciou k širokému spektru antibiotík a ďalšími faktormi virulencie, a zároveň schopnosťou prežívať nepriaznivé podmienky prostredia (Foulquie Moreno et al., 2006). Okrem prirodzenej rezistencie na niekoľko antibiotík je pre enterokoky charakteristická aj ich jedinečná schopnosť výmeny genetického materiálu, čím si dokážu získať rezistenciu voči viacerým antibiotikám ako sú aminoglykozidy (gentamicín, streptomycín), glykopeptidy (vankomycín a teikoplanín), tetracyklíny (tetracyklín), makrolidy (erytromycín), chloramfenikol (Huys et al., 2004). Zástupcovia rodu *Enterococcus* sa z pohľadu antimikrobiálnej rezistencie stali významnou skupinou mikroorganizmov predovšetkým preto, že sa stali ubiquitárne rozšírenými baktériami v okolitom prostredí (Fracalanza et al., 2007). Záujem sa zvýšil predovšetkým o vankomycín rezistentné enterokoky spôsobujúce závažné zdravotné problémy nielen v USA, ale taktiež v Európe a prvé kmene sa dokázali už aj na Slovensku (Jarčuška et al., 2006).

Zdrojom enterokokov rezistentných na antibiotiká môže byť aj surové mlieko. Šustáčková et al. (2003) zistili u izolátov druhu *E. faecalis* pochádzajúcich z mlieka prevládajúcu rezistenciu na tetracyklín, streptomycín a chloramfenikol, zatiaľ čo izoláty druhu *E. faecium* mali rezistenciu na erytromycín. Rezistenciu na vankomycín na intermediálnej úrovni (MIC=8 µg.ml⁻¹) zistili iba u jedného izolátu *E. faecalis* a jedného izolátu *E. faecium*. Gomes et al. (2008) najčastejšie z mlieka izolovali druh *E. faecalis*. V porovnaní s izolátmi druhu *E. faecium* u izolátov druhu *E. faecalis* zistili častejšie výskyt rezistencie na tetracyklín, erytromycín a gentamicín. Prítomnosť enterokokov s klinicky významnou rezistenciou na antibiotiká preto indikuje potrebu

efektívnej stratégie kontroly na zníženie kontaminácie týmito mikroorganizmami v potravinách živočíšneho pôvodu, ktoré môžu predstavovať ich potenciálny rezervoár a byť tak príčinou zdravotných problémov (Fracalanza et al., 2007).

Cieľom práce bolo kvantifikovať enterokoky prítomné v kravskom mlieku, identifikovať ich pomocou biochemických a molekulárnych metód, sledovať ich termorezistenciu a stanoviť rezistenciu voči vybraným druhom antibiotík používaných v liečbe ľudí.

MATERIÁL A METODIKA

Vzorky surového mlieka sa odoberali z cisterien zvozných vozidiel (n=18) a zo zásobných tankov (n =18). Vzorky

al. (2000). Elektroforetická separácia DNA fragmentov sa uskutočnila v 2 % agarózovom géli pri 200 V, 180 mA, 15 min.

Identifikované kmene rodu *Enterococcus* sp. sa podrobili hodnoteniu rezistencie na antibiotiká diskovou difúznou metódou na Mueller Hinton agare (*HiMedia Laboratories*, India) s použitím nasledovných antibiotických diskov a koncentráciou: Ampicilín 10 mcg/disk, Erytromycín 15 mcg/disk, Tetracyklín 30 mcg/disk, Teikoplanin 30 mcg/disk, Gentamicin 10 mcg/disk a Vankomycín 30 mcg/disk (*HiMedia Laboratories*, India). Zaradenie jednotlivých kmeňov medzi rezistentné, stredne rezistentné a citlivé sa uskutočnilo podľa kritérií CLSI (2006).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Tabuľka 1: Priemerné počty sledovaných skupín mikroorganizmov (CFU.ml⁻¹) v surovom a pasterizovanom mlieku

Sledovaná skupina	Priemerné počty sledovaných mikroorganizmov v CFU.ml ⁻¹		
	Cisternové vzorky (4-6 °C)	Vzorky zo zásobného tanku (6-10 °C)	Vzorky pasterizovaného mlieka
CPM	1,87. 10 ⁶	2,47. 10 ⁶	7,40.10 ¹
CPP	1,51. 10 ⁶	1,97. 10 ⁶	1,60.10 ¹
CPE	8,30. 10 ³	9,70. 10 ³	< 1.10 ¹

mlieka sa odobrali taktiež po pasterizácii mlieka (n=18). Odobraté vzorky sa následne vyšetrili štandardnou kultivačnou metódou. Celkový počet mezofilných mikroorganizmov (CPM) sa stanovil pri teplote 30 ± 1°C po 72 ± 2 hodinách kultivácie na GTK agare (*HiMedia Laboratories*, India). Počet psychrotrofných mikroorganizmov (CPP) sa stanovil po 10 dňovej kultivácii pri teplote 6,5 ± 1°C na GTK agare (*HiMedia Laboratories*, India) s prídavkom sušeného odstredeného mlieka. Počet enterokokov (CPE) sa zistil na selektívnom diagnostickom médiu Slanetz-Bartley (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) kultiváciou pri teplote 37 ± 1°C po 48 ± 2 hodinách kultivácie. Počty jednotlivých sledovaných skupín mikroorganizmov sa vyjadrili ako geometrický priemer.

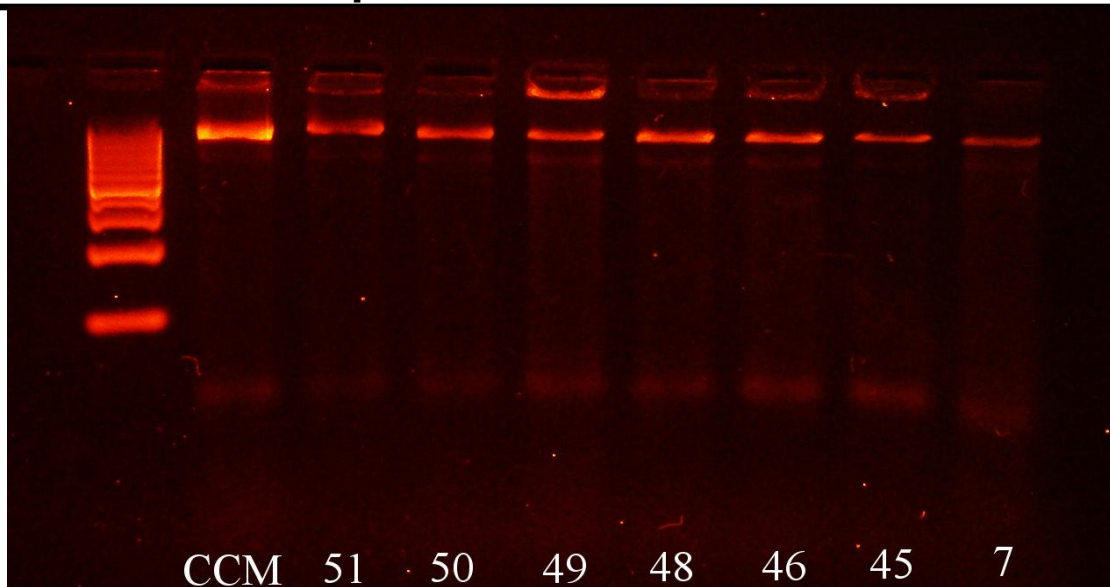
Suspektné kolónie enterokokov vyrastených na Slanetz – Bartley agare sa podrobili rodovému potvrdeniu rastom na selektívnom žľč-eskulín-azidovom médiu (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) po 24 hodinách kultivácie pri teplote 37 ± 1°C, negatívnym katalázovým a pozitívnym PYRA – testom (*Lachema*, Česká republika). Uskutočnilo sa potvrdenie príslušnosti ku G⁺ baktériam. Potvrdené kmene sa druhovo identifikovali pomocou komerčného EN-COCCUS testu (*Lachema*, Česká republika). Izoláty enterokokov identifikované pomocou EN-COCCUS testu (*Lachema*, ČR) ako druh *E. faecalis* sa podrobili potvrdeniu pomocou PCR metódy s použitím nasledovnej sekvencie primerov – For: ATC AAG TAC AGT TAG TCT, Rev: ACG ATT GAA AGC TAA CTG (941bp). Z čistej 24 hodinovej kultúry sa pomocou komerčného kitu InstaGene matrixu (*BioRad*, USA) pripravil lyzát z ktorého sa 5µl pridalo do 20µl mixu pripraveného z: 2,5µl 10 x PCR buffer (*Fermentas*, Germany), 0,5µl 10mM dNTP set (*Fermentas*, Germany), 2,5µl MgCl₂ (*Fermentas*, Germany), 0,2µl Taq polymerázy (*Fermentas*, Germany) a 0,5µl z každého 10pmol/µl primeru (*Fermentas*, Germany). Teplotný profil sa nastavil podľa Kariyama et

Priemerné počty sledovaných skupín mikroorganizmov v surovom a pasterizovanom mlieku sú uvedené v tabuľke 1. Počet enterokokov stanovený v cisternových vzorkách mlieka sa pohyboval v rozmedzí od 1,3.10³ do 2,9.10⁴ KTJ.ml⁻¹ a vo vzorkách zo zásobného tanku v rozmedzí od 2,1.10³ do 3,2.10⁴ KTJ.ml⁻¹.

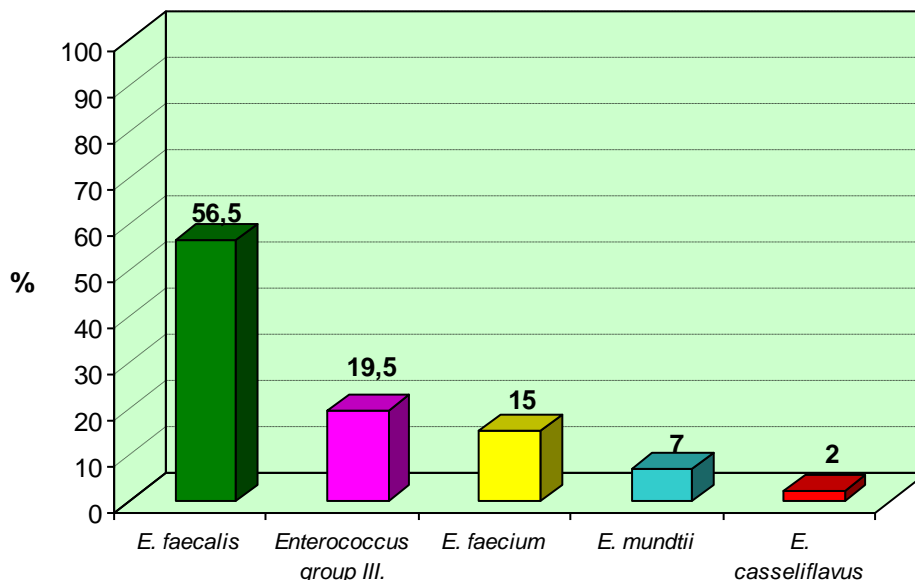
Počty sledovaných skupín mikroorganizmov sa v surovom mlieku počas skladovania zvyšovali.

Görner a Valík (2004) zistili v surovom kravskom mlieku počty enterokokov v rozmedzí 1,0.10⁴ – 5,0.10⁴ KTJ.ml⁻¹. Panfili et al. (2008) sledovali počty enterokokov pri skladovaní mlieka pri teplote 4 °C a následne pri teplote 22 °C. Z ich výsledkov vyplýva pomerne konštantný počet enterokokov pri nižšej teplote, kým pri teplote 22 °C sa ich počty zvyšovali. Na porovnanie, počet enterokokov v sledovaných vzorkách mlieka pochádzajúcich zo zásobného tanku sa zvýšil už pri teplote skladovania od 6°C do 10°C. Viacerí autori (Sorqvist, 2003; Görner a Valík, 2004; Fracalanza et al., 2007; Riboldi et al., 2009) uvádzajú tiež prítomnosť enterokokov v pasterizovanom mlieku. V nami odobratých vzorkách pasterizovaného mlieka (šetrná pasterizácia) sa prítomnosť enterokokov nepotvrdila.

Kučerová et al. (2009) sledovali prítomnosť a vlastnosti enterokokov v mlieku a mliečnych výrobkoch. Zistili nasledovné počty enterokokov: v surovom mlieku (n=6) 10³ - 10⁵ KTJ.ml⁻¹, v čerstvých syroch (n=5) 10² - 10⁶ KTJ.g⁻¹ a v polotučných syroch (n=5) 10³-10⁵ KTJ.g⁻¹. Z týchto izolovaných enterokokov identifikovali druhy *E. faecalis* a *E. faecium*. Z dostupných publikovaných výsledkov vyplýva, že v mliečnych výrobkoch sa najčastejšie vyskytujú druhy *E. faecalis* a *E. faecium* (Zago et al., 2009). V našich vzorkách mlieka odobratých z cisterny a zásobného tanku sa identifikovali druhy *E. faecalis*, *E. faecium*, *Enterococcus* group III., *E. mundtii* a *E. casseliflavus*. Identifikácia izolátov druhu *E.*



Obrázok 1: Potvrdenie druhu *E. faecalis* u 7 izolátov enterokokov pomocou PCR metódy 100bp DNA marker (*Fermentas*, Germany), *E. faecalis* CCM 4224, amplifikované produkty DNA izolátov *E. faecalis* (941bp).



Obrázok 2: Prehľad izolovaných druhov rodu *Enterococcus* (n=46) zo surového mlieka.

faecalis pomocou PCR metódy je znázornená na obrázku 1.

Druhové zastúpenie izolovaných kmeňov enterokokov (n=46) zo surového kravského mlieka je znázornené na obrázku 2. Izoláty druhu *E. faecalis* tvorili dominantnú časť vo vyšetovaných vzorkách surového mlieka z cisterny ako aj zo zásobného tanku. Tento druh podľa viacerých autorov (Teixeira et al., 2005; Gomes et al., 2008) sa najčastejšie izoluje z mliekarenských zariadení a mlieka.

Cítak et al. (2005) izolovali zo surového mlieka celkovo 177 izolátov, ktoré následne identifikovali pomocou API 20 Strep systému a biochemických testov. Podľa nich sa v mlieku najčastejšie vyskytovali druhy *E. faecalis* a *E. faecium*. Priamo zo surového mlieka alebo mliečnych

výrobkov izolovali aj druhy *E. durans*, *E. italicus* a *E. malodoratus* (Fortina et al., 2004). Na porovnanie Franz et al. (1999) z mliečnych výrobkov izolovali najmä druhy *E. faecalis* a *E. casseliflavus*. Cítak et al. (2006) uvádzajú ako najviac zastúpený druh v kravskom mlieku *E. faecalis* (54,2 %), nasledovaný druhom *E. faecium* (29 %), *E. durans* (6,2 %), *E. hirae* (5 %) a *E. gallinarum* (3 %).

Identifikované enterokoky, ktoré sa izolovali zo surového mlieka sa následne vyšetřili na rezistenciu voči antibiotikám: erytromycín, vankomycín, ampicilín, tetracyklín, teikoplanín a gentamicín. Testované kmene enterokokov preukázali najvyššiu citlivosť na teikoplanín (97,9 %). Izoláty testovaných kmeňov enterokokov preukázali najvyššiu rezistenciu na tetracyklín. Tieto

izoláty (n=7) sa pomocou biochemických testov a PCR s druhom *E. faecium*. Nedokázala sa rezistencia izolátov

Tabuľka 2: Citlivosť zástupcov rodu *Enterococcus* (n=46) izolovaných zo surového mlieka (z cisterien a zásobného tanku) na vybrané antibiotiká (vyjadrená v % izolátov)

DRUH ANTIBIOTIKA	CITLIVÉ	STREDNE REZISTENTNÉ	REZISTENTNÉ
Vankomycín 30 [mcg/disk]	95,5	-	4,5
Tetracyklín 30 [mcg/disk]	54,4	30,4	15,2
Teikoplanín 30 [mcg/disk]	97,9	2,1	0
Erytromycín 15 [mcg/disk]	87	6,5	6,5
Gentamicín 10 [mcg/disk]	60,9	30,4	8,7
Ampicilín 10 [mcg/disk]	6,5	89,1	4,4

analýzou identifikovali ako druh *E. faecalis*. Izoláty druhu *E. faecalis* mali taktiež rezistenciu aj na ostatné druhy antibiotík. Jeden izolát druhu *E. faecium*, preukázal antibiotickú rezistenciu len na ampicilín.

Citak et al. (2006) vo vzorkách surového mlieka zistili vysokú rezistenciu u enterokokov na erytromycín (95 %) a streptomycín (97 %). Valenzuela et al. (2008) taktiež zistili ako najčastejší druh rezistentný na antibiotiká izolovaný z mlieka a syrov *E. faecalis*. Rezistenciu potvrdili predovšetkým na rifampicín (8/9), na ciprofloxacín (6/9), levofloxacín (6/9), quinupristín/dalfopristín (6/9) a erytromycín (5/9). Nasledovala rezistencia na tetracyklín (4/9), nitrofurantoin (2/9), vankomycín (1/9) a streptomycín (2/9). Zistili vysoký počet izolátov *E. faecium* rezistentných na nitrofurantoin (12/16), ciprofloxacín (12/16), rifampicín (11/16) a levofloxacín (8/16). Nasledovala rezistencia na erytromycín (4/16), vankomycín (2/16), teikoplanín (2/16), quinupristín/dalfopristín (2/16), tetracyklín (1/16) a streptomycín (2/16). Medzi izolátmi oboch druhov nezistili rezistenciu na ampicilín, penicilín, chloramfenikol a gentamicín. Gomes et al. (2008) pri hodnotení brazílskych syrov zistili väčšiu rezistenciu na antibiotiká u izolátov druhu *E. faecalis* v porovnaní s *E. faecium*. U izolátov druhu *E. faecalis* zistili 31 % rezistentných na tetracyklín, 10 % na erytromycín a 22,5 % na gentamicín. Ako multi-rezistentné (gentamicín, erytromycín a tetracyklín) stanovili 3 izoláty *E. faecalis*. Taktiež zistili 3 vankomycín rezistentné izoláty, ale zároveň citlivé na ostatné testované antibiotiká. Rezistenciu druhu *E. faecium* zistili na antibiotiká tetracyklín (6,5 % izolátov) a na erytromycín (9 %). Výsledky Valenzuela et al. (2009) dokázali vysoký počet kmeňov enterokokov rezistentných na rifampicín, ciprofloxacín, levofloxacín, tetracyklín a erytromycín. Uvádzajú, že niekoľko izolátov *E. faecalis* a *E. faecium* prejavilo rezistenciu na všetky testované antibiotiká okrem vankomycínu. Citak et al. (2004) sledovali rezistenciu enterokokov voči 13 rôznym antibiotikám, pričom u väčšiny izolovaných enterokokov zistili rezistenciu na streptomycín, erytromycín, oxacilín a vankomycín. Na vankomycín zistili 96,8 % rezistentných izolátov *E. faecalis* a 7 % rezistentných izolátov *E. faecium*.

Naše výsledky potvrdili, že rezistencia na antibiotiká ampicilín, tetracyklín, erytromycín, gentamicín sa častejšie vyskytovala u izolátov druhu *E. faecalis* v porovnaní

druhu *E. faecalis* na teikoplanín. Vyššia variabilita antibiotickej rezistencie u *E. faecalis* môže byť spôsobená lepšou schopnosťou výmeny genetického materiálu druhu *E. faecalis* v porovnaní s inými druhmi enterokokov (Gomes et al., 2008).

ZÁVER

Výsledky práce potvrdili, že enterokoky patria k bežným kontaminantom surového mlieka, pričom ich virulencia a antibiotická rezistencia predstavuje negatívny aspekt ich výskytu v mlieku. Na základe uvedených výsledkov možno tiež konštatovať, že jednotlivé kmene enterokokov prejavili rôznu antibiotickú rezistenciu k sledovaným antibiotikám. Prítomnosť enterokokov s klinicky významnou rezistenciou na antibiotiká preto indikuje potrebu efektívnej stratégie kontroly na zníženie kontaminácie týmito mikroorganizmami v potravinách živočíšneho pôvodu, ktoré môžu predstavovať ich potenciálny rezervoár a byť tak príčinou zdravotných problémov. Vzhľadom k známej schopnosti enterokokov odolávať pôsobeniu nepriaznivých vonkajších podmienok je potrebné nepodceňovať a dodržiavať všetky zásady hygieny a sanitácie pri získavaní a spracovaní mlieka a tak obmedziť šírenie enterokokov do potravinového reťazca aj vzhľadom v poslednom období často dokazovanej rezistencii na antibiotiká.

LITERATÚRA

- BATISH, V. K., CHANDER H., RANGANATHAN, B. 2006. Heat resistance and other characteristics of deoxyribonuclease positive Enterococci isolated from milk and milk products. In *Journal of Food Science*, vol. 50 (3), 2006, p. 834 – 835.
- CITAK, S., YUCEL, N., ORHAN, S. 2004. Antibiotic resistance and incidence of *Enterococcus* species in Turkish white cheese. In *International Journal of Dairy Technology*, vol. 57 (1), 2004, p. 27.
- CITAK, S., YUCEL, N., MENDI, A. 2005. Antibiotic resistance of enterococcal isolates in raw milk. In *Journal of Food Processing and Preservation*, vol 29, 2005, p. 183–195.
- CITAK, S., GUNDOGAN, N., MENDI, A. 2006. Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw milk samples in Turkey. In *Milchwissenschaft*, vol. 61 (2), 2006, p. 150-152.
- CLSI, 2006. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Ninth Edition, M2

- A9. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA, 37 s.
- COGAN, T. M., REA, M. C., GELSONIMO, R. et al. 2001. Enterococci in food fermentation: Functional and safety aspects. In *Armis* (online). 2001, no. 4547 (cit. 2001-08-30) p. 120-130.
- FORTINA, M. G., RICCI, G., MORA, D. et al. 2004. Molecular analysis of artisanal Italian cheeses reveals *Enterococcus italicus* sp. nov. In *International Journal of Evolutionary Microbiology*, vol. 54, 2004, p. 1717-1721.
- FOULQUIE MORENO, M. R., SARATINOPOULUS, P., TSAKALIDOU, E. et al. 2006. The role and application of enterococci in food and health. In *International Journal of Systematic Bacteriology*, vol. 106, 2006, p. 1-24.
- FRACALANZZA, S. A. P., SCHEIDEGGER, E. M. D., DOS SANTOS P. F. et al. 2007. Antimicrobial resistance profiles of enterococci isolated from poultry meat and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. In: *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, vol. 102 (7), 2007, p. 853-859.
- FRANZ, C. M. A. P., HOLZAPFEL, W. H., STILES, M. E. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety? In *International Journal Food Microbiology*, vol. 47, 1999, p. 1-24.
- GELSOMINO, R., VANCANNEYT, M., COGAN, T. M., et al. 2002. Sources of Enterococci in Farmhouse Raw-Milk Cheese. In *Applied and Environmental Microbiology*, vol. 68 (7), 2002, p. 3560-3565.
- GIRAFFA, G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 88, 2003, p. 212-222.
- GOMES, B. C., ESTEVES, C. T., PALAZZO, I. C. V. et al. 2008. Prevalence and characterization of *Enterococcus* spp. isolated from Brazilian foods. In *Food Microbiology*, vol. 25 (5), 2008, p. 668 – 675.
- GÖRNER, C., VALÍK, E. 2004. *Aplikovaná mikrobiológia požívatin*. Bratislava: Malé Centrum, 2004, 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
- GREIFOVÁ, M., GREIF, G., LEŠKOVÁ, E. et al. 2003. Enterokoky – ich hodnotenie v mliekarenskej technológii. In *Mliekarstvo*, roč. 34 (2), 2003, s. 42-44.
- HUYS, G. D., HAENE K., COLLARD, J. C. et al. 2004. Prevalence and molecular characterization of tetracycline resistance in *Enterococcus* isolates from food. In *Applied Environmental Microbiology*, vol. 70, 2004, p. 1555-1562.
- JARČUŠKA, P., NOVOTNÝ, R., KYSLAN, K. et al. 2006. Rezistencia na antiinfektíva – známe a neznáme aspekty. In *Slovenský veterinársky časopis*, roč. 31 (6), 2006, s. 37-38.
- KAGKLI, D. M., VANCANNEYT, M., VANDAMME, P. 2007. Contamination of milk by enterococci and coliforms from bovine faeces. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 103 (5), 2007, p. 1393-1405.
- KARIYAMA, R., MITSUHATA, R., CHOW, J. W. et al. 2000. Simple a reliable multiplex PCR assay fo surveillance isolates of vancomycin-resistant Enterococci. In *J. Clin. Microbiol.*, vol. 38, 2000, p. 3092-3095.
- KUČEROVÁ, K., SVOBODOVÁ, H., TŮMA, Š. et al. 2009. Production of Biogenic Amines by Enterococci. In *Czech Journal of Food Science*, vol. 27, 2009, special issue 2., p. 50-55.
- ORTIGOSA, M., IRIGOYEN, A., URDIN, M., et al., 2008. Sources of enterococci in Idiazábal-type cheese. In *International Journal of Food Microbiology*, vol. 125 (2), 2008, p. 146-152.
- PANFILI, G., FRATIANNI, A., DI CRISCIO T. et al. 2008. Influence of microorganisms on retinol isomerization in milk. In *Journal of Dairy Research*, vol. 75 (1), 2008, p. 37-43.
- RIBOLDI G. P., FRAZZONI, J., D'AZEVEDO, P. A. et al., 2009. Antimicrobial resistance profile of *Enterococcus* spp. isolated from food in Southern Brazil. In *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 40, 2009, p. 125-128.
- SORQVIST, S. 2003. Heat resistance in liquids of *Enterococcus* spp., *Listeria* spp., *Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. In *Acta Veterinaria Scandinavica*, vol. 44 (1-2), 2003, p. 1-19.
- ŠUSTÁČKOVÁ, A., NÁPRAVNÍKOVÁ, E., NAVRÁTILOVÁ, et al., 2003. Potraviny živočišného pôvodu jako vektor rezistence k antibakteriálním látkam. In *Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe*, zborník z medzinárodného vedeckého seminára, Nitra: 2003, s. 328-342.
- TEIXEIRA, P., LOPES, Z., AZEREDO, J. 2005. Physico-chemical surface characterization of a bacterial population isolated from a milking machine. In *Food Microbiology*, vol. 22 (2-3), 2005, p. 247-251.
- VALENZUELA, A. S., OMAR, N. B., ABRIOUEL, H. et al. 2008. Risk factors in enterococci isolated from foods in Morocco: Determination of antimicrobial resistance and incidence of virulence traits. In *Food and Chemical Toxicology*, vol. 49 (8), 2008, p. 2648-2652.
- VALENZUELA, A. S., OMAR, N. B., ABRIOUEL, H. et al. 2009. Virulence factors, antibiotic resistance, and bacteriocins in enterococci from artisan foods of animal origin. In *Food Control*, vol. 20, 2009, p. 381-385.
- ZAGO, M., BONVINI, B., CARMINATI, D. et al. 2009. Detection and quantification of *Enterococcus gilvus* in cheese by real-time PCR In *Systematic and Applied Microbiology*, vol. 32, 2009, p. 514-521.

Pod'akovanie

Práca sa riešila za finančnej podpory grantovej výskumnej úlohy VEGA projektu č. 1/0410/09.

Kontaktná adresa: Ing. Jana Fabianová, LEVICKÉ MLIEKÁRNE a.s., Júrska cesta č. 2, Levice, 934 01. e-mail: jfabianova@levmilk.sk