

Výsledky senzoričského hodnocení navržených výrobků jsou uvedeny v tab. II. Přestože byly senzoričskému panelu předloženy čerstvě připravené vzorky, výrobkům se sladovým výtažkem byla vytýkána zejména silná sladová pachuť. Ukázalo se rovněž, že je ochucení slady v různé formě obtížné skombinovat s dalšími příchutěmi.

U vzorku fermentovaného kulturou *Ent. durans* CCDM 922 někteří členové senzoričského panelu hodnotili negativně jeho mírnou slizovitost. Přítomnost zcukřeného sladu zřejmě stimulovala tvorbu exopolysacharidů, která byla vyšší než při kultivaci v samotném mléce. Přesto by tento výrobek zakoupilo nejvíce hodnotitelů (73 %).

## Závěr

Diskutovány byly různé způsoby aplikace sladů do fermentovaných mléčných výrobků. Jako nejvhodnější se jeví použití zrn zcukřeného sladu světlého typu s minimální enzymatickou aktivitou. Žádoucí je důkladné tepelné ošetření sladové ochucující složky nebo její oddělení balení. Ochucení slady není vhodné kombinovat s dalšími příchutěmi, výrobek je však možné dosladit. Recepturu a technologický postup lze optimalizovat a dosáhnout spotřebitelsky atraktivního výrobku.

Neprokázal se pozitivní vliv sladového výtažku nebo zrn zcukřeného sladu na růst nebo přežívání zákysových kultur ve fermentovaných mléčných výrobcích, a to žádným z předpokládaných mechanismů (tzn. lepší dostupnost živin působením enzymů za sladu, adherence na nerozpustnou vlákninu, utilizace prebiotických oligosacharidů).

## Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou NAZV, projekt QI101B090, program VAK.

## Literatura

- Basařová, G., Šavel, J., Basař, P., Lejsek, T.: Pivovarství: teorie a praxe výroby piva. VŠCHT Praha, 2010, ISBN 978-80-7080-734-7.
- ČSN 56 0100 Mikrobiologické zkoušení poživatin, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. ČNI, Praha, 1994.
- ČSN ISO 7889 Jogurt - Stanovení počtu charakteristických mikroorganismů - Technika stanovení počtu kolonií při 37 °C. ČNI, Praha, 2004.
- Guergoletto, K.B., Magnani, M., Martin, J.S., Tardeli de Jesus Androde, C.G., Garcia, S.: Survival of *Lactobacillus casei* (LC-1) adhered to prebiotic vegetal fibres. *Innov. Food Sci. & Emerg. Technol.* 11/2 (2010): 415 - 421.
- Charalampopoulos, D., Wung, R., Pandiella, S.C., Webb, C.: Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *Int. J. Food Microbiol.* 79/1-2 (2002): 131 - 141.
- International IDF Standard 149A Dairy starter cultures of lactic acid bacteria (LAB) - Standard of identity. FIL-IDF, Brussels, Belgium, 1997.
- Pokorný, J.: Metody senzoričské analýzy potravin a stanovení senzoričské jakosti. 1. st. ed., ÚZPI Praha, 1993, ISBN 80-85120-34-8.
- PUV 2013-27880: Fermentovaný mléčný výrobek s přídavkem zcukřeného sladu. Původci: Němečková, I., Kejmarová, M., Hanušová, J., Hartman, I. Úřad průmyslového vlastnictví, Praha, 2013.
- RU2003133431: Composition based on fermented milk product for baby nutrition. Původci: Pas ko, O.V., Gavrilova, N.B., Grechuk, E.J. European Patent Office, 2005.
- Saman, P., Vázquez, J.A., Pandiella, S.S.: Controlled germination to enhance the functional properties of rice. *Process. Biochem.* 43/12 (2008): 1377 - 1382.

Přijato do tisku 21. 5. 2013

Lektrováno 3. 6. 2013

# CHARAKTERISTIKA *ESCHERICHIA COLI* V PRVÝROBĚ MLÉKA

Mgr. Skočková Alena<sup>1</sup>, Mgr. Bogdanovičová Kateřina<sup>1</sup>,  
MVDr. Koláčková Ivana, PhD.<sup>2</sup>,  
RNDr. Vyletěllová Marcela, PhD.<sup>3</sup>,  
Ing. Němečková Irena, PhD.<sup>3</sup>,  
Doc. Šustová Květoslava, PhD.<sup>4</sup>,  
Doc. MVDr. Karpíšková Renáta, PhD.<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Fakulta veterinární hygieny a ekologie, Veterinární a farmaceutická univerzita, Brno

<sup>2</sup> Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i. Brno

<sup>3</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>4</sup> Mendelova univerzita v Brně

Kontaktní adresa: Mgr. Alena Skočková, Ústav hygieny a technologie mléka, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Česká republika  
Telefon: +420775023327, E-mail: H10380@vfu.cz

## Characteristic of *Escherichia coli* in dairy farms

### Souhrn

Práce je zaměřena na charakterizaci *Escherichia coli* izolovaných ze syrového kravského mléka (n = 84) a mléčných filtrů (n = 73). Byla zjišťována rezistence k antimikrobiálním látkám a přítomnost vybraných genů virulence a rezistence. Úroveň antibiotické rezistence u získaných izolátů byla nízká, nejčastěji byla zjištěna rezistence k ampicilinu a tetracyklinu. Žádný ze sledovaných genů virulence nebyl detekován. Na jedné farmě byla potvrzena přítomnost kmenů s geny kódujícími rezistenci k tetracyklinům *tetA* a *tetB* a rezistenci k β-laktamům gen *bla<sub>SHV</sub>*. Tyto izoláty jsou možným rezervoárem genů rezistence, které se mohou šířit prostřednictvím potravinového řetězce.

**Klíčová slova:** Rezistence, geny virulence, mléko, mléčný filtr

### Summary

This study is focused on the characterization of *Escherichia coli* isolates obtained from the raw cow's milk (n = 84) and milk filters (n = 73). Resistance to antimicrobial agents and detection of selected resistance and virulence genes was performed. The level of antibiotic resistance in obtained isolates was low, resistance to ampicillin and tetracycline was detected the most often. No observed virulence genes were detected. Resistance genes encoding resistance to tetracycline *tetA* and *tetB* and the gene *bla<sub>SHV</sub>* encoding resistance to β-lactams were detected in isolates originating from the same farm. Such strains may represent a reservoir of resistance genes spreading through the food chain.

**Key words:** Resistance, virulence genes, milk, milk filter

## Úvod

Baktérie *E. coli* je běžnou součástí intestinální mikroflóry lidí i teplokrevných zvířat, ale může být i organismem patogenním (Costa a kol., 2009). Úroveň antibiotické rezistence *E. coli* je považována za vhodný indikátor selekčního tlaku způsobeného užíváním antibiotik (Lei a kol., 2010) a při mikrobiologické analýze potravin a surovin bývá přítomnost *E. coli* používána k posouzení jejich hygienické kvality.

Cílem práce bylo porovnat vlastnosti *E. coli* získaných z mléka a mléčných filtrů z mléčných farem se zaměřením na zhodnocení rezistence k antimikrobiálním látkám a detekci genů kódujících vybrané faktory virulence a geny rezistence.

## Materiál a metodika

V období květen 2012 - leden 2013 bylo odebráno a vyšetřeno 49 vzorků syrového kravského mléka z 16 farem a 44 mléčných filtrů z 10 farem v České republice. Všechny vzorky byly odebírány v pravidelných časových intervalech v průběhu laktace. Mléko bylo odebráno do sterilních vzorkovnic a převáženo v izotermických obalech do laboratoře k okamžitému zpracování.

Detekce *E. coli* byla prováděna po pomnožení vzorku v pufované peptonové vodě (Oxoid, VB) při 37 °C po dobu 24 hodin s následnou kultivací na TBX agaru (44 °C, 24 h). Z každého pozitivního vzorku byly do studie zařazeny 1 - 3 izoláty suspektních *E. coli*. Konfirmace suspektních izolátů spočívala v detekci oxidázy (OXItest, Erba-Lachema, ČR) a v posouzení tvorby indolu (COLItest, Erba-Lachema, ČR).

Diskovou difúzní metodou byla testována rezistence k 13 terapeuticky významným antimikrobiálním látkám patřícím do skupin:  $\beta$ -laktamy (ampicilin, amoxicilin/klavulanová kyselina, cefotaxim), amfenikoly (chloramfenikol), aminoglykosidy (streptomycin, kanamycin, gentamycin), antimetabolity (sulfometoxazol/trimetoprim, trimetoprim), tetracykliny (tetracyklin), chinolony a fluorchinolony (nalidixová kyselina, ciprofloxacín) a polymyxiny (kolistin). Chloramfenikol se nepoužívá k léčbě hospodářských zvířat, ale pro komplexní pohled byla sledována rezistence i k této látce. Stanovení bylo provedeno podle metodiky CLSI (2006a), antibiotické disky s koncentrací antibiotik od 5 do 30  $\mu$ g byly získány od firmy Oxoid (VB). Na základě velikosti inhibičních zón byly izoláty vyhodnoceny jako citlivé, intermediálně rezistentní nebo rezistentní dle kritérií uvedených v CLSI (2006b).

K detekci genů kódujících vybrané faktory virulence - *eaeA*, *hly*, *stx<sub>1</sub>* a *stx<sub>2</sub>*, genů rezistence k tetracyklinu - *tetA*, *tetB*, *tetC* a *tetG* a k  $\beta$ -laktamovým antibiotikům - *bla<sub>TEM</sub>*, *bla<sub>SHV</sub>*, *bla<sub>CTX</sub>*, byla použita polymerázová řetězová reakce (PCR). K detekci *tet* genů byly použity primery uvedené autory Ng et al. (2001), k detekci *bla* genů primery uvedené autory Briñas et al. (2002) a Lewis et al. (2007). Reakční

objem činil 25  $\mu$ l a k amplifikaci byla použita *taq*-Purple DNA polymeráza s MgCl<sub>2</sub> (Top-Bio, ČR). Detekce faktorů virulence byla provedena pomocí multiplex PCR podle autorů Fagan et al. (1999), v 25  $\mu$ l reakční směsi byl použit PCR QIAGEN Master mix (Qiagen, Německo). Produkty PCR byly analyzovány gelovou elektroforézou v 1,5% agaróze (Serva, Německo) s následnou vizualizací na transiluminátoru po obarvení ethidium bromidem.

## Výsledky a diskuse

Baktérie *E. coli* byla detekována u 47 (95,9 %) vzorků syrového kravského mléka a 42 (95,5 %) mléčných filtrů. Pouze 2 bazénové vzorky mléka a 2 mléčné filtry ze dvou farem byly negativní na přítomnost *E. coli*. Celkem bylo získáno 157 izolátů *E. coli* (syrové kravské mléko: n = 84; mléčný filtr: n = 73).

Pouze 20,2 % izolátů z mléka a 16,4 % izolátů z filtrů bylo rezistentních k minimálně jedné antimikrobiální látce. Výsledky diskové difúzní metody jsou znázorněny v tabulce 1. K antimikrobiálním látkám v tabulce neuvedených, byly izoláty *E. coli* citlivé.

**Tab. 1** Výskyt rezistentních izolátů *Escherichia coli* v mléce a mléčných filtrech

Antimikrobiální látka	Obsah disku	Mléko (n=84)		Filtry (n=73)	
		n	%	n	%
Ampicilin (AMP)	10	12	14,3	5	6,8
Amoxicilin/klavulanová kys. (AMC)	30	0	0	1	1,4
Streptomycin (STR)	10	2	2,4	3	6,1
Sulfometoxazol/trimetoprim (SXT)	25	1	1,2	0	0
Trimetoprim (TMP)	5	5	6,0	3	4,1
Tetracyklin (TET)	30	5	6,0	8	11,0

Metodou PCR byla prokázána přítomnost genů *tetA*, *tetB* zodpovědných za rezistenci k tetracyklinu u 5 izolátů z mléka (6,0 %) a u 8 izolátů z mléčných filtrů (11,0 %). Kromě jednoho izolátu pocházely všechny z opakovaně odebíraných vzorků z jedné farmy v Moravskoslezském kraji. Geny *tetA* a *tetB* kódují energeticky závislý efflux systém, který je nejčastějším mechanismem rezistence k tetracyklinům mezi gramnegativními baktériemi. Tyto geny mohou být lokalizované na mobilních genetických elementech, takže se v prostředí snadno šíří (Tuckman a kol., 2007). V mléčném filtru získaném ze stejné farmy byl detekován také jeden kmen nesoucí gen zodpovědný za rezistenci k  $\beta$ -laktamům *bla<sub>SHV</sub>*. Tyto geny kódující produkci enzymů  $\beta$ -laktamáz mohou být taktéž lokalizovány na mobilních genetických elementech (Bennett, 2008; Ojer-Usoz a kol., 2013).  $\beta$ -laktamová a tetracyklinová antibiotika jsou široce využívána v chovech hospodářských zvířat, proto rezistence k těmto skupinám antimikrobiálních látek komplikuje léčbu bakteriálních chorob např. mastitid (Sawant a kol., 2007). Přítomnost genů virulence nebyla detekována u žádného z izolátů.

## Závěr

Z uvedených výsledků vyplývá, že bakterie *E. coli* se v syrovém kravském mléce a mléčných filtrech běžně vyskytují. U žádného ze získaných izolátů však nebyla zjištěna přítomnost sledovaných genů virulence, které bývají detekovány u Shigatoxin produkujících kmenů. U izolátů *E. coli* pocházejících z jedné farmy byla zjištěna přítomnost genů *tetA*, *tetB* a *bla<sub>SHV</sub>*. Tyto geny se mohou přenášet horizontálně i na další gramnegativní bakterie a proto představují potenciální riziko jejich dalšího šíření v potravinovém řetězci.

**Poděkování:** Práce vznikla za finanční podpory projektů KUS QJ 1230044, AdmireVet CZ.1.05/2.1.00/01.0006 - ED0006/01/01 a IGA 15/2013/FVHE.

## Literatura

- BENNETT P. M. (2008): Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, 153, s. 347-357.
- BRI?AS L., ZARAZAGA M., SÁENZ Y., RUIZ-LARREA F., TORRES C. (2002):  $\beta$ -lactamases in ampicillin-resistant *Escherichia coli* isolates from foods, humans, and healthy animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 46, s. 3156-3160.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006a): *Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition*. Clinical and Laboratory Standards Institute dokument M2-A9. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 37 s.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2006b): *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Sixteenth Informational Supplement*. Clinical and Laboratory Standards Institute dokument M100-S16. Wayne, PA, USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 183 s.
- COSTA D., VINUÉ L., POETA P., COELHO A. C., MATOS M., SÁENZ Y., SOMALO S., ZARAZAGA M., RODRIGUES J., TORRES C. (2009): Prevalence of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli* isolates in faecal samples of broilers. *Veterinary Microbiology*, 138, s. 339-44.
- FAGAN P. K., HORNITZKY M. A., BETTELHEIM K. A., DJORDJEVIC S. P. (1999): Detection of shiga-like toxin (*stx1* and *stx2*), intimin (*eaeA*), and enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) hemolysin (EHEC *hlyA*) genes in animal feces by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, s. 868-872.
- LEI T., TIAN W., HE L., HUANG X. H., SUN Y. X., DENG Y. T., SUN Y., LV D. H., WU C. M., HUANG L. Z., SHEN J. Z., LIU J. H. (2010): Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from food animals, animal food products and companion animals in China. *Veterinary Microbiology*, 146, s. 85-89.
- LEWIS J. S. II, HERRERA M., WICKES B., PATTERSON J. E., JORGENSEN J. H. (2007): First report of the emergence of CTX-M-type extended-spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBLs) as the predominant ESBL isolated in a U.S. health care system. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, s. 4015-4021.
- NG L. K., MARTIN I., ALFA M., MULVEY M. (2001): Multiplex PCR for the detection of tetracycline resistant genes. *Molecular and Cellular Probes*, 15, no. 4, s. 209-215.
- OJER-USOZ E., GONZÁLEZ D., VITAS A. I., LEIVA J., GARCÍA-JALÓN I., FEBLES-CASQUERO A., ESCOLANO MDE L. (2013): Prevalence of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in meat products sold in Navarra, Spain. *Meat science*, 93, no. 2, s. 316-321.
- SAWANT A. A., HEGDE N. V., STRALEY B. A., DONALDSON S. C., LOVE B. C., KNABEL S. J., JAYARAO B. M. (2007): Antimicrobial-resistant enteric bacteria from dairy cattle. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, s. 156-163.
- TUCKMAN M., PETERSEN P. J., HOWE A. Y. M., ORLOWSKI M., MULLEN S., CHAN K., BRADFORD P. A., JONES C. H. (2007): Occurrence of tetracycline resistance genes among *Escherichia coli* isolates from the phase 3 clinical trials for tigecycline. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 51, s. 3205-3211.

Přijato do tisku 21. 5. 2013

Lektorováno 6. 6. 2013

## IDENTIFIKACE MIKROBIÁLNÍCH PŮVODCŮ VAD MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ MODERNÍMI MOLEKULÁRNĚ-BIOLOGICKÝMI METODAMI

Iva Jebavá<sup>1</sup>, Sabina Purkrtová<sup>2</sup>, Jana Hanušová<sup>3</sup>, Dana Savická<sup>2</sup>, Eva Šviráková<sup>1</sup>, Irena Němečková<sup>3</sup>, Kateřina Demnerová<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Ústav mléka, tuků a kosmetiky, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>2</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>3</sup> Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

### Identification of microbial agents causing defects of dairy products by modern molecular-biological methods

#### Abstrakt

Mezi mikrobiální původce různých vad mlékárenských výrobků a surovin patří často zdravotně i technologicky rizikové bakterie (např. *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), ale také kvasinky (např. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Sporobolomyces* sp., *Yarrowia* sp.) a nejružnější plísně. Některé mikroorganismy mohou být někdy obtížně detekovatelné klasickými kultivačními mikrobiologickými metodami, které jsou časově náročné. Vhodnou alternativu k těmto metodám představují moderní molekulárně-biologické metody, poskytující vysoce spolehlivé výsledky v relativně rychlém čase. V této práci byly rizikové bakterie a kvasinky, izolované z mlékárenských výrobků a surovin, identifikovány pomocí třech různých metod (sekvenční analýzy vybraných genů rRNA, metody MALDI-TOF MS a biochemických testů). Výsledky získané z experimentů této práce mohou být uplatnitelné v oblasti zvyšování jakosti mlékárenských výrobků, a také při zajišťování úrovně výrobního standardu, za pomoci vhodných metod aplikovatelných v praxi.

**Klíčová slova:** sekvenční analýza genů rRNA, MALDI-TOF MS, biochemické testy, identifikace, bakterie, kvasinky

#### Abstract

Microbial agents of various defects of dairy products and raw materials are often classified as healthy and technologically hazardous bacteria (e.g. *Staphylococcus* sp., *Serratia* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Clostridium* sp.), but also yeasts (e.g. *Candida* sp., *Cryptococcus* sp., *Debaryomyces* sp., *Sporobolomyces* sp., *Yarrowia* sp.) and various moulds. Some microorganisms may be detected