



TVORBA BIOFILMU KVASINEK IZOLOVANÝCH ZE SYROVÉHO MLÉKA A ÚČINNOST DEZINFEKČNÍCH PROSTŘEDKŮ

Marcela Klimešová¹, Hana Nejeschlebová¹,
Ivana Kucharovičová², Petr Roubal¹, Růžena Seydlová¹

¹ Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

² Státní veterinární ústav, Jihlava

Biofilm production of yeasts isolated from raw milk and effect of disinfectants

Abstrakt

Z bazénových vzorků mléka (n = 521) byly identifikovány a vybrány následující druhy kvasinek: *K. marxianus* (n = 12), *C. inconspicua* (n = 10), *P. kudriavzevii* (n = 20), *P. fermentans* (n = 11), *C. albicans* (n = 7), *C. parapsilosis* (n = 5), *C. rugosa* (n = 5), *C. guilliermondii* (n = 4), *C. tropicalis* (n = 11), *C. famata* (n = 3), *C. lusitaniae* (n = 4), *C. glabrata* (n = 2) a *Y. lipolytica* (n = 10). U všech kmenů byla hodnocena intenzita tvorby biofilmu a účinek dezinfekčních prostředků (Cid™Liquid acid detergent a Super Liquidalkaline detergent) na eliminaci biofilmu. Tvorba biofilmu byla potvrzena u všech druhů, vyjma *K. marxianus*, *C. inconspicua* a *C. glabrata*. Z výsledků účinnosti dezinfekčních prostředků lze konstatovat, že testované prostředky byly ve všech případech účinné, ale žádný z nich biofilm úplně neodstranil.

Klíčová slova: kravské mléko; kvasinky; biofilm; dezinfekce

Abstract

The following yeast species were identified and selected from bulk tank milk samples (n = 521): *K. marxianus* (n = 12), *C. inconspicua* (n = 10), *P. kudriavzevii* (n = 20), *P. fermentans* (n = 11), *C. albicans* (n = 7), *C. parapsilosis* (n = 5), *C. rugosa* (n = 5), *C. guilliermondii* (n = 4), *C. tropicalis* (n = 11), *C. famata* (n = 3), *C. lusitaniae*

(n = 4), *C. glabrata* (n = 2) a *Y. lipolytica* (n = 10). The intensity of biofilm formation and the effect of disinfectants (Cid™Liquid acid detergent and Super Liquidalkaline detergent) on biofilm elimination were evaluated for all strains. Biofilm formation was confirmed in all species except *K. marxianus*, *C. inconspicua* and *C. glabrata*. From the results of the effectiveness of disinfection agents, it can be stated that the tested disinfectants were effective in all cases, but none of them completely removed the biofilm.

Keywords: cow milk; yeast; biofilm; disinfectant

Úvod

Biofilmy jsou společenství mikroorganismů stejného nebo různého druhu, které se vyskytují v nejrůznějších prostředích, jako je zdravotnictví, průmyslová odvětví (mlékárna) nebo i prvovýroba mléka (Aalbaek a kol., 1994; Dworecka-Kaszak a kol., 2012). Tato společenství mohou být prospěšná (např. čistička odpadních vod) nebo naopak problematická (např. zdravotnictví nebo potravinářský průmysl; Klaban, 2001). Biofilmy usnadňují mikroorganismům přežití v nepříznivějším období (sucho, nedostatek živin) a chrání je rovněž i před účinkem dezinfekčních prostředků nebo antibiotik (Algburi a kol., 2017; Bridier a kol., 2011). Tento mikro-ekosystém je zdrojem jak nežádoucích patogenních mikroorganismů (např. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Candida albicans*, *Pseudomonas aeruginosa*), tak technologicky problematických (např. tvorba proteolytických enzymů u *Pseudomonas fluorescens*). K nejzávažnějším mikroorganismům patří pak kmeny rezistentní k antibiotikům, které mohou šířit geny rezistence prostřednictvím plasmidů a to mezidruhově i mezirodově bez ohledu na to, zda se tyto mechanismy rezistencí vyskytují u patogenních či nepatogenních bakterií (Forbes a Schaberg, 1983; Karpíšková a Štátsková, 2009; Bloemendaal a kol., 2010; Vaidya, 2011). Kvasničková a kol. (2016) popisují původce tzv. biofilmových infekcí, mezi které řadí koagulasa-negativní stafylokoky, *S. aureus*, zástupce streptokoků, především *Streptococcus gallolyticus* subsp. *gallolyticus*, méně často *Streptococcus pneumoniae*, enterokoků, gramne-

gativních bacilů (např. *Escherichia coli*, *P. aeruginosa*) a anaerobních bakterií (např. *Clostridium* spp., *Bacteroides fragilis*, *Peptostreptococcus* spp. a *Actinomyces* spp.), a z mykobakterií lze uvést *Mycobacterium tuberculosis* (Ojha a kol., 2008). Nejčastějšími původci infekcí ze skupiny eukaryotních mikroorganismů jsou kvasinky *Candida albicans* a *Candida parapsilosis* a zástupci plísní *Aspergillus* spp. (Azzam a kol., 2009; Cavalheiro a Teixeira, 2018). Jako další druhy izolované z klinického materiálu, které však nejsou v žádné souvislosti s prvovýrobou mléka, byly popsány i kvasinky testované v naší studii: *Pichia kudriavzevii*, *Candida tropicalis*, *Candida glabrata*, *Candida famata* (seps), *Candida rugosa* (izolace z moči a krve hospitalizovaných pacientů chirurgického oddělení), *Kluyveromyces marxianus*, *Candida guilliermondii*, *Candida inconspicua*, *Candida lusitaniae* (hematologické malignity), *Pichia fermentans*, *Yarrowia lipolytica* (onkologické onemocnění), (Pfaller a kol., 2006; Girmenia a kol., 2006; Guitard a kol., 2013; Dufresne a kol., 2014; Douglass a kol., 2018; Wawrysiuk a kol., 2018; Karapetsa a kol., 2019; Noni a kol., 2020; Megri a kol., 2020; Piatti a kol., 2021).

Práce byla zaměřena na potvrzení tvorby biofilmů zástupců rodu *Candida*, *Kluyveromyces*, *Pichia* a *Yarrowia* izolovaných z bazénového kravského mléka a na zjištění účinnosti dezinfekčních prostředků používaných v prvovýrobě mléka.

Materiál a metody

Původ vzorků a druhová identifikace

Bazénové vzorky syrového kravského mléka (n = 521) byly odebírány v letech 2019 a 2020 z 9 mlékáren v ČR. V laboratoři SVÚ Jihlava byla provedena kultivace na Sabouradově agaru (HiMedia, Indie) pro kvalitativní mikrobiologické vyšetření kvasinek (SOP Var. 19 – Kultivační media pro identifikaci plísní a kvasinek metodou MALDI-TOF MS). Kultivace proběhla při teplotě 25 ± 1 °C po dobu 3-5 dnů. Z odebraných vzorků bylo izolováno 51 druhů kvasinek, které byly dále identifikovány metodou MALDI-TOF MS (Biotyper Microflex LT/SH, Bruker, Německo) přímým nátěrem na desku za použití Matrix HCCA, portioned (kyselina α -kyan-4-hydroxysořicové). Pro vyhodnocení byl použit SW MBT Compass 4.1. (Build (100)), flex Control Version 3.4. (Build 204.10). Kmeny byly zamrazeny na teplotu -80 °C a jsou uloženy ve sbírce SVÚ Jihlava.

Tvorba biofilmu

Ze všech identifikovaných kvasinek byly náhodně vybrány následující druhy tak, aby jen nepocházely z jedné mlékárny: *K. marxianus* (dříve *C. kefir*; n = 12), *C. inconspicua* (n = 10), *P. kudriavzevii* (dříve *C. krusei*; n = 20), *P. fermentans* (dříve *C. lambica*; n = 11), *C. albicans* (n = 7), *C. parapsilosis* (n = 5), *C. rugosa* (n = 5), *C. guilliermondii* (n = 4), *C. tropicalis* (n = 11), *C. famata* (n = 3), *C. lusitaniae* (n = 4), *C. glabrata*

(n = 2) a *Y. lipolytica* (n = 10). Podrobný seznam testovaných kmenů je uveden v Tabulce 1. Postup zkoušky byl proveden dle Djordevic a kol. (2002) a podrobněji je popsán i v práci Klimešová a kol. (2020). Vykultivované kmeny kvasinek byly naočkovány jednou očkovací kličkou do 9 ml BHI bujonu o výsledné koncentraci 2,2 McFarlandovy zákalové stupnice. Následovalo pomnožení 24 hodin při teplotě 25 °C a úprava denzity tak, aby byla shodná pro každý kmen (hodnota 4,2 McFarlanda). Takto připravená kultura byla naředěna v poměru 0,3 ml do 10 ml sterilního BHI bujonu a v objemu 100 μ l dávkována na mikrotitrační destičky předem vypláchnuté 70% ethanolem a usušené na vzduchu. Připravené mikrotitrační destičky byly inkubovány při teplotě 25 °C po dobu 72 hodin. Od každé testované skupiny byly takto napipetovány 4 jamky a další 4 jamky byly použity jako kontrola pouze se sterilním BHI bujonem. Poté byl z jamek vylit BHI bujon, následovalo 5 x promytí destilovanou vodou a bylo napipetováno 150 μ l 0,1% roztoku krystalové violeti, která se nechala působit po dobu 45 min. Následovalo vylití barvicího roztoku a 5 x promytí destilovanou vodou. Intenzita tvorby biofilmu (tj. intenzita zbarvení krystalovou violetí) byla hodnocena pomocí stupnice 0 nezbarveno, + slabé zbarvení, ++ středně intenzivní zbarvení, +++ velmi intenzivní zbarvení a výsledek byl vyjádřen jako součet získaných bodů ve všech čtyřech jamkách (výsledná stupnice 0-12). Jako pozitivní kontrola byl použit kmen *Acinetobacter schindleri* S24-AB-1B (sbírka pracovních kmenů VÚM, Praha).

Účinek dezinfekčních prostředků

Pro testování byly vybrány dva dezinfekční prostředky, běžně používané v praxi v prvovýrobě mléka:

- Cid™ Liquid acid detergent (DeLaval), dále označen jako CID,
- Super Liquid alkaline detergent (DeLaval), dále označen jako SUPER.

Byly testovány všechny kmeny s pozitivní tvorbou biofilmů. Na vykultivovaný biofilm v mikrotitračních destičkách byl aplikován dezinfekční roztok o předepsané teplotě 70 °C a koncentraci 0,7 % a byl vystaven působení látek po dobu 10 minut. Vedle této koncentrace byla testována a srovnána účinnost i vyšší koncentrace 7 %. Prostředek byl následně 5x vypláchnut destilovanou vodou a bylo přidáno 150 μ l 0,1% roztoku krystalové violeti. Hodnocení bylo provedeno jako v případě tvorby biofilmu (0 až +++). Takto byly odzkoušeny oba dezinfekční prostředky samostatně a následně byla provedena i kontrola kombinované účinnosti při aplikaci obou 0,7% prostředků po dobu 6 a 24 hodin. Nejdříve byl aplikován jeden prostředek po testovanou dobu 10 minut, který byl následně vylit. Po 6 a 24 hodinách byl aplikován druhý prostředek, ponechán testovanou dobu, vypláchnut destilovanou vodou a poté bylo přidáno 150 μ l 0,1% roztoku krystalové violeti a byla hodnocena intenzita zbarvení. Pro srovnání účinnosti dezinfekčních prostředků, jejich koncentrace a způsobu použití byl použit párový *t*-test.

Tabulka 1 Seznam testovaných kmenů kvasinek

<i>K. marxianus</i>	1-1-M4	1-4-M	1-6-M	1-15-M	1-27-M1	1-2-M2
	1-16-M2	1-19-M1	1-20-M1	1-21-M2	1-29-M	1-31-M
<i>C. inconspicua</i>	1-46-M2	1-53-M2	1-61-M2	1-30-M1	1-66-M	1/48-2
	1-48-M3	1-76-M2	1-79-M1	1-89-M1		
<i>P. kudriavzevii</i>	1-1-M2	1-8-M1	1-20-M4	1-41-M3	1-52-M1	1-12-M2
	1-64-M1	3-12-M3	3-17-M2	3-30-M3	3-35-M5	4-7-M8
	4-16-M9	4-18-M6	4-35-M3	4-41-M3	4-66-M2	1-77-M3
	2-6-M3	2-9-M1				
<i>P. fermentans</i>	1-7-M	1-18-M1	1-23-M2	1-33-M	1-45-M3	1-51-M2
	2-17-M2	1-67-M2	1-68-M2	2-8-M1	1-63-M2	
<i>C. albicans</i>	1-32-M2	2-6-M1	2-29-M4	20-2-4-M2	20-2-5-M6	20-2-13-M6
	20-4-33-M2					
<i>C. parapsilosis</i>	2-21-M2	2-24-M1	2-26-M4	2-35-M5	2-39-M1	
<i>C. rugosa</i>	1-26-M	1-88-M1	2-14-M1	2-14-M6	2-3-M4	
<i>C. guilliermondii</i>	1-27-M2	2-69-M4	4-9-M6	4-38-M5		
<i>C. tropicalis</i>	20-1-4-M3	20-1-9-M3	20-1-20-M2	20-1-47-M1	20-1-50-M4	20-1-72-M4
	20-4-27-M6	20-4-70-M1	2-35-M4	20-1-14-M3	20-6-7-M6	
<i>C. famata</i>	3-6-M-10	4-13-M3	4-25-M6			
<i>C. lusitaniae</i>	20-1-76-M2	20-5-3-M1	20-1-8-M1	20-1-75-M1		
<i>C. glabrata</i>	20-1-5-M1	20-1-54-M7				
<i>Y. lipolytica</i>	3-1-M-5	3-3-M3	3-10-M6	4-10-M7	4-34-M7	4-35-M7
	4-56-M-4	4-58-M3	20-4-5-M3	20-5-3-M7		

Poznámka: tučně označené kmeny tvořily biofilm

Výsledky a diskuse

Tvorba biofilmu

V Tabulce 2 jsou souhrnně uvedeny výsledky intenzity tvorby u všech testovaných druhů kvasinek. Variční rozpětí představuje minimální a maximální hodnotu stupnice intenzity tvorby biofilmu, vedle aritmetického průměru jsou uvedeny i vzhledem k vyšší směrodatné odchylce (> 50 % u *C. parapsilosis* a *C. tropicalis*) geometrický průměr a medián. Negativní tvorba biofilmu byla potvrzena u všech vybraných kmenů *K. marxianus*, *C. inconspicua* a *C. glabrata*. Tvorba biofilmu pak byla potvrzena u 17 kmenů *P. kudriavzevii* (n = 17; 70 %), *P. fermentans* (n = 9; 82 %), *C. parapsilosis* (n = 5; 100 %), *C. rugosa* (n = 5; 100 %), *C. guilliermondii* (n = 4; 100 %), *C. albicans* (n = 3; 43 %), *C. tropicalis* (n = 8; 73 %), *C. famata* (n = 3; 100 %), *C. lusitaniae* (n = 2; 50 %) a *Y. lipolytica* (n = 10; 100 %).

Podrobnější výsledky produkce biofilmu jednotlivých testovaných kmenů jsou uvedeny v Tabulce 3. Nejvýrazněji tvořily biofilmy kmeny *Y. lipolytica* (geometrický průměr 11,2), *C. rugosa* (9,41), *C. tropicalis* (5), *C. albicans* (5,04), *C. parapsilosis* (4,59) a *C. lusitaniae* (4). U dalších druhů kvasinek se geometrický průměr pohyboval v rozmezí 2,66 až 2,33 (*P. kudriavzevii*, *C. guilliermondii* a *P. fermentans*), nejmenší hodnota 1,59 pak byla dosažena u *C. famata*.

Vztah mezi tvorbou biofilmu v prostředí prvovýroby mléka a následným infekčním onemocněním člověka není popsán v žádné dostupné literatuře. Infekční onemocnění v závislosti na biofilmech jsou popisována hlavně v nemocničním prostředí. Kuhn a kol. (2002) srovnávali

tvorbu biofilmů u bioprotetických prostředků mezi druhy *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* a *C. tropicalis* a potvrdili, že *C. albicans* produkuje kvantitativně větší a kvalitativně složitější biofilmy než jiné druhy kvasinek. Zjistili, že produkce a charakteristiky biofilmu přitom závisí na schopnosti každého druhu produkovat extracelulární polymerní látky (EPS) a vykazovat dimorfní růst, ale také na substrátu biofilmu, dostupnosti zdroje uhlíku a dalších faktorech. Podobně Marak a Dhanashree (2018) potvrdili produkci biofilmů u izolátů z klinických lidských vzorků *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* a *C. krusei*. U kmenů *C. glabrata* nebyla tvorba biofilmu zaznamenána podobně jako v naší studii. Tvorbu biofilmu *C. lusitaniae*, méně často v případě *C. inconspicua* izolovaného z různých klinických materiálů potvrdili ve své práci Hasan a kol. (2009) a Vitális a kol. (2020).

Vivek a kol. (2015) sledovali tvorbu biofilmu kvasinek izolovaných z různých klinických materiálů a potvrdili silnou produkci biofilmu *C. tropicalis* (12 z 27), následovanou *C. albicans* (8 z 16), *C. parapsilosis* (3 z 5), *C. guilliermondii* (2 ze 3), *K. marxianus* (1 ze 3) a *C. glabrata* (1 z 1). Ze získaných dat zjistili, že tzv. NAC (non-albicans) druhy jsou kvalitativně i kvantitativně lepšími producenty biofilmu než *C. albicans*. Na rozdíl od našich výsledků však nepotvrdili u žádného izolátu *P. kudriavzevii* (n = 6) tvorbu biofilmu. Martins a kol. (2016) podrobně zkoumali duální tvorbu biofilmů *C. albicans* s NAC druhy (*C. rugosa*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*) izolovaných ze zubních protéz. Nejčastěji biofilm tvořily druhy *C. albicans* a *C. tropicalis*, přičemž v počtech kolonií (KTJ/ml) převládaly druhy NAC. Ve srovnání s jednodruhovým biofilmem měly dvoudruhové

Tabulka 2 Tvorba biofilmu a účinnosti dezinfekčních prostředků

Druh	Statistické parametry	BIOFILM	CID	SUPER	CID	SUPER	CID+SUP	SUP+CID	CID+SUP	SUP+CID
		hodnota	koncentrace přípravku				čas			
			0,7 %	0,7 %	7 %	7 %	6 hod	6 hod	24 hod	24 hod
<i>P. kudriavzevii</i>	var. rozpětí	2-4	1-2	1-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2	1-2,5	1-2	1-2,5
	aritm. prům.	2,82	1,56	1,21	1,26	0,97	1,45	1,55	1,75	1,90
	sm. odch.	1,01	0,50	0,40	0,44	0,37	0,55	0,55	0,35	0,39
	medián	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,50	1,50	2,00	2,00
	geom. prům.	2,66	1,48	1,16	1,19	0,91	1,34	1,46	1,71	1,85
<i>P. fermentans</i>	var. rozpětí	2-4	1-2	1-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2	0,5-2	1-2	1-2
	aritm. prům.	2,44	1,28	1,33	1,17	1,06	1,11	1,11	1,61	1,50
	sm. odch.	0,88	0,44	0,43	0,56	0,46	0,42	0,55	0,49	0,43
	medián	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,50
	geom. prům.	2,33	1,22	1,28	1,05	0,97	1,05	1,00	1,54	1,44
<i>C. parapsilosis</i>	var. rozpětí	2-8	1,5-5	1,5-4,5	1,5-4,5	1-4	1,5-7,5	1,5-8	2-5	2-5
	aritm. prům.	5,20	3,00	2,90	2,80	2,30	3,81	4,25	3,00	3,30
	sm. odch.	2,68	1,84	1,47	1,35	1,57	2,34	2,66	1,41	1,20
	medián	4,00	2,00	2,00	2,00	1,50	3,50	4,00	2,00	3,00
	geom. prům.	4,59	2,57	2,61	2,55	1,89	3,17	3,47	2,76	3,13
<i>C. rugosa</i>	var. rozpětí	8-12	4-5	4-5	3-4	3-4,5	4-10	4,5-10,5	3-5	4-5
	aritm. prům.	9,60	4,30	4,50	3,80	3,90	7,10	7,90	4,20	4,20
	sm. odch.	2,19	0,45	0,35	0,45	0,55	1,66	2,12	0,84	0,45
	medián	8,00	4,00	4,50	4,00	4,00	7,50	7,50	4,00	4,00
	geom. prům.	9,41	4,28	4,49	3,78	3,87	6,91	7,63	4,13	4,18
<i>C. guilliermondii</i>	var. rozpětí	2-4	1-3	1-2	1-2	1-2	1,5-4,5	2-4	2	1,5-2,5
	aritm. prům.	2,50	1,88	1,63	1,38	1,38	2,90	2,90	2,00	2,00
	sm. odch.	1,00	0,85	0,48	0,48	0,48	1,29	1,02	0,00	0,41
	medián	2,00	1,75	1,75	1,25	1,25	2,50	2,50	2,00	2,00
	geom. prům.	2,38	1,73	1,57	1,32	1,32	2,67	2,76	2,00	1,97
<i>C. albicans</i>	var. rozpětí	4-8	2-5	2-4	2-4,5	1-3,5	3-4	3-4	2-4	2-4
	aritm. prům.	5,33	3,33	2,67	2,83	2,17	3,60	3,40	2,83	2,83
	sm. odch.	2,31	1,53	1,15	1,44	1,26	0,55	0,55	1,04	1,04
	medián	4,00	3,00	2,00	2,00	2,00	4,00	3,00	2,50	2,50
	geom. prům.	5,04	3,11	2,52	2,62	1,91	3,57	3,37	2,71	2,71
<i>C. tropicalis</i>	var. rozpětí	2-12	1,5-9	1,5-8	1-5,5	1-8	1-2	1-2	1-7	1,5-7
	aritm. prům.	6,00	4,63	4,56	3,88	3,81	1,25	1,38	4,00	4,38
	sm. odch.	3,55	2,74	2,62	2,60	2,56	0,50	0,48	2,36	2,37
	medián	6,00	4,50	4,50	3,75	3,75	1,00	1,25	4,00	4,50
	geom. prům.	5,00	3,88	3,80	3,00	2,97	1,19	1,32	3,27	3,71
<i>C. famata</i>	var. rozpětí	1-2	1-2	0,5-1	1-2	0,5-1	1,5-4	2-4	1	1-2
	aritm. prům.	1,67	1,67	0,83	1,33	0,83	2,50	2,67	1,00	1,33
	sm. odch.	0,58	0,58	0,29	0,58	0,29	1,32	1,15	0,00	0,58
	medián	2,00	2,00	1,00	1,00	1,00	2,00	2,00	1,00	1,00
	geom. prům.	1,59	1,26	0,79	1,26	0,79	2,29	2,52	1,00	1,26
<i>C. lusitanae</i>	var. rozpětí	4	3	3-3,5	2	2	0,5-2	1-2	2,5	3
	aritm. prům.	4,00	3,00	3,25	2,00	2,00	1,17	1,33	2,50	3,00
	sm. odch.	0,00	0,00	0,35	0,00	0,00	0,76	0,58	0,00	0,00
	medián	4,00	3,00	3,25	2,00	2,00	1,00	1,00	2,50	3,00
	geom. prům.	4,00	3,00	3,24	2,00	2,00	1,00	1,26	2,50	3,00
<i>Y. lipolytica</i>	var. rozpětí	6-12	5-10	5-10	4-10	4-8	2	2,5-3	5-10	5-10
	aritm. prům.	11,40	8,20	7,50	7,50	6,00	2,00	2,75	6,90	7,00
	sm. odch.	1,90	1,55	1,65	1,58	1,25	0,00	0,35	1,37	1,33
	medián	12,00	8,00	7,50	8,00	6,00	2,00	2,75	7,00	7,00
	geom. prům.	11,20	8,05	7,34	7,32	5,88	2,00	2,74	6,79	6,89

Vysvětlivky: var. rozpětí = variační rozpětí; aritm. prům. = aritmetický průměr; sm. odch. = směrodatná odchylka; geom. prům. = geometrický průměr

Tabulka 3 Tvorba biofilmu jednotlivých kmenů testovaných druhů kvasinek

Druh	n1	n2	intenzita tvorby biofilmu / počet kmenů			
<i>P. kudriavzevii</i>	20	17	2/10	4/7		
<i>P. fermentans</i>	11	9	2/2	4/7		
<i>C. albicans</i>	7	3		4/2	8/1	
<i>C. parapsilosis</i>	5	5	2/1	4/2	8/2	
<i>C. rugosa</i>	5	5			8/3	12/2
<i>C. guilliermondii</i>	4	4	2/3	4/1		
<i>C. tropicalis</i>	11	8	2/2	4/2	8/3	12/1
<i>C. famata</i>	3	3	1/1	2/2		
<i>C. lusitaniae</i>	4	2		4/2		
<i>Y. lipolytica</i>	10	10			6/1	12/9

Vysvětlivky: n1 = počet testovaných kmenů; n2 = počet kmenů s tvorbou biofilmu

biofilmy i významně odlišnou metabolickou aktivitu a vizuální rozdíl v konstituci.

Na rozdíl od našich výsledků byla také potvrzena, i když zřídka, produkce biofilmu *K. marxianus* na jiných zařízeních, jako jsou např. kardiostimulátory a protetické srdeční chlopně (Mukherjee a kol., 2014). Rozdílné výsledky tvorby biofilmu mezi naší studií a studií jiných autorů (*K. marxianus*, *P. kudriavzevii*, *C. glabrata*) rovněž potvrzuje zjištění, že při tvorbě biofilmu hraje důležitou roli i prostředí, substrát a povrch materiálu (Lagree a kol., 2018).

Vedle negativních vlastností, tj. tvorba biofilmu v humánní nebo veterinární medicíně, mají i některé testované druhy pozitivní využití v potravinářském nebo jiném průmyslu. Například schopnost *K. marxianus* redukovat laktózu je užitečná z důvodu potenciálu přeměnit průmyslový odpad ze syrovátky, problematický odpadní produkt pro likvidaci, na užitečnou biomasu pro krmení zvířat, potravinářské přísady nebo palivo (Lane a Morrissey, 2010). V jiných případech vývoj biofilmu v mléčných výrobcích pozitivně ovlivňuje vlastnosti produktů. Bylo prokázáno, že kmeny *K. marxianus* izolované z fermentovaného kozího mléka hrají také užitečnou roli při zrání sýrů “Pecorino di Farindola” a “Parmigiano Reggiano” (Perpetuini a kol., 2018; 2019).

Tabulka 4 Výsledky párového t-testu jednotlivých prostředků CID a SUPER

Druh	Statistické parametry	CID	SUPER	CID vs. SUPER	CID vs. SUPER
		0,7 % vs. 7 %	0,7 % vs. 7 %	7 %	0,7 %
<i>P. kudriavzevii</i>	t-test	3,26	3,08	2,67	2,84
	významnost	**	**	*	**
<i>P. fermentans</i>	t-test	1,41	3,00	0,93	1,02
	významnost	ns	*	ns	ns
<i>C. tropicalis</i>	t-test	7,43	4,29	0,90	0,32
	významnost	***	**	ns	ns
<i>Y. lipolytica</i>	t-test	2,21	8,54	4,63	1,98
	významnost	ns	***	**	ns
Ostatní	t-test	3,92	5,62	2,08	1,25
	významnost	***	***	ns	ns
Všechny kvasinky	t-test	6,33	8,18	4,61	3,15
	významnost	***	***	***	**

Vysvětlivky: * = P < 0,05; ** = P < 0,01; *** = P < 0,001; ns = statisticky nevýznamné

Rovněž *Y. lipolytica*, která má dlouhou historii použití v potravinářském průmyslu a rozšiřující se biotechnologický potenciál, může být příkladem vzácného oportunního patogenu s tvorbou biofilmu (Abbes a kol., 2017; Zieniuk a Fabiszewska; 2019). Další kvasinky *Candida antarctica* a *C. rugosa* jsou zdrojem průmyslově důležitých lipáz, *C. krusei* se používá k fermentaci kaka při výrobě čokolády. *C. rugosa* se svou širokou specifikou pro hydrolýzu lipidů také používá jako enzymový doplněk na podporu trávení tuků (Menden a kol., 2019).

Účinek dezinfekčních prostředků

Výsledky účinnosti dezinfekčních prostředků jsou sumarizovány v Tabulce 2, kde jsou uvedeny minimální a maximální hodnoty biofilmu, aritmetického průměru a směrodatné odchylky, mediánu a geometrického průměru. Z těchto výsledků lze konstatovat, že použité prostředky byly ve všech případech účinné, ale žádný z nich biofilm úplně neodstranil. Účinek dezinfekčních prostředků vyjádřený z geometrického průměru byl pro oba samostatně testované prostředky s výrobcem předepsanou 0,7% koncentrací následující: *P. kudriavzevii* (44,4 % CID a 56,4 % SUPER), *P. fermentans* (47,6 a 45,1 %), *C. parapsilosis* (44 a 43 %), *C. rugosa* (54,5 a 52,3 %), *C. guilliermondii* (27,3 a 34 %), *C. albicans* (38,3 a 50 %), *C. tropicalis* (22,4 a 24 %), *C. famata* (20,8 a 50,3 %), *C. lusitaniae* (25 a 19 %) a *Y. lipolytica* (28,1 a 34,5 %).

V literatuře není dostupné srovnání účinnosti k námi testovaným dezinfekčním prostředkům. Ilknur a kol. (2012) zkoumali biofilmovou tvorbu pěti izolátů *Candida* (*C. albicans*, *C. glabrata*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* a *C. tropicalis*) a jejich citlivost na pět dezinfekčních prostředků (glutaraldehyd, peroxid vodíku, kyselina peroctová, ortho-ftalaldehyd a chlornan sodný) v různých časech tvorby biofilmu (6, 12, 24 a 48 hodin). Z testovaných dezinfekčních prostředků měla kyselina peroctová největší účinnost. Výsledky ukázaly shodně s naším sledováním, že žádný z dezinfekčních prostředků biofilm úplně neodstranil. Kart a kol. (2014) porovnávali účinnost devíti komerčně dostupných dezinfekčních prostředků (chlornan sodný, benzalkoniumchlorid, chloroxolenol, etanol, chlorhexidin, peroxid vodíku, nemočiční antiseptický koncentrát s obsahem cetrimidu a chlorhexidinu, povidon-jod, cetrimid) proti *S. aureus*, *C. albicans* a *P. aeruginosa* a v biofilmech s více bakteriálními druhy. Výsledky ukázaly, že velikost účinku ve vícedruhovém biofilmu závisí na kmeni a použitém dezinfekčním prostředku. Tím zpochybnili obecné tvrzení, že

Tabulka 5 Výsledky párového t-testu kombinovaného účinku CID a SUPER

Druh	Statistické parametry	CID a SUPER vs. SUPER a CID	CID a SUPER vs. SUPER a CID	CID a SUPER	SUPER a CID
		6 hodin	24 hodin	6 vs 24 hod	6 vs 24 hod
<i>P. kudriavzevii</i>	t-test	0,58	1,34	2,57	2,55
	významnost	ns	ns	*	*
<i>P. fermentans</i>	t-test	0,00	0,93	2,14	2,27
	významnost	ns	ns	ns	ns
<i>C. tropicalis</i>	t-test	2,79	2,84	0,95	0,59
	významnost	*	*	ns	ns
<i>Y. lipolytica</i>	t-test	1,65	0,53	0,49	1,89
	významnost	ns	ns	ns	ns
Ostatní	t-test	1,04	1,55	2,95	3,64
	významnost	ns	ns	**	**
Všechny kvasinky	t-test	2,60	2,40	2,66	1,22
	významnost	*	*	*	ns

organismy jsou ve více-druhovém biofilmu vždy méně citlivé než v jedno-druhovém biofilmu.

Srovnání účinku dezinfekčních prostředků

Výsledky srovnání účinku CID a SUPER a jejich koncentrací jsou shrnuty a statisticky vyhodnoceny v Tabulce 4. Byly hodnoceny účinky pro každý druh, pokud bylo v souboru hodnoceno více jak šest testovaných kmenů (17 kmenů *P. kudriavzevii*, 9 *P. fermentans*, 8 *C. tropicalis*, 10 *Y. lipolytica*). V tabulce jsou dále uvedeny souhrnné výsledky ostatních druhů (22 kmenů) a výsledné hodnoty celého souboru (66 kmenů). Obecně lze konstatovat, že lepší účinek na biofilmy měly oba přípravky vždy s vyšší koncentrací 7 % a alkalický prostředek SUPER působil lépe na biofilmy při obou použitých koncentracích. V případě přípravku SUPER byly rozdíly v použité koncentraci u všech kmenů statisticky významné ($P < 0,05$ až $P < 0,001$). Rozdíl mezi použitou koncentrací 0,7 a 7 % přípravku CID byl ve většině případů rovněž statisticky významný ($P < 0,01$ až $P < 0,001$) s výjimkou *P. fermentans* a *Y. lipolytica*.

Hodnocení použití 0,7% prostředků v intervalu 6 a 24 hodin je sumarizováno v Tabulce 5. Použití pořadí prostředků (CID a SUPER) vykazovalo lepší účinnost v případě pořadí CID a SUPER (vyjma *P. fermentans*, *C. albicans* a *C. guilliermondii*), což podporuje i výše popsané zjištění, že alkalický prostředek SUPER působil lépe na biofilmy. Tento rozdíl však nebyl, s výjimkou *C. tropicalis*, statisticky významný v žádném z časových intervalů. Zajímavým zjištěním je vyrovnání vyšší účinek kombinovaných prostředků při 6 a 24 hodinách, neboť jsme předpokládali výrazně vyšší eliminaci biofilmu při 6 hodinovém intervalu. Tento vyšší účinek byl potvrzen pouze u *P. kudriavzevii*, *P. fermentans*, *C. tropicalis*, *C. lusitanae* a *Y. lipolytica*, přičemž statisticky významné rozdíly byly zjištěny pouze u *P. kudriavzevii* ($P < 0,05$) a u skupiny ostatních kvasinek ($P < 0,01$). Toto zjištění podporuje možnosti využití přípravků v různém časovém intervalu v prvovýrobní praxi.

Závěr

Závěrem lze konstatovat, že vybrané prostředky a výrobcem předepsaná koncentrace dezinfekčních prostředků a způsob užití jsou vhodné pro aplikaci v prvovýrobě mléka k odstranění biofilmů na dojicím zařízení. Zároveň je důležité si uvědomit, že tvorba biofilmu chrání jejich producenty před obranou hostitele a antimikrobiálními látkami. Proces tvorby biofilmu na povrchích, které přicházejí do styku s potravinami, může nepříznivě ovlivnit mikrobiální kvalitu potravin, pokud jsou navíc tvořeny smíšenými populacemi bakterií, kvasinek a hub.

Pro výrobu mikrobiologicky bezpečných a kvalitních produktů v potravinářském průmyslu je proto zapotřebí lepší porozumění procesu ulpívání bakterií na technologických zařízeních. Z těchto důvodů je jednou z hlavních výzev současné potravinářské mikrobiologie identifikace nových nástrojů schopných předcházet nebo odstraňovat biofilmy smíšených druhů (Zara a kol., 2020; Gebreyohannes a kol., 2019).

Poděkování:

Příspěvek vznikl za podpory projektů MZe ZEMĚ QK1910092 a MZe RO1422.

Literatura

- AALBAEK, B., STENDERUP, J., JENSEN, H.E., VALBAK, J., NYLIN, B., HUDA, A. (1994): Mycotic and algal bovine mastitis in Denmark. *Acta Pathologica Microbiologica et Immunologica Scandinavica*, 102 (6), s. 451–456. doi.org/10.1111/j.1699-0463.1994.tb04898.x.
- ABBES, S., AMOURI, I., TRABELSI, H., NEJI, S., SELLAMI, H., RAHMOUNI, F., MAKNI, F., REBAI, T., AYADI, A. (2017): Analýza faktorů virulence a in vivo biofilm tvořící kapacity *Yarrowia lipolytica* izolované od pacientů s fungemií. *Med Mycol*. 2017; 55 (2), s. 193–202. doi: 10.1093/mmy/myw028.
- ALGBURI, A., COMITO, N., KASHTANOV, D., CICKS, L.M.T., CHIKINDAS, M.L. (2017): Control of biofilm formation: antibiotics and beyond. *Applied and Environmental Microbiology*, 83 (3), s. e02508-16. doi: 10.1128/AEM.02508-16.
- AZZAM, K., PARVIZI, J., JUNGKIND, D., HANSEN, A., FEHRING, T., SPRINGER, B., BOZIC, K., DELLA, VALLE C., PULIDO, L., BARRACK, R. (2009): Microbiological, clinical, and surgical features of fungal prosthetic joint infections: a multi-institutional experience. *Journal of Bone and Joint Surgery*, 91 (Suppl. 6), s. 142–149. doi: 10.2106/JBJS.I.00574.
- BLOEMENDAAL, A.L.A., BROUWER, E.C., FLUIT, AD C. (2010): Methicillin resistance transfer from *Staphylococcus epidermidis* to methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* in a patient during antibiotic therapy. *Plos ONE*, 5, s. 1–5.
- BRIDIER, A., BRIANDET, R., THOMAS, V., DUBOIS-BRISSENET, F. (2011): Resistance of bacterial biofilms to disinfectants: a review. *Biofouling*, 27 (9), s. 1017–1032, doi: 10.1080/08927014.2011.626899.
- CAVALHEIRO, M., TEIXEIRA, M.C. (2018): *Candida* Biofilms: threats, challenges, and promising strategies. *Frontiers in Medicine (Lausanne)*, 5 (28), s. 1–15. doi:10.3389/fmed.2018.00028.
- DJORDEVIC, D., WIEDMANN, M., MC LANDSBOROUGH, L.A. (2002): Microtiter plate assay for assessment of *Listeria monocytogenes* biofilm formation. *Applied Environmental Microbiology*, 68 (6), s. 2950–2958. doi: 10.1128/AEM.68.6.2950-2958.2002.

- DOUGLASS, A.P., OFFEI, B., BRAUN-GALLEANI, S., COUGHLAN, A.Y., MARTOS, A.A.R., ORTIZ-MERINO, R.A., BYRNE, K.P., WOLFE, K.H. (2018): Population genomics shows no distinction between pathogenic *Candida krusei* and environmental *Pichia kudriavzevii*: One species, four names. *PLOS Pathogens*, 14 (7), s. e1007138. doi.org/10.1371/journal.ppat.1007138.
- DUFRESNE, S. F., MARR, K. A., SYDNOR, E., STAAB, J. F., KARP, J. E., LU, K., ZHANG, S. X., LAVALLÉE, C., PERL, T. M., NEOFYTOS, D. (2014): Epidemiology of *Candida kefyr* in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*, 52 (6), s. 1830–1837. doi.org/10.1128/JCM.00131-14.
- DWORECKA-KASZAK, B., KRUTKIEWICZ, A., D., KLECZKOWSKI, M., BIEGAŃSKA, M. (2012): High prevalence of *Candida yeast* in milk samples from cows suffering from mastitis in Poland, *Scientific World Journal*, Published online 2012 Apr 24. doi: 10.1100/2012/196347.
- FORBES, B.A., SCHABERG, D.R. (1983): Transfer of resistance plasmids from *Staphylococcus epidermidis* to *Staphylococcus aureus*: evidence for conjugative exchange of resistance. *Journal of Bacteriology*, 153 (2), s. 627–634. ISSN 0021-9193.
- GEBREYOHANNES, G., NYERERE, A., BII, C., SBHATU, D.B. (2019): Challenges of intervention, treatment, and antibiotic resistance of biofilm-forming microorganisms. *Heliyon*. 5 (8), e02192. doi:10.1016/j.heliyon.2019.e02192.
- GIRMENIA, C., PIZZARELLI, G., CRISTINI, F., BARCHIESI, F., SPREGHINI, E., SCALISE, G., MARTINO, P. (2006): *Candida guilliermondii* fungemia in patients with hematologic malignancies. *Journal of clinical microbiology*, 44 (7), s. 2458–2464. doi.org/10.1128/JCM.00356-06.
- GUIARD, J., ANGOULVANT, A., LETSCHER-BRU, V., L'OLLIVIER, C., CORNET, M., DALLE, F., GRENOUILLET, F., LACROIX, C., VEKHOFF, A., MAURY, E., CAILLOT, D., CHARLES, P.E., SPILI-FLOURY, S., HERBRECHT, R., RAFFOUX, E., BRETHON, B., HENNEQUIN, CH.: (2013): Invasive infections due to *Candida norvegensis* and *Candida inconspicua*: report of 12 cases and review of the literature, *Medical Mycology*, 51 (8), s. 795–799. doi.org/10.3109/13693786.2013.807444.
- HASAN, F., XESS, I., WANG, X., JAIN, N., FRIES, B.C. (2009): Biofilm formation in clinical *Candida* isolates and its association with virulence, *Microbes and Infection*, 11 (8-9), s. 753–761. doi.org/10.1016/j.micinf.2009.04.018.
- ILKNUR, D., OZ, Y., KIRAZ, N. (2012): Effect of disinfectants on biofilm development by five species of *Candida*. *African journal of microbiology research*. 6 (10), s. 2380–2386. doi: 10.5897/AJMR11.1427.
- KARAPETSA, M., TSOLAKIA, V., ARABATZIS, M., PETINAKI, E., VELEGRAKI, A., ZAKYNTHINOS E. (2019): Septic shock due to *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) candidemia in an ICU immunocompetent trauma-patient. *Journal of Infection and Public Health*, 12 (4), s. 594–597. doi.org/10.1016/j.jiph.2018.12.015.
- KARPIŠKOVÁ, R., ŠTÁSTKOVÁ, Z. (2009): Nálezy meticilin rezistentních *Staphylococcus aureus* u zvířat. *Veterinářství*, 59, s. 34–38.
- KART, D., TAVERNIER, S., VAN ACKER, H., NELIS, H.J., COENYE, T. (2014): Activity of disinfectants against multispecies biofilms formed by *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research*, 30 (3), s. 377–383. doi.org/10.1080/08927014.2013.878333.
- KLABAN, V. (2001): *Svět mikrobů*. Hradec Králové: Gaudelamus, 2001.
- KLIMEŠOVÁ, M., KUCHAROVIČOVÁ, I., MORÁVKOVÁ, M., BAČOVÁ, R., ROUBAL, P., SEYDLOVÁ, R., NEJESCHLEBOVÁ, L. (2020): Sledování tvorby biofilmu a termorezistence u řas *Prototheca* spp. izolovaných z bazéňových vzorků mléka. *Mlékařské listy – Zpravodaj* 176, 31 (2), s. 13–18.
- KUHN, D.M., CHANDRA, J., MUKHERJEE, P.K., GHANNOUM, M.A. (2002): Comparison of biofilms formed by *Candida albicans* and *Candida parapsilosis* on bioprosthetic surfaces. *Infection and Immunity*, 70 (2), s. 878–888. doi: 10.1128/IAI.70.2.878-888.2002.
- KVASNIČKOVÁ, E., PALDRYCHOVÁ, M., MAŤÁTKOVÁ, O., MASÁK, J. (2016): Medicinální aspekty mikrobiálních biofilmů. *Chemické Listy*, 110, s. 485–490.
- LAGREE, K., MON, H.H., MITCHELL, A.P., DUCKER, W.A. (2018): Impact of surface topography on biofilm formation by *Candida albicans*. *PLoS ONE*, 13(6), e0197925. https://doi.org/10.1371/journal.
- LANE, M., MORRISSEY, J.P. (2010): *Kluyveromyces marxianus*: A yeast emerging from its sister's shadow. *Fungal Biology Reviews*, 24 (1–2), s. 17–26. doi:10.1016/j.fbr.2010.01.001.
- MARAK, M.B., DHANASHREE, B. (2018): Antifungal susceptibility and biofilm production of *Candida* spp. isolated from clinical samples. *International Journal of Microbiology*, Article ID 7495218, 5 s. doi.org/10.1155/2018/7495218.
- MARTINS, C.H.G., PIRES, R.H., CUNHA, A.O., PEREIRA, C.A.M., DE LACORTE SINGULANI, J., ABRÃO, F., DE MORAES, T., MENDES-GIANNINI, M.J.S. (2016): *Candida/Candida* biofilms. First description of dual species *Candida albicans/C. rugosa* biofilm. *Fungal Biology*, 120 (4), s. 530–537. doi.org/10.1016/j.funbio.2016.01.013.
- MEGRI, Y., ARASTEHFAR, A., BOEKHOUT, T., DANESHNI, F., HÖRTNAGL, C., SARTORI B., HAFEZ A., PAN, W., LASS-FLÖRL, C., HAMRIOUI, B. (2020): (2020): *Candida tropicalis* is the most prevalent yeast species causing candidemia in Algeria: the urgent need for antifungal stewardship and infection control measures. *Antimicrob Resist Infect Control*, 9 (50), https://doi.org/10.1186/s13756-020-00710-z.
- MENDEN, A., HALL, D., PARIS, D., MATHURA, V., CRAWFORD, F., MUL-LAN, M., CRYNEN, S., AIT-GHEZALA, G. (2019): A fast, miniaturised in-vitro assay developed for quantification of lipase enzyme activity. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 34 (1): 1474–1480. doi:10.1080/14756366.2019.1651312.
- MUKHERJEE, A., PRAMANIK, S., DAS, D., ROY, R., THERESE, K.L. (2014): Polymicrobial chronic endophthalmitis diagnosed by culture and molecular technique. *Indian Journal of Medical Microbiology*, 32 (3), s. 331–332. doi:10.4103/0255-0857.136593. PMID 25008833.
- NONI, M., STATHI, A., VELEGRAKI, A., MALAMATI, M., KALAMPALIKI, A., ZACHARIADOU, L., MICHOS, A. (2020): Rare invasive yeast infections in greek neonates and children, a retrospective 12-Year Study. *Journal of Fungi*, 6 (4), s. 194. doi: 10.3390/jof6040194. PMID: 32998455; PMCID: PMC7711555.
- OJHA, A.K., BAUGHN, A.D., SAMBANDAN, D., HSU, T., TRIVELLI, X., GUERARDEL, Y., ALAHARI, A., KREMER, L., JACOBS, JR. W.R., HATFULL, G.F. (2008): Growth of *Mycobacterium tuberculosis* biofilms containing free mycolic acids and harbouring drug-tolerant bacteria. *Molecular Biology*, 69 (1), s. 164–174. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06274.x.
- PERPETUINI, G., TITTARELLI, F., MATTARELLI, P., MODESTO, M., CILLI, E., SUZZI, G., TOFALO, R. (2018): Intraspecies polymorphisms of *Kluyveromyces marxianus* strains from Yaghnob valley, *FEMS Microbiology Letters*, 365 (6), March 2018, fny028. doi.org/10.1093/femsle/fny028.
- PERPETUINI, G., TITTARELLI, F., SUZZI G., TOFALO, R. (2019): Cell wall surface properties of *Kluyveromyces marxianus* strains from dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 10, open access article 79. doi=10.3389/fmicb.2019.00079.
- PFALLER, M. A., DIEKEMA, D. J., COLOMBO, A. L., KIBBLER, C., NG, K. P., GIBBS, D. L., NEWELL, V. A. (2006): *Candida rugosa*, an emerging fungal pathogen with resistance to azoles: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of clinical microbiology*, 44 (10), s. 3578–3582. doi.org/10.1128/JCM.00863-06
- PIATTI, G., FELTRIN, S., FELLINI, E., BARBERO, V., BALLESTRERO, A. (2021): Catheter-related sepsis by *Candida parapsilosis* in an adult patient under chemotherapy regimen, *Case Reports in Infectious Diseases*, Article ID 8858157, 3 pages, 2021. https://doi.org/10.1155/2021/8858157.
- VAIDYA, V.K. (2011): Horizontal transfer of antimicrobial resistance by extended-spectrum β lactamase-producing *Enterobacteriaceae*. *Journal of Laboratory Physicians*, 31, s. 37–42. doi:10.4103/0974-2727.78563.
- VITÁLIS, E., NAGY, F., TÓTH, Z., FORGÁCS, L., BOZÓ, A., KARDOS, G., MAJOROS, L., KOVÁCS, R. (2020): *Candida* biofilm production is associated with higher mortality in patients with candidaemia. *Mycoses*, 63 (4), s. 352-360.
- VIVEK, A., RUCHIKA, B., MOLLY, M. (2015): Comparison of biofilm formation in clinical isolates of *Candida* species in a tertiary care center, North India. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*, 58 (4), s. 475–478. doi:10.4103/0377-4929.168873.
- WAWRYSIUK, S., RECHBERGER, T., FUTYMA, K., MIOTŁA, P. (2018). *Candida lusitanae* – a case report of an intraperitoneal infection. *Przegląd menopauzalny = Menopause review*, 17 (2), s. 94–96. https://doi.org/10.5114/pm.2018.77310.

- ZARA, G., BUDRONI, M., MANNAZZU, I., I., FANCELLO, F., ZARA, S. (2020): Yeast biofilm in food realms: occurrence and control. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 36, open access article 134. doi.org/10.1007/s11274-020-02911-5.
- ZIENIUK, B., FABISZEWSKA, A. (2019): *Yarrowia lipolytica*: a beneficial yeast in biotechnology as a rare opportunistic fungal pathogen: a mini-review. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 35 (1), s. 10. doi.org/10.1007/s11274-018-2583-8.

Korespondující autor:

doc. RNDr. Marcela Klimešová, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, e-mail: marcela.vyletelova@seznam.cz

Přijato dne: 8. 3. 2022

Lektorováno: 16. 3. 2022

ANTIMASTITIDNÍ VAKCINACE JAKO VARIANTA REDUKCE POUŽITÍ ANTIBIOTIK U DOJNIC – PŘÍPADOVÁ STUDIE

Jiří Mašek¹, Klára Šašková¹, Monika Rychlíková¹,
Zdeňka Hegedúšová², Oto Hanuš², Josef Kučera³,
Radek Holásek²

¹ MVDr. Jiří Mašek, s.r.o., Měřín² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha³ Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Hradištko

Antimastitis vaccination as a variant of reduction to the use of antibiotics in dairy cows – a case study

Abstrakt

Projekt „Vývoj metod redukce průniku antibiotik do prostředí v chovu dojnic jako podpora prevence vzniku antibiotické rezistence mikroorganismů (MZe NAZV Země QK 21010123)“ cílí na postupné vytváření vhodných podmínek pro možnost snížení spotřeby antibiotik (z ekonomických a prostředových důvodů) a omezení růstu rezistence patogenů k antibiotikům v mlékařském prostředí ČR. Tyto náměty a jejich realizace mohou být významné v ochraně životního prostředí, veřejného zdraví a v tvorbě udržitelného, prostředově příznivého odvětví živočišné výroby. Toho lze docílit rámcově zejména následnými kroky: – vytvořením vhodných algoritmů efektivní selekce dojnic k antibiotickému/neantibiotickému zasušení laktace dojnic podle dynamiky mléčných ukazatelů v kontrole užitkovosti během laktace; – efektivní aplikací antimastitidní vakcinace dojnic (především intradermální, s lepší podporou welfare dojnic) při kontrole jejich zdravotního stavu; – účinnými pozitivními modifikacemi v technologii zasušení laktace dojnic bez

aplikace antibiotik v případě jejich dobrého zdravotního stavu mléčné žlázy během laktace. Dlouhodobé, pravidelné používání těchto inovačních přístupů v mlékařské praxi může přispět: – k poklesu antibiotické rezistence mastitidních patogenních mikroorganismů ve stádech dojnic; – ke snížení rizika výskytu reziduí inhibičních látek v mléce v potravinářství. V retrospektivní praktické studii (5 roků) aplikace antimastitidní vakcinace (intramuskulární, pak intradermální, jedná se o autogenní intradermální vakcínu s antigeny *Escherichia coli* a *Klebsiella pneumoniae*) dojnic holštýnského stáda (n = 580) a při souběžném používání post-dípu Valiant: – poklesl počet případů mastitid (klinických a závažných subklinických) za rok z 98 na 9; – pokleslo procento vyřazených a uhynulých krav v souvislosti s mastitidami o více než 93 %; – byla, na základě kultivací, výrazně snížena spotřeba antibiotik z 1 160 tis. Kč (2. rok) na 135 tis. Kč (5. rok); – stoupl výrazně prodej mléka z 93,3 % (3. rok) na 99,2 % (5. rok). Od počátku intradermální vakcinace je zřejmý nižší výskyt reprodukčních onemocnění (pyometra, zadržení placenty), nižší náklady na reprodukci a nižší náklady na léčbu mastitid. Na porážce byly konfiskovány čtvrté mléčné žlázy postižené abscesy po injekční aplikaci vakcíny, což bylo intradermální aplikací eliminováno. Obecně je tato vakcinační metoda efektivní především při řešení problémů s Gram- patogeny.

Klíčová slova: dojnice, reprodukce, mléko, mastitida, vakcinace, antibiotikum, zdraví, patogen, rezistence, životní prostředí

Abstract

The project “Development of methods of reducing the penetration of antibiotics into the environment in dairy farming as a support for the prevention of the emergence of antibiotic resistance of microorganisms (MZe NAZV Země QK 21010123)” aims to gradually create suitable conditions for reducing antibiotic use (for economic and environmental reasons) and growth of pathogen resistance to antibiotics in the dairy environment of the Czech Republic. These issues and their implementation can be important in protecting the environment, public health and creating a sustainable, environmentally friendly livestock sector. This can be achieved in general by the following steps: – developing appropriate algorithms for effective selection of dairy cows for antibiotic/non-antibiotic drying of dairy cow lactation according to the dynamics of milk indicators in milk recording during lactation; – effective application of antimastitis vaccination of dairy cows (especially intradermal, with better support of welfare of dairy cows) in the control of their health status; – effective positive modifications in the technology of drying lactation of dairy cows without the application of antibiotics in case of their good health of the mammary gland during lactation. The long-term, regular use of these innovative approaches in dairy practice can contribute to: – reducing the antibiotic resistance of mastitis