

POTENCIÁL METODY MIR-FT PRO APROXIMAČNÍ ZÁCHYT KONCENTRACE LAKTOFERINU V KOZÍM MLEZIVU

Hana Nejeschlebová¹, Oto Hanuš¹, Klára Bartáková², Lenka Vorlová², Pavlína Navrátilová², Eva Samková³, Gavin Thompson⁴, Jaroslav Kopecký¹, Radoslava Jedelská¹

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

² Veterinární univerzita Brno, Fakulta veterinární hygieny a ekologie

³ Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Fakulta zemědělská a technologická

⁴ Bentley Czech s.r.o., Prostějov

Potential of the MIR-FT method for approximate detection of lactoferrin concentration in goat colostrum

Abstrakt

Jednou ze zásadních složek mleziva pro imunitu mláďat je laktoferin (LF). Znalost kvality mleziva je důležitou součástí managementu péče o narozená mláďata savců. V rutinních mléčných laboratořích však běžně nejsou k dispozici analyzátoři disponující kalibrací pro tento specifický materiál. Důvodem je zejména vysoká variabilita složek mleziva. Cílem této práce bylo proto posoudit možnost rychlého odhadu obsahu LF v kozím mlezivu rutinně dostupnou metodou infračervené spektroskopie ve střední oblasti s Fourierovou transformací (MIR-FT) s využitím kalibračního modelu pro kravské mléko. Vzorky kozího mleziva ($n = 24$) byly odebírány v České republice na farmě v Jihomoravském kraji od února do dubna 2024 od 12 koz (5 hnědých krátkosrstých koz; 3 bílé krátkosrsté kozy; 4 kříženci obou plemen), a to vždy 2. a 5. den laktace. Ve všech vzorcích byl stanoven obsah LF metodou referenční (kapalinová chromatografie na reverzní fázi s iontově párovacím činidlem; LF HPLC)

a metodou MIR-FT, obsah laktózy a počet somatických buněk (PSB). Průměrný obsah LF metodou HPLC činil $560,83 \pm 279,36$ mg/l, průměrný obsah LF metodou MIR-FT pak $605,38 \pm 229,85$ mg/l. Rozdíl mezi průměry metod pro stanovení LF byl nevýznamný ($P > 0,05$) pro původní hodnoty LF ($44,55 \pm 124,4$ mg/l; LF MIR-FT – LF HPLC) a významný ($P < 0,05$) pro log LF. Korelační koeficient mezi obsahem LF stanoveným metodami HPLC a MIR-FT činil 0,889 ($P < 0,001$) pro původní hodnoty a 0,907 ($P < 0,001$) pro log LF. I přesto, že v práci nebyla použita kalibrace pro kozí mlezivo a nejednalo se tak o „standardní měření“, bylo dosaženo výsledků, které opravňují k označení možnosti tohoto způsobu rychlého stanovení LF v kozím mlezivu za prakticky použitelné k informaci o nutriční kvalitě kozího mleziva. Dále byla zjištěna tendence LF v kozím mlezivu korelovat s parametry mléka ve smyslu změn, ke kterým dochází při mastitidách. Byly zjištěny pozitivní korelační koeficienty mezi LF a PSB, pro HPLC $r = 0,254$; pro MIR-FT $r = 0,311$, které byly však nevýznamné ($P > 0,05$). Mezi LF a obsahem laktózy byly zjištěny významné negativní korelace, pro HPLC $r = -0,754$ ($P < 0,001$); pro MIR-FT $r = -0,835$ ($P < 0,001$). Uvedené ukazuje na potenciál využití posuzované metody MIR-FT také k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy koz.

Klíčová slova: mléko, kozí mlezivo, infračervený spektroskop, vysoce účinná kapalinová chromatografie, analýza, kalibrace, referenční metoda (hodnota), laktoferin, věrohodnost výsledku

Abstract

One of the important components of colostrum for the immunity of young animals is lactoferrin (LF). Knowledge of colostrum quality is an important part of the management of care for newborn mammals. However, analyzers featuring calibrations for this specific material are not commonly available in routine dairy laboratories. The reason is mainly the high variability of colostrum components. The aim of this work was therefore to assess the possibility of a rapid estimate of the LF content in goat colostrum by the routinely available method of

Fourier transform mid-infrared spectroscopy (MIR-FT) using a calibration model for cow's milk. Samples of goat colostrum ($n = 24$) were collected in 2024 in the Czech Republic on a farm in the South Moravian Region from February to April, from 12 goats (5 brown short-haired goats; 3 white short-haired goats; 4 crossbreeds of both breeds), always on the 2nd and 5th day of lactation. In all samples, the LF content was determined by the reference method (ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography; LF HPLC) and the MIR-FT method, as well as the lactose content and somatic cell count (SCC). The mean LF content by the HPLC method was 560.83 ± 279.36 mg/l, and the mean LF content by the MIR-FT method was 605.38 ± 229.85 mg/l. The mean difference between the methods for LF determination was insignificant ($P > 0.05$) for the original LF values (44.55 ± 124.4 mg/l; LF MIR-FT – LF HPLC) and significant ($P < 0.05$) for log LF. The correlation coefficient between the LF content determined by the HPLC and MIR-FT methods was 0.889 ($P < 0.001$) for the original values and 0.907 ($P < 0.001$) for log LF. Even though the calibration for goat colostrum was not used and it was not a “standard measurement”, results were achieved that justify the possibility of labeling this method of rapid LF determination in goat colostrum as practically applicable to provide information on the nutritional quality of goat colostrum. Furthermore, a tendency of LF in goat colostrum to correlate with milk parameters in terms of changes that occur during mastitis was found. Positive correlation coefficients were found between LF and SCC, for HPLC $r = 0.254$; for MIR-FT $r = 0.311$. However these were statistically non-significant ($P > 0.05$). Statistically significant negative correlation coefficients were found between LF and lactose content, for HPLC $r = -0.754$ ($P < 0.001$); for MIR-FT $r = -0.835$ ($P < 0.001$). This indicates the potential of using the assessed MIR-FT method also for diagnosing the health status of the mammary gland of goats.

Keywords: milk, goat's colostrum, infrared spectroscopy, high-performance liquid chromatography, analysis, calibration, reference method (value), lactoferrin, reliability of the result

Úvod

Význam a možnost netradičních typů analýz mléčného materiálu v mlékařské analytické praxi

Infračervená spektroskopie (MIR) hraje v mlékařství celosvětově již cca 60 roků stále důležitější analytickou roli. Je dlouhodobě využívána k rutinním rozborům různých typů vzorků mléka a mléčných výrobků a její výsledky následně k technologickým a hospodářským účelům. Přístroje (mléčné analyzátoři) jsou provedeny v různých variantách různých výrobců v poloautomatické nebo automatické verzi a s průtočným systémem, s výkonem od 30 do 500 vzorků za hodinu. Infračervená spektroskopie ve středové oblasti v technologickém provedení s optický-

mi filtry (MIR), jako nepřímá metoda, je používána obvykle ke stanovení tzv. majoritních složek mléka, tzn. obsahu tuku, bílkovin, laktózy, sušiny tukuprosté, sušiny celkové a vody v mléce a mléčných výrobcích.

S nástupem analytické technologie MIR-FT se skenováním (pomocí Michelsonova interferometru) a analýzou celého infraskpektra a vyhodnocením signálu prostřednictvím Fourierových transformací se toto spektrum mlékařských analýz podstatně rozšiřuje, zejména o řadu minoritních složek mléka (močovina, volné mastné kyseliny, kyselina citronová, ketony, hlavní mastné kyseliny mléčného tuku a jejich skupiny; Soyeurt et al., 2006; Hanuš et al., 2009, 2011, 2013; Bonfatti et al., 2016; Samková et al., 2020). V současnosti se jeví jako aktuální rozšířit toto analytické portfolio MIR-FT o bioaktivní molekuly mléka, laktoferin a lysozym. Zatímco k tomuto typu analýzy pro laktoferin informace existují (Soyeurt et al., 2007, 2012; Nejeschlebová et al., 2023, 2024), pro lysozym nebyly zatím nalezeny žádné podklady.

Laktoferin (LF) je transportní glykoprotein vázající železo, který patří do skupiny transferinů. Poprvé byl objeven v kravském mléce (Sørensen & Sørensen, 1939) a postupně byla jeho přítomnost potvrzena u celé řady savců. Kromě mléka, které je současně jeho nejbohatším zdrojem, se nachází v řadě dalších sekretů, jako jsou například sliny, slzy, žluč či nosní sekret. Je uvolňován z neutrofilů v krvi a tkání postižených zánětem. Nejvíce je znám pro svůj přímý antibakteriální účinek, který je dán vychytáváním železa (bakteriostatický účinek) a schopností vázat lipopolysacharidy (baktericidní účinek). Jsou známy rovněž jeho imunomodulační, protizánětlivé, antivirové, antiparazitární a antifungální účinky (Giansanti et al., 2016). Jeho příjem v mlezivu je tak zásadní pro narozená mláďata. Segura et al. (2024) uvedli pozitivní korelaci Brix hodnoty a LF ($r = 0.716$, $p < 0.001$) v kozím mlezivu, z čehož vyplývá, že obsah LF v mlezivu významně vypovídá o jeho kvalitě. Stanovit složení, resp. kvalitu kolostra a mít tuto informaci je obecně vždy důležité při odchovu mláďat savců. Proto u domestikovaných zvířat v praxi roste průběžně zájem o informativní výsledky složení kolostra. Jednou ze zájmových složek je právě i specifický, významný, transportní, tedy biologicky funkční laktoprotein, laktoferin.

Mlezivo není materiál, na který by se v rutinních mléčných laboratořích běžně specificky kalibrovala analytická technika, obvykle nepřímé metody infračervené spektroskopie. Důvodů je více, kromě nízké frekvence praktických požadavků v malých sériích vzorků, kde velké objemy zakázek jsou ekonomickou podmínkou tohoto typu analýz (v kontrole kvality mléka bazénové vzorky a v kontrole mléčné užitkovosti individuální vzorky mléka), je to především až velmi rasantní variabilita většiny složek kolostra v čase cca 5 dní mlezivového období. Specifické kalibrace na kolostrum jakéhokoliv druhu savce v mlékařském analytickém systému tedy nejsou běžně dostupné. Některé typy těchto analýz pro tyto účely vyžadují specifickou kalibraci, nicméně,

v případech potřeby některých rychlých odhadů použití jiné kalibrace, pro jiný mléčný materiál, nemusí být až zásadně chybné a možnost přibližně správného odhadu výsledku pro získání použitelné praktické informace tak často existuje.

Cíl práce

Cílem této práce bylo posoudit možnost rychlého přibližného odhadu obsahu laktoferinu v kozím mlezivu rutinně dostupnou metodou v mlékařské analytické praxi pro účely posouzení jeho zdravotní, resp. nutriční kvality.

Materiál a metody

Vzorky mleziva ($n = 24$) byly odebírány na farmě v Jiho-moravském kraji, v nadmořské výšce 215 m v roce 2024, během konce února až začátku dubna, od 12 koz, vždy 2. a 5. den laktace. Zastoupení zvířat z hlediska plemene bylo následující: 5 zvířat plemene koza hnědá krátkosrstá, 3 zvířata plemene koza bílá krátkosrstá a 4 kříženky obou plemen. Z hlediska pořadí laktace sestávala skupina z následujících údajů: 2. laktace $\times$ 3; 3. lak.; 4. lak. $\times$ 2; 5. lak.; 6. lak. $\times$ 3; 8. lak.; 10-tá laktace.

Složení vzorků bylo měřeno na analyzátoru mléka DairySpec FT (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Obsah laktózy byl vyjádřen jako % monohydrátu laktózy. Kalibrace infraanalyzátoru (MIR-FT) pro měření LF byla instalována firemně (pan Craig Parsons, Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA; statistická metoda částečných nejmenších čtverců – PLS), na bázi referenčních hodnot LF metodou ELISA v kravském mléce.

Počet somatických buněk (PSB) v mléce byl stanoven pomocí metody průtočné cytometrie (FC) na fluoro-opto-elektronickém čítači částic Somacount 300 (Bentley Instruments, Chaska, Minnesota, USA). Kombinovaná rozšířená nejistota výsledků měření činila: $\pm 9,3$ % pro PSB < 900 tis./ml. Při kalibrační a kontrolní činnosti bylo postupováno v rámci norem: ČSN EN ISO/IEC 17025; ČSN EN ISO 13366–1 (57 0531); ČSN EN ISO 13366–2 (57 0531).

Ve všech vzorcích ($n = 24$) bylo provedeno stanovení LF metodou vysoceúčinné kapalinové chromatografie na reverzní fázi s iontově-párovacím činidlem (HPLC). Vzorky koziho mleziva byly odstředěny

(5 000 otáček/10 minut/5 °C) a z povrchu byl mechanicky odebrán tuk, 50 ml takto upraveného vzorku bylo vysráženo 10% kyselinou octovou na hodnotu pH 4,2. Po odstředění byla syrovátka oddělena od kaseinu, zmrazena na teplotu -18 °C a před vlastním stanovením rozmrazena a přefiltrována přes nylonový membránový filtr (0,22 μ m) do vialek pro HPLC stanovení. Vlastní stanovení bylo provedeno kapalinovým chromatografem Alliance 2695 s PDA 2996 detektorem (Waters, USA) a kolonou Poroshell 300SB-C8, 2,1 $\times$ 75 mm, 5 μ m (Agilent Technologies, USA). Bylo použito gradientové eluce a průtoku mobilní fáze 1,0 ml/min (voda/acetonitril/kyselina trifluoroctová), teplota kolony činila 50 °C, objem nástriku byl 5 μ L. Analyty byly detekovány při 205 nm. Pro sběr a vyhodnocování dat a chod kapalinového chromatografu byl použit software Empower 2 (Waters, USA).

Statistická analýza byla provedena výpočtem základních charakteristik mléčných ukazatelů. Výsledky ukazatelů PSB a LF byly logaritmicky transformovány. Při hodnocení vztahů mezi ukazateli a jejich výsledky byla použita lineární regrese a korelační analýza. Všechny operace byly provedeny v programu MS Excel (Microsoft, Redmond, Washington, USA).

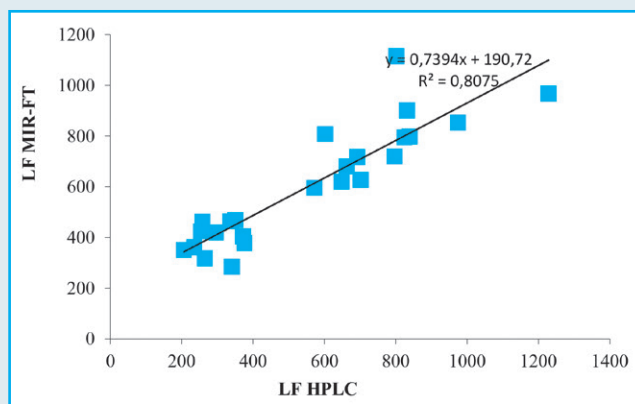
Výsledky a diskuse

Průměrný obsah LF v kozím mlezivu (Tab. 1) referenční metodou HPLC činil $560,83 \pm 279,36$ mg/l ($v_x = 49,8$ %), nepřímou metodou MIR-FT (kalibrace na kravském mléce metodou ELISA) pak $605,38 \pm 229,85$ mg/l ($v_x = 38,0$ %). Geometrické průměry (xg) a mediány (m) LF podle metod pak byly: 494 mg/l xg a 586,85 mg/l m (HPLC); 564 mg/l xg a 607,75 mg/l m (MIR-FT). Pokud jde, z fyziologického pohledu na laktaci koz, o průměrné hodnoty a variabilitu LF v 2. a 5. den mlezivového období, tyto činily: – 2. den, pro HPLC $680,57 \pm 277,29$ mg/l ($v_x = 40,7$ %), xg 624 mg/l a m 677 mg/l, pro MIR-FT $730,5 \pm 218,85$ mg/l ($v_x = 30,0$ %), xg 699 mg/l a m 756 mg/l; – 5. den, pro HPLC $441,09 \pm 234,53$ mg/l ($v_x = 53,2$ %), xg 391 mg/l a m 338,1 mg/l, pro MIR-FT $480,27 \pm 168,58$ mg/l ($v_x = 35,1$ %), xg 455 mg/l a m 422 mg/l. Rozdíl mezi 2. a 5. dnem laktace v mlezivovém období koz byl pro LF významný ($P < 0,05$) pro obě analytické metody, referenční i nepřímou.

Tab. 1 Porovnání výsledků stanovení koncentrace laktoferinu (LF; mg/l) v kozím mlezivu mezi referenční metodou (HPLC) a nepřímou metodou (MIR-FT, kalibrovaná na kravské mléko, LF ELISA)

Parametr/Metoda	$\bar{x} \pm sd$	v_x (%)	xg	m	min	max	$d \pm sd$	t	významnost
MIR-FT	$605,38 \pm 229,85$	38,0	564	607,75	284,8	1 114,7	$44,55 \pm 124,4$	1,72	$P > 0,05$
HPLC	$560,83 \pm 279,36$	49,8	494	586,85	206,1	1 227,9			
MIR-FT (log)	$2,7513 \pm 0,169$			2,7837	2,4545	3,0479	$0,0579 \pm 0,104$	2,67	$P < 0,05$
HPLC (log)	$2,6934 \pm 0,229$			2,7684	2,3141	3,0892			

MIR-FT = infračervená spektroskopie, nepřímá metoda; HPLC = vysoce účinná kapalinová chromatografie, referenční metoda; log = dekadický logaritmus; $\bar{x}$ = aritmetický průměr; sd = směrodatná odchylka; v_x = variační koeficient (%); xg = geometrický průměr; m = medián; min = minimum; max = maximum; d = průměrný rozdíl (diference, aritmetický průměr; LF MIR-FT – LF HPLC); t = hodnota testovacího kritéria t párového t-testu; významnost = pravděpodobnost nulové hypotézy.

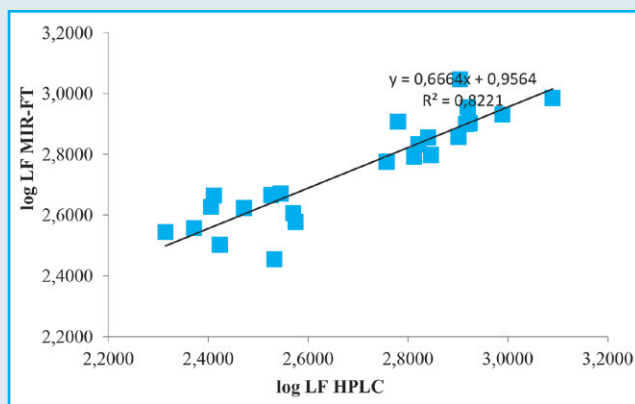


Obr. 1 Lineární regrese mezi obsahem laktoferinu stanoveným metodou HPLC (LF HPLC; mg/l) a metodou MIR-FT (LF MIR-FT; mg/l) v kozím mlezivu, $n = 24$; $r = 0,889$ ($P < 0,001$)

Rozdíl mezi průměry metod pro LF za mlezivové období (Tab. 1) byl nevýznamný ($P > 0,05$) pro původní hodnoty LF ($44,55 \pm 124,4$ mg/l; LF MIR-FT – LF HPLC) a významný ($P < 0,05$) pro log LF. S ohledem na průměrné hodnoty LF HPLC lze konstatovat, že pro praktické, informativní využití hodnot LF jsou tyto rozdíly zanedbatelné (v průměru 7,9 %), i když vykazují jistou variabilitu.

Pokud jde o hodnoty korelačních koeficientů (Obr. 1 a 2) výsledků LF mezi metodami (HPLC $\times$ MIR-FT), tyto činily: 0,889 ($P < 0,001$) pro původní hodnoty LF; 0,907 ($P < 0,001$) pro log LF. To znamená, že až 80,8 a 82,2 % variability v hodnotách LF nepřímé metody MIR-FT je určováno variacemi v hodnotách LF referenční metody HPLC. Zároveň, podle regresního koeficientu (Obr. 1), jednotkové zvýšení hodnoty LF HPLC (o 1 mg/l) přináší zvýšení LF MIR-FT o 0,7394 mg/l. Pokud jde o určité vizuální rozdělení hodnot v grafech na dvě mírně separované skupiny podél regresní přímky, pak tyto reprezentují dva odběrové termíny v mlezivovém období (5. a 2. den laktace) a představují tak známou časovou dynamiku změn kolostra, takže z metodického hlediska neinterferují negativně do podstaty použitého statistického vyhodnocení. Tyto výsledky pak opravňují k označení možnosti tohoto způsobu rychlého stanovení LF v kozím mlezivu za prakticky použitelné k informaci o nutriční kvalitě kozího mleziva ve vzájemném porovnání mleziv jednotlivých zvířat.

Výstupy této analýzy ukázaly, že vzdor použití jiné mléčné matrice při měření (kozí mlezivo versus kalibrace LF MIR-FT_{ELISA} pro kravské mléko), tedy ignorace specifické druhové kalibrace, vzdor známé rychlé a vysoké variability složek včetně LF v multi-komponentní matici mleziva v čase, i vzdor výrazně zpravidla vyšším průměrným hodnotám mléčných složek v mlezivu oproti zralému mléku, dosažené výsledky takto, dalo by se říci „metodicky nekorektního měření“, byly překvapivě nadějně, pokud jde o věrohodnost výsledků „aproximačního odhadu“ hodnot LF v kozím kolostru. To by mohlo prakticky



Obr. 2 Lineární regrese mezi logaritmicky transformovaným obsahem laktoferinu stanoveným metodou LF HPLC (log LF HPLC) a logaritmicky transformovaným obsahem laktoferinu stanoveným metodou MIR-FT (log LF MIR-FT) v kozím mlezivu, $n = 24$; $r = 0,907$ ($P < 0,001$)

umožňovat např. vzájemné porovnání kvality mleziva z hlediska koncentrace LF mezi jednotlivými zvířaty v době vrhu mláďat pro informaci k případně usměrněné výživě nově sajících kůzlat v období jejich mlezivové výživy. To je v období specificky, krátkodobě zvýšené průchodnosti epitelů části jejich zažívacího traktu pro biomakromolekuly v této periodě efektivního zisku pasivní imunity, jak je tomu převážně u přežvýkavců s obtížně prostupnou placentou – syndesmochorialis. To vše s ohledem na žádoucí podporu imunity mláďat při jejich odchovu.

Validace (externí validace) téhož kalibračního modelu (firemní kalibrace Bentley Instruments Inc.), jaký byl použit v předkládané práci, avšak se vzorky kravského mléka ($n = 120$) odebranými v České republice (ČR, severní Morava) ukázala průměrný obsah LF HPLC 124,37 mg/l a validační koeficient determinace (R^2_v) 0,3321 (Nejeschlebová et al., 2024). Jednalo se tak o výrazně slabší závislost než v případě výsledků dosažených pro kozí mlezivo v této práci ($R^2_v = 0,8075$). Jedním z možných důvodů této odchylky může být výrazně nižší průměrný obsah LF v práci se vzorky kravského mléka (Nejeschlebová et al., 2024) než v předkládané práci, kde byl obsah LF vzhledem k charakteru vzorkovaného materiálu (kolostrum) dle očekávání výrazně vyšší (560,38 mg/l). Těsnost závislosti může být ovlivněna množstvím analy-

Tab. 2 Vztah obsahu laktoferinu k počtu somatických buněk a obsahu laktózy v kozím kolostru

Parametry kolostra	r	Parametry kolostra	r
LF HPLC vs PSB	0,254 ns	LF MIR-FT vs PSB	0,311 ns
LF HPLC vs log PSB	0,186 ns	LF MIR-FT vs log PSB	0,251 ns
log LF HPLC vs log PSB	0,238 ns	log LF MIR-FT vs log PSB	0,258 ns
LF HPLC vs laktóza	-0,754 ***	LF MIR-FT vs laktóza	-0,835 ***
log LF HPLC vs laktóza	-0,748 ***	log LF MIR-FT vs laktóza	-0,838***

LF HPLC = obsah laktoferinu stanovený metodou HPLC; LF MIR-FT = obsah laktoferinu stanovený metodou MIR-FT; PSB = počet somatických buněk; r = Pearsonův korelační koeficient; ns = $P > 0,05$; *** = $P < 0,001$).

zované složky, (Soyeurt et al., 2006, 2021) tj. čím vyšší koncentrace, tím vyšší R^2_v či R^2_{cv} (cross-validační koeficient determinace).

Také další práce ukázaly soubory s nižším průměrným obsahem LF a nižším R^2_v či R^2_{cv} . Možnost měření LF metodou MIR-FT uvedli dříve Soyeurt et al. (2007, 2012), taktéž pro kravské mléko. V obou studiích byla jako referenční metoda pro stanovení LF použita ELISA. V pilotní studii Soyeurt et al. (2007) byla použita kalibrační sada 69 vzorků kravského mléka z belgického Valonu. Bylo dosaženo průměrné koncentrace LF 253,72 mg/l a R^2_{cv} 0,75. V následné větší studii (Soyeurt et al., 2012) byl kalibrační soubor tvořen 2 499 vzorky kravského mléka ze stád v Belgii, Irsku a Skotsku. Průměrná koncentrace LF činila 163,29 mg/l, R^2_{cv} bylo 0,71. V obou pracích Soyeurt et al. (2007, 2012) se jedná o tzv. cross-validaci, tj. výpočty nebyly provedeny se vzorky nezávislými na kalibračním modelu. Druhá práce Soyert et al. (2012) je doplněna o externí validaci s 265 vzorky kravského mléka z Valonu, kde byl získán R^2_v 0,60. Průměrný obsah LF v tomto souboru není uveden. Nejeschlebová et al. (2024) se zabývali stanovením LF v kravském mléce metodou MIR-FT, přičemž jako referenční metodu použili HPLC. Zjistili průměrný obsah LF HPLC 127,6 mg/l a R^2_{cv} 0,5887. Kalibrační sada obsahovala 205 vzorků odebraných ze stád dojníc v ČR (severní Morava a Vysočina) v průběhu tří let.

LF hraje klíčovou roli v obraně mléčné žlázy proti infekcím. Je známá spojitost zvýšeného obsahu LF v mléce a mastitidy jak u skotu, tak u koz (Hagiwara et al., 2003; Chen et al., 2004; Cheng et al., 2008). Bylo zjištěno, že v kravském mléce má LF tendenci korelovat s parametry mléka ve smyslu změn, ke kterým dochází při mastitidách. V kravském mléce uvedli pozitivní korelaci LF a PSB (zásadní ukazatel pro diagnostiku mastitid) Soyeurt et al. (2020; $r = 0,21$), pozitivní korelaci LF a skóre PSB uvedli Cheng et al. (2008; $r = 0,375$; $P < 0,001$) a Niero et al. (2023; $r = 0,40$). Negativní korelaci LF a laktózy v kravském mléce zaznamenali Cheng et al. (2008; $r = -0,183$; $P = 0,049$) a Niero et al. (2023; $r = -0,33$; $P < 0,001$). Wang et al. (2018) naopak uvedli kladnou korelaci pro LF a laktózu v kozím mléce ($r = 0,186$; $P = 0,001$). Hiss et al. (2008) zjistili významně vyšší obsah LF ($P < 0,05$) v kozím mléce s PSB nad 430 tis./ml než v mléce s PSB pod tímto limitem. Tabulka 2 uvádí korelační koeficienty mezi obsahem LF a PSB a mezi obsahem LF a laktózy v kozím kolostru. Byly zjištěny pozitivní korelační koeficienty mezi LF a PSB, pro HPLC $r = 0,254$ ($P > 0,05$); pro MIR-FT $r = 0,311$ ($P > 0,05$). Ačkoliv byly tyto korelace statisticky nevýznamné, je z nich jasně patrná tendence LF narůstat se zvyšujícím se PSB. Mezi LF a obsahem laktózy byly zjištěny významné negativní korelace, pro HPLC $r = -0,754$ ($P < 0,001$); pro MIR-FT $r = -0,835$ ($P < 0,001$). Uvedené ukazují na potenciál využití posuzované metody MIR-FT taktéž k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy koz.

Závěr

Jak ukazují výsledky odhadu koncentrace LF v kozím kolostru ($n = 24$) metodou MIR-FT (s kalibrací na LF v kravském mléce podle výsledků metody ELISA) v komparaci k výsledkům LF HPLC, shoda mezi metodami referenční (HPLC) a nepřímá (MIR-FT) je prakticky poměrně dobrá, resp. použitelná. Postup může zejména vhodně posloužit, jakkoliv se jeví „nestandardní“, na místě v praxi, pro bezprostřední vzájemné porovnání vzorků kozího mleziva na koncentraci laktoferinu mezi jednotlivými zvířaty z kvalitativního hlediska pro nutriční účely výživy čerstvě narozených mláďat, v tradičním sezónním (předjarním) období koncentrovaného rození kůzlat. Zaznamenané korelace LF k PSB a obsahu laktózy rovněž poukazují na potenciál využití posuzované metody MIR-FT k diagnostice zdravotního stavu mléčné žlázy koz.

Práce vznikla za podpory projektů MZe NAZV Země QK 21010326 a MZe RO 1425.

Seznam literatury

- BONFATTI V., DEGANI L., MENEGH A., CARNIER P. (2016): Short communication: Mid-infrared spectroscopy prediction of fine milk composition and technological properties in Italian Simmental. *Journal of Dairy Science*, 99, (10), s. 8216–21.
- CHEN P., W., CHEN W. C., MAO F. C. (2004): Increase of lactoferrin concentration in mastitic goat milk. *Journal of Veterinary Medical Science*, 66, (4), s. 345–350.
- CHENG J. B., WANG J. Q., BU D. P., LIU G. L., ZHANG C. G., WEI H. Y., ZHOU L. Y., WANG J. Z. (2008): Factors Affecting the Lactoferrin Concentration in Bovine Milk. *Journal of Dairy Science*, 91, (3), s. 970–976.
- GIANSANTI F., PANELLA G., LEBOFFE L., ANTONINI G. (2016): Lactoferrin from milk: nutraceutical and pharmacological properties. *Pharmaceuticals*, 9, (4), 61.
- HAGIWARA S., KAWAI K., ANRI A., NAGAHATA H. (2003): Lactoferrin concentrations in milk from normal and subclinical mastitic cows. *Journal of Veterinary Medical Science*, 65, (3), s. 319–323.
- HANUŠ O., GENČUROVÁ V., ZHANG Y., HERING P., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., DOLÍNKOVÁ A., MOTYČKA Z. (2011): Milk acetone determination by the photometrical method after microdiffusion and via FT infra-red spectroscopy. *Journal of Agrobiology*, 28, (1), s. 33–48.
- HANUŠ O., HULOVÁ I., GENČUROVÁ V., ŠTOLC L., KUČERA J., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R., MOTYČKA Z. (2009): Result interpretation of experimental calibration for milk citric acid determination via infra-red spectroscopy (MIR-FT). Interpretace výsledků pokusné kalibrace pro stanovení kyseliny citronové v mléce infračervenou spektroskopií (MIR-FT). *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LVII, (5), s. 87–101.
- HANUŠ O., SAMKOVÁ E., ŘÍHA J., VYLETĚLOVÁ M., KLIMEŠOVÁ M., ROUBAL P. (2013): Evaluation of development in indirect determination of milk fat free fatty acids in Czech Republic. Hodnocení vývoje v nepřímém stanovení volných mastných kyselin mléčného tuku v České republice. *Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendelianae Brunensis*, LXI, (6), s. 1669–1679.
- HISS S., MEYER T., SAUERWEIN H. (2008): Lactoferrin concentrations in goat milk throughout lactation. *Small Ruminant Research*, 80, (1–3), s. 87–90.
- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., KOPECKÝ J., JEDELSKÁ R. Metodika CM 46 2024 – název: Postup rychlého stanovení obsahu laktoferinu v mléce rutinní metodou infračervené spektrometrie. Uplatněno u Svazu výrobců mléka a.s., 21. 11. 2024. Datum certifikace 5. 12. 2024 (č. SVS/2024/176939-G). ISBN: 978-80-88390-12-1 (MILCOM) https://agronavigator.cz/sites/default/files/users/user446/Postup_rychleho_stanoveni_laktoferinu.pdf

- NEJESCHLEBOVÁ H., HANUŠ O., BARTÁKOVÁ K., SAMKOVÁ E., VORLOVÁ L., NAVRÁTILOVÁ P., BORKOVÁ M., KUČERA J., HASONOVÁ L., HÁLOVÁ K., KOPECKÝ J. (2023): Vybrané analytické a interpretační aspekty obsahu laktoferinu v kravském mléce. Selected analytical and interpretative aspects of lactoferrin content in cow milk. *Mlékařské Listy – Zpravodaj*, 34, (1), s. 1–7.
- NIERO G., THOMAS S. A., MOURATIDOU K., VISENTIN G., DE MARCHI M., PENASA M., CASSANDRO M. (2023): Lactoferrin concentration in bovine milk: validation of radial immunodiffusion technique, sources of variation, and association to udder health status. *Italian Journal of Animal Science*, 22, (1), s. 230–238.
- SAMKOVÁ E., ŠPIČKA J., HANUŠ O., ROUBAL P., PECOVÁ L., HASONOVÁ L., SMETANA P., KLIMEŠOVÁ M., ČÍTEK J. (2020): Comparison of fatty acid proportions determined by mid-infrared spectroscopy and gas chromatography in bulk and individual milk samples. *Animals*, 10, (6), 1095.
- SEGURA M. M., MARTÍNEZ-MIRÓ S., LÓPEZ M. J., MADRID J., GONZÁLEZ V., HERNÁNDEZ F. (2024): The effect of the season on the time dependent changes in colostrum lactoferrin level in Murciano–Granadina goats in intensive system farming. *Animals*, 14, (17), 2580.
- SØRENSEN M., SØRENSEN S. P. L. (1939): The proteins in whey. *Comptes Rendus Des Travaux Du Laboratoire Carlsberg*, 23, s. 55–99.
- SOYEURT H., BASTIN C., COLINET F. G., ARNOULD V. M.-R., BERRY D. P., WALL E., DEHARENG F., NGUYEN H. N., DARDENNE P., SCHEFERS J., VANDENPLAS J., WEIGEL K., COFFEY M., THÉRON L., DETILLEUX J., REDING E., GENGLER N., MCPARLAND S. (2012): Mid-infrared prediction of lactoferrin content in bovine milk: potential indicator of mastitis. *Animal*, 6, (11), s. 1830–1838.
- SOYEURT H., COLINET F. G., ARNOULD V. M.-R., DARDENNE P., BERTOZZI C., RENAVILLE R., PORTETELLE D., GENGLER N. (2007): Genetic variability of lactoferrin content estimated by mid-infrared spectrometry in bovine milk. *Journal of Dairy Science*, 90, (9), s. 4443–4450.
- SOYEURT H., DARDENNE P., GILLON A., CROQUET C., VANDERICK S., MAYERES P., BERTOZZI C., GENGLER N. (2006): Variation in fatty acid contents of milk and milk fat within and across breeds. *Journal of Dairy Science*, 89, (12), s. 4858–4865.
- SOYEURT H., GRELET C., MCPARLAND S., CALMELS M., COFFEY M., TEDDE A., DELHEZ P., DEHARENG F., GENGLER N. (2020): A comparison of 4 different machine learning algorithms to predict lactoferrin content in bovine milk from mid-infrared spectra. *Journal of Dairy Science*, 103, (12), s. 11585–11596.
- WANG J., SHI H., ZHANG T., HUANG J., LI Z., MA G., ZHANG X. (2018): The lactoferrin content variation and its related factors in milk of Xinong Saanen goats. *Journal of Applied Animal Research*, 46, (1), s. 1032–1035.

Korespondující autor: Mgr. Hana Nejeschlebová
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,
160 00 Praha 6, email: hana.nejeschlebova@seznam.cz

Přijato do tisku: 18. 4. 2025

Lektorováno: 27. 5. 2025

ANTIBIOTICKÁ REZISTENCE BAKTERIÍ MLÉČNÉHO KVAŠENÍ IZOLOVANÝCH ZE SÝRŮ TYPU GOUDA

Eva Musilová¹, Blanka Vrchotová¹, Hana Sýkorová²,
Sabina Purkrťová², Šárka Horáčková¹

¹ Ústav mléka, tuků a kosmetiky, VŠCHT Praha

² Ústav biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha

Antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Gouda-type cheeses

Abstrakt

Antibiotická rezistence mikroorganismů je v současné době důležitým vědeckým tématem, mimo jiné i v souvislosti s rizikem přenositelných genů antibiotické rezistence, které se mohou vyskytovat i u bakterií mléčného kvašení. V práci byl proveden mikrobiologický rozbor tří sýrů typu Gouda od různých českých výrobců se zaměřením na sledování počtů bakterií mléčného kvašení na půdách M17, Rogosa agaru a MRS agaru s přídavkem antibiotik. Z těchto půd bylo získáno 34 izolátů presumptivních nezákysové bakterií mléčného kvašení, u kterých byla dále provedena repetitivní PCR a stanovena citlivost k antibiotikům na agaru difúzní metodou. Na základě těchto testů bylo vybráno 12 izolátů, které byly metodou MALDI-TOF MS identifikovány jako *Lactiplantibacillus plantarum* ($n = 8$) a *Latilactobacillus curvatus* ($n = 4$). U těchto izolátů byla stanovena minimální inhibiční koncentrace antibiotika pomocí diluční metody v mikrotitračních destičkách s vybranými antibiotiky (vankomycin, ampicilin, gentamicin, streptomycin, kanamycin, erythromycin, klindamycin, tetracyklin, chloramfenikol) na základě pokynů pro charakterizaci mikroorganismů EFSA. Kromě rezistence k vankomycinu byla u více než 80 % vybraných izolátů zaznamenána vyšší minimální inhibiční koncentrace u antibiotik ze skupiny aminoglykosidů, než je mezní hodnota stanovená v pokynech EFSA.

Klíčová slova: nezákysové bakterie mléčného kvašení, sýr, Gouda, aminoglykosidy, tetracyklin, chloramfenikol

Abstract

Antibiotic resistance of microorganisms is currently a significant scientific concern, particularly due to the potential risk of transferable antibiotic resistance genes, which can also occur in lactic acid bacteria. In this study, a microbiological analysis was conducted on three samples of Gouda-type cheese from different Czech producers, focusing on quantifying the number of lactic acid