

NEBAKTERIÁLNÍ PŮVODCI MASTITID V BAZÉNOVÝCH VZORCÍCH MLÉKA

Šimon Friedrich¹, Ivana Kucharovičová¹, Marek Brychta¹,
Tomáš Brychta¹, Pavel Barták¹, Petr Roubal², Růžena
Seydlová², Romana Bačová³, Monika Morávková³

¹ Státní veterinární ústav Jihlava

² Výzkumný ústav mlékárenský Praha

³ Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno

Nonbacterial causative agents of mastitis in milk pool samples

Abstrakt

V bazénových vzorcích mléka (celkem 253) ze šesti mlékáren byla kultivačně zjišťována přítomnost kvasinek, řas rodu *Prototheca* a plísní. Současně bylo provedeno i stanovení počtu kvasinek a řas v 1 ml mléka. K identifikaci izolátů byla použita metoda MALDI TOF. Celkem bylo identifikováno 48 druhů kvasinek v 246 pozitivních vzorcích mléka, tzn. 97,2 %. Řasy rodu *Prototheca* se podařilo identifikovat v 13 vzorcích, tzn. 5,1 %.

Klíčová slova: kvasinky, *Prototheca* spp., mastitis

Abstract

The presence of yeasts, algae of genus *Prototheca* and moulds in bulk tank milk samples were examined from six dairies (in total 253 samples). The estimation of colony counts per 1ml of milk was performed at the same time. The identification of isolates was carried out by MALDI TOF. In total, we identified 48 yeast species out of 246 positive samples, i.e. 97.2%. *Prototheca* algae were identified in 13 milk samples, i.e. 5.1%.

Key words: yeasts, *Prototheca*, mastitis

Úvod

Kvasinky jsou jednobuněčné eukaryotické organismy. Jsou komenzály kůže a sliznic, vyskytují se v podestýlce, pivovarském mlátu (WINTER 2009), mají široké biotechnologické využití.

Izolovány z kravského mléka byly poprvé roku 1901 (PENGOV, 2002). Mezi druhy nejčastěji zachycované ze zánětů mléčné žlázy skotu patří *Candida krusei*, *Candida kefyr*, *Candida rugosa* (PENGOV 2002, DUBRAVKA, 2014). Výskyt kvasinkami vyvolaných mastitid je často vázán na předchozí léčbu kortikosteroidy nebo dlouhotrvající léčbu antibiotiky (BAUMGARTNER, 2008, WINTER, 2009).

Z hlediska technologického zpracování mléka je významné, že vyšší počty kvasinek narušují svojí enzymatickou aktivitou senzoričké vlastnosti mléka a mléčných výrobků (JESENSKÁ Z., 1987).

Řasy rodu *Prototheca* jsou jednobuněčné, nezelené organismy příbuzné rodu *Chlorella*. Jejich výskyt je ubikvitární v prostředí, nejčastěji na vlhkých místech (napajedla), v organickém materiálu (půda), krmných žlabech (RAPUNTEAN, 2009, WINTER, 2009).

Poprvé byl tento rod popsán Krügerem roku 1894 (TODD, 2017). V současné době je popsáno kolem 14 druhů (Jagielskii, 2019). U lidí převažuje druh *Prototheca wickeramii* způsobující onemocnění kůže a systémové infekce (LASS-FRÖL 2007). Druhy *Prototheca zopfii* genotyp II. (v současné době označovaná jako *P. bovis*) a *P. blaschkeae* jsou původci mastitid skotu (ARNHOLDT, 2012).

Jako zástupce plísní izolovaný z mléčné žlázy skotu je uváděn *Aspergillus fumigatus*. Jedná se plíseň běžně zastoupenou v prostředí, např. v plesnivě podestýlce nebo zaplísněném krmivu (WINTER, 2009). Dále je možné zmínit rod *Mucor* (GRUNERT, 1996).

Všechny výše uvedené skupiny organismů jsou schopny vyvolat zánět mléčné žlázy skotu (mastitis). Terapie antimikrobiky není v současné době pro tyto případy dostupná a onemocnění proto často končí vyřazením dojnice.

Materiál a metody

Charakteristika a původ vzorků

K vyšetření byly zaslány chlazené bazénové vzorky mléka o objemu 10 ml z celkem 6 mlékáren. Vyšetření bylo zaměřeno na stanovení přítomnosti kvasinek a řas (*Prototheca* sp.), jejich rodové a druhové určení a kvantifikaci. U vybraných kmenů následovala archivace izolátů

za účelem předání dalším pracovištím (VÚVeL Brno, VÚM-pracoviště Praha a Šumperk) k dalšímu výzkumu.

Kultivační vyšetření mléka

Po temperování na laboratorní teplotu bylo 0,1 ml vzorku inokulováno na tři půdy - Sabouradův agar s dextrózou, desoxycholátový agar s dichloranem a bengálskou červení - pro určení počtu kvasinek a *Prototheca* isolation medium agar - pro izolaci *Prototheca* sp. Kultivace probíhala souběžně při 37 °C a 25 °C po 5 dnů. První odečet výsledků byl proveden třetí den inkubace, při pozitivním nálezu byly podezřelé kolonie izolovány. Agarová půda použitá pro izolaci odpovídala půdě pro primokultivaci. Závěrečné zhodnocení primokultivace bylo provedeno pátý den. V případě objevení se nových kolonií byly tyto opět izolovány.

Kvantitativní vyšetření

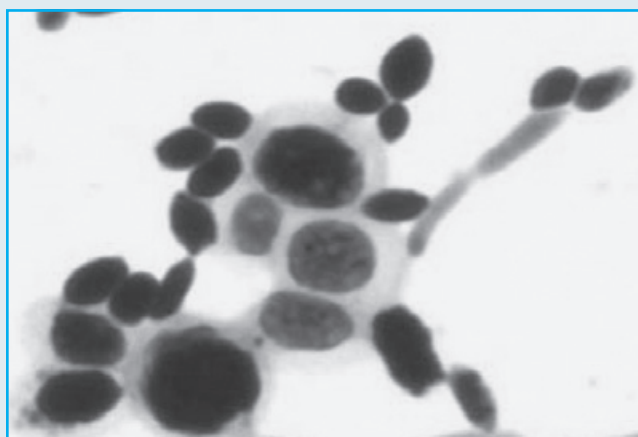
Metodicky se kvantitativní vyšetření dodaných vzorků řídilo normou ČSN ISO 21527 - 2: Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda stanovení počtu kvasinek a plísní. V případě stanovování počtu řas bylo postupováno obdobně.

Vyšetření vzorků bylo provedeno ve dvou ředěních (10^{-1} a 10^{-2}), velikost inokula 0,1 ml, inkubace při 25 °C po pět dnů. Následně byly počítány narostlé kolonie.

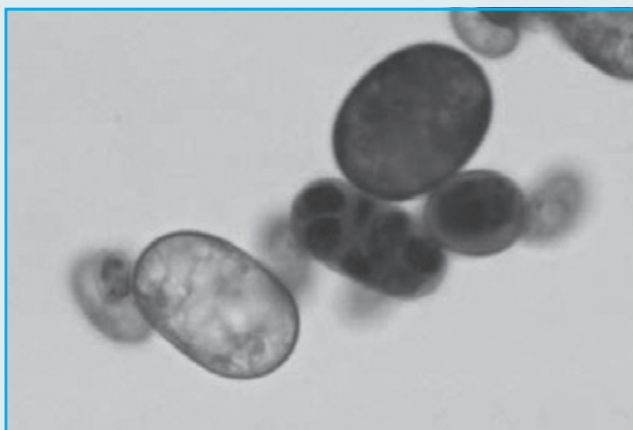
Identifikace izolátů

K druhové identifikaci izolátů byla použita metoda hmotnostní spektrofotometrie MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization* s analyzátozem doby letu Time of Flight), firma: Bruker-Daltonics, Německo. Vzorky byly zpracovány metodou extrakce kyselinou mravenčí.

V případech, kdy nebylo možné izolát metodou MALDI-TOF určit, byl zhotoven fixovaný preparát barvený pomocí Grama (Obr. 1) nebo nativní preparát barvený metylénovou modří (Obr. 2). Na základě jeho posouzení bylo možné zařadit kmen mezi kvasinky nebo řasy-resp. rod *Prototheca*.



Obr. 1 *Prototheca* sp. ve směsi s kvasinkami Barvení dle Grama (kvasinky se jeví Gram pozitivní, *Prototheca* Gram negativní, resp. labilní)



Obr. 2 *Prototheca* sp. Barvení metylénovou modří

Suspektní izoláty prototék byly podrobeny molekulární identifikaci pomocí dvou na sebe navazujících multiplexních real-time PCR systémů I a II (qPCR; Bacova et al., 2020). 50 mg kultury bylo suspendováno ve 300 µl sterilní PCR vody. Do zkumavky byly přidány zirkoniové kuličky (0,1 mm) a proběhla homogenizace při 6 400 rpm/ min. Lyzáty byly dále inkubovány při 100 °C po dobu 5 minut. Následně proběhla centrifugace při 14 000 g x 5 min. Takto připravené lyzáty byly použity pro qPCR analýzu.

Multiplex I obsahuje sadu primerů a fluorescenčně značených TagMan sond, které identifikují rod *Prototheca* a přítomnost nejčastějšího zástupce, vyskytujícího se v mastitidním mléce - *Prototheca bovis*. Vzorky, které multiplex I potvrdil jako *Prototheca*, nicméně neurčil je jako *P. bovis*, dále podstoupily multiplex II. Ten identifikuje další nejčastější zástupce *P. blashkeae*, *P. wickerhamii* a *P. ciferrii* (dříve *P. zopfii* genotyp I). Součástí multiplexního qPCR systému je i interní amplifikační kontrola (Bacova et al., 2020).

Výsledky a diskuse

Souhrnné výsledky uvádíme v tabulkách 1 a 2. Vzorky ze všech vyšetřovaných mlékáren byly pozitivní na přítomnost kvasinek. Kvasinky byly izolovány z většiny vzorků mléka, pouze 7 vzorků mléka tzn. 2,7 % vzorků bylo negativních. Nejvyšší výskyt vykazovaly druhy *Candida kefyr* (98 izolátů), *Candida krusei* (85 izolátů) a *Candida inconspicua* (74 izolátů). Přítomnost řas rodu *Prototheca* se podařilo prokázat ve čtyřech ze šesti mlékáren. Konkrétně byla řasa prototéka izolovaná z bazénových vzorků mléka ze 13 farem, což představuje 5 % pozitivních mlék na přítomnost *Prototheca* spp. Většinou se jednalo o druh *P. bovis*, který patří mezi nejčastější původce prototékové mastitidy skotu. Ve dvou případech byl izolát identifikován jako *P. blashkeae* a v jednom případě jako *P. ciferrii* (dříve byl tento druh uváděn jako *P. zopfii* genotyp 1).

Tabulka 3 a 4 uvádí výsledky kvantitativního vyšetření. Pro účely článku byly počty KJT/ml vzorku rozříděny do pěti kategorií 10^1 - 10^5 /ml. Pro úplnost dodáváme, že

Tab. 1 Výsledky kultivačních vyšetření - kvasinky

	Počet bazénových vzorků	Počet pozitivních vzorků	Počet pozitivních vzorků %	Počet identifikovaných druhů
Mlékárna č. 1	96	93	96,9	28
Mlékárna č. 2	15	13	86,7	21
Mlékárna č. 3	14	14	100	14
Mlékárna č. 4	86	85	98,8	26
Mlékárna č. 5	35	34	97,1	22
Mlékárna č. 6	7	7	100	18
CELKEM	253	246	97,2 %	48

Tab. 2 Výsledky kultivačních vyšetření - řasy *Prototheca* sp.

	Počet bazénových vzorků	Počet pozitivních vzorků	Počet pozitivních vzorků %
Mlékárna č. 1	96	2	2,1
Mlékárna č. 2	15	1	6,7
Mlékárna č. 3	14	0	0,0
Mlékárna č. 4	86	3	3,49
Mlékárna č. 5	35	7	20,0
Mlékárna č. 6	7	0	0,0
CELKEM	253	13	5,1 %

Tab. 3 Výsledky kvantitativního vyšetření kvasinek

Počet KTJ/ml v řádu	Počet vzorků
10 ¹	64
10 ²	93
10 ³	63
10 ⁴	25
10 ⁵	1
Celkem vzorků	246

Tab. 4 Výsledky kvantitativního vyšetření *Prototheca* sp.

Počet KTJ/ml v řádu	Počet vzorků
10 ¹	11
10 ²	1
10 ³	1
10 ⁴	0
10 ⁵	0
Celkem vzorků	13

nejnižší počty kvasinek i řas se pohybovaly v <50 KTJ/ml, nejvyšší zjištěný počet kvasinek byl 128 000 KTJ/ml vzorku, nejvyšší počet *Prototheca* sp. byl 3000 KTJ/ml vzorku.

Z identifikovaných izolátů plísní je z klinického hlediska zajímavý *Aspergillus niger*, který je popisován jako možný patogen mléčné žlázy (CARTER, 1995). Souhrnné výsledky - tabulka 6.

Na závěr je třeba konstatovat, že uváděné výsledky jsou průběžné a na identifikaci izolátů je dále pracováno.

Závěr

Provedeným vyšetřením jsme prokázali v bazénových vzorcích mléka nebakteriální původce mastitid - kvasinky, řasy i plísně. Jejich zdrojem může být prostředí, popř. dojnice (postižená nebakteriální mastitidou).

Tab. 5 Identifikace řasy *Prototheca* pomocí dvou multiplexních qPCR

	Počet pozitivních vzorků	Multiplex I qPCR	Multiplex II qPCR	
		<i>P. bovis</i>	<i>P. blasheae</i>	<i>P. ciferrii</i>
Mlékárna č. 1	2	1	1	
Mlékárna č. 2	1	1		
Mlékárna č. 3	0			
Mlékárna č. 4	3	2	1	
Mlékárna č. 5	7	6		
Mlékárna č. 6	0			1
CELKEM	13	79,9 %	15,4 %	7,7 %

Tab. 6 Identifikace plísní

	Počet izolátů	Identifikované plísně
Mlékárna č. 1	10	<i>Didymella aurea</i> , <i>Epicoccum sorghinum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium</i> spp., <i>Penicillium citrinum</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Coniochaeta mutabilis</i> , <i>Cladosporium herbarum</i>
Mlékárna č. 2	0	
Mlékárna č. 3	0	
Mlékárna č. 4	3	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Fusarium solani</i> , <i>Penicillium commune</i>
Mlékárna č. 5	1	<i>Aspergillus niger</i>
Mlékárna č. 6	2	2x <i>Coniochaeta mutabilis</i>

Výskyt těchto původců v bazénových vzorcích proto může napovídat jak chyby v metodických postupech získávání mléka, tak neuspokojivé zoohygienické podmínky chovu a může být impulzem mimo jiné pro další vyšetření dojnic, které je řešeno v navazující fázi projektu. Všechny skupiny mikroorganismů jsou schopny vyvolat akutní i subklinické mastitidy. Pro zabránění jejich šíření v chovu je nebytně nutná identifikace postižených zvířat - zejména subklinických případů, jejich oddělení ustájení a dojení (resp. „dojení nakonec“), popř. okamžité vyřazení (GRUNERT, 1996).

Poděkování

Práce vznikla v rámci řešení projektu NAZV QK 1910092 a za institucionální podpory MZE-RO0518.

Literatura:

- GRUNERT E. (1996), Buiatrik-Band 1, Verlag M. H.Schaper Alfred, Hannover, ISBN 3-7944-0181-6
- SELBITZ H.-J. (2011), Tiermedizinische Mikrobiologie, Infektions- und Seuchenlehre, Enke Verlag Stuttgart in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH Co., ISBN 978-3-8304-1080-5
- WINTER P. (2009), Praktischer Leitfaden Mastitis, Parey in MVS Medizinverlage Stuttgart GmbH Co., ISBN 978-3-8304-4168-7
- JESENSKÁ Z. (1987), Mikroskopické huby v poživatinách a v krmivách, Alfa Bratislava, 063-018-87 MHV
- CARTER, G. R. (1995): Diagnostic procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology. 6th ed., (Carter, G. R. and J. R. Cole Jr., Eds.) Academic Press inc., California. pp. 457-467
- Bacova R., Kralík P., Kucharovicova I., Seydlova R., Moravkova M. (2020): A novel TaqMan qPCR assay for rapid detection and quantification of pro-inflammatory microalgae *Prototheca* spp. in milk samples. Manuscript submitted for publication.

- Jagielski, T., Bakula, Z., Gawor, J., Maciszewski, K., Kusber, W. H., Dyla, M., ... & Karnkowska, A. (2019). The genus *Prototheca* (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*) revisited: Implications from molecular taxonomic studies. *Algal Research*, 43, 101639.
- RAPUNTEAN, S., RAPUNTEAN, G., FIT, N. I., CUC, C., & NADAS, G. C. (1). Morphological and Cultural Characterization of some Strains of Unicellular Algae of the Genus *Prototheca* Sampled from Mastitic Cow Milk. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 37(1), 31-40. <https://doi.org/10.15835/nbha3713091>
- DUBRAVKA MILANOV1*, BOJANA PRUNIŠ1, MAJA VELHNER1, J. BOJKOVSKI Diagnosis of yeast mastitis in dairy cows. *LUCRĂRI ȘTINȚIFICE MEDICINĂ VETERINARĂ VOL. XLVII(1), 2014, TIMIȘOARA*. https://www.researchgate.net/publication/264976829_DIAGNOSIS_OF_YEAST_MASTITIS_IN_DAIRY_COWS
- LASS-FLÖRL C. and MAYR A.: Human Protothecosis, *Clin Microbiol Rev*. 2007 Apr; 20(2): 230-242. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1865593/>
- PENGOV A. (2002), Prevalence of mycotic mastitis in cows, *Acta Veterinaria* (Beograd), Vol. 52. No. 2-3, 133-136., UDK 619:618.19-002:636.2
- BAUMGARTNER M, SPERGGER J., SCHODER G., WINTER P (2008): Ausbruch akuter Hefemastitiden in einem österreichischen Milchviehbetrieb nach kombinierter Antibiotika-Prednisolon-Behandlung, *Vet. Med. Austria / Wien. Tierärztl. Mschr.* 95, 15-21. <https://vetline.de/ausbruch-akuter-hefemastitiden-in-einem-oesterreichischen-milchviehbetrieb-nach-kombinierter-antibiotika-prednisolon-behandlung/150/3252/68135>
- TODD J.R. et al (2018), Medical mycology 2017, *Medical Mycology*, Volume 56, Issue suppl_1, 1 April 2018, Pages S188-S204, <https://doi.org/10.1093/mmy/mjx>

Korespondující autor: MVDr. Šimon Friedrich
Státní veterinární ústav Jihlava, Rantířovská 93/20, Horní
Kosov, 586 01 Jihlava, e-mail: friedrich@svujihlava.cz

Přijato do tisku: 14. 10. 2020

Lektorováno: 4. 11. 2020

ZMĚNY TECHNOLOGICKÝCH VLASTNOSTÍ MLÉKA MALÝCH PŘEŽVÝKAVCŮ V DŮSLEDKU FALŠOVÁNÍ MLÉKEM KRAVSKÝM

Oto Hanuš¹, Lucie Rysová², Irena Němečková¹,
Veronika Legarová², Josef Kučera³, Marcela Klimešová¹,
Radoslava Jedelská¹, Jaroslav Kopecký¹,
Ludmila Nejeschlebová¹

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

² Katedra kvality a bezpečnosti potravin,
Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů,
Česká zemědělská univerzita v Praze

³ Českomoravská společnost chovatelů, a.s., Hradištko

Changes in the technological properties of small ruminant milk as a result of adulteration by cow milk

Abstrakt

Rostoucí poptávka konzumentů po kozím (KOM) a ovčím mléku (OVM) a jeho výrazně vyšší cena v po-

rovnání s kravským mlékem (KRM) představují zásadní podněty k falšování. Proto jsou významné analytické metody pro identifikaci takového neetického jednání. V současnosti (projekt *MZe ZEMĚ QK 1920222*) jsou v této souvislosti studovány možnosti analytických metod MALDI-TOF a nukleární magnetické rezonance (NMR). Relevantní výzkum poukazuje na identifikační potenciál těchto metod ve smyslu prevence zhoršování kvality potravinového řetězce a podpory ochrany zdraví konzumentů. Uvedeným postupem falšování mohou být, podle intenzity faktoru, ovlivněny nejen nutriční, ale i technologické vlastnosti mléčné suroviny. Bylo vzorkováno 6, 5 a 6 stád koz, ovcí a krav dvakrát v roce (květen a srpen). Plemenná struktura stád zvířat odpovídala podmínkám ČR. Do experimentu bylo zařazeno celkově 24 bazénových vzorků mléka pro každý druh. Následně bylo kozí a ovčí mléko záměrně narušeno kravským mlékem v poměrech 0,5, 1, 5 a 10 % a ošetřeno vysokou pasterací. Vedle složek a hygienických vlastností byly stanoveny i technologické vlastnosti mléka: aktivní kyselost (pH); titrační kyselost (SH); čas enzymatické koagulace laktoproteinů (ČK); pevnost syřeniny (PS); kvalita syřeniny (KS); objem vypuzené syrovátky po synerézi (OS); kysací schopnost mléka (KSM); počet streptokoků po fermentaci (STR); počet laktobacilů po fermentaci (LAC). Analyzováno bylo nativní i porušené mléko. Technologické vlastnosti byly testovány u kozího a ovčího mléka při porušení 5 a 10 % KRM. Mezdruhové rozdíly nebyly výrazné pro geometrické průměry (xg) celkového počtu mikroorganismů 53, 77 a 148 tisíc KTJ/ml pro KRM, KOM a OVM. Tyto výsledky naznačily srovnatelné hygienické situace při dojení ve stádech. Tyto rozdíly byly nevýznamné ($P > 0,05$) mezi malými přežvýkavci a převážně významné mezi malými přežvýkavci a KRM ($P > 0,05$ až $P \leq 0,001$). Mezdruhové diference u počtu somatických buněk (xg; 152, 1001 a 729 tisíc/ml) byly opět nevýznamné ($P > 0,05$) mezi malými přežvýkavci a významné mezi malými přežvýkavci a KRM ($P \leq 0,001$). Pro obsah tuku a bílkovin nebyly významné rozdíly mezi kozou a krávou ($P > 0,05$), ale byly vždy významné pro rozdíly u OVM ($P \leq 0,001$). Obsah laktózy malých přežvýkavců je vždy nižší (KRM 5,05, KOM 4,62 a OVM 4,74 %). Výrazné rozdíly byly u obsahu močoviny, která se zvyšovala v pořadí KRM, KOM a OVM ($P \leq 0,001$) 34,57, 64,39 a 96,11 mg/100ml. To zřejmě odpovídá specifické druhové fyziologii metabolismu zvířat. U falšování KOM (10 % KRM) byl významný ($P \leq 0,05$) vliv na SH: z 5,97 na 6,14 °SH (v důsledku vyššího obsahu bílkovin u KRM, které jsou zdrojem (kasein) cca 2/5 SH mléka. U falšování OVM (10 % KRM) byl významný vliv na: SH z 10,15 na 9,91 °SH ($P \leq 0,001$); KS ($P \leq 0,05$); KSM z 50,43 na 48,39 °SH ($P \leq 0,001$). Falšování do 10 % mění technologické vlastnosti mléka malých přežvýkavců jen omezeně. Za druhově nejvýraznější, statisticky významné rozdíly v technologických vlastnostech mléka lze považovat diference pro SH (KOM