



VÚVeL Academy - od výzkumu k praxi v chovech hospodářských zvířat, cyklus seminářů

**Sborník ze semináře
4. 10. 2023
(VÚVeL)**

Nové poznatky o zdravotně a technologicky rizikových mikroorganismech v potravinách

Seminář přináší poznatky vzniklé řešením projektu MZe NAZV Země QK1910121

Perzistence vybraných původců alimentárních onemocnění, hygienických indikátorů a možnosti jejich eliminace z prostředí potravinářských podniků

POZVÁNKA



Česká technologická platforma pro zemědělství,
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.
a Výzkumný ústav mlékárenský, s. r. o.
ve spolupráci s

Výzkumným ústavem živočišné výroby, v. v. i. a Mendelovou univerzitou v Brně
si Vás dovolují pozvat na seminář

Nové poznatky o zdravotně a technologicky rizikových mikroorganismech v potravinách

PROGRAM

- Rezistence koliformních bakterií – riziko perzistování na mlékárenských provozech
Ing. Irena Němečková, Ph.D. a Ing. Šárka Trešlová (VÚM)
- Vývoj mikroflóry sýrů během výroby a zráni - konkurence startovacích kultur a mikrobioty prostředí – Mgr. Helena Juřicová, Ph.D. (VUVeL)
- Experimentální aplikace vybraných pigment-produkujících bakterií a jejich vliv na zbarvení sýrů – Mgr. Kristýna Kořená (VUVeL)
- Zoohygiena v chovech dojnic – Prevence před mastitidami v rámci antibiotické terapie a rizik rezistencí bakterií – MVDr. Miroslav Macháček, Ph.D. (VETUNI)
- Přenosná rezistence ke kolistinu v českých chovech a potravinách
Mgr. Iva Sukkar, Ph.D (CEITEC VETUNI)
- Srovnání metod genotypizace a nástrojů pro predikci antimikrobiální rezistence u *Campylobacter jejuni* – Mgr. Nicol Straková, Ph.D. (VUVeL)
- Molekulární metody detekce vybraných patogenů v potravinách (a jejich úskalí)
Ing. Miroslava Krzyžánková, Dr.rer.nat. (VUVeL)
- Celogenomová analýza meticilin rezistentních a meticilin citlivých *Staphylococcus aureus* ve fermentovaných salámech – Mgr. Martina Florianová, Ph.D. (VUVeL)

Kdy:
4. 10. 2023
10:00 – 15:00 hod.

Kde:
VUVeL,
Hudcová 296/70,
Brno 621 00

Kontakt:
Tel.: 773 756 631

Účast na semináři je bezplatná, občerstvení zajištěno.

Registrace
www.vri.cz/prihlaseni/



Kontaktní osoba: doc. MVDr. Soňa Šlosárová, Ph.D.; e-mail: sona.slosarkova@vri.cz

Seminář přináší poznatky vzniklé řešením projektu MZe NAZV Země QK1910121 Perzistence vybraných původců alimentárních onemocnění, hygienických indikátorů a možnosti jejich eliminace z prostředí potravinářských podniků

V průběhu semináře bude pořizována fotodokumentace akce, případně audiovizuální záznam výhradně za účelem medializace a propagace akce.

Osobní údaje budou v souladu s nařízením EP a Rady (EU) č. 679/2016 o ochraně fyzických osob v souvislosti se zpracováním osobních údajů a o volném pohybu těchto údajů a o zrušení směrnice 95/46/ES zpřístupněny také Státnímu zemědělskému intervenčnímu fondu a Ministerstvu zemědělství pro účely administrace.

CÍL PRÁCE

REZISTENCE KOLIFORMNÍCH BAKTERIÍ – RIZIKO PERZISTOVÁNÍ NA MLÉKÁRENSKÝCH PROVOZECH

Irena Němečková, Šárka Trešlová, Eliška Hromádková
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

- posoudit rezistenci vybraných druhů M.O. (*E. coli*, *Klebsiella* spp., *S. aureus*, *L. monocytogenes*) vůči fyzičkám podmínkám
- kontaminanty mlékárenských, popř. masních provozů
- v této prezentaci koliformní bakterie, mlékárenské provozy
- vytipovat rizikové vlastnosti indikující zvýšené riziko perzistování na provozu
 - suspektně perzistentní kmény
 - izolovaný z prostředí výroby, meziproduktů, výrobků, apod.
 - stejný pulzotyp zachycen na různých místech daného provozu
 - stejný pulzotyp zachycen opakován v průběhu času
 - neperzistentní kmény
 - izolovány ze suroviny
 - ani při opakování odberů stejný pulzotyp jinde na provozu nezachycen

TESTOVANÉ KMENY

- izolace, typizace a výběr kménů na pracovišti VÚVeL
(R. Karpišková, T. Gelbíčová, H. Juřícová, K. Kořená, N. Straková, M. Florianová a kol.)
- 3 sýťárný, celkem 33 kménů
- *E. coli* 17 kménů, 5 pulzotypů (EC-Xba-7, EC-Xba-17, EC-Xba-19, EC-Xba-191, EC-Xba-233)
 - z toho 1 kmen neperzistentní (EC-Xba-17)
 - *K. pneumoniae* 2 kmény, 2 pulzotypy (KP-Xba-122, KP-Xba-135)
 - *K. oxytoca* 14 kménů, 9 pulzotypů (KO-Xba-126, KO-Xba-132, KO-Xba-136, KO-Xba-148, KO-Xba-175, KO-Xba-179, KO-Xba-180, KO-Xba-181, KO-Xba-200)
 - z toho 1 kmen neperzistentní (KO-Xba-136)

MODELOVÁ MÉDIA

- BHI bujón
- sušené odstředěné mléko obnovené na sušinu 0,1 g/100 ml („bílá voda“)
- upravená sladká syrovátká (model prostředí sýrárny, solovny, apod.)
 - zářívek 108 °C/8 min, odfiltrování sraženiny, úprava na různé hodnoty pH, ošetření 110 °C/15 min
 - úprava pH na 4,6, odfiltrování sraženiny, ošetření 110 °C/20 min, přídavek soli sterilované suchým teplem, aseptická úprava pH na 5,2, aseptické odstředění sraženiny
- odstředěné mléko (testování termorezistence)
 - média pro testování antibakteriálního účinku sanitárních roztoků

REZISTENCE K pH

- upravená syrovátká pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 6,8; 10,0
- měření OD (850 nm), Biosan RTS-1C, kultivace při 18 °C

- *E. coli* kmenů, z toho 1 neperzistentní

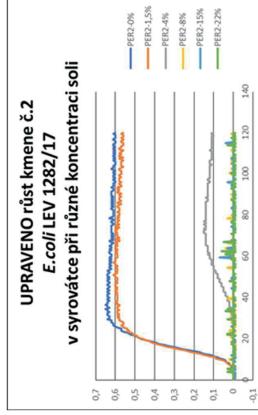
- 3 kmeny (neperzist. ze suroviny, perzistentní z výrobního zařízení, sýrárna A)
 - při pH 3,0 a 3,5 bez nárustu po 7 dnech
 - při pH 4,0 velmi slabý nárust
 - při pH 4,5 nejkratší lag-fáze (2-4 h)
 - při pH 6,8 a 10,0 nejvýšší nárust
- 3 kmeny (ze solných lázní, sýrárna C)
 - při pH 3,0; 3,5; 4,0 a 10,0 bez nárustu po 7 dnech
 - při pH 4,5 a 6,8 roste, lag-fáze 6-8 h
- *Klebsiella* spp. 6 kmenů, z toho 1 neperzistentní
 - při pH 3,0 a 3,5 bez nárustu po 7 dnech
 - vliv ostatních pH na maximální nárust málo výrazný
 - nejkratší lag-fáze při pH 4,5 a 6,0 (4-6 h)

REZISTENCE K NaCl

- upravená syrovátká s 0,0; 1,5; 4,0; 8,0; 15,0; 22,0 % hm. NaCl
- měření OD (850 nm), Biosan RTS-1C, kultivace při 18 °C

- *E. coli* kmenů, z toho 1 neperzistentní

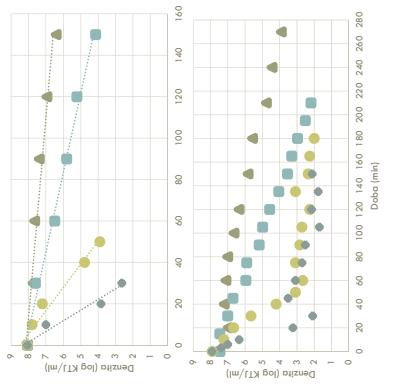
- při 0,0 a 1,5 % NaCl lag-fáze 5-12 h
- při 4,0 % NaCl slabě čáž významně snížený
- při 8,0; 15,0 a 22,0 % NaCl bez nárustu po 7 dnech
- *Klebsiella* spp. 6 kmenů, z toho 1 neperzistentní
 - při 0,0 a 1,5 % NaCl lag-fáze 4-9 h
 - při 4,0 % NaCl slabě čáž významně snížený nárust, lag-fáze 0,5-1,0 den
 - při 8,0; 15,0 a 22,0 % NaCl bez nárustu po 7 dnech



REZISTENCE VŮČI ZÁHŘEVU

- Metodika posuzování rezistence bakterií vůči záhřevům na (sub)pasterizační teploty Osvědčení: SVS/2021/11/5238/G

- příklad: *K. oxytoca* S525



REZISTENCE VŮČI ZÁHŘEVU

- pouze 1 suspenčně perzistentní kmén K. oxytoca citlivý k záhřevu dle očekávání podle literatury

<i>E. coli</i> (4 kmény, z toho 1 neperzistentní): z (°C) 7-9 °C			
T (°C)	D (min)	t _{log} (min)	t _{II} (min)
50	182-417	100-120	>180
53	53-400	60-100	150->180
56	31-68	<10-60	120->150
59	20-32	<10-45	90->150

<i>K. oxytoca/pneumoniae</i> (5 kmén, z toho 1 neperzistentní): z (°C) 6-8 °C			
T (°C)	D (min)	t _{log} (min)	t _{II} (min)
50	18-164	<30-120	90->150
53	19-32	<30-60	60->120
56	3-18	<5-30	40->60
59	ND-6	ND-20	ND-50

▲ 50 °C ■ 3 °C ▲ 35 °C ● 59 °C

REZISTENCE VŮČI SANITAČNÍM ROZTOKŮM

- ČSN EN 1276 (2020): Chemické dezinfekční přípravky a antisepтика – Kvantitativní zkouška v suspenzi k hodnocení baktericidní aktivity chemických dezinfekčních přípravků a antisepтик používaných v potravinářství, průmyslu, domácnostech a veřejných prostorách
- namísto referenčního sibirkového kmene použít perzistenti *E. coli* LEV 686/17/B
- 1. kmén nakultivovaný při 37 °C/24 h na BHl agaru, setřít do peptonové vody, nastavit OD₆₆₀ 0,15–0,46 (stanovená denzita 1,5 – 5,0 × 10⁸ KTJ/ml)
- 2. přidat odstředěné mléko (simulace organického znečištění)
- 3. vytemparovat na experimentální teplotu 20 nebo 60 °C
- 4. přidat vytopenový sanitáční roztok naředěný ve sterilní tvrdé vodě během zvolené doby (20 min) vzorkování po 1 ml vzorku
- 5. inkubace v neutralizačním roztoku po dobu 5 min
- 6. očkování na plotny, stanovení denzity přeživých MO
- 7. očkování na plotny, stanovení denzity přeživých MO

REZISTENCE VŮČI SANITAČNÍM ROZTOKŮM

- pro každý testovaný kmen a každý testovaný sanitáční roztok nutno provést validaci metody
- validace experimentálních podmínek (teplota a doba působení)
- validace toxicity neutralizačního roztoku (jako takového)
- validace úspěšné neutralizace sanitáčního roztoku
- podmínky experimentu upravovat, dokud validace není úspěšná
- testováno 10 sanitáčních roztoků ve 3 koncentracích (o 0,2 nižší než doporučené minimum; v polovině doporučeného intervalu; doporučené maximum)
- použité neutralizační roztoky v různých koncentracích:
 - kyselina citronová k neutralizaci alkalií (měřeno pH)
 - uhlíčitan sodný k neutralizaci kyselin (měřeno pH)
 - destilovaná voda k neutralizaci peroxidu
- směs polysorbát 80 + saponin + sojový lecitin nebo polysorbát 80 + thiosíran sodný + sojový lecitin k neutralizaci tenzidů (validace koncentrační řady)

REZISTENCE VŮČI SANITAČNÍM ROZTOKŮM

- za antibakteriálně účinný je sanitáční roztok považován, pokud dojde k redukcii denzity alespoň o 5,0 řádů
- experimentální teplota 60 °C nevhověla při validaci, přesto nejnižší testované koncentrace sanitáčních roztoků (hydroxidy s chloranem; kys. dusičná s fosforečnou) nebyly dostatečně účinné ani po 20 minutách
- koncentrace mírně nižší než doporučené rozmezí byla obecně neúčinná
- v otestovaném souboru sanitáčních roztoků všechny koncentrace, které byly účinné, byly účinné už po 1. minutě působení
- roztoky na bázi peroxidu vodiku byly neúčinné nebo účinné až v nejvyšší koncentraci – spotřebování aktivní látky v interakci s organickým znečištěním
- učinnější než peroxidu byly roztoky na bázi tenzidů (sulfáty, diaminy, alkoxylované alkoholy, alkylaminoidy) v kombinaci s dalšími látkami (např. kys. salicylová, etanol, NaOH, kys. chloroctová, aj.)

SCHOPNOST TVŘIT BIOFILM

- kultivace v mikrotitračních destičkách, v BHI bujónu při 18 a 37 °C/1; 2 a 3 dny
- barvení biofilmu krystalovou violeťí, měření absorbance při 560 nm
- otestován celý soubor kmenev
- schopnost tvrjit biofilm pozorována u 62 % kmenev
- intenzita tvrby biofilmu byla pouze slabá až střední
- výsledky odpovídají naším předchozím zkušenostem s různými druhy MO
- tvrba biofilmu tedy není jediným mechanismem perzistování kmenev na provozu
- metodický problém – tvrba biofilmu bývá často kódována na plazmidech, přičemž bakterie v příznivých podmírkách (např. dlouhodobé uchovávání *in vitro*) mohou plazmidy ztrátit
- už po 1 dnu kultivace se může biofilm odlučovat

% pozitivních kmenev	18 °C	37 °C
<i>E. coli</i>	0	54
<i>Klebsiella</i> spp.	73	73

TVORBA MULTIDRUHOVÉHO BIOFILMU

- tvorba biofilmu na mikrotitračních destičkách, barvení krystalovou violetí
- BHl, upravená syrovátká, „bilá voda“ – řady s různým pH nebo obsahem soli kultivace při 18 °C/2 a 7 dnů, při 37 °C/1 a 5 dnů
- kombinace kmeneů
 - kultivačně rozlišitelné, pokud možno biofilmující, ze stejného místa a provozu
 - poměr 1:3; 1:1; 3:1
 - *E. coli* + *K. oxytoca* (2x), *K. oxytoca* + *S. aureus* (2x), *E. coli* + *S. aureus* (1x)
- společný výskyt kmeneů tvorbu biofilmu nestimuloval
- fyziologické-chemické podmínky prostředí mléka dřenských provozů jsou pro tvorbu biofilmů více či méně vhodné, rozchoduje biofilmující schopnost daného kmene jako taková

TVORBA MULTIDRUHOVÉHO BIOFILMU

- přítomnost soli tvořebu biofilmu omezila, ale zcela ji nezabránila
- viv pH kombinován s vlivem kultivačního média
- nutričně bohatý BHl – biofilm tvořen v širokém rozmezí pH
- „bilá voda“ (živiny v nízké koncentraci, působící látky) – biofilm tvořen nejvíce při měrné kyseleém pH
- kombinace kmeneů
 - kultivačně rozlišitelné, pokud možno biofilmující, ze stejného místa a provozu
 - srážení bílkovin
 - snazší adherence díky povrchovému náboji buněk a destičky
 - vyšší dostupnost živin
 - chemický stres
- upravená syrovátká (laktosa, stopy jiných živin) – biofilm tvořen nejvíce v neutrálním až alkaličkém pH
- lepší růst MO díky neutralizaci metabolitů
 - vytvořené kyseliny neutralizují prostředí a brání rozpuštění biofilmu v alkaličkém pH

POROVNÁNÍ VLASTNOSTÍ PERZISTENTNÍCH A NEPERZISTENTNÍCH KMENŮ

- schopnost perzistence není vlastnost daného kmene, kterou by bylo možné prokázat či vyvrátit nějakým testem
- na perzistování kmene lze usuzovat při opakované izolaci mikroorganismu daných genotypů. a fenotyp. vlastnosti
- mezi perzistentními a neperzistentními kmeny nebyly shledány významné rozdíly, o uchycení daného kmene na provozu rozhoduje spíše náhoda
- rezistence MO včetně nepříznivým fyzikálně-chemickým podmínkám z dlouhodobého hlediska roste – poznatky o vlastnostech rizikových druhů MO je potřeba průběžně aktualizovat
- mechanismy perzistování na provozu
 - tvorba a uvolňování biofilmu v příznivých podmínkách
 - růst a šíření planktonických buněk v příznivých podmínkách
 - přežívání nepříznivých podmínek (např. v solných lázních)
 - křížová kontaminace (nelze využít absolutně vše naráz a dosratečně)
 - možnost perzistování už v provozovrabcích

DĚKUJI VÁM
ZA POZORNOST ...

Tato práce vznikla s finančním příspěvím MZE, NAZV při řešení projektu QK1910121 v programu ZEMĚ.

VÝVOJ MIKROBIOTY SÝRŮ BĚHEM VÝROBY A ZRÁNÍ - KONKURENCE STARTOVACÍCH KULTUR A MIKROBIOTY PROSTŘEDÍ

Juričová Helena
helena.juričová@vri.cz

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
Hudecova 296/70
Brno, 621 00

VUVeL

- **SÝR** = matrice pro růst mikroorganismů a jejich interakci
 - ▶ baktérie, kvasinky, plísň, viry
 - ▶ technologicky žadoucí - startovací kultury (LAB), doplňkové
 - ▶ technologicky nežádoucí
 - ▶ prostředí výroby

► vliv na konečné vlastnosti produktu

1 g sýra $\approx 10^7 - 10^9$ CFU

microorganisms

Ariele
Microbial Succession in the Cheese Ripening Process—Competition of the Starter Cultures and the Microbiota of the Cheese Plant Environment
Kristýna Kovářová, Miroslava Kežeková, Martina Flátná, Daniela Karasová, Vladimír Bašek
Natalia Štaklová, and Irena Juricová

VUVeL

METODIKA - komerční výroba zrajících sýrů, odběry vzorků

- Příprava vstupní suroviny: pasterezace, úprava tučnosti
- Provozní záklys (D1) - startovací kultura: *L. lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc*
- Přidávek syřidla, formování sýru (D1)
- Solení, ošetření kvasnou kulturou (D2): *Debaryomyces hansenii*
- Ošetření doplňkovou kulturou (D4 - D14): *Brevibacterium linens*
- Balení (D15) → tržní sít' - finální produkt (D15 - D55)

Metodický řád: 4 °C

► sběr vzorků (3 výrobní fáze) → zpracování celého sýra, duplicitně dřen a kůra
→ + vzorky mléka
→ izolace celkové DNA
→ sekvenace V3/V4 16S rRNA (illumina MiSeq)

VUVeL

GEN PRO 16S rRNA - TAXONOMICKÁ IDENTIFIKACE BAKTERIÍ

Sekundární struktura bakteriální 16S rRNA

- Kóduje rRNA malé podjednotky (30s) prokaryotických ribozomů
- Délka 1 542 bp
- Obsahuje konzervované oblasti a variabilní oblasti (V1-V9)
- Metody NGS
 - amplifikace a sekvenace V3/V4 oblasti v komplexním bakteriálním společenství
 - identifikace, klasifikace, určení četnosti v bakt. populaci

► Metodický řád: 4 °C

► + vzorky mléka

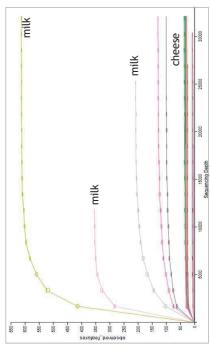
► izolace celkové DNA

► sekvenace V3/V4 16S rRNA (illumina MiSeq)

VUVeL

BAKTERIÁLNÍ SLOŽENÍ MléKA

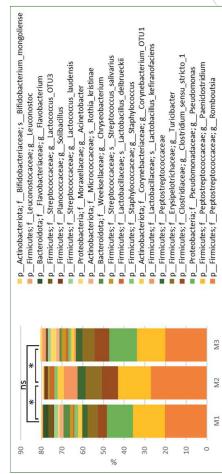
- Rarefakční křivky - „diverzita mikrofóry“
- OTU - operační taxonomická jednotka
- cut off > 0,1%



VUVéL

BAKTERIÁLNÍ SLOŽENÍ MléKA x SÝRA

- dominantní bakteriální taxony:
- kmen Firmicutes: *Romboutsia*, *Paenibacillus*, *Clostridium*, *Turicibacter*, zást. čel. *Peptostreptococcaceae*,
- *Staphylococcus*, *Lactobacillus kefianofaciens* a *L. delbrueckii*
- kmen Actinobacteria: *Corynebacterium*
- kmen Proteobacteria: *Pseudomonas*
- žádný z técto taxonů nebyl detekován v sýru v množství vyšším než 0,1 % celkové mikrobioty = účinnost pasterace



MIKROBIALNÍ SLOŽENÍ SÝRŮ - VÝVOJ BĚHEM VÝROBY A ZRÁNÍ

- Mikrobiální složení sýra - odlišné od mléka
- Kompetice SC a mikrobioty prostředí

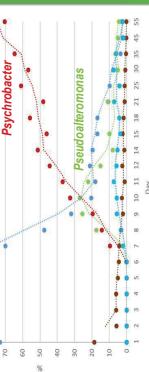
► 1. týden výroby (15°C): složení mikrofóry stabilní, dominují LAB ze SC

► 2. týden výroby (15°C): LAB ↓ (80-25%)

× ↑ *Psychrobacter*, *Pseudodalteromonas*, *Vibrio*
× ↑ *Psychrobacter* (78%), *Vagococcus*, *Psychrylyobacter*, *Malaciobacter*

zrání sýra (6 týdnu, 25 °C): LAB ↓ (3%)

× ↑ *Psychrobacter*, *Vagococcus*, *Psychrylyobacter*, *Malaciobacter*



VUVéL

SLOŽENÍ MIKROBIOTY DŘENĚ A KÚRY

- LEfSe analýza (linear discriminant analysis effect of size)

► 9 taxonů charakterizujících pro dřeň:

- LAB pocházející ze SC

- kmen Firmicutes: *L. lactis*, *cremoris*, *Leuconostoc*

► 16 taxonů charakteristických pro kúru

- pocházející z prostředí

- kmen Proteobacteria: *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*

- kmen Firmicutes: *Vagococcus*, *Marinilactibacillus*

- kmen Fusobacteria: *Psychrylyobacter*

- kmen Campylobacterota: *Malaciobacter marinus*

- 16 taxonů charakteristických pro kúru

- pocházející z prostředí

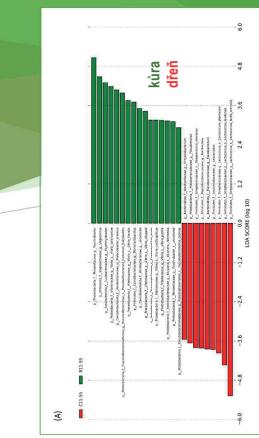
- kmen Proteobacteria: *Psychrobacter*, *Vibrio*, *Pseudoalteromonas*

- kmen Firmicutes: *Vagococcus*, *Marinilactibacillus*

- kmen Fusobacteria: *Psychrylyobacter*

- kmen Campylobacterota: *Malaciobacter marinus*

- 9 taxonů charakterizujících pro dřeň:



VUVéL

SHRNUTÍ

- Pomocí NGS jsme charakterizovali složení a vývoj mikrobioty zrajících sýrů během jejich výroby a následného zrání.

► Vývoj mikroflóry lze rozdělit do několika etap: V prvních dnech výroby v sýru zcela dominovaly **bakterie startovacích kultur**. Od druhého týdne se začaly prosazovat **bakterie pocházející z prostředí**, které ke konci zrání v mikrobiotě sýra **dominovaly**.

► Složení mikrobioty od ráží použité zakysové kultury je však značně ovlivněno mikroorganismy pocházejícími z výrobního prostředí → **vliv na konečně vlastnosti produktu**.

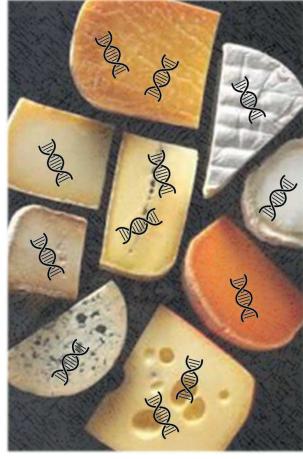


DĚKUJI ZA POZORNOST

- Pomocí NGS jsme charakterizovali složení a vývoj mikrobioty zrajících sýrů během jejich výroby a následného zrání.

► Vývoj mikroflóry lze rozdělit do několika etap: V prvních dnech výroby v sýru zcela dominovaly **bakterie startovacích kultur**. Od druhého týdne se začaly prosazovat **bakterie pocházející z prostředí**, které ke konci zrání v mikrobiotě sýra **dominovaly**.

► Složení mikrobioty od ráží použité zakysové kultury je však značně ovlivněno mikroorganismy pocházejícími z výrobního prostředí → **vliv na konečně vlastnosti produktu**.



- Studie vznikla za finanční podpory projektu:
 - Ministerstva zemědělství QK1910_21
 - institucionální podpory MZe-R00523
- Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.
 - Hudcová 296/70, Brno, ČR
 - helena.juricova@vri.cz

► Studie vznikla za finanční podpory projektu:

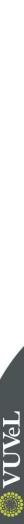
► Ministerstva zemědělství QK1910_21

► institucionální podpory MZe-R00523

► Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v.v.i.

► Hudcová 296/70, Brno, ČR

► helena.juricova@vri.cz



Zbarvení sýru

- Rostlinné barvivo Annatto
- Zrající sýry
 - doplňkové kultury – pigment produkující bakterie *Brevibacterium linens*, *Glutamicibacter* (*Arthrobacter*)
 - Vliv dalších mikroorganismů v prostředí, pH, teplota,...

Indigo- and indirubin-producing strains of *Proteus* and *Pseudomonas* are associated with purple rind defect in a surface-ripened cheese
Noboru Kamimura^a, Michael Zdziarski^a, Isabella Mermado^a, Albert Bobat^a, Benjamin E. Young^{b,c}

Pink discoloration defect in commercial cheese: a review

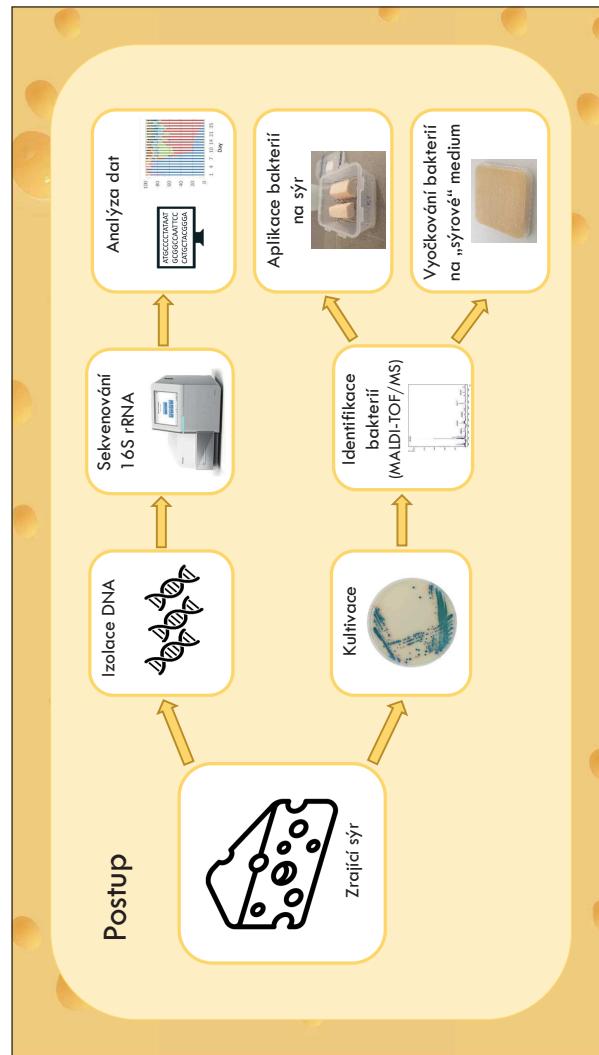
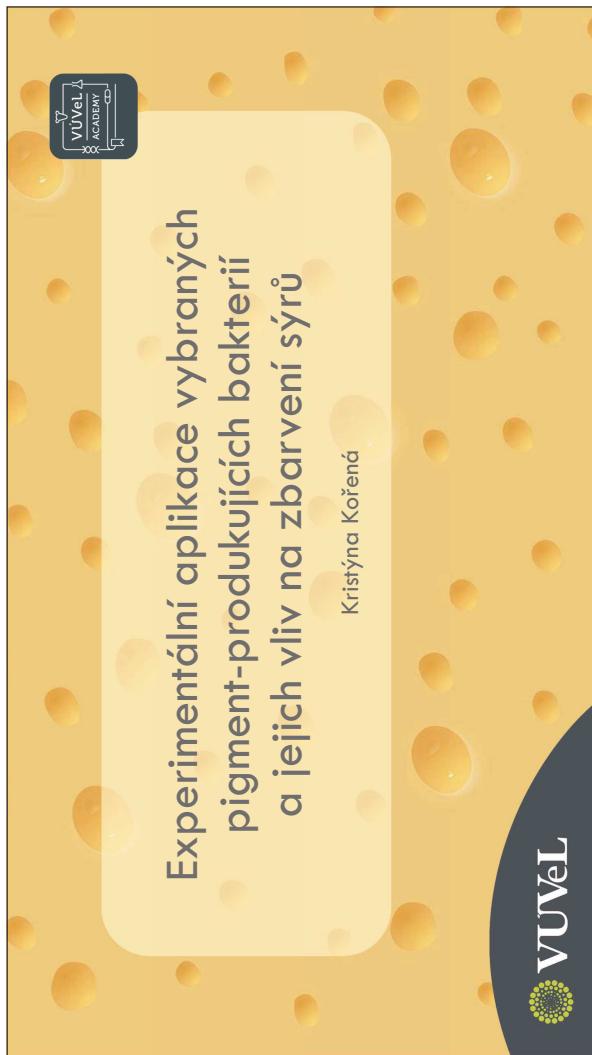
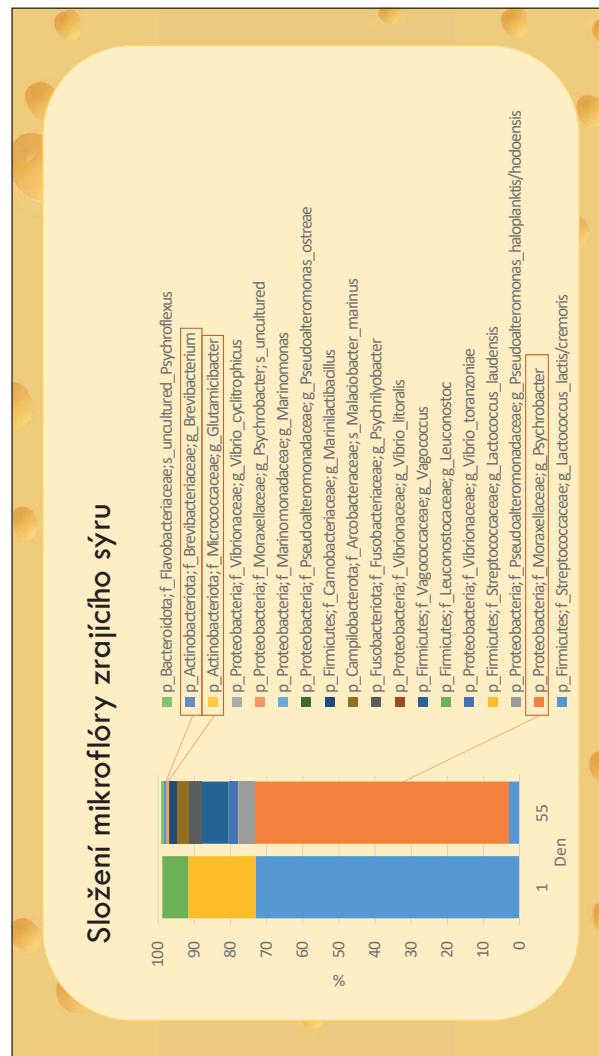
D. E. M. Daly^a, P. L. H. McSweeney^a, J. J. Sheehan^a

Thermus and the Pink Discoloration Defect in Cheese

Lisa Ongley^{a*}, Daniel J. O'Sullivan^a, David Daly^a, Orla O'Sullivan^a, Gerald F. Fitzpatrick^a, Paul J. H. McSweeney^a, Linda Cullen^a, Jeremiah J. Sheehan^a, Paul D. Crittenden^a

Relationship between lactose utilization of lactic acid bacteria and browning of cheese during storage

Ayaka Arai^a, Asuka Iguchi^a, Aoi Inoue^a, Kyoko Noda^a, Satomi Tatsutsuwa^a and Masatoshi Murata^a



Vybrané pigment produkující bakterie

Brevibacterium linens

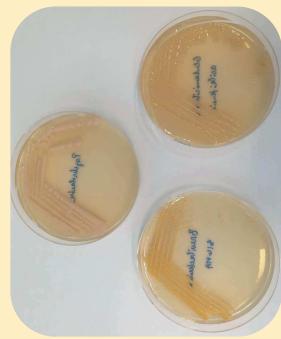
- Micrococcales, Actinobacteria
- Geny crt pro biosyntézu karotenoidů → oranžový pigment
- Produkce sloučenin obsahujících sýru → aroma

Glutamicibacter aralaitensis

- Pseudomonadales, Actinobacteria
- Geny crt pro biosyntézu karotenoidů → žlutý pigment
- Produkce indiga a indirubínu → fialový pigment
- Produkce sloučenin obsahujících sýru - může mít vliv na aroma

Psychrobacter sp.

- Pseudomonadales, Pseudomonadota
- Produkce indiga a indirubínu → fialový pigment
- Produkce sloučenin obsahujících sýru - může mít vliv na aroma

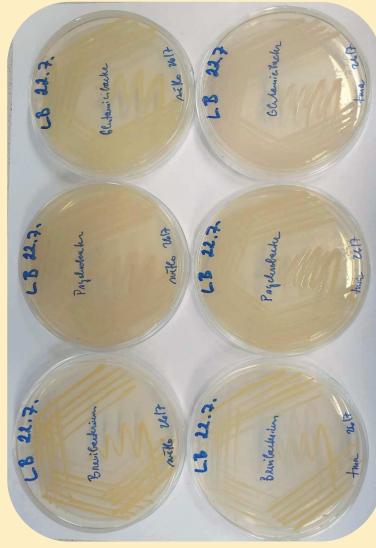


Experimentální aplikace bakterií na sýr

- Simulace zráni sýru v laboratorních podmínkách
- Sýřenina ošetřena kvasinkou
- Aplikace vybraných bakterií na sýr 5x v průběhu prvních 2 týdnů
- Zabalení sýru 15. den výroby
- Průběžný odběr vzorků na izolaci DNA pro sekvenování 16S rRNA

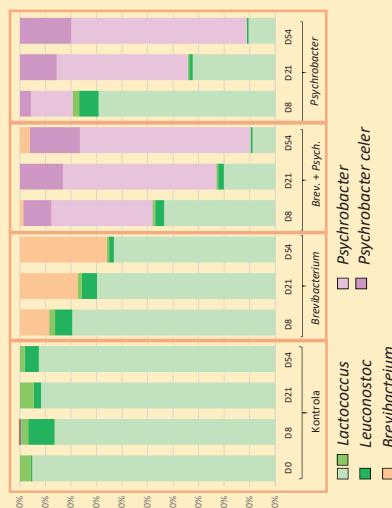


Experiment – vliv světelných podmínek na produkci karotenoidů



Light-inducible carotenoid production controlled by a MarR-type regulator in *Corynebacterium glutamicum*
Satoshi Onishi, Yoko Suzuki, Tetsuro Matsuki, Takeshi Yamamoto, Chieko Tsuchi, Ken Min, Takeya Kawanabe, Naomichi To, Yoko Shimura, Mika Arai, Tomoko Shioya, Shoko Watanabe, Miwa Ito, Ryoko Hidemoto, Takanori Ochiai, Kenji Ueda & Hisashi Tsurumi

Experimentální aplikace *Brevibacterium* a *Psychrobacter*



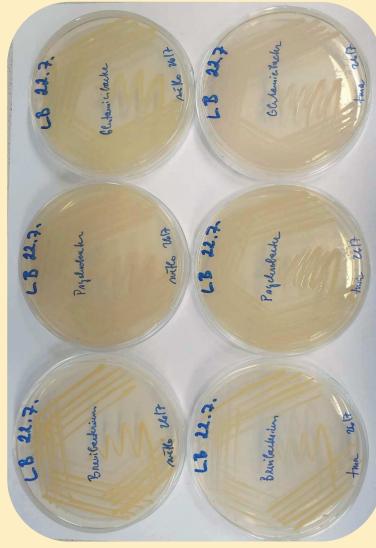
Kontrola Brevibacterium *Efen + Parch.* *Psychrobacter*

Experimentální aplikace bakterií na sýr

- Simulace zráni sýru v laboratorních podmínkách
- Sýřenina ošetřena kvasinkou
- Aplikace vybraných bakterií na sýr 5x v průběhu prvních 2 týdnů
- Zabalení sýru 15. den výroby
- Průběžný odběr vzorků na izolaci DNA pro sekvenování 16S rRNA

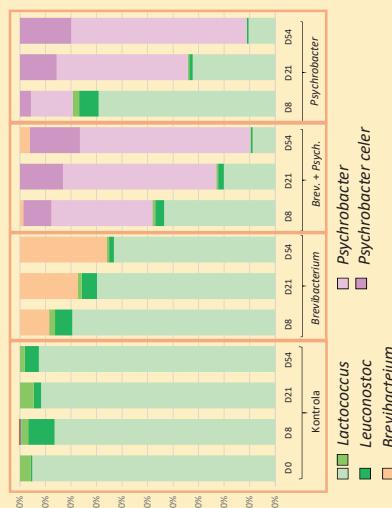
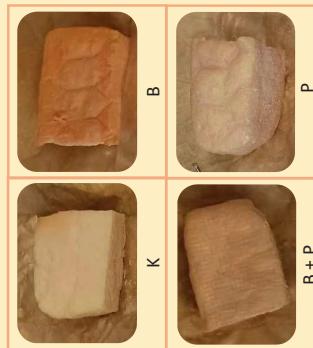


Experiment – vliv světelných podmínek na produkci karotenoidů



Light-inducible carotenoid production controlled by a MarR-type regulator in *Corynebacterium glutamicum*
Satoshi Onishi, Yoko Suzuki, Tetsuro Matsuki, Takeshi Yamamoto, Chieko Tsuchi, Ken Min, Takeya Kawanabe, Naomichi To, Yoko Shimura, Mika Arai, Tomoko Shioya, Shoko Watanabe, Miwa Ito, Ryoko Hidemoto, Takanori Ochiai, Kenji Ueda & Hisashi Tsurumi

Experimentální aplikace *Brevibacterium* a *Psychrobacter*



Kontrola Brevibacterium *Efen + Parch.* *Psychrobacter*

Vyočkování bakterií na „sýrové“ medium



Experimentální zpráva sýru

	Tma	Světlo	Tma	Světlo
B				
G				
K				

Co dál?

- Analyzovat barevné změny sýru pomocí spektrofotometru
- Kvantifikovat expresi genů pro biosyntézu karotenoidů

Celková změna barvy vůči kontrole D4
pro jednotlivé vzorky sýru



Studie vznikla za finanční podpory projektů:
• Ministerstva zemědělství QK1910121
• Instituciální podpory MZe-RO0523

Poděkování



kristyna.korená@vri.cz



„Nové poznatky o zdravotně a technologicky rizikových mikroorganismech v potravinách“

4. říjen 2023



Zoohygiena v chovech dojnic – Prevence před mastitidami v rámci antibiotické terapie a rizik rezistencí bakterií

Macháček Miroslav
Veterinární univerzita Brno

Antibiotická rezistence

Odolnost mikroorganismů vůči působení
antibiotika
Schopnost překonat účinek léku
Choroboplodné zárodky nejsou usmrcteny
Dochází k dalšímu množení choroboplodných
zárodků

Primární	Geneticky podmíněná nectitivostí bakterií na dané antibiotikum
Není nutný předchozí kontakt	
Sekundární	
Vznik	V průběhu terapie Následkem předchozího podávání antibiotik
Rychlosi závisí na	Frekvenči mutací Počtu bakterii s určitým stupněm rezistence
Typy	Penicilinový Diouhodobé podávání penicilinu, chloramfenikolu, bacitracinu Streptomycinový Krátkodobé podávání streptomycinu, erytromycinu, linkomycinu, rifampicinu

Antibiotická rezistence

Mechanizmy rezistence

- Omezená penetrace antibiotika do bakteriální buňky
- Změna cílové struktury
- Metabolické změny v bakteriální buňce
- Enzymatická inhibice nebo inaktivace antibiotika
- Efluxní pumpy

5

Onemocnění mléčné žlázy

Environmentální mastitidy

- Mikroorganismy z vnějšího prostředí
Streptococcus uberis, *E. coli*, koliformní mikroorganismy
- Kontagiózní mastitidy
- Mikroorganismy přizpůsobené na prostředí v mléčné žlázy
Streptococcus agalactiae, *Staphylococcus aureus*

6

Stájová hygiena

- Technologie ustájení dojnic
- Hygiena steliva
- Dezinfeckce stájí

7

Zoohygiena v chovech dojnic

8

Stelivové materiály u dojnic

- Anorganické
- Písek
- Organické
 - Sláma
 - Piliny
 - Hobliny
 - Separovaná kejda

9

Dezinfekce stájí

- Se zvířaty X Bez zvířat
- Důkladná mechanická očista
- Volba vhodného dezinfekčního přípravku

10

Hygiena dojení

- Management stáda
- Dezinfekce struků po dojení
- Dezinfekce dojícího zařízení

Management stáda

- Vakcínace
- Kontrola zdraví mléčné žlázy
- Dojič
- Dojící robot
- Pořadí dojení dojnic

11

12

Dezinfekce struků po dojení

- Dostatečný účinek
- Neovlivňovat mléko
- Ošetření struků

13

Dezinfekce dojícího zařízení

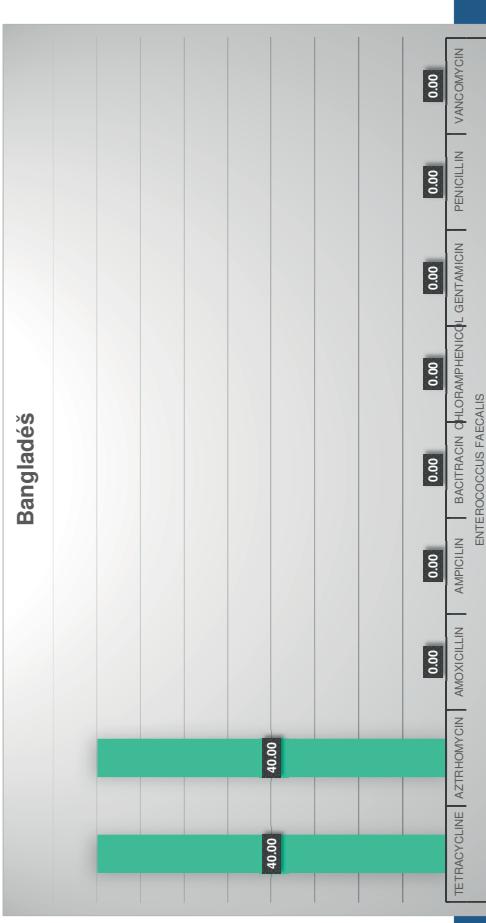
- Dostatečný účinek
- Neovlivňovat mléko
- Ochrana dojícího zařízení

14

Mastitidy a antibiotická rezistence ve světě

Rezistence některých MO na vybraná ATB

Bangladéš

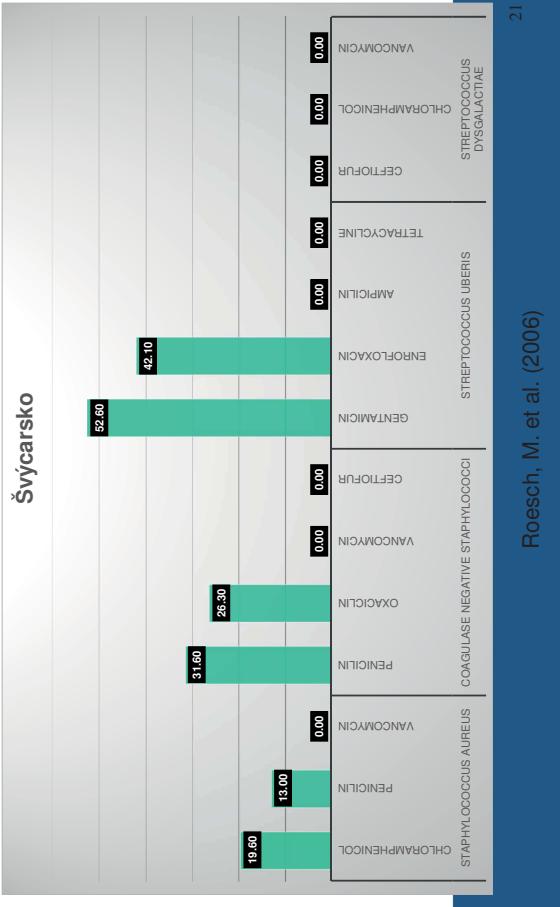


15

Kalmus, P. et al. (2011)

16

Rezistence některých MO na vybraná ATB



Roesch, M. et al. (2006)

21

Děkuji za pozornost

Závěr

Mastitidy

Ekonomické ztráty

Léčba antibiotiky

Rizika vzniku rezistencí

Prevence

Levnější než léčba

Snížení používání antibiotik

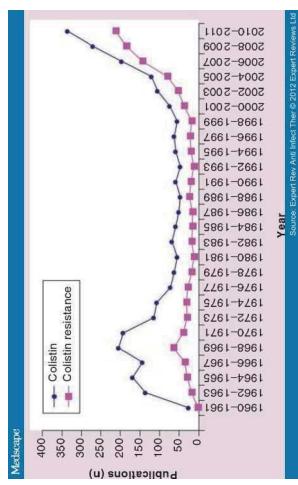
Snížení vzniku antibiotické rezistence

22

23

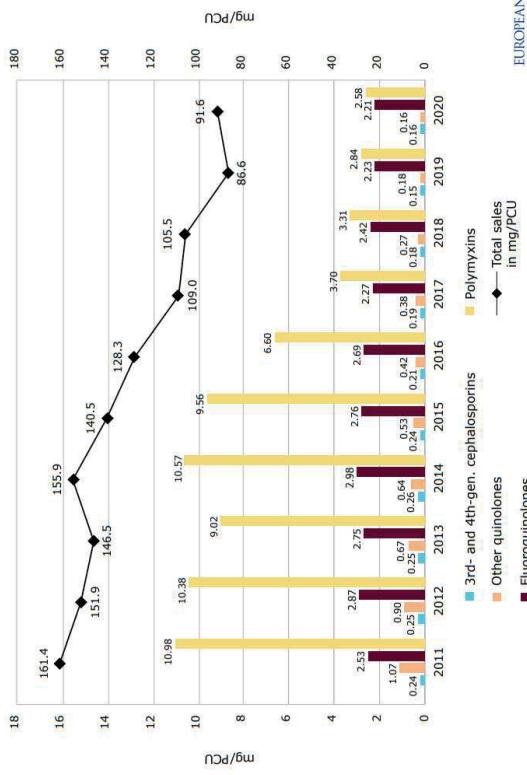
Kolistin

- Vysoká toxicita – ústup použití v 70. letech
- Od pol. 90. let léčba infekcí (multiresistentní bakterie)
- V humánní medicíně antibiotika poslední volby
- Vysoká spotřeba kolistinu ve veterinární medicíně – léčba a prevence
- Narůstající rezistence ke kolistinu u humánních i veterinárních izolátů

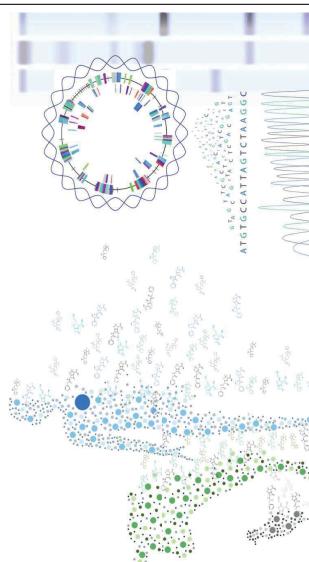


Kolistin ve veterinární medicíně

2011-2020: pokles spotřeby polymyxinů o 76,5 % v Evropě



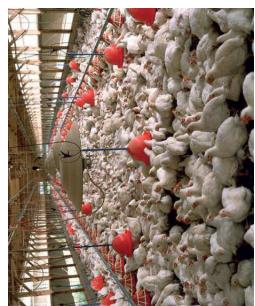
Přenosná rezistence ke kolistinu v českých chovech a potravinách



Iva Sukkar
Monika Dolejská
Veterinární univerzita Brno
Biomedicínské centrum LF UK v Plzni
Fakultní nemocnice Brno

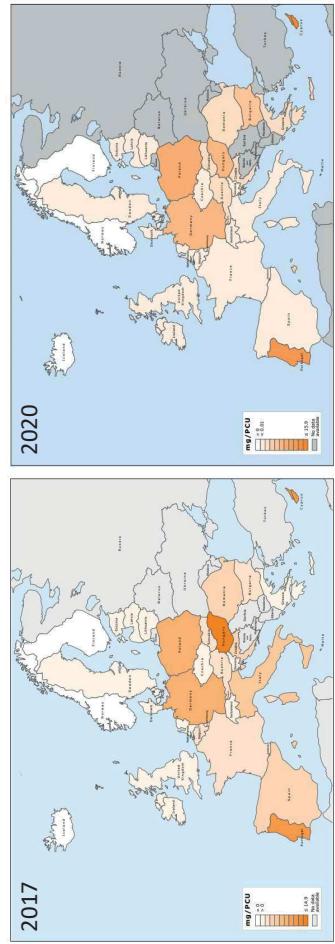
Kolistin ve veterinární medicíně

- Historicky vysoká spotřeba
- Léčba, prevence, stimulace růstu
- Enterobakteriální infekce (*E. coli*, *Salmonella*)
- Drůbež, prasata, skot, ovce, kozy, králičí
- 2011 – 5. nejpoužívanější ATB v Evropě (7 %)
- Zákaz použití kolistinu jako růstového stimulátoru u hospodářských zvířat v mnoha zemích ve světě



Kolistin ve veterinární medicíně

Spotřeba polymyxinů v Evropě



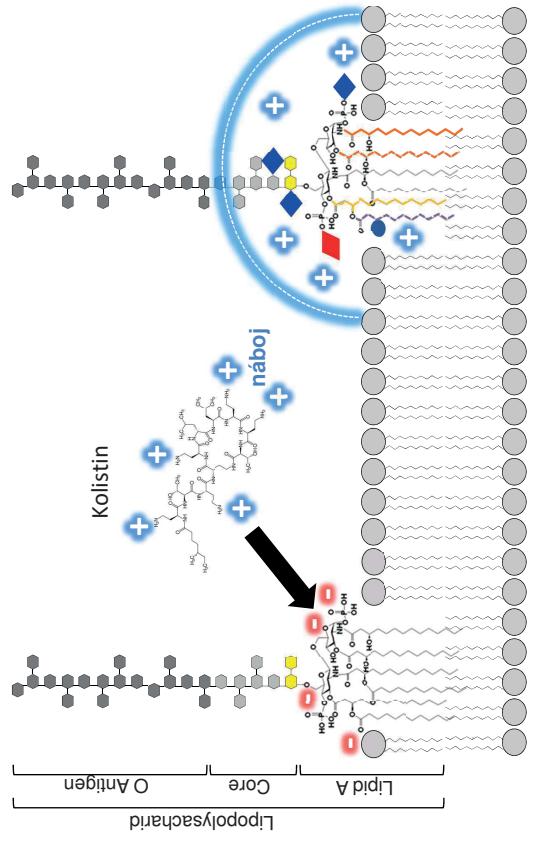
ČR 0,6 % celkové spotřeby veterinárních ATB
2,8 % evropský průměr v 2020



EUROPEAN MEDICINES AGENCY
SCIENCE MEDICINE HEALTH

Chromozaomální rezistence ke kolistinu

◆ L-Ara4N (4-amino-4-deoxy-L-arabinóza)
◆ PETN (fosfoethanolamin)
◆ + náboj
◆ + Lipopolysacharid
Core
Lipid A
O Antigen



Plazmidy přenášená rezistence ke kolistinu

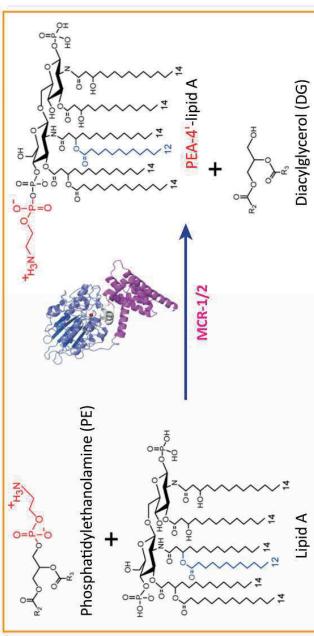
- „modern/mobile_colistin resistance“

- gen *mcr*
- fosfoetanolamin transferáza
- změna náboje
- nevratná modifikace LPS

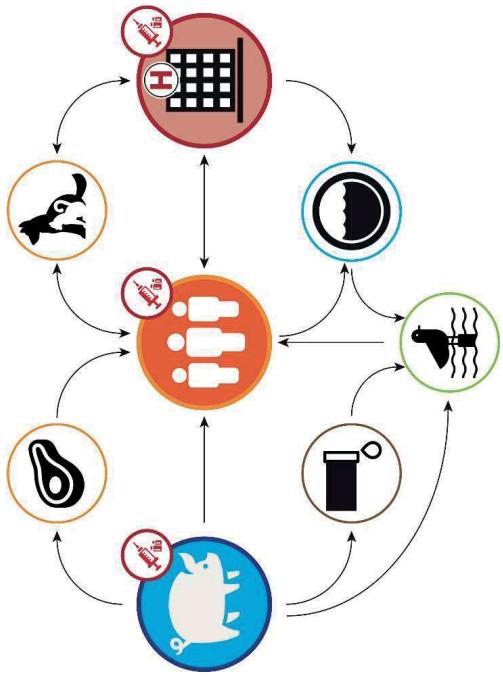
The Lancet Infectious Diseases, 18. listopadu 2015

Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China:
a microbiological and molecular biological study

Yi-Ping Lu*, Tong Wang*, Timothy R. Walsh, Ling-Xian Yu, Zhong-Tao Bai, Bo Li, Guohua Tian, Timothy Spratt, Xiang-Yun Tang, Zheng-Jie Liu, Li-Dongmei Zhou, Hong-Fei Ren, Xiang-Qing Chen, Lin-Hua Li, Zhen-Liang Jiang, Hua-Liu, Jian-Zhong Shen



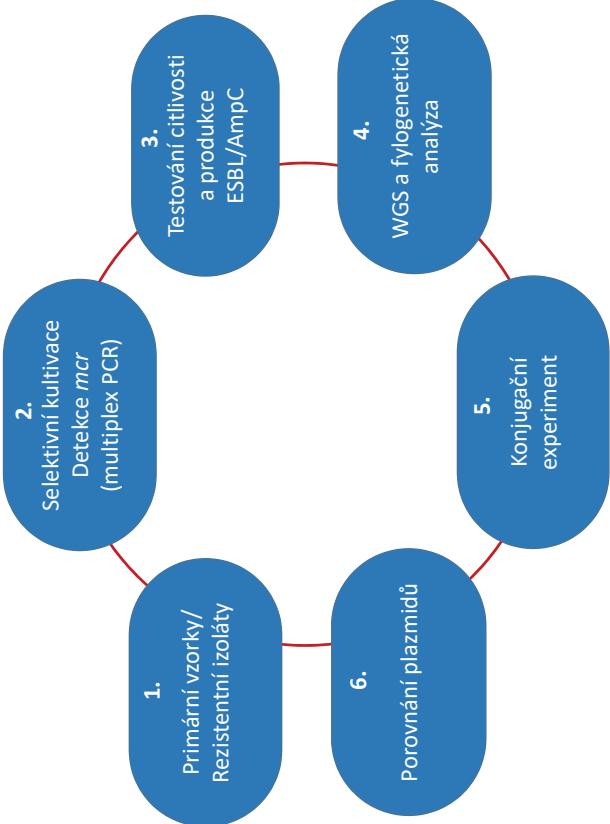
Rezistence ke kolistinu = Jedno zdraví



Cíle studie

- Stanovení výskytu plazmidy kódované rezistence ke kolistinu u izolátů *E. coli* v mase z tržní sítě a střevě hospodářských zvířat z ČR
- Fenotypová a genotypová charakterizace *mcr*-pozitivních izolátů
- Přímá detekce genů *mcr* ve vzorcích
- Data pro národní monitoring mobilní kolistinové rezistence

Metodický přístup



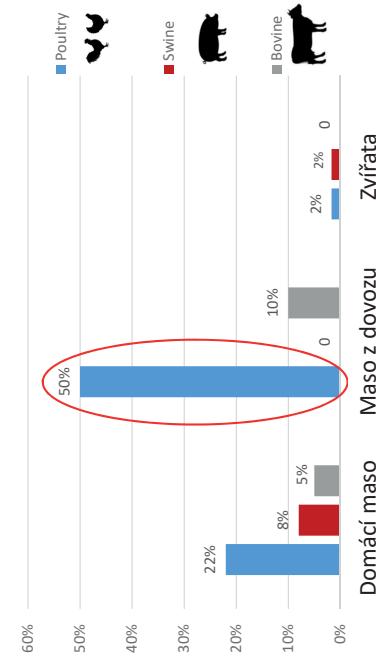
Monitoring kolistinové rezistence u potravinových zvířat a v potravinách

- Spolupráce s SVÚ Praha
- Součást programu monitorování
AMR u zoonotických bakterií
- Sběr 2020 – 2021
- 659 vzorků

Druh	Typ vzorku	Původ	Počet vzorků
Družba (n=364)	čerstvé maso	domácí produkce	149
	slepé střevo	zahraničí	32
Prasata (n=205)	čerstvé maso	domácí produkce	181
	slepé střevo	zahraničí	2
Skot (n=90)	čerstvé maso	domácí produkce	80
	slepé střevo	zahraničí	10

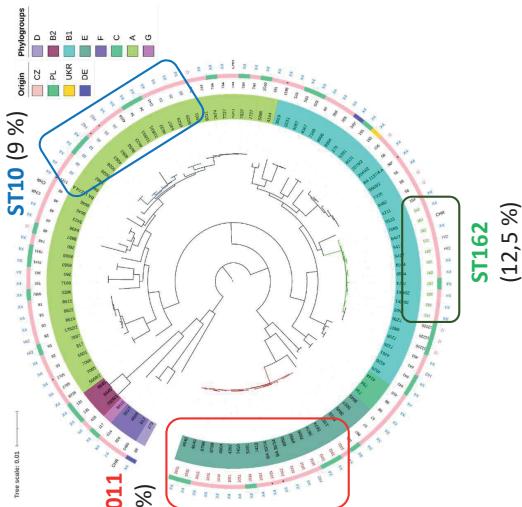
Veterinární izoláty *E. coli* s genem *mcr*

- 65 vzorků neslo alespoň jeden izolát *E. coli* s *mcr-1* (10 %)
- Rezistence k různým antibiotikům (87 %)
- Extraintestinální patogenní *E. coli* (ExPEC)

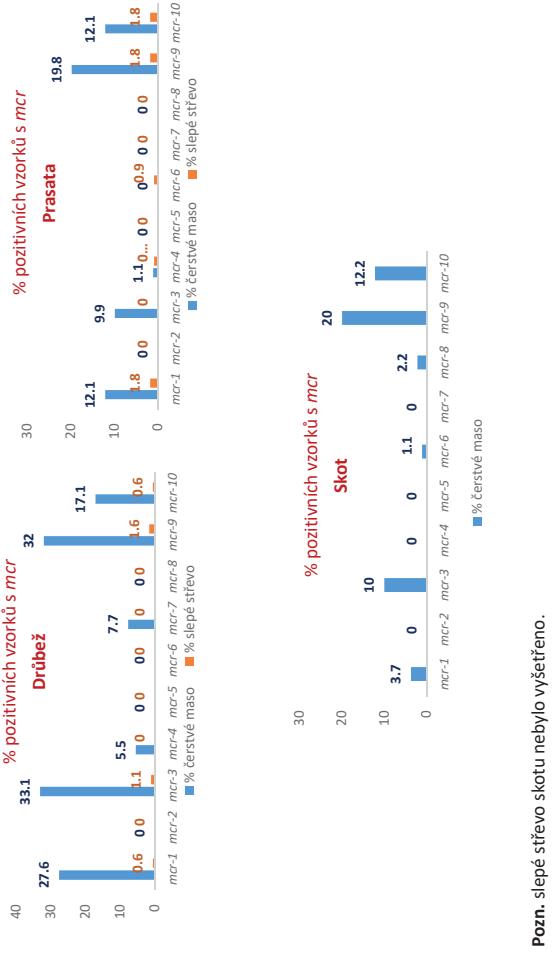


Celogenomové sekvenování *E. coli* s *mcr-1*

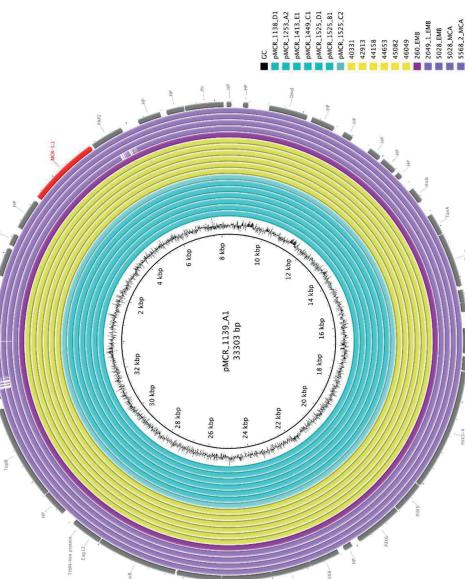
- 121 izolátů (2 izoláty na vzorek)
- 39 různých sekvenčních typů
- Extraintestinální patogenní *E. coli* (ExPEC) – zejména APEC (15 %)
- Různé geny rezistence k antibiotikům
- Geny kódující ESBL/AmpC
- Přenos *mcr-1* u 81 % izolátů
- IncX4 (80 %), IncI2 (6 %), IncH12 (7 %)
- Nukleotidová podobnost konjugativních plazmidů
-



Přímá detekce *mcr* ze vzorku dle původu



Komparativní analýza plazmidů s geny *mcr*



Identita sekvencí plazmidů IncX4 s přenosnou rezistencí ke kolistinu u masa, zvířat a pacientů (software BRIG)

Národní monitoring plazmidy determinované rezistence ke kolistinu - shrnutí

- Vysoký výskyt *E. coli* s *mcr-1* ve vzorcích masa
- Kuřecí maso z dovozu zdrojem kolistinové rezistence?
- Multirezistence a vysoká genetická variabilita izolátů
- Výskyt *mcr-1* na přenosných plazmidech (**IncX4**, **IncI2**, **IncH12**)
- Metodou přímé detekce prokázán vyšší výskyt a sekvenční variabilita *mcr* genů
- Potenciální přenos na člověka prostřednictvím potravinového řetězce => „One Health concept“

Poděkování

VETUNI Brno

Petra Šíšmová

Markéta Zelendová

Kristína Nešporová

Jana Palkovičová

SZÚ Praha

Helena Žemličková

Vladislav Jakubů

Katarína Pomorská

SVÚ Praha

Ivana Chytilová

AZV ČR
Adressa nebo zdroj odkazu

NV18-09-00605 - Enterobacteriaceae rezistentní ke karbapenemům a kolistinu:
koncept jednoho zdraví v hodnocení humánních a jiných zdrojů rizikových
mechanismů antimikrobiální rezistence (2018-2021)

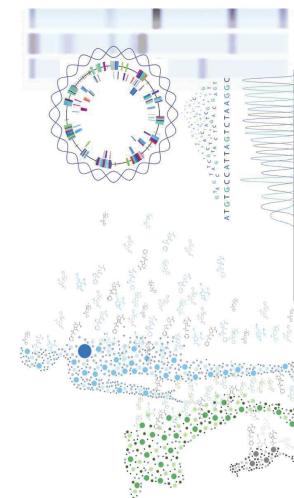


Microbiology
Spectrum

Antimicrobial Chemotherapy / Research Article

Plasmid-mediated colistin resistance from fresh meat and
slaughtered animals in the Czech Republic: nation-wide
surveillance 2020–2021

Petr Slavicek,^{1,2} Ivo Šukla,² Lukáš Kolářecová,³ Ivana Chytilová,⁴ Jana Palková,⁵ Monika Dolajová,^{1,2,3} Katarína Nešporová⁶



NV18-09-00605 - Enterobacteriaceae rezistentní ke karbapenemům a kolistinu:
koncept jednoho zdraví v hodnocení humánních a jiných zdrojů rizikových
mechanismů antimikrobiální rezistence (2018-2021)

Srovnání metod genotypizace a nástrojů pro predikci antimikrobiální rezistence u *Campylobacter jejuni*

Nicol Straková

Campylobacter jejuni je patogenem, který je zodpovědný za nejčastější alimentární onemocnění. Vysledování původce infekce je obtížné kvůli jeho vysoce variabilnímu genomu. Prvním cílem naší práce bylo porovnat tři dostupné metody genotypizace (MLST, PFGE a mP-BIT) a určit nejúčinnější metodu genotypizace. V naší práci byly *C. jejuni* rozděleny do 4 shluků na základě vizuální příbuznosti kmenů v dendrogramu, následně byly porovnány dendrogramy 3 testovaných metod s cílem určit přesnost každé metody ve srovnání s referenční metodou cgMLST. V současné době lze nejvyšší a nejspolehlivější rozlišení izolátů dosáhnout pomocí celogenomové sekvenace. cgMLST má ovšem několik úskalí. Je to příliš přísná metoda pro tak vysoce variabilní organismus, jakým je *C. jejuni*, dalším úskalím je její nízká dostupnost a vysoká cena analýzy. Naše data tedy ukázala, že MLST je optimálním nástrojem pro genotypizaci *C. jejuni*. Dalším cílem práce bylo pomocí dvou metod predikce založených na sekvenci genů stanovit antimikrobiální rezistenci k ciprofloxacinu, erytromycinu a tetracyklinu u kmenů *C. jejuni* izolovaných ze vzorků lidí, vody, vzduchu, potravin a zvířat a porovnat je se skutečnou citlivostí kmenů *C. jejuni* pomocí diskové difuzní metody. Naše výsledky ukázaly, že ResFinder a RGI synchronně předpovídají antimikrobiální citlivost *C. jejuni* a lze je oba využít k predikci antimikrobiální rezistence *C. jejuni*.

Práce byla podpořena grantem GAČR 18-16549S a institucionální podporou Ministerstvo zemědělství ČR RO0523.

Molekulární metody detekce vybraných patogenů v potravinách (a jejich úskalí)



Miroslava
Krzýžánková

Výskyt nejčastějších alimentárních onemocnění v České republice (ISIN)

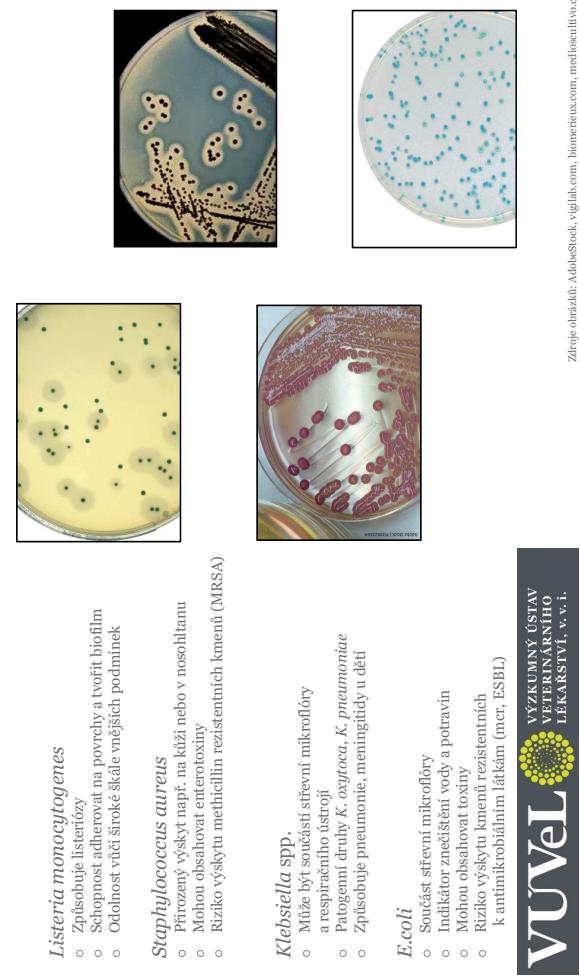
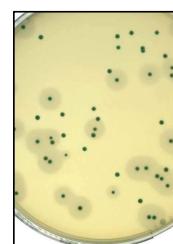
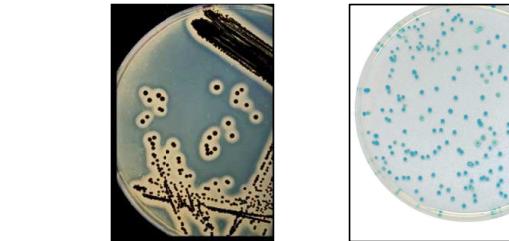
diagnóza	původce	2022	2023*
Kampylobakteriøza	<i>Campylobacter</i> spp	9404	8385
Salmoneløza	<i>Salmonella</i> spp	4717	4583
Listeriøza	<i>Listeria monocytogenes</i>	36	26
Alimentární intoxikace	<i>Staphylococcus aureus</i>	4	60
Infekce vyvolané STEC/VTEC	<i>Escherichia coli</i>	58	32
Virové střevní infekce	Noroviry, Rotaviry	11459	5384
Hepatitida E	Virus hepatitidy E	214	471

www.szu.cz/wp-content/uploads/2023/09/Tabulka_leden-spen_2023.pdf



VÝzkumný ústav
VETERINÁRNÍHO
LEKAŘSTVÍ, v.v.i.

- Listeria monocytogenes*
 - Způsobuje listeriozy
 - Schopnost adhérerovat na povrchy a tvorit biofilm
 - Odolnost vůči široké skále veřejných podmínek
- Staphylococcus aureus*
 - Přirozený výskyt např. na kůži nebo v nosohltanu
 - Mohou obsahovat enterotoxiny
 - Riziko výskytu methicillin rezistentních kmenů (MRSA)
- Klebsiella* spp.
 - Může být součástí střevní mikroflóry a respiračního ústrojí
 - Patogenní druhy *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*
 - Způsobuje pneumonie, meningitidu u dětí
- E.coli*
 - Součást střevní mikroflóry
 - Indikátor znečištění vody a potravín
 - Mohou obsahovat toxiny
 - Riziko výskytu kmenů rezistentních k antimikrobiálním látkám (mnr. ESBL)



Zdroje obrázků: AdobeStock, vigilant.com, biomerieion.com, medisource.com



podle Trinh et al. 2023

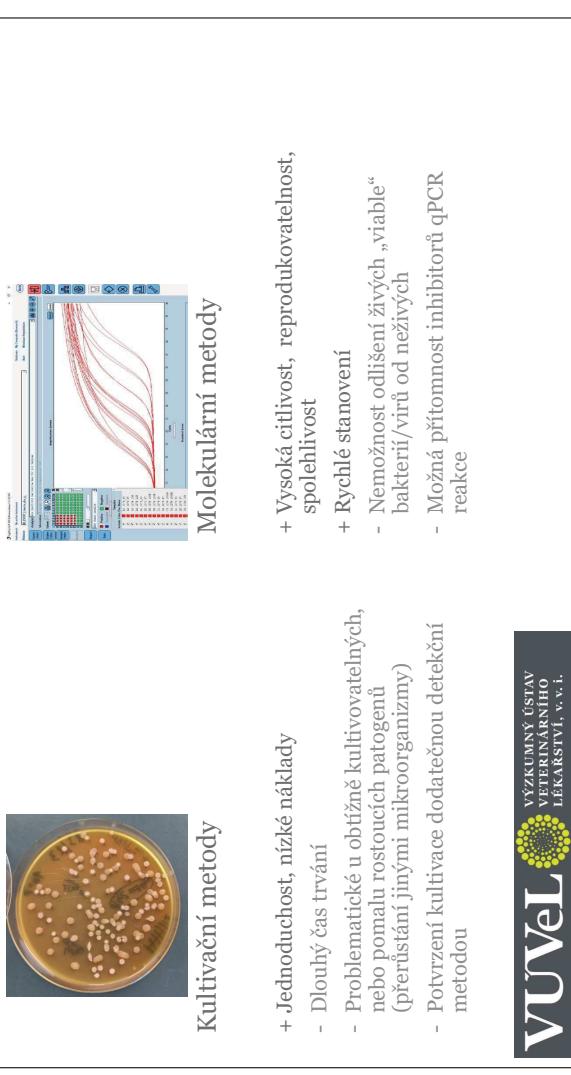
Detekce viability pomocí molekulárních metod



Kultivační metody

- + Jednoduchost, nízké náklady
- Dlouhý čas trvání
- Problematické u obtížně kultivovatelných, nebo pomalu rostoucích patogenů (přeruštání jinými mikroorganismy)
- Potvrzení kultivace dodatečnou detekcí metodou

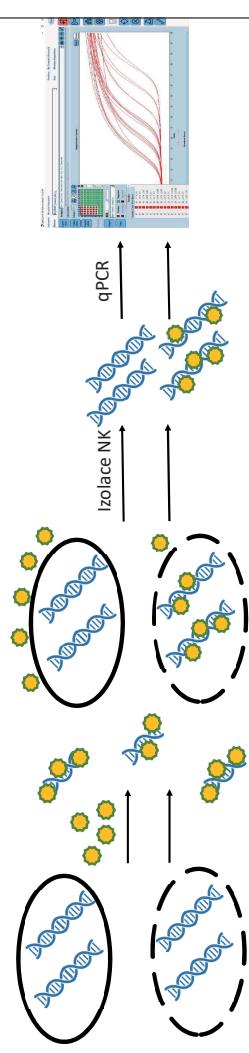
VUVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.



- Před izolací nukleové kyseliny
- Nutné odstranění volné NK
 - Působením enzymů (DNAAZY, RNAZY)
 - Zamezení amplifikace volné NK
 - Propidium monoazid (PMA), etidium monoazid (EMA)
- Amplifikace (nejčastěji qPCR)
 - Pd a PT sloučeniny

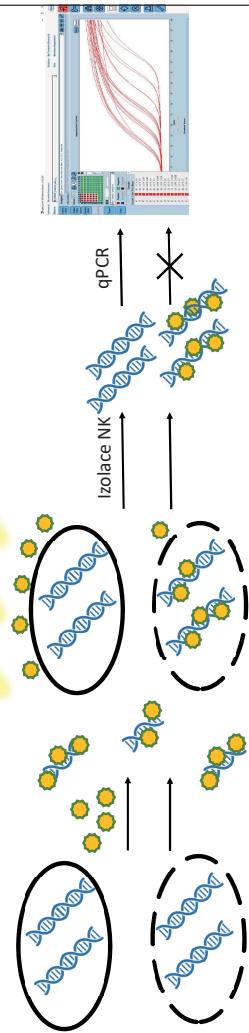
VUVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

Princip viability qPCR

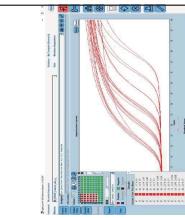


VUVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.

PMA, EMA



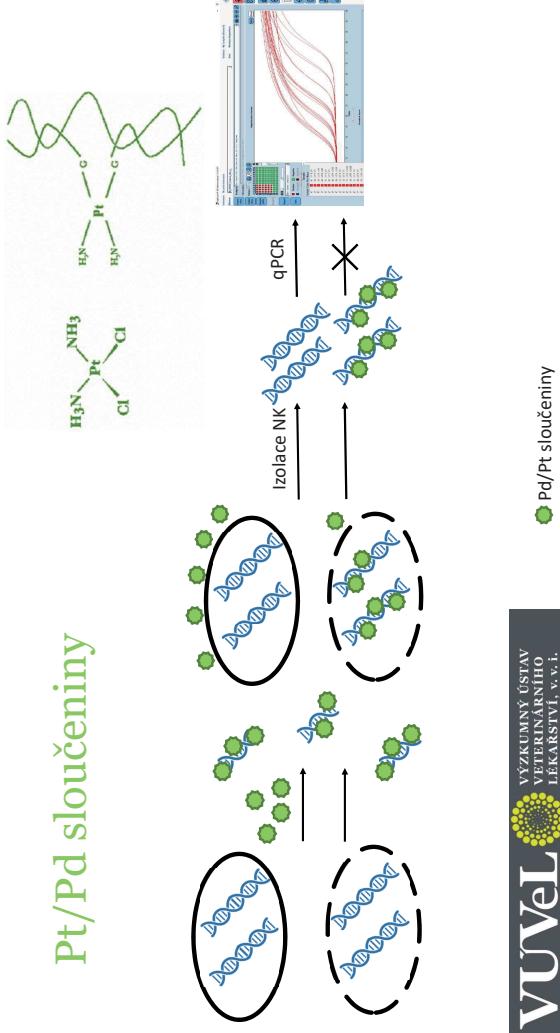
VUVeL
VÝZKUMNÝ ÚSTAV
VETERINÁRNÍHO
LÉKAŘSTVÍ, v.v.i.



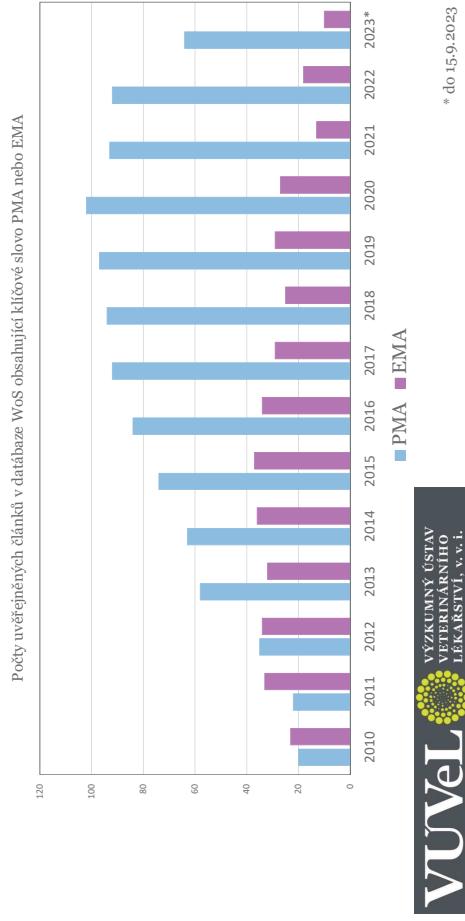
Propidium monoazid (PMA)



Pt/Pd sloučeniny

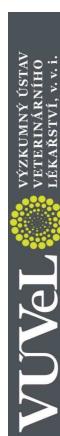


Publikace podle Web of Science



PMA, PMAXx

- + Používaná, komerčně dostupná sloučenina
- Optimalizace koncentrace pro každý druh bakterie
- Optimalizace intenzity, času a typu fotoaktivace
- Použití detergentů – (SDS, Tween, Triton...)
- Cena 1mg PMA ~ 150\$

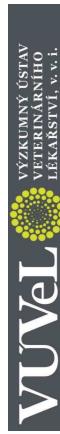


Codony F et al., 2023, doi.org/10.1016/j.mimet.2023.106737
Leifels M et al., 2021, doi.org/10.1016/j.wrol.2020.100080

Sloučeniny Pt a Pd

- + Nižší cena (100x levnější než PMA)
- + Bez fotoaktivace, bez práce ve tmě
- Různé typy sloučenin, různé efekty

parametr	efektivní Pt sloučeniny	konz. Pt sloučenin	efektivní Pd sloučeniny	konz. Pd sloučenin
viry	PtCl ₄ , CDDP	1000μM-2500μM	BB-PdCl ₂ , PdCl ₂ -COD	1000μM
bakterie	PtCl ₄ , CDDP	10μM-100μM	BB-PdCl ₂ , PdCl ₂ -COD, Pd(O-Ac) ₂	1-50μM

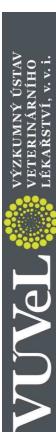


Vliv potravinové matrice

Bakterie

- 10% suspenze potraviny v živém bujónu nebo v pufru
- Zbytky potravinové matrice – tuky, břulkoviny, polysacharidy, silice – inhibice qPCR
- Separace interferujích látek se vzorku – centrifugace (bakterie)
- Zkoncentrování bakterií/ virů ve vzorku pomocí magnetických částic
- Flokulace, precipitace (z vodních roztoků), pomocí látek s vysokou molekulární hmotností (polyetylenglykol) navázání patogenu (zejména virů), které jsou následně ze směsi odděleny centrifugací

Řešení



Viry

- Oplach potraviny (viry se nacházejí na povrchu, nemnoží se na/v potravině)
- Bakterie
 - PMA
 - *Campylobacter* – validován vč. ISO (String et al 2021)
 - *Salmonella* spp., *E.coli*, *S. aureus* – multiplexní detekce (Liang et al 2022)
 - *L.monocytogenes* – detekce v mléku (Roumani et al 2021)
 - Pt/Pd sloučeniny
 - Pt/Pd malý počet publikací, detekce v mléku (Soejima et al 2016)
 - Viry
 - PMA
 - noroviry, virus hepatitidy E, virus hepatitidy A (mořské plody, zelenina)
 - Pt/Pd sloučeniny
 - PtCl₄ nejvíce publikací (noroviry, HEV), CDDP- (detekce virů ve vodě)
 - Pd sloučeniny pro DNA viry

Aplikace v praxi

Bakterie

Viry

- Bakterie
 - PMA
 - *Campylobacter* – validován vč. ISO (String et al 2021)
 - *Salmonella* spp., *E.coli*, *S. aureus* – multiplexní detekce (Liang et al 2022)
 - *L.monocytogenes* – detekce v mléku (Roumani et al 2021)
 - Pt/Pd sloučeniny
 - Pt/Pd malý počet publikací, detekce v mléku (Soejima et al 2016)
 - Viry
 - PMA
 - noroviry, virus hepatitidy E, virus hepatitidy A (mořské plody, zelenina)
 - Pt/Pd sloučeniny
 - PtCl₄ nejvíce publikací (noroviry, HEV), CDDP- (detekce virů ve vodě)
 - Pd sloučeniny pro DNA viry



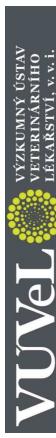
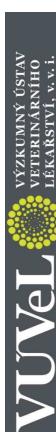
Pohled do budoucnosti

- Další rozvoj metod s PMA/PMAXX
- Pt/Pd sloučeniny – levnější a méně pracná alternativa?
- Využití:
 - Kontrola kvality potravin
 - Studium komplexních bakteriálních komunit
 - Environmentální mikrobiologie
 - Klinická diagnostika



Financováno s podporou Ministerství zemědělství České Republiky (QK1910121) a institucionální podpory (RV00518)

Děkuji za pozornost



Celogenomová analýza meticilin rezistentních a meticilin citlivých *Staphylococcus aureus* ve fermentovaných salámech



Martina Florianová



Fermentované salámy

- nepodléhají tepelné úpravě během výrobního procesu ani před konzumací, proto jejich výroba vyžaduje vysoké standardy správné hygienické a výrobní praxe
- mikrobiologicky bezpečné ? - dán charakterem výrobku a přítomnosti konkurenční mikrobioty
 - startovací kultury - LAB - rody *Lactobacillus* a *Pediococcus*
 - GCC+ - *Micrococcus varians*, *Staphylococcus carnosus* nebo *Staphylococcus xylosus*
 - svou metabolickou aktivitou významně přispívají ke zlepšení organoleptických a senzorických vlastností konečného výrobku
 - produkce řady antimikrobiálních látek
 - nepříznivé podmínky pro růst patogenů, přesto...

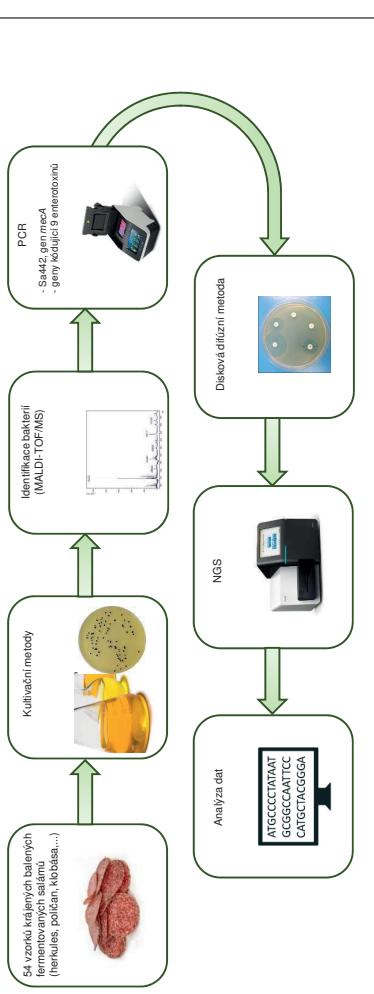
Cíle

- otestovat fermentované salámy na přítomnost *S. aureus*
- u získaných izolátů vyšetřit
 - rezistenci k antimikrobiálním látkám
 - vybrané geny virulence
- odhadnout možný zdroj kontaminace

Staphylococcus aureus

- jeden z nejrozšířenějších patogenů
 - schopen způsobit řadu onemocnění
- schopen přežít v rozmezí hodnot pH = 4,5 – 8,
 - při teplotách 4°C až 45°C
 - a koncentracích soli do 15%
 - a nízkých hodnotách aktivity vody
- rezistentní kmeny (zejm. MRSA) vs. kmeny produkující enterotoxiny
 - maso a masné výrobky jsou považovány za zdroj *S. aureus*

Materiál a metody



Vzorky

výrobce	počet vyzkoušených výrobků	výrobky - <i>S. aureus</i> +	počet získaných izolátů <i>S. aureus</i>
A	15	12	32
B	19	2	3
C	10	1	1
D	2	0	0
E	1	0	0
F	1	0	0
G	3	0	0
H	1	0	0
I	2	0	0
celkem	54	15	36

Výsledky - typizace metodou PCR

- 5 *meca* pozitivních izolátů (SEs neg)
 - disková difúzní metoda → **R** - betalaktamy, tetracyclin, klindamycin, erytromycin → **multirezistentní**
- 4 izoláty nesoucí gen pro enterotoxiny (*mecA* neg)
 - izolát nesoucí gen *seb*, *seg*, *sei*, *sej*
 - izolát nesoucí gen *seh*
 - izolát nesoucí gen *seg*
 - izolát nesoucí gen *seb*
- 27 izolátů *meca* neg / SEs neg



Celogenomové sekvenování

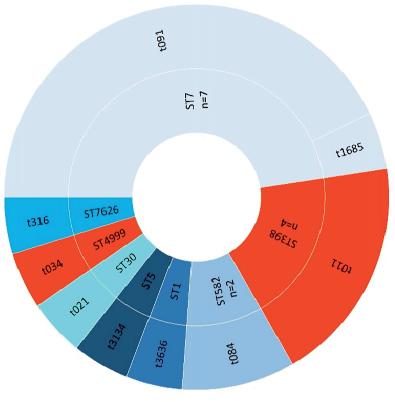
- vybráno 21 izolátů (5x **MRSA** a 16x **MSSA**)
 - izolace DNA
 - NGS (MiSeq) - externí firma
 - zpracování dat - SPAdes
 - ResFinder, VirulenceFinder



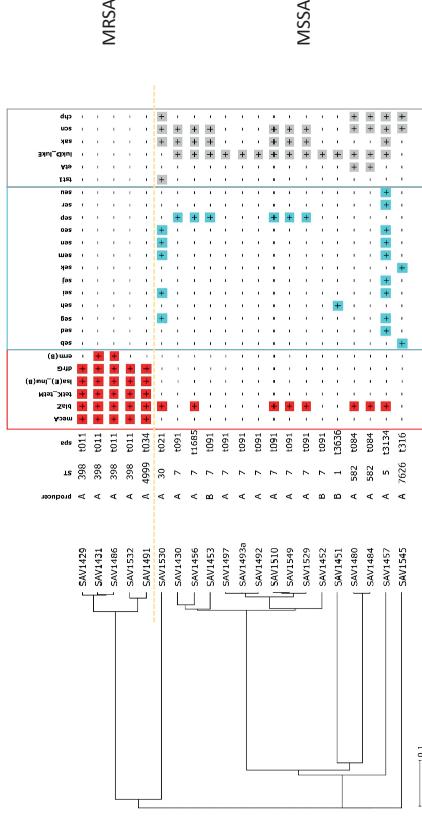
<https://cge.cbs.dtu.dk/services>



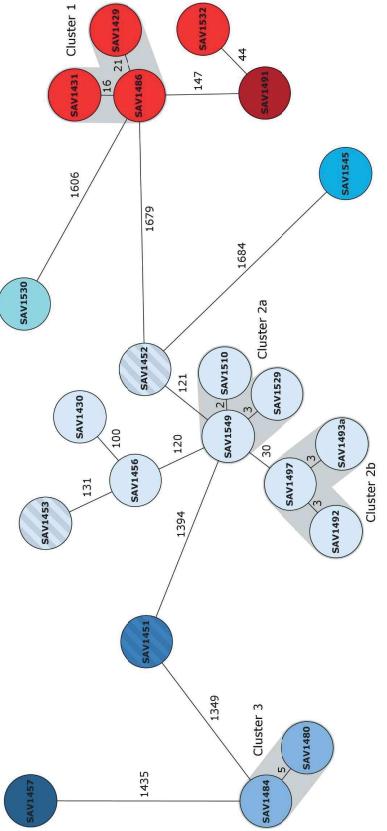
Výsledky 1) ST a spa



2) geny rezistence, geny virulence



3) core genom MLST analýza



Závěr

- *S. aureus* prokázán v 15 vzorcích fermentovaných salámu (27,8%)
→ 36 izolátů
- dle PCR / NGS odhaleno 5 MRSA
- 10 MSSA s geny pro enterotoxiny
- na základě analýz lze využívat, že
 - MRSA izoláty mají původ ve vepřovém mase
 - MSSA izoláty jsou původem lidské

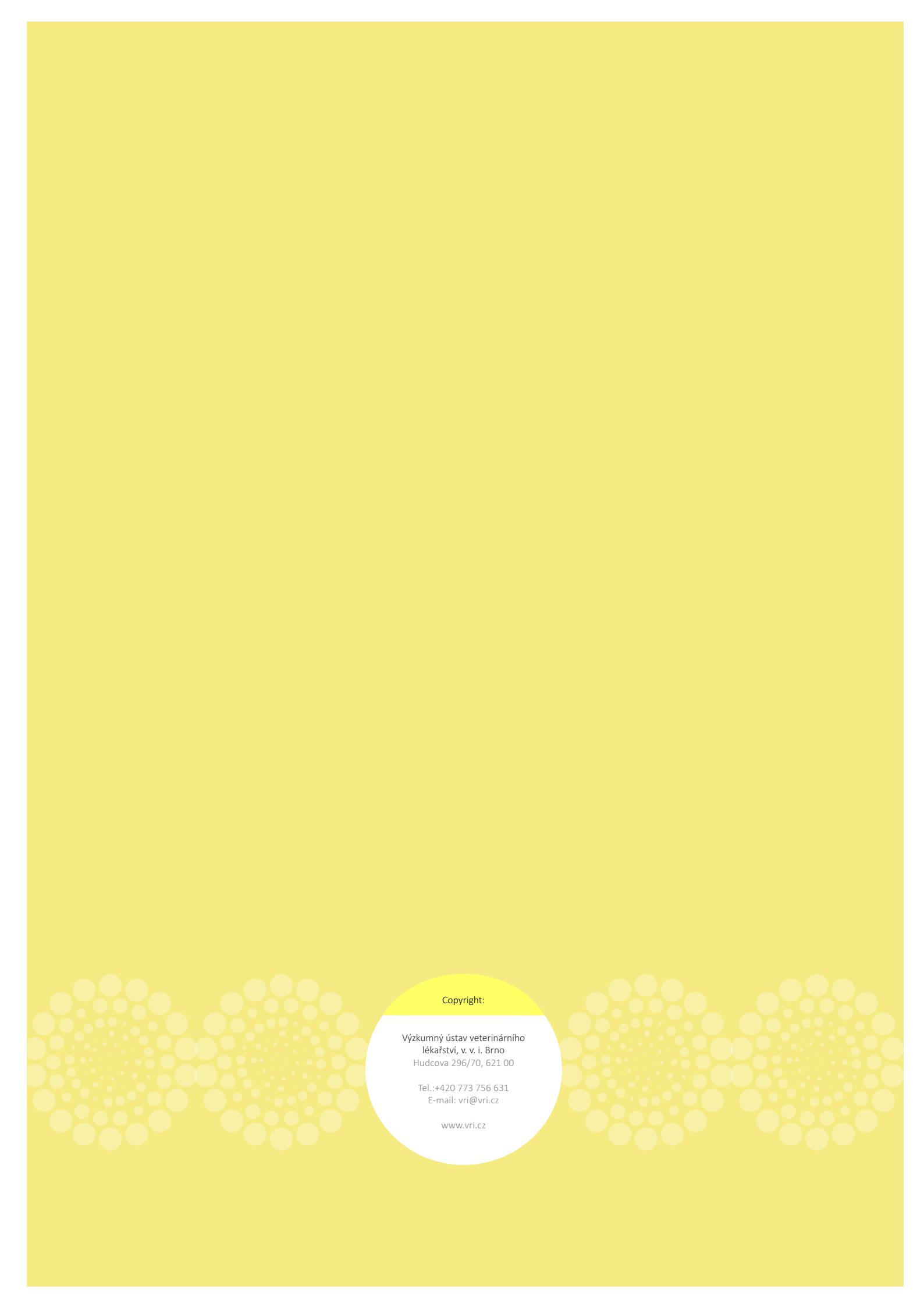
Poděkování

• Projekt QK1910121 řešený s finanční podporou NAZV v programu ZEMĚ

• DKRVO RVO0518

.... a za pozornost





Copyright:

Výzkumný ústav veterinárního
lékařství, v. v. i. Brno
Hudcová 296/70, 621 00

Tel.: +420 773 756 631
E-mail: vri@vri.cz

www.vri.cz