

SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA

V NITRE

FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA

Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov

Mäso ako možný vektor rezistencie voči antibiotikám

Autoreferát dizertačnej práce
na získanie vedecko-akademickej hodnosti philosophiae doctor
v doktorandskom študijnom programe technológia potravín
v študijnom odbore: 6.1.13
Spracovanie poľnohospodárskych produktov

Ing. Miroslav Kročko

Nitra, 2007

Dizertačná práca bola vypracovaná v dennej forme doktorandského štúdia na Katedre hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov Fakulty biotechnológie a potravinárstva Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre.

Doktorand: Ing. Miroslav Kročko
Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vedúci dizertačnej práce: doc. Ing. Ladislav Lagin, CSc.
Konzultant, špecialista: doc. Ing. Margita Čanigová, CSc.
Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Oponenti: doc. Ing. Dana Tančinová, PhD.
Katedra mikrobiológie
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

prof. Ing. Ladislav Hetényi, PhD.
Zástupca riaditeľa VÚŽV Nitra
SCPV Nitra

Ing. Ladislav Staruch, PhD.
Katedra potravinárskej technológie
Fakulta chemickej a potravinárskej technológie
Slovenská technická univerzita v Bratislave

Autoreferát bol odoslaný dňa2007

Stanovisko k dizertácii vypracovala Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov, Fakulta biotechnológie a potravinárstva, Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre.

Obhajoba doktorandskej dizertácie sa koná dňa2007 o h pred komisiou pre obhajobu dizertačných prác študijného programu technológia potravín študijného odboru 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov na Fakulte biotechnológie a potravinárstva, Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre, vymenovanou predsedom OK dňa 15. 6. 2005

Miesto konania: Katedra
Fakulta biotechnológie a potravinárstva
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre
Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra

Miestnosť:

S dizertačnou prácou sa možno oboznámiť na dekanáte Fakulty biotechnológie a potravinárstva.

Predseda komisie pre obhajoby študijného programu technológia potravín študijného odboru 6.1.13 Spracovanie poľnohospodárskych produktov

prof. Ing. Zdenka Muchová, CSc.
FBP SPU Nitra

ABSTRAKT

Cieľom práce bolo charakterizovať mikrobiologickú kvalitu bravčového, hovädzieho a kuracieho mäsa. Zistiť vzťahy medzi fyzikálnou charakteristikou bravčového mäsa a stupňom ako aj charakterom kontaminácie tohto mäsa 24 hod *post mortem* a po 7 dňoch zrenia, stanoviť úroveň kontaminácie jatočných tiel ošípaných, hovädzieho dobytku a kurčiat vybranými skupinami mikroorganizmov s dôrazom na enterokoky, izolovať a identifikovať komerčnými testami náhodne vybrané kmene enterokokov, porovnať účinnosť selektivity troch rozličných kultivačných médií určených pre stanovenie enterokokov, potvrdiť vybrané identifikované druhy enterokokov PCR metódou, otestovať rezistenciu enterokokov na antibiotiká a zistiť možnosť ich prežívania v mäsových výrobkoch ako aj prostredí žalúdka a dvanástnika.

Z výsledkov práce vyplynulo, že mikrobiologická a fyzikálna charakteristika mäsa skladovaného v chlade je podmienená kvalitatívnymi odchýlkami mäsa (PSE, DFD), predporážkovými vplyvmi (dĺžka prepravy, podmienky ustajnenia, sprchovanie zvierat), hygienickými podmienkami a spôsobom chladenia mäsa. Mikrobiologická kvalita surového mäsa je podmienená aj počiatočným množstvom psychrotrofných mikroorganizmov a ich podielom na celkovej mikroflóre. Pri hodnotení jatočných ošípaných možno konštatovať, že 31 % vzoriek nevyhovovalo prijateľným limitom uvedeným v Zbierke zákonov č. 281/2003. Príčinu možno vidieť v nedostatočných hygienických podmienkach na bitúnkoch, ktoré štatisticky významne ($P < 0,01$) podmienili celkový počet mikroorganizmov. Najhoršiu mikrobiologickú kvalitu mali vzorky bravčového mäsa charakteru DFD.

Hodnotami celkových počtov mikroorganizmov nevyhovovalo prijateľným limitom uvedeným v Zbierke zákonov č. 281/2003 osem percent analyzovaných vzoriek hovädzieho mäsa.

Z výsledkov celkového počtu mikroorganizmov na kuracom mäse vyplýva, že oblasť brušnej dutiny je v porovnaní s odbernými miestami u vzoriek bravčového a hovädzieho mäsa najviac kontaminovaná mikroorganizmami.

Počty enterokokov v bravčovom mäse sa pohybovali v rozmedzí 0,60 – 6,47 log KTJ.cm⁻², v hovädzom mäse 0 – 2,14 log KTJ.cm⁻² a v kuracom mäse 1,45 – 4,00 log KTJ.cm⁻². *Enterococcus faecium* získaný z bravčového (72 %) a kuracieho mäsa (38 %) sa stal prevažujúcim druhom, nasledovaný *E. faecalis* 10 % (bravčové) a 23 % (kuracie). Druhovú identifikáciu vybraných enterokokov (n = 12) PCR metódou potvrdila, že použitie samotných biochemických metód pre identifikáciu enterokokov nepostačuje.

Zo 75 izolátov enterokokov 15 % bolo rezistentných na vankomycín a 15 % na erythromycín, 27 % na ampicilín, 25 % na gentamicín a 56 % na tetracyklín. V prevažnej väčšine sa zistili stredne rezistentné izoláty z bravčového a kuracieho mäsa na ampicilín (70 resp. 40 %), gentamicín (66 resp. 40 %), tetracyklín (len bravčové 54 %) a erythromycín (len bravčové 64 %). Najčastejší výskyt multirezistencie na antibiotiká sa zaznamenal u druhov *E. faecium* a *E. faecalis*. Potvrdenie rezistencie na vankomycín PCR metódou sa u vybraných druhov enterokokov v porovnaní s diskovou difúznou metódou zhodovalo v 75 %. Naša štúdia dokázala, že surové mäso môže byť rezervoárom enterokokov rezistentných na antibiotiká.

Minimálny tepelný zázehv 70 °C počas 10 min, ako uvádza Potravinový kódex SR pre ošetrenie tepelne opracovaných mäsových výrobkov, postačoval na usmrtenie vankomycín rezistentného kmeňa *E. gallinarum* v tepelne opracovanom mäsovom výrobku – dusená šunka. Ďalej sa zistilo, že už teplota 68 °C postačuje na usmrtenie tohto kmeňa. *E. gallinarum* naočkovaný v bujóne neprežil hodnoty pH 1,5 až 2,5 a v prípade fyziologického roztoku ani hodnotu pH 3,0. So zvyšujúcou sa hodnotou pH počet prežívajúcich mikroorganizmov vzrastal, ale s narastajúcou hodnotou doby pôsobenia tohto prostredia ich počet postupne klesal. Vysoká hodnota pH v prostredí žlče poskytuje výhodu prežitia druhom rodu *Enterococcus*. Zvyšujúca sa koncentrácia žlče postupne znižuje počet enterokokov.

ABSTRACT

The aim of this work was to characterize the pork, beef and chicken microbial quality; to found out a relationship between the pork physical characteristic and degree of meat contamination 24 hod *post mortem* and after 7 days of ripening, to estimate the microbial contamination level of pork, beef a chicken by chosen microorganisms with emphasis to enterococci, to isolate and identify randomly chosen strains of enterococci by commercial tests, to compare the selectivity of three different medias for enterococci enumeration and isolation, PCR confirmation of identified enterococci by commercial tests, to test the antibiotic resistance of enterococci and found the possibility of their surviving in the meat products, stomach and duodeum conditions.

The results shows that microbiological and physical quality of meat stored in coldness is conditioned by meat quality aberrances (PSE, DFD), pre- slaughter factors (transport distance, stabling conditions, shower), sanitary and chilling conditions of abattoirs. The microbiological quality of raw meat is also conditioned by initial count of psychrotrophic bacteria and by its portion on the total microflora. Evaluating the pork, it is possible to claim that up to 31 % of samples didn't conform with Slovak government statute no. 281/2003. The reason is seen in the inferior hygienic conditions at slaughterhouses which statistically significantly ($P < 0,01$) conditioned the total bacterial count. The samples of DFD character of meat had the worst microbial quality.

Up to 8 % of analysed samples of beef didn't conform with Slovak government statute no. 281/2003.

The results of chicken total bacterial count shows that sampeling area of abdomen is the most contaminated by bacteria in comparison with sampeling area of pork and beef.

The counts of enterococci was in the range of 0.60 – 6.47 log cfu.cm⁻² in pork, 0 – 2.14 log cfu.cm⁻² in beef and 1.45 – 4.00 log cfu.cm⁻² in poultry. *Enterococcus faecium* was the predominat species recovered from pork (72 %) and poultry (39 %), followed by *E. faecalis* 10 % (pork) and 23 % (poultry). The identification of chosen enterococci isolates (n = 12) by PCR assay confirm, that using only the biochemical methods for enterococci identification is not sufficient.

Of 75 isolates of enterococci 15 % were resistant to vancomycin and 15 % were resistant to erythromycin, 27 % to ampicillin, 25 % to gentamicin and 56 % to tetracycline. We found a higher prevalence of intermediate resistant isolates of both pork and poultry to ampicillin (70 resp. 40 %), gentamicin (66 resp. 40 %), tetracycline (only pork 54 %) and erythromycin (only pork 64 %). The

highest incidence of antibiotic multiresistance were found in *E. faecium* a *E. faecalis*. The confirmation of 75 % chosen isolates of enterococci to vancomycin resistance by PCR assay was in accordance with disk diffusion method. Our study suggests that raw meat plays a potential role as reservoirs of resistance enterococci to antibiotics.

The minimal heat treatment of 70 °C 10 min for the heat treat meat products, which is reported by Codex alimentarium SR, is sufficient for the antibiotic resistant *E. gallinarum* strain damage in the heat treat meat product – boiled ham. We found that temperature 68 °C is also sufficient for antibiotic resistant *E. gallinarum* strain damage. This strain in the nutrient broth didn't survive conditions of stomach with pH value in range of 1.5 to 2.5 and in the case of the saline they didn't survive conditions of stomach with pH value of 1.5 to 3.0. The surviving of enterococci were increased if the pH value increase, however the count of enterococci were decreased after long time period of this condition effect. The high pH value in the conditions of bile provides the advantage to *Enterococcus* spp. The increased concentration of bile cause a consistent decline of enterococci count.

POUŽITÉ SKRATKY, SYMBOLY A ZNAČKY

- CPM – celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov
- DFD – dark, firm, dry (tmavé, tvrdé, suché)
- *E.* – rod *Enterococcus*
- ENT – enterokoky
- GTKA – agar s glukózou a kvasničným extraktom
- KTJ – kolóniu tvoriace jednotky
- *L.* – rod *Lactobacillus*
- PCR – polymerázová reťazová reakcia
- PSE – pale, soft, exudate (svetlé, mäkké, vodnaté)
- VRE – vankomycín-rezistentné enterokoky

OBSAH

ÚVOD.....	6
1 CIEĽ PRÁCE.....	7
2 MATERIÁL A METÓDY	8
2.1 Stanovenie fyzikálnych ukazovateľov kvality bravčového mäsa.....	8
2.2 Stanovenie mikrobiologických ukazovateľov.....	9
2.3 Izolácia enterokokov.....	10
2.4 Rodová identifikácia enterokokov	10
2.5 Druhová identifikácia enterokokov komerčným testom	10
2.6 Potvrdenie druhej identifikácie enterokokov PCR metódou.....	11

2.7 Stanovenie rezistencie enterokokov na antibiotiká	11
2.8 Potvrdenie rezistencie enterokokov PCR metódou	11
2.9 Modelový pokus – prežívanie vankomycín rezistentného enterokoka (VRE) v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch	11
2.10 Modelový <i>in vitro</i> test – vplyv pH žalúdka na prežívanie VRE	11
2.11 Modelový <i>in vitro</i> test – vplyv pH dvanástnika (<i>duodenum</i>) v kombinácii so žľouchou na prežívanie VRE	12
2.12 Štatistické vyhodnotenie výsledkov	12
3 VÝSLEDKY A ZÁVERY	12
4 POUŽITÁ LITERATÚRA	166
5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU	177

Ú V O D

Medzi potravinami popredné miesto zaujíma mäso a mäsové výrobky, ktoré patria k najdôležitejším zložkám ľudskej výživy. Tvoria v nej nenahraditeľný podiel tak pre svoje nutričné hodnoty, ako aj pre úžitkové vlastnosti. Na finálnu akosť mäsa a mäsových výrobkov z hľadiska nutričnej hodnoty, ale aj bohatosti a plnosti chutí, vône a trvanlivosti pôsobi rad vonkajších a vnútorných vplyvov ešte počas života zvierat a ako aj pri jeho technologickom spracovaní a skladovaní. Na tieto vplyvy úzko nadväzujú prísne hygienické a výrobné predpisy, ktoré by sa mali dodržiavať na každom stupni od začiatku až po finalizáciu, distribúciu a predaj pre zachovanie požadovanej akosti výrobku. Rozhodujúcu úlohu v tomto smere zohráva mikrobiologická kvalita získavaného mäsa a zmeny mikroflóry počas spracovania mäsa na finálne výrobky.

Koža zvierat obsahuje $10^6 - 10^8$ mikroorganizmov na cm^2 , vo výkaloch zvierat sa počty baktérií nachádzajú v koncentrácii minimálne $10^7 \cdot \text{g}^{-1}$. Zdravý organizmus zvierat však tieto mikroorganizmy zdoľáva svojimi obrannými prostriedkami a mechanizmami. Ak sú však zvieratá unavené alebo vyčerpané dlhodobou prepravou, prípadne dlhým čakaním na bitúnkoch, mikroorganizmy spontánne migrujú z tráviacej sústavy do svaloviny, ktorá sa nimi intravitálne kontaminuje. Kontaminácia mikroflórou zo zažívacieho traktu napr. u ošípaných je veľmi pravdepodobná v oblasti stehna, najmä z oblasti konečníka. Jednou z kontaminujúcich skupín mikroorganizmov mäsa môžu byť aj enterokoky.

Enterokoky sú ubikvitárne baktérie, ktoré sa frekventovane vyskytujú v značnom počte v mliekarenských výrobkoch, ale aj v iných fermentovaných potravinách vrátane mäsových výrobkov. Sú schopné prežívať vo veľmi nepriaznivých podmienkach. Väčšina druhov rodu *Enterococcus* je schopná rasti pri koncentrácii 6,5 % NaCl, pri hodnotách pH 9,6 a schopná prežiť teplotu 60 °C po dobu 30 minút. Najčastejšie identifikovanými druhmi enterokokov z mäsa sú *E. faecium* a *E. faecalis*. Enterokoky používané v potravinárstve, alebo ako probiotiká, sú zvyčajne kmene druhu *E. faecium*. Väčšina enterokokov produkujúcich bakteriocíny, odporúčené ako štartovacie kultúry, patrí tiež do tohto druhu. Patogénny potenciál *E. faecalis* je väčší ako u druhu *E. faecium*, lebo viac ako 80 % enterokokov spojených s ľudskými infekciami patrí do druhu *E. faecalis*. Aj keď súčasné dôkazy nenaznačujú, že

enterokoky patria k pôvodcom alimentárnych infekcií, potravinový reťazec je nepochybne dôležitým zdrojom enterokokov pre ľudí.

Extrémne vysoká úroveň antibiotickej rezistencie zistená u enterokokov a ich rozšírenie v surovinách živočíšneho pôvodu sú dva kľúčové faktory prispievajúce k sledovaniu rezistentných enterokokov v nefermentovaných, ale aj vo fermentovaných potravinárskych výrobkoch. Enterokoky rezistentné na antibiotiká sa zistili v mäse, mlieku a v potravinách, ktoré sa vyrobili z nich na priamy konzum ako aj v probiotikách obsahujúcich kmene enterokokov. V prácach zaoberajúcich sa antibiotickou rezistenciou enterokokov sa z jatočných tiel hydiny, ošípaných a hovädzieho dobytku ale aj z čerstvého výsekového mäsa v malo a veľkoobchodných predajniach pravidelne izolovali kmene *E. faecium* a *E. faecalis*.

V literárnom prehľade doktorandskej práce sa pojednáva o výskyte enterokokov v mäse a mäsových výrobkoch, o ich probiotických vlastnostiach a tvorbe bakteriocínov a biogénnych aminov, ako aj možných problémoch v súvislosti s patogénnym charakterom niektorých druhov rodu *Enterococcus*. Experimentálna časť práce je zameraná najmä na zistenie prítomnosti enterokokov v rôznych druhoch mäsa, ich druhovú identifikáciu, zistenie antibiotickej rezistencie a schopnosti prežívať vo výrobkoch ako aj v podmienkach zažívacieho traktu ľudí.

Doktorandská práca má prispieť k rozšíreniu poznatkov o enterokokoch, najmä ich identifikácii a zhodnoteniu enterokokov ako možných vektorov prenosu antibiotickej rezistencie.

Doktorandská práca sa riešila v rámci projektov VEGA 172/2004 a VEGA 201/2006.

1 CIEĽ PRÁCE

Cieľom doktorandskej práce je charakterizovať mikrobiologickú kvalitu mäsa rôznych druhov zvierat so zameraním na množstvo a druhové zastúpenie ubiquitnej skupiny mikroorganizmov – enterokokov a stanovenie vzťahu medzi fyzikálnou charakteristikou mäsa a jeho mikrobiálnou kontamináciou. U izolátov enterokokov zistiť ich citlivosť na antibiotiká a otestovať ich prežívanie v simulovaných podmienkach zažívacieho traktu a tepelne opracovanom mäsovom výrobku. V súvislosti s dosiahnutím vytýčeného cieľa je potrebné:

1. Zistiť vzťahy medzi fyzikálnou charakteristikou bravčového mäsa a stupňom ako aj charakterom kontaminácie tohto mäsa 24 hod *post mortem* a po 7 dňoch zrenia pri teplote $2 \pm 1^\circ\text{C}$ a relatívnej vlhkosti 85 – 95 %.
2. Stanoviť úroveň kontaminácie jatočných tiel ošípaných, hovädzieho dobytku a kurčiat vybranými skupinami mikroorganizmov s dôrazom na enterokoky.
3. Izolovať a identifikovať komerčnými testami náhodne vybrané kmene enterokokov.
4. Porovnať účinnosť selektivity troch rozličných kultivačných médií určených pre stanovenie enterokokov vzhľadom k zisteniu ich celkového počtu a následnej fenotypovej identifikácii na úrovni rodu a druhu.
5. Potvrdiť vybrané identifikované druhy enterokokov PCR metódou.
6. Testovať citlivosť kmeňov enterokokov na vybrané typy antibiotík.
7. Potvrdiť antibiotickú rezistenciu enterokokov PCR metódou.

8. V modelových pokusoch otestovať prežívanie enterokoku rezistentného na antibiotiká v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch.
9. V modelových pokusoch zistiť schopnosť vybraného rezistentného enterokoka prežívať v prostredí simulovaných podmienok žalúdka a dvanástnika.
10. Štatisticky spracovať a vyhodnotiť výsledky.

2 MATERIÁL A METÓDY

- Vzorky bravčového mäsa ($n = 75$) sa odobrali zo zvierat pochádzajúcich od viacerých chovateľov, ktoré sa opracovali na bitúnkoch č. 1; č. 2 a č. 3 v rokoch 2004 – 2007. Bitúanky sa odlišovali rozdielnymi predporážkovými vplyvmi (dĺžka prepravy, ustajnenie, sprchovanie vlažnou vodou), odštetinovacou a vykolovacou technikou a v neposlednom rade hygienickými podmienkami a spôsobom chladenia mäsa. Odber a analýza vzoriek sa vykonali 2 – krát mesačne. Pri rozrábke jatočných tiel 24 hod *post mortem* sa odobrali vzorky PSE, DFD a mäsa s normálnym priebehom zrenia, ako kontrolnej skupiny, zo stehna (*musculus semimembranosus*) o hmotnosti približne 1 kg na stanovenie vybraných ukazovateľov akostnej charakteristiky mäsa. Proces zrenia sa imitoval uskladnením vzoriek bez akejkoľvek úpravy a balenia v chladiarenských podmienkach pri teplote 2 ± 1 °C a relatívnej vlhkosti 85 – 95 % po dobu 7 dní.
- Vzorky hovädzieho mäsa ($n = 25$) sa odoberali z jedného bitúanky v období rokov 2004 – 2005. Na posúdenie mikrobiologickej kvality hovädzieho mäsa sa použil sval *musculus longissimus dorsi* z oblasti medzi 10. – 13. rebrom 24 hod *post mortem*. Proces zrenia mäsa sa imitoval podobne, ako u vzoriek bravčového mäsa, pri teplote 2 ± 1 °C a relatívnej vlhkosti 85 – 95 % taktiež po dobu 7 dní.
- Vzorky kurčiat ($n = 15$) pochádzali z jedného chovu, v ktorom sa v rámci iného pokusného zámeru (vplyv rastlinných silíc na fyzikálno-chemické a senzorické vlastnosti kuracieho mäsa) rozdelili na pokusnú a kontrolnú skupinu. Pokusným skupinám výkrmových kurčiat COBB 500 sa do krmnej zmesi (HYD-01 až HYD-03) pridával premix silíc (škoricová, pamajoránová, tymiánová) v zastúpení 0,05 %. V kontrolnej skupine sa do krmnej zmesi pridávalo antibiotikum avilamicín. Na mikrobiologický rozbor sa odobrali zo vzoriek kurčiat stery z oblasti brušnej dutiny 1 hod *post mortem*. Vzorky sa po procese zrenia už neanalyzovali.

Vo vzorkách mäsa sa stanovili vybrané fyzikálne a mikrobiologické ukazovatele.

2.1 Stanovenie fyzikálnych ukazovateľov kvality bravčového mäsa

- Meranie pH sa uskutočnilo po 45 min, 24 hod *post mortem* a po 7 dňoch zrenia bravčového mäsa pomocou štandardného vpichového pH metra značky Gryf 209 (Garrido et al., 1995)
- Meranie elektrickej vodivosti sa uskutočnilo po 45 min a 24 hod *post mortem* z hľadiska ďalšieho posúdenia akostných odchýlok bravčového mäsa. Meranie je založené na aplikácii vpichovej elektródy do mäsa (Garrido et al., 1995). Používal sa prístroj typu Biotech.

- Meranie úrovne osvalenia jatočných tiel ošipaných (% chudej svaloviny) sa stanovilo dvojbodovou metódou na základe hrúbky svaloviny meranej v bedernej oblasti, a to ako najkratšia spojnice od hornej (dorzálny) hrany miechového kanálíka k prednému (kraniálnemu) okraju stredného zadnicového svalu (*musculus gluteus medius*). Hrúbka slaniny vrátane kože sa merala v bedernej krajine v mieste najnižšej vrstvy nad stredom stredného zadnicového svalu (*musculus gluteus medius*) (Zbierka zákonov č. 239/2002).
- Vzorka pre stanovenie farby mäsa (10 g) sa odobrala zo svalu *musculus semimembranosus* 24 hod *post mortem* a po 7 dňoch zrenia mäsa, vložila sa do skúšobného taniera, ktorý je súčasťou prístroja a farba mäsa (%) sa stanovila ako remisia zmeraná pri vlnovej dĺžke 520 nm spektrálnym fotokolorimetrom SPEKOL 11 (Hunt a Mancini, 2002).
- Hodnota strižnej sily sa stanovila metódou Warner-Bratzlera a vyjadřila v kg.cm⁻². Vzorka bravčového mäsa (*musculus semimembranosus*) sa narezala na 1 x 3 cm hrubé hranoly približne 10 cm dlhé a po vložení do prístroja Chatillon (prístroj viedol rez nie medzi, ale cez svalové vlákna) sa hodnota strižnej sily vyjadřila ako priemer troch po sebe nasledujúcich meraní (Goodson et al., 2002).
- Straty odkvapom (%) sa stanovili po 24 hod a po 7 dňoch zrenia. Vzorka mäsa (150 g) sa v uzavretej vzorkovnici uskladnila v chladničke pri teplote 2 ± 1°C a relatívnej vlhkosti 85 – 95 %. Po stanovenej dobe sa zistili hmotnostné straty vzorky mäsa a prepočítali sa na percentuálny podiel (Honikel, 1998).
- Straty hmotnosti tepelným opracovaním sa stanovili po dosiahnutí teploty 70 °C v jadre vzorky (150 g) po 10 minútach varu. Z rozdielu hmotnosti vzorky pred a po tepelnom opracovaní sa zistili hmotnostné straty a prepočítali sa na percentuálny podiel (Prusa a Hughes, 1986).

2.2 Stanovenie mikrobiologických ukazovateľov

Na vzorkách bravčového (*musculus semimembranosus*) a hovädzieho (*musculus longissimus dorsi*) mäsa sa vykonal povrchový ster 24 hod *post mortem* a po 7 dňoch zrenia. Na vzorkách hydiny sa ster z oblasti brušnej dutiny vykonal 1 hod *post mortem*. Stery sa vykonalí na ploche 25 cm² zotretím povrchu svaloviny sterilným tampónom, ktorý sa následne vytrepával 10 minút v 10 cm³ sterilného fyziologického roztoku s peptónom. Odobraté vzorky sa vyšetrili na:

- celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov (CPM) na GTKA (*HiMedia*, India) kultiváciou pri teplote 30 ± 1 °C, 72 ± 2 hod. (STN ISO 4833, 2004)
- počet enterokokov na živnom médiu Slanetz – Bartley (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko) pri teplote 37 ± 1 °C, 48 ± 2 hod. (STN 560100, 1970)
- počet psychrotrofných mikroorganizmov na GTKA (*HiMedia*, India) kultiváciou pri 6,5 ± 1 °C, 10 dní (STN 560100, 1970).

Pri hodnotení selektivity živných médií pre stanovenie enterokokov sa testovali nasledovné médiá:

- Slanetz – Bartley médium (*Biokar Diagnostic*, Francúzsko; *HiMedia*, India), kultivácia enterokokov pri teplote 37 ± 1 °C, 48 ± 2 hod.

- Eskulín – žlčové médium (*HiMedia*, India), kultivácia enterokokov pri teplote 37 ± 1 °C, 24 ± 2 hod.
- Eskulín – žlč – azidové médium (*Biokar Diagnostic*, Francúzko) kultivácia enterokokov pri teplote 37 ± 1 °C, 24 ± 2 hod.

2.3 Izolácia enterokokov

Vyrastené, náhodne vybrané kolónie enterokokov na médiu Slanetz - Bartley (*Biokar Diagnostic*, Francúzko) pochádzajúce z bravčového a kuracieho mäsa sa preočkovali čiarovaním na selektívne eskulín – žlčové (*HiMedia*, India) a eskulín – žlč – azidové médiá (*Biokar Diagnostic*, Francúzko) a na krvný agar. Vzorky sa inkubovali pri 37 ± 1 °C, 24 ± 2 hod.

2.4 Rodová identifikácia enterokokov

Príslušnosť k rodu *Enterococcus* sa u suspektných 24 hodinových kolónií zisťovala na základe:

- makroskopicky hodnoteného tvaru, veľkosti, farby a okraja kolónií na použítom živnom médiu,
- mikroskopicky, pomocou natívneho preparátu sa určil tvar, usporiadanie buniek, pohyblivosť a čistota kultúry izolovaných baktérií a potvrdila sa príslušnosť podľa Grama,
- negatívnej katalázovej skúšky, ktorá sa vykonala kvapnutím 3 % H₂O₂ na vyrastenú kolóniu enterokokov. Pri pozitívnej reakcii sa intenzívne uvoľňujú bublinky kyslíka (Betina et al., 1987),
- produkcie enzýmu pyrrolidonylarylamidázy na PYRA-teste (*Lachema*, ČR). Kolónie baktérií sa preočkovali na detekčný prúžok obsahujúci β-naftylamid kyseliny pyroglutamovej, ktorý sa hydrolyzuje bakteriálnou pyrrolidonylarylamidázou. Hydrolyza sa detekovala PYR činidlom. Pozitívne sa hodnotilo červené až fialové sfarbenie prúžka.

2.5 Druhovú identifikáciu enterokokov komerčným testom

Druhovú identifikáciu izolátov rodu *Enterococcus* sa vykonala pomocou komerčného EN – COCCUS testu (*Lachema*, ČR). Z čistej 24 hodinovej kultúry sa pripravila vo fyziologickom roztoku (1,2 cm³) suspenzia mikroorganizmov zodpovedajúca 2. stupňu McFarlandovej zákalovej stupnice (roztok 0,2 cm³ 1 % BaCl₂ a 9,8 cm³ 1 % H₂SO₄). Bakteriálnou suspenziou sa v množstve 0,1 cm³ inokulovali jamky testu. Následne sa testy vložili do termostatu a inkubovali pri teplote 37 ± 1 °C, 24 ± 2 hod. Na hodnotenie farebných reakcií sa použila farebná porovnávacia stupnica súpravy EN-COCCUS test. Hodnotili sa biochemické reakcie arginínu (ARG), sorbózy (SOE), arabinózy (ARA), manitolu (MAN), sorbitolu (SOR), melibiózy (MLB), rafinózy (RAF), melezitózy (MLZ).

2.6 Potvrdenie druhej identifikácie enterokokov PCR metódou

Potvrdenie druhej identifikácie enterokokov, ako aj ich rezistencie na antibiotiká, PCR metódou sa uskutočnilo v spolupráci s MVDr. Miriam Revalovou na Štátnom veterinárnom a potravinovom ústave v Dolnom Kubíne. Potvrdenie sa uskutočnilo na 12 druhoch enterokokov identifikovaných EN – COCCUS testom: 5 druhov *E. faecalis*, 4 druhy identifikované ako *Enterococcus spp.*, 2 druhy *E. faecium* a jeden druh *E. casseliflavus*.

2.7 Stanovenie rezistencie enterokokov na antibiotiká

Pred testami na rezistenciu sa izoláty enterokokov oživilo na GTKA (*HiMedia*, India) 24 hod kultiváciou pri teplote 37 ± 1 °C. Inokulum sa pripravilo rozsuspendovaním vyrastených kolónií z GTKA vo fyziologickom roztoku ($1,2 \text{ cm}^3$) do vytvorenia zákalu zodpovedajúcemu 0,5 stupňa McFarlandovej zákalovej stupnice (roztok $0,05 \text{ cm}^3$ 1 % BaCl_2 a $9,95 \text{ cm}^3$ 1 % H_2SO_4) podľa nariadení National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 1999), čo zodpovedalo približnej hustote buniek $10^5 - 10^6$ KTJ. cm^{-3} . Testovanie rezistencie enterokokov na antibiotiká sa vykonalo diskovou difúznou metódou naočkovaním 1 cm^3 suspenzie enterokokov do Petriho misiek a následným zaliatím Mueller – Hinton agarom (*HiMedia*, India). Po jeho stuhnutí sa na povrch platničiek sterilnou pinzetou rovnomerne rozložili antibiotické disky v rovnakej vzdialenosti od okraja. Citlivosť na antibiotiká sa sledovala použitím antibiotických diskov s koncentráciou: Vankomycín (VAN) 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$, Gentamicín (GEN) 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$, Erythromycín (ERY) 15 $\mu\text{g}/\text{disk}$, Tetracyklín (TET) 30 $\mu\text{g}/\text{disk}$, Ampicilín (AMP) 10 $\mu\text{g}/\text{disk}$ (*HiMedia*, India). Kultivácia prebiehala 14 – 19 hod pri 37 ± 1 °C. Na základe veľkosti vytvorenej zóny sa izoláty klasifikovali ako citlivé, stredne rezistentné alebo rezistentné.

2.8 Potvrdenie rezistencie enterokokov PCR metódou

Potvrdenie rezistencie na antibiotiká PCR metódou sa vykonalo na druhoch enterokokov identifikovaných PCR metódou.

2.9 Modelový pokus – prežívanie vankomycín rezistentného enterokoka (VRE) v tepelne opracovaných mäsových výrobkoch

Pre pokusný zámer sa vybral kmeň *E. gallinarum*, u ktorého sa zistila rezistencia na vankomycín a ďalšie antibiotiká a sledovala sa jeho schopnosť prežiť teplotu 68 °C a 70 °C počas 10 min v tepelne opracovanom výrobku – dusená šunka v konzerve.

2.10 Modelový *in vitro* test – vplyv pH žalúdka na prežívanie VRE

V modelovom pokuse sme sa zamerali na sledovanie schopnosti VRE prežiť v podmienkach s rôznou hodnotou pH, čím sa simulovali podmienky žalúdka. Pokus sa uskutočnil vo fyziologickom roztoku resp. v živnom bujóne, kde sa nastavili hodnoty pH na 1,5; 2,0; 2,5; 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0. Hodnoty pH sa upravovali 3 % HCl alebo 3 % KOH. Do jednotlivých skúmaviek s obsahom

fyziológického roztoku a živného bujónu s upravenou hodnotou pH sa sterilne pridal 1 cm³ suspenzie *E. gallinarum* (VRE), ktorá sa pripravila rozsuspendovaním vyrastených 24 hodinových kolónií enterokoka. Skúmavky s enterokokom sa inkubovali pri 37 ± 1 °C 1, 2 a 3 hod. Následne sa stanovili počty prežívajúcich enterokokov kultivačnou metódou na eskulín – žlč – azidovom médiu (24 hod kultivácia, 37 ± 1 °C). Pokus sa opakoval 8 krát.

2.11 Modelový *in vitro* test – vplyv pH dvanástnika (duodenum) v kombinácii so žľou na prežívanie VRE

Pokus sa uskutočnil v živnom bujóne (*Imuna*, Šarišské Michaľany) s hodnotou pH 7,0; 7,5; 8,0; 8,5; 9,0 v kombinácii s 5 %, 10 %, 15 %, 20 % a 25 % koncentráciou žľče. Žlč sa získala zo žlčníka ošipaných odobratím pomocou injekčnej striekačky. Živný bujón s hodnotou pH 3,0 sa naočkoval vankomycín rezistentným *E. gallinarum* v množstve približne 10³ – 10⁴ KTJ.cm⁻³ a ponechal v termostate (37 ± 1 °C) približne 1 hod. Následne sa 1 cm³ suspenzie naočkovalo do pripravených skúmaviek s rôznou hodnotou pH a koncentrácie žľče a po 20 min inkubácie pri teplote 37 ± 1 °C sa stanovili počty prežívajúcich enterokokov kultivačnou metódou na eskulín – žlč – azidovom médiu (24 hod kultivácia, 37 ± 1 °C). Pokus sa opakoval 4 krát.

2.12 Štatistické vyhodnotenie výsledkov

Získané výsledky sa spracovali variačno-štatistickými metódami programom Office Excel 2003 a SAS. Vypočítali sa aritmetické priemery, geometrické priemery, štandardné odchýlky, korelačné koeficienty podľa Pearsona a analyzoval sa rozptyl (ANOVA). Ak sa dokázala preukaznosť F hodnoty na hladine P<0,05; ďalej sa preukaznosť zistila na základe Least Significant Differences (LSD) testu. Výsledky mikrobiologických analýz sa transformovali na logaritmus počtu kolóniu tvoriacich jednotiek (KTJ.cm⁻²) a analyzovali sa rozptyl (ANOVA) a preukaznosť LSD testom.

3 VÝSLEDKY A ZÁVERY

Celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov (CPM) na povrchu bravčového mäsa (bez delenia na PSE a DFD) sa pohyboval v rozmedzí od 2,38 do 5,86 log KTJ.cm⁻², počet psychrotrofných mikroorganizmov (PS) v rozmedzí od 1,60 do 5,26 log KTJ.cm⁻² a počet enterokokov (ENT) od 0,60 do 6,48 log KTJ.cm⁻². Percentuálny podiel mäsových častí sa u ošipaných v jednotlivých skupinách (normálne, PSE, DFD) pohyboval na rovnakej úrovni (57,23 : 57,46 : 57,00). Na povrchu bravčového mäsa s kvalitatívnou odchýlkou PSE sa celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov 24 hod *post mortem* pohyboval v rozmedzí od 2,68 do 5,15 log KTJ.cm⁻², počet psychrotrofných mikroorganizmov od 2,08 do 5,26 log KTJ.cm⁻² a počet enterokokov od 0,60 do 5,48 log KTJ.cm⁻². Na povrchu bravčového mäsa s kvalitatívnou odchýlkou DFD sa celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov 24 hod *post mortem* pohyboval v rozmedzí od 2,60 do 5,34 log KTJ.cm⁻², počet psychrotrofných mikroorganizmov od 1,60 do 5,26 log KTJ.cm⁻² a počet enterokokov od 0,70 do 5,48 log KTJ.cm⁻². V kontrolnej skupine s normálnym priebehom zrenia sa na povrchu bravčového mäsa

24 hod *post mortem* celkový počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov pohyboval v rozmedzí od 2,38 do 5,86 log KTJ.cm⁻², počet psychrotrofných mikroorganizmov od 2,07 do 5,11 log KTJ.cm⁻² a počet enterokokov od 0,60 do 6,47 log KTJ.cm⁻². Psychrotrofné mikroorganizmy majú významné zastúpenie na celkovej mikroflóre bravčového mäsa 24 hod *post mortem* ako aj po 7 dňoch zrenia. Najvyšší podiel psychrotrofných mikroorganizmov 24 hod *post mortem* sa zistil na bravčovom mäse s normálnym priebehom zrenia. Najvyšší percentuálny podiel enterokokov 24 hod *post mortem* sa zistil na vzorkách bravčového mäsa DFD. Po 7 dňoch zrenia podiel psychrotrofných mikroorganizmov vrástol na všetkých troch typoch mias a predstavoval 99 – 104 %. Na bravčovom mäse s normálnym priebehom zrenia sa zistil v porovnaní s 24 hod *post mortem* opäť najvyšší podiel psychrotrofných mikroorganizmov. Podiel enterokokov sa po 7 dňoch zrenia znížil, ale opäť v porovnaní s 24 hod *post mortem* sa ich najvyššie zastúpenie zistilo na bravčovom mäse DFD. Vzájomný vzťah medzi psychrotrofnými a celkovými počtami mikroorganizmov je veľmi veľký až dokonalý (Cohen, 1988). Najvyššie závislosti medzi jednotlivými skupinami mikroorganizmov sa zaznamenali v mäse typu DFD. V ostatných typoch, vrátane DFD, sa vyššie korelačné koeficienty v porovnaní s 24 hod *post mortem* zaznamenali po 7 dňoch zrenia.

Z porovnania bitúnkov z hľadiska výskytu PSE a DFD mäsa vyplýva, že krátka vzdialenosť prepravy a vhodné predporážkové ustajnenie ošípaných môže eliminovať výskyt ošípaných s mäsom DFD. V podmienkach bitúnkov horšej hygienickej kvality sa počty hlavne psychrotrofnej mikroflóry na bravčovom mäse počas zrenia zvyšujú, čím sa nepriamo skraca možná doba zrenia bravčového mäsa.

Na povrchu hovädzieho mäsa 24 hod *post mortem* počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov kolísal v rozmedzí od 1,77 do 4,11 log KTJ.cm⁻², počet psychrotrofných mikroorganizmov kolísal v rozmedzí od 1,04 do 3,83 log KTJ.cm⁻² a počet enterokokov kolísal v rozmedzí od 0,30 do 2,14 log KTJ.cm⁻². Po 7 dňoch zrenia sa počet aeróbných mezofilných mikroorganizmov na povrchu hovädzieho mäsa zvýšil o 1,73 log KTJ.cm⁻² a dosiahol hodnotu 4,32 log KTJ.cm⁻². Počet psychrotrofných mikroorganizmov sa po 7 dňoch zrenia na hovädzom mäse zvýšil o 2,23 log KTJ.cm⁻², čo je približne dvojnásobok v porovnaní s počtom psychrotrofných mikroorganizmov 24 hod *post mortem*. Naopak, počet enterokokov sa znížil o 0,32 log KTJ.cm⁻² a dosiahol hodnotu 0,84 log KTJ.cm⁻². Na základe dosiahnutých výsledkov možno konštatovať, že počty enterokokov na hovädzom mäse sú v porovnaní so psychrotrofnými mikroorganizmami nižšie a ich počet a podiel na celkových počtoch mikroorganizmov sa v procese zrenia mäsa znižujú.

Z výsledkov stanovenia počtu aeróbných mezofilných mikroorganizmov a enterokokov na kuracom mäse vyplýva, že oblasť brušnej dutiny je v porovnaní s odbernými miestami u vzoriek bravčového a hovädzieho mäsa najviac kontaminovaná týmito mikroorganizmami.

Z celkove 331 odpichnutých izolátov z bravčového, hovädzieho a kuracieho mäsa sa identifikovalo komerčným EN – COCCUS testom (*Lachema*, ČR) 75 druhov enterokokov. Identifikované druhy pochádzali prevažne z bravčového a následne z kuracieho mäsa. Z hovädzieho mäsa sa nepodarilo izolovať a následne identifikovať ani jedného zástupcu rodu *Enterococcus*. Identifikovali sa nasledujúce druhy: *E. faecium* (60,53 %), *E. faecalis* (14,47 %), *E. casseliflavus*, *E. mundtii* (po 5,26 %), *E. durans* (1,31 %) a 13,16 % *Enterococcus* sp. Dominantným druhom zisteným v bravčovom (72 %) a v kuracom

mäse (38 %) bol *E. faecium*, nasledovaný *E. faecalis* (10 % bravčové a 23 % kuracie mäso), *E. casseliflavus* (15 % kuracie mäso). Ostatné druhy enterokokov sa vyskytli sporadicky.

Najlepši selektívny účinok z testovaných médií sa zistil na eskulín – žlčovo – azidovom médiu. Stredne veľké až veľké šedo-biele kolónie tvorili silne ohraničené tmavé zóny a taktiež sa zaznamenal nižší nárast kolónií bielej farby bez tmavých zón. Podľa Weiss et al. (2005) väčšina enterokokov tvorí na tomto médiu stredne veľké až veľké kolónie s bielym pigmentom vykazujúce veľmi silnú hydrolyzu. *E. casseliflavus* vytvára hnedý a *E. mundtii* žltý pigment. Všetky enterokoky, okrem *E. gallinarum*, vykazujú silnú hydrolyzu eskulínu. Na tomto médiu možno pozorovať minimálny rast laktobacilov a pediokokov. Niektoré kmene druhov *L. plantarum*, *Pediococcus dextrinicus* a *Pediococcus pentosaceus*, ktoré vykazovali silnú hydrolyzu eskulínu možno odlišiť na základe veľkosti kolónií. Doming et al. (2003) zistili, že po 48 hod kultivácii na eskulín – žlčovo – azidovom médiu je možný výskyt veľmi podobných kolónií aké vytvára rod *Enterococcus*, ale druhom *Listeria monocytogenes*. Na základe našich výsledkov a získaných skúseností vyplýva: z porovnania kolónií, ktoré sa náhodne izolovali z média Slanetz – Bartley sa zistilo, že len červenohnedé kolónie s veľkosťou 1,5 až 2 mm (môžu byť sprevádzané slabou červenou zónou) rastúce vo vnútri média sa pozitívne prejavili na eskulín žlčovom médiu, eskulín – žlčovo – azidovom médiu a na základe PYRA a EN-COCCUS testu identifikovali ako druhy rodu *Enterococcus*.

Možno teda konštatovať, že médium a charakteristika enterokokov určené v STN 560100 (1970) pre stanovenie enterokokov v požívatinách sú nepostačujúce a podľa súčasných poznatkov o enterokokoch aj prekonané.

Z výsledkov druhej identifikácie enterokokov PCR metódou vyplýva, že päť kmeňov identifikovaných EN-COCCUS testom ako *E. faecalis* sa potvrdilo aj PCR metódou. Jeden kmeň sa EN-COCCUS testom jednoznačne identifikoval ako *E. faecium*, ale PCR metódou sa nepotvrdil. Vzhľadom k výsledkom biochemických testov (pozitívny PYRA test, negatívna katalázová skúška, pozitívny rast na eskulín – žlčovo – azidovom médiu) sa tento druh, aj napriek nepotvrdeniu PCR metódou, zaradil do rodu *Enterococcus*. Je možné predpokladať, že ide o iný ako testované referenčné kmene. Negatívne potvrdenie *E. casseliflavus* PCR metódou a identifikácia druhu *E. gallinarum* súvisí zrejme s nejasnou reakciou arginínu na EN-COCCUS teste. Táto reakcia napriek zdanlivo jednoznačnému výsledku môže poskytnúť falošnú identifikáciu, na čo identifikačný kľúč EN-COCCUS testu aj upozorňuje (označenie „d“). PCR metódou sa zistilo, že kmene zatriedené pomocou EN-COCCUS testu ako neidentifikované (*sp*), patria do druhu *E. faecium*. Zistené skutočnosti nás vedú k záverom, že identifikácia pomocou komerčného EN-COCCUS testu je obmedzená a spoľahlivá len na bežne sa vyskytujúce druhy (*E. faecium* a *E. faecalis*) s jednoznačnými biochemickými a teda aj fenotypovými prejavmi.

Zo 75 izolátov sa zistilo 15 % enterokokov rezistentných na vankomycín a 15 % rezistentných na erythromycín, 27 % na ampicilín, 25 % na gentamicín a 56 % na tetracyklín. Viac prevažovali stredne rezistentné druhy na ampicilín (60 %), gentamicín (57 %), erythromycín (48 %) a tetracyklín (36 %). Zo získaných výsledkov vyplýva, že *E. faecium* tvoril hlavný druh z 12 % vankomycín rezistentných enterokokov (VRE) izolovaných z bravčového mäsa. Naopak, hlavným druhom z 20 % VRE izolovaných z kurčiat bol *E. faecalis*.

V bravčovom mäse sa ďalej zistili izoláty rezistentné na ampicilín (18 %), gentamicín (24 %), tetracyklín (34 %) a erythromycín (10 %). Preukazne vyššia ($P < 0,05$) rezistencia na ampicilín (44 %) a tetracyklín (100 %) sa zistila u izolátov z kuracieho mäsa. Izoláty z bravčového mäsa sa vyznačovali nižším podielom multirezistencie ako izoláty z kuracieho mäsa. Najčastejší výskyt multirezistencie sa zaznamenal u druhov *E. faecium* a *E. faecalis*, čo je pochopiteľné, keďže tieto dva druhy sa izolovali najčastejšie. Multirezistentný fenotyp tetracyklín + erythromycín + vankomycín sa zistil z našich izolátov len u druhu *E. faecalis* izolovaného z bravčového mäsa a *E. gallinarum* izolovaného z kuracieho mäsa. Rezistencia na tetracyklín a erythromycín poukazuje na spojitosť medzi podávaním antibiotík zvieratám a výskytom rezistencie u baktérií izolovaných z potravín živočíšneho pôvodu (Šustáčková et al., 2004).

Zaujímavosťou našich výsledkov je, že u 15 % VRE sa nezistila rezistencia na erythromycín. Niekoľko štúdií naopak dokazuje, že medzi genetickými determinantami vankomycínu a erythromycínu existuje silná spojitosť. Je to v zhode so sledovaním, že erythromycín a vankomycín rezistentné gény môžu byť lokalizované na rovnakom úseku DNA (Aarestrup, 2000; Borgen et al., 2001). Potvrdenie rezistencie na vankomycín PCR metódou sa u vybraných druhov enterokokov v porovnaní s diskovou difúznou metódou zhodovalo v 75 %.

Teplota 70 °C ako aj 68 °C počas 10 min postačuje na zničenie *E. gallinarum*, ktorý vykazoval vrodennú rezistenciu na vankomycín, v tepelne opracovanom mäsovom výrobku – dusená šunka. Získané výsledky naznačujú, že je možné prežitie buniek na vankomycín rezistentného druhu *E. gallinarum* v kyslom prostredí žalúdka. S rastúcim pôvodným počtom týchto mikroorganizmov sa pravdepodobnosť ich prežitia zvyšuje a vytvára sa predpoklad, že sa môžu dostať aj do ďalších častí tráviaceho traktu. Tiež je možné predpokladať, že prežitie tohto kmeňa v žalúdku pri konzumácii potravín bielkovinovej povahy sa zvyšuje vzhľadom na ochranný charakter bielkovín.

Najvyššia baktericídna účinnosť žlče sa zistila pri hodnote pH 7, čo zodpovedá aj pôvodnej reakcii žlče odobratej zo žlčníka ošípaných. So zvyšujúcou hodnotou pH, sa počet prežívajúcich mikroorganizmov zvyšoval. Naopak, so zvyšujúcou hodnotou koncentrácie žlče počet mikroorganizmov klesal. Z výsledkov vyplýva, že vysoká hodnota pH v prostredí žlče poskytuje výhodu rastu a prežívania druhom rodu *Enterococcus*, ale zvyšujúca koncentrácia žlče postupne znižuje ich počet. Je teda zrejmé, že prežitie enterokokov v dvanástniku je vysoko pravdepodobné, čo podporuje aj skutočnosť, že sa testoval vplyv vyššej koncentrácie žlče aká je v dvanástniku.

Vzhľadom k tomu, že je pravdepodobné že, rezistentné enterokoky na antibiotiká môžu prežiť prostredie žalúdka ako aj dvanástnika a dostať sa do tráviaceho traktu, je dôležité sledovať ich počet hlavne vo výrobkoch, ktoré sú určené na priamu konzumáciu, a pri ich výrobe bezpodmienečne dodržiavať stanovený teplotný režim. Z našich výsledkov vyplynulo, že teplota a doba jej pôsobenia môžu inhibovať enterokoky s antibiotickou rezistenciou, čím by sa predišlo k ich preniknutiu do zažívacieho traktu ľudí a tým prenosu génu rezistentného na antibiotiká na iné mikroorganizmy.

4 POUŽITÁ LITERATÚRA

1. AARESTRUP F. M. 2000. Characterization of glycopeptide-resistant *Enterococcus faecium* (GRE) from broilers and pigs in Denmark: genetic evidence that persistence of GRE in pig herds is associated with coselection by resistance to macrolides. In *J. Clin. Microbiol.*, roč. 38, 2000, s. 2774-2777.
2. BETINA, V. – BARÁTHOVÁ, H. – FARGAŠOVÁ, A. 1987. *Mikrobiologické laboratorné metódy*. Martin : Tlačiarne SNP, 1987, 544 s.
3. BORGES K. – SORUM M. – WASTESON Y. et al. 2001. VanA-type vancomycin-resistant enterococci (VRE) remain prevalent in poultry carcasses 3 years after avoparcin was banned. In *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 28, 2001, s. 89-94.
4. COHEN, J. 1988. *Statistical power analysis for the behavioral sciences* (2nd ed.). Hillsdale, NJ : Lawrence Erlbaum Associates. 1998, 567 s. ISBN: 0805802835
5. DOMING, J. D. – MAYER, H. K. – KNEIFEL, W. 2003. Methods used for the isolation, enumeration, characterisation and identification of *Enterococcus* sp. Media for isolation and enumeration. In *Int. J. Food Microbiol.*, roč. 88, 2003, s. 147-164.
6. GARRIDO, M. D. – PEDAUYK, J. – BACON, S. et al. 1995. On-line methods for pork quality detection. In *Food Control*, roč. 6, 1995, s. 111-113.
7. GOODSON, K. J. – MORGAN, W. W. – REAGAN, J. O. et al. 2002. Beef customer satisfaction: Factors affecting consumer evaluation of clod steaks. In *J. Anim. Science*, roč. 80, 2002, s. 401-408.
8. HONIKEL, K. O. 1998. Reference methods for the assessment of physical characteristics of meat. In *Meat Science*, roč. 49, 1998, s. 447-457.
9. HUNT, M. C. – MANCINI, R. A. 2002. Guidelines for measuring pork color. In *3rd Annual Pork Quality Improvement Symposium*, Michigan State University, 2002, s. 17.
10. NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards: 1999 Performance standards for antimicrobial disc and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. Approved Standard M31 – A. NCCLS. s. 86.
11. PRUSA, K. J. – HUGHES, K. V. 1986. Cholesterol and Selected Attributes of Pork Tenderloin Steaks Heated by Conventional, Convection, and Microwave Ovens to Two Internal Endpoint Temperatures. In *J. Food Science*, roč. 51, 1986, s. 1139-1140.
12. ŠUSTÁČKOVÁ, A. – NÁPRAVNÍKOVÁ, E. – SCHLEGELOVÁ, J. 2004. Antimicrobial resistance of *Enterococcus* spp. isolates from raw beef and meat products. In *Folia Microbiol.*, roč. 49, 2004, s. 411-417.
13. WEISS, A. – DOMIG, K. J. – KNEIFEL, W. 2005. Selective Media for Enumeration of Probiotic Enterococci. In *Food Technol. Biotechnol.*, roč. 43, 2005, s. 147-155.
14. STN ISO 4833 : 2004. Všeobecné pokyny na stanovenie celkového počtu mikroorganizmov. Metóda počítania kolónií vykultivovaných pri 30 °C. ÚNM : Bratislava, 2004, 16 s.
15. STN 560100 : 1970. Mikrobiologické skoušení potravín, předmětů běžného užívání a prostředí potravinářských provozoven. ÚNM : Praha 1970, 239 s.

16. Zbierka zákonov č. 239/2002, príloha č. 2 k nariadeniu vlády č. 281/2003 Z.z. o klasifikácii jatočných ošípaných, čiastka 104, s. 2362-2369.

5 PUBLIKOVANÉ PRÁCE SÚVISIACE S PROBLEMATIKOU

Vedecké práce v zahraničných karentovaných časopisoch

DUCKOVÁ, V. – ČANIGOVÁ, M. – **KROČKO, M.** – HEGEDŮSOVÁ, A. 2007. A marhahús minőségek mikrobiológiai mutatói az érlelés előtt és után. [Microbiological quality of beef before and after ripening]. In *Magyar Állatorvosok Lapja*, roč, 129, 2007, s. 376-380.

Vedecké práce v domácich karentovaných časopisoch

KROČKO, M. – ČANIGOVÁ, M. – DUCKOVÁ, V. 2007. Occurrence, isolation and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from raw pork, beef and poultry. In *J. Food and Nutrition Research*, roč. 46, 2007, s. 91-95.

Vedecké práce v domácich recenzovaných vedeckých zborníkoch, monografiách

LAGIN, L. – BOBKO, M. – **KROČKO, M.** 2006. Jatočná hodnota a kvalita mäsa súčasných úžitkových typov ošípaných vo vzťahu ku kvalite mäsových výrobkov. In KOVÁČIK, J. *Biologické aspekty zvyšovania kvality surovín a potravín živočíšneho pôvodu*. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-738-8, s. 131-138.

LAGIN, L. – **KROČKO, M.** – BOBKO, M. 2006. Vplyv podávania bielkovinového krmneho komponentu - mycélia na kvalitu mäsa a dusenej šunky. In KOVÁČIK, J. *Biologické aspekty zvyšovania kvality surovín a potravín živočíšneho pôvodu*. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-738-8, s. 139-143.

Publikované príspevky na zahraničných vedeckých konferenciách

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2006. Zmeny senzoričných vlastností hydinového mäsa po nahradení antibiotík rasstlinnými silicami. In *Drúbež a mléko ve výživě člověka : konference s mezinárodní účastí, 24.5.2006 Praha*. 1. vyd. Praha : Česká zemědělská univerzita, 2006. ISBN 80-213-1548-2, s. 88-91.

Publikované príspevky na domácich vedeckých konferenciách

KROČKO, M. – ČANIGOVÁ, M. 2005. Enterokoky - je ich výskyt v potravinách rizikový?. In *Rizikové faktory potravinového reťazca V : proceeding book, October 6-th, 2005, Nitra*. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005, s. 172-175.

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2005. Vplyv nahradenia antibiotík biostrongom na senzoričné vlastnosti hydinového mäsa. In *Rizikové faktory potravinového reťazca V : proceeding book, October 6-th, 2005, Nitra*. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005, s. 28-31.

LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2006. Kvalita mäsa a mäsových výrobkov a možnosti jej kontroly v kontexte s aktuálnymi ustanoveniami Potravinového kódexu. In *Bezpečnosť a kontrola potravín : zborník*

prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra, 5.-6. apríl 2006. 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-682-9, s. 349-353.

DUCKOVÁ, V. – ČANIGOVÁ, M. – **KROČKO, M.** 2006. Enterokoky izolované z bryndze a ich rezistencia na antibiotiká. In *Rizikové faktory potravinového reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie, Nitra 12.10.2006.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 68-73.

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2006. Krmiva s fytoncidmi vo vzťahu ku kvalite mäsa kurčiat. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín : zborník vedeckých prác z II. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, Nitra, 9. november 2006.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 33-37.

KROČKO, M. – ČANIGOVÁ, M. – DUCKOVÁ, V. Enterokoky izolované z bravčového mäsa a ich rezistencia na antibiotiká. In *Rizikové faktory potravinového reťazca : zborník z medzinárodnej konferencie, Nitra 12.10.2006.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 198-203.

DUCKOVÁ, V. – ČANIGOVÁ, M. – **KROČKO, M.** 2006. Porovnanie mikrobiologickej kvality ovčieho mlieka získaného strojovým a ručným dojením. In *Bezpečnosť a kvalita surovín a potravín : zborník vedeckých prác z II. vedeckej konferencie s medzinárodnou účasťou, Nitra, 9. november 2006.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006. ISBN 80-8069-767-1, s. 83-89.

ČANIGOVÁ, M. – **KROČKO, M.** – DUCKOVÁ, V. – LAGIN, L. 2006. Zmeny počtov psychrotrofnej mikroflóry v procese zrenia mäsa. In *Aktuálne problémy riešené v agrokomplexe : zborník z XI. medzinárodného vedeckého seminára, Nitra 10. november 2006.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2006, s. 286-289.

ČANIGOVÁ, M. – DUCKOVÁ, V. – **KROČKO, M.** 2007. Vplyv spôsobu dojenia na mikrobiologickú kvalitu ovčieho mlieka. In *Hygiena alimentorum XXVIII : bezpečnosť a kvalita mlieka a mliečnych výrobkov.* Košice : Univerzita veterinárskeho lekárstva, 2007. ISBN 978-80-8077-055-6, s. 235-237.

KROČKO, M. – ČANIGOVÁ, M. – DUCKOVÁ, V. 2007. Porovnanie selektívnych kultivačných médií pre stanovenie počtu enterokokov. In *Laboralim 2007 : zborník prednáškových a posterových príspevkov zo XVI. medzinárodnej konferencie o analytických metódach v potravinárstve, v súlade s harmonizáciou legislatívy EÚ v dňoch 7.-8. februára 2007 v Banskej Bystrici.* Bratislava : Slovenská technická univerzita, 2007. ISBN 80-227-2222-7, s. 295-299.

KROČKO, M. – LAGIN, L. – ČANIGOVÁ, M. – DUCKOVÁ, V. 2007. Mikrobiologická kvalita bravčového mäsa vo vzťahu k zreciemu procesu. In *Bezpečnosť a kontrola potravín : zborník prác z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra, 28. - 29. marec 2007.* Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007, s. 342-346.

Abstrakty príspevkov zo zahraničných konferencií

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** – KUSÁ, S. 2005. Porovnanie výsledkov kvalifikovaného odhadu podielu svaloviny pri využití štandardných a inovovaných regresných rovníc. In *Sborník souhrnné sdělení XXXII. semináře o jakosti potravin a potravinových surovin : Brno 3. března 2005.* Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 80-7157-839-8, s. 11-12.

LAGIN, L. – DUCKOVÁ, V. – BOBKO, M. – **KROČKO, M.** – KUSÁ, S. 2005. Súčasná kvalita bravčového mäsa ako základnej suroviny na výrobu šunky pri minimalizácii technologických aditív. In

Sborník souhrnů sdělení XXXII. semináře o jakosti potravin a potravinových surovin : Brno 3. března 2005. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2005. ISBN 80-7157-839-8, s. 12.

KROČKO, M. – LAGIN, L. – BOBKO, M. 2006. Vplyv podávania bielkovinového krmneho komponentu - mycélia na fyzikálno-chemické vlastnosti mäsa. In *Sborník souhrnů sdělení XXXIII. semináře o jakosti potravin a potravinových surovin : Brno 8. března 2006.* 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. ISBN 80-7157-930-0, s. 26.

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2006. Vplyv nahradenia antibiotík za škoricovú silicu na senzoričné vlastnosti hydínového mäsa. In *Sborník souhrnů sdělení XXXIII. semináře o jakosti potravin a potravinových surovin : Brno 8. března 2006.* 1. vyd. Brno : Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, 2006. ISBN 80-7157-930-0, s. 31.

Abstrakty príspevkov z domácich konferencií

KROČKO, M. 2005. Sledovanie závislosti CPM a enterokokov v mäse. In *III. vedecká konferencia študentov a doktorandov : zborník abstraktov, Nitra, 14. apríl 2005.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005. ISBN 80-8069-506-7, s. 93.

KROČKO, M. 2007. Antibiotická rezistencia enterokokov izolovaných z bravčového a kuracieho mäsa. In *V. vedecká konferencia študentov a doktorandov s medzinárodnou účasťou na FBP : zborník abstraktov, Nitra, 26. apríl 2007.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2007. ISBN 978-80-8069-874-4, s. 85.

Postery z domácich konferencií

BOBKO, M. – LAGIN, L. – **KROČKO, M.** 2005. Vplyv nahradenia antibiotík rastlinnými silicami vo výžive brojlerových kurčiat na senzoričné vlastnosti hydínového mäsa. In *1. medzinárodné vedecké hydínárske dni : zborník z medzinárodnej vedeckej konferencie, Nitra 12.-14.september 2005.* 1. vyd. Nitra : Slovenská poľnohospodárska univerzita, 2005.

Odborné práce v zahraničných nekarentovaných časopisoch

LAGIN, L. – BOBKO, M. – **KROČKO, M.** 2006. Vplyv netradičného krmneho komponentu na kvalitu mäsa a šunky. In *Maso.* Praha : České a slovenské odborné nakladateľství s.r.o., 2006, roč. 17, č. 5, s. 10-12.