

je v ČR pozice producentů ve srovnání se zpracovateli mléka obtížnější, což dokazuje i výrazný nepoměr mezi nákupními cenami mléka a cenami průmyslových výrobců (za mléko a mléčné produkty). Podle *Marshalla (2015)* jsou ve Velké Británii mezi producenty rovněž obavy z poklesu cen mléka, nicméně tyto jsou vyvráceny ze strany Evropské Komise tvrzením, že takové obchodní velmoci jako je Čína a další jsou doslova "hladové" po evropské farmářské produkci a tudíž pokles cen by neměl být zaznamenán.

Změny agrární politiky po skončení systému mléčných kvót předpokládá 44 % dotazovaných producentů. Naproti tomu 17 % dotazovaných tyto změny neočekává. Nedostatečnou politickou podporu agrárního sektoru považuje za závažnou nevýhodu podnikání v oblasti výroby mléka 71 % producentů, problémy se zajištěním odbytu po ukončení režimu mléčných kvót očekává 57 % producentů. Podle 43 % respondentů není podpora vývozu a domácí spotřeby potravin dostatečná a 48 % se domnívá, že nevýhodou je rovněž nedostatečné prosazování a ochrana práv českých zemědělců v orgánech EU.

## Závěr

Z dotazníkového šetření vyplynulo, že značná část dotazovaných producentů mléka se obává, že s ukončením systému mléčných kvót dojde k přílivu zahraničních mlékárenských výrobků, k poklesu nákupní ceny mléka a k výraznějšímu kolísání tržních cen. Naproti tomu výhodu spatřují producenti v možnosti navýšení produkce mléka, ve zrušení umělé regulace trhu s mlékem a v možnosti přirozeného působení tržních podmínek.

Zda zrušení mléčných kvót přinese očekávané klady nebo více obávaných nevýhod lze zatím pouze odhadovat. Můžeme se však domnívat, že nově vzniklou situaci se otevírají možnosti, kterých budou moci využít nejen jednotliví producenti mléka, ale rovněž celá Česká republika k obchodování a k propagaci našeho mlékárenského průmyslu.

## Poděkování

Příspěvek byl zpracován s podporou projektů výzkumného záměru MSM 6007665806, OP VK CZ.1.07/2.3.00/09.0081 a OP VK CZ.1.07/2.4.00/17.0026.

Poděkování patří rovněž Ing. Jindřichu Kvapilíkovi, DrSc. (Výzkumný ústav živočišné výroby, v.v.i. Praha Uhřetěves) za cenné rady při přípravě dotazníku.

## Seznam literatury

- ARTHUR, R. (2014): Milk market observatory will aid shift to post-quota Europe. [online] © 2014. [cit. 2015-5-20]. Dostupné na: <http://www.dairyreporter.com/Markets/Milk-Market-Observatory-will-aid-shift-to-post-quota-Europe>.
- ASTLEY, M. (2014): Milk quota abolition will create North European production belt. [online] © 2014. [cit. 2015-5-20]. Dostupné na: <http://www.dairyreporter.com/Markets/Milk-quota-abolition-will-create-North-European-production-belt>.
- ASTLEY, M. (2015): EU milk quota abolition the closing of a chapter in the history of dairy. EC. [online] © 2015. [cit. 2015-5-22]. Dostupné na: <http://www.dairyreporter.com/Regulation-Safety/EU-milk-quota-abolition-the-closing-of-a-chapter-in-the-history-of-dairy-EC>.

- HEALY, A. (2015): Dairy farmers celebrate as milk quotas abolished after 31 years. The Irish Times. [online] © 2015. [cit. 2015-5-21]. Dostupné na: <http://www.irishtimes.com/news/ireland/irish-news/dairy-farmers-celebrate-as-milk-quotas-abolished-after-31-years-1.2160563>.
- MARSHALL, C. (2015): Milk: End of EU quota heightens UK farmers fears. [online] © 2015. [cit. 2015-5-22]. Dostupné na: <http://www.bbc.com/news/uk-32136218>.
- NOVÁKOVÁ, V. (2015): Informativní newsletter SZIF - Aktuálně v SZIF, duben 2015. Státní zemědělský intervenční fond. [online] © 2013. [cit. 2015-5-20]. Dostupné na: <http://www.szif.cz/cs/zpravodaj-szif>
- KOPÁČEK, J. (2011): Světový mlékárenský summit IDF 2011. *Mlékařské listy*, 129, III-X.
- KOPÁČEK, J. (2013) (oponentský posudek): Švecová, R.: *Dopady ukončení režimu mléčných kvót pro producenty mléka*. [Diplomová práce]. České Budějovice: JU ZF. 85 s.
- KOPÁČEK, J. (2014): Situace v českém mlékárenství před ukončením mléčných kvót. Českomoravský svaz mlékárenský. [online] © 2014. [cit. 2015-5-20]. Dostupné na: <https://www.mastitis.cz>
- KOPÁČEK, J. (2015): osobní sdělení
- KVAPILÍK, J. (2004): Produkce mléka v rámci reformy společné zemědělské politiky unie. *Zemědělec*, 38, 32-33.
- KVAPILÍK, J., SYRŮČEK J. (2014): Syrové kravské mléko a mléčné výrobky. *Mlékařské listy*, 143, VII-XII.
- SAMKOVÁ, E., ŠVECOVÁ, R., HANUŠ, O. (2011): Vybrané ukazatele trhu s mlékem v oblasti jihozápadních Čech. *Mlékařské listy*, 127: X-XIV.
- ŠVECOVÁ, R.: *Dopady ukončení režimu mléčných kvót pro producenty mléka*. [Diplomová práce]. České Budějovice: JU ZF. 85 s.

## Kontaktní adresa:

doc. Ing. Eva Samková, Ph.D., Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta, Studentská 13, 370 05 České Budějovice, Česká republika, e-mail: [samkova@zf.jcu.cz](mailto:samkova@zf.jcu.cz)

*Přijato do tisku: 13. 5. 2015*

*Lektorováno: 1. 6. 2015*

## IDENTIFIKACE TECHNOLOGICKY RIZIKOVÝCH BAKTERIÍ RODU ACINETOBACTER

**Eva Šviráková<sup>1</sup>, Andrea Múhlhansová<sup>2</sup>, Irena Němečková<sup>2</sup>, Petra Junková<sup>3</sup>, Sabina Purkrtová<sup>3</sup>, Markéta Jelínková<sup>4</sup>, Jürgen Felsberg<sup>4</sup>**

<sup>1</sup> Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>2</sup> Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

<sup>3</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

<sup>4</sup> Středisko sekvenování DNA, Mikrobiologický ústav, Akademie věd České republiky, Praha

## Identification of technologically risky bacteria of the *Acinetobacter* genus

## Abstrakt

Bakterie rodu *Acinetobacter* patří do skupiny gramnegativních, nesporulujících, nefermentujících, striktně aerob-

ních bakterií. Představují důležité půdní a vodní bakterie s širokým výskytem v přírodě, potravinářských surovinách, potravinách a lidských zdrojích. Acinetobakterie představují zdravotní riziko u imunokompromitovaných jedinců, nejčastěji ve formě nozokomiálních infekcí. V mlékárenském průmyslu jsou technologicky rizikové a způsobují zde vážné problémy ve spojitosti s mnoha senzoryckými a texturními vadami výrobků, například s bombážováním mlék UHT. Mohou být identifikovány relativně rychle a s vysokou spolehlivostí na úroveň rodu a druhu s využitím různých metod. V této práci byly acinetobakterie izolovány ze syrového mléka, z mlékárenských výrobků a výrobního zařízení a pomůcek. Identifikace acinetobakterií na úrovni druhu byla provedena pomocí metody sekvenace úseku 16S rRNA a metody MALDI-TOF MS. Pomocí obou identifikačních metod bylo zjištěno, že izoláty patřily k šesti různým druhům *Acinetobacter* spp. (*baumanii*, *calcoaceticus*, *guillouiae*, *johnsonii*, *lwoffii* a *pitii*). Výsledky této práce mohou být užitečné pro zajištění kvality nejenom mléka a mlékárenských výrobků, ale obecně pro zajištění hygienické úrovně výrobků v ostatních potravinářských oblastech, s využitím jednoznačné identifikace zdravotně a technologicky rizikových mikroorganismů.

**Klíčová slova:** *Acinetobacter* spp., zdravotní riziko, technologické riziko, syrové mléko, sýry, identifikace, sekvenace 16S rRNA, MALDI-TOF MS

## Abstract

Bacteria of *Acinetobacter* genus belong to the Gram-negative, non-spore-forming, non-fermentative, strictly aerobic, bacteria. There are important soil and water bacteria with wide occurrence in nature, raw food materials, foods and human sources. Acinetobacteria represent health risky bacteria causing in immunocompromised individuals mostly nosocomial infections. There are technologically risky and in dairy industry causing serious problems in connection to many sensory and texture defects, for example bulging and thickening of UHT milk. They can be detected relatively quickly with high reliability at the genus and species levels using different methods. In this work acinetobacteria were isolated from raw milk, dairy products and processing equipment and aids. Identification of acinetobacteria at the species level was done by means of the sequencing method of the 16S rRNA genes and the MALDI-TOF MS method. Based on the both identification methods it has been consistently found that the isolates belonged to the six different *Acinetobacter* species (*baumanii*, *calcoaceticus*, *guillouiae*, *johnsonii*, *lwoffii* and *pitii*). The results of this work may be useful for quality assurance not only milk and dairy products, but in general for ensuring the level of hygiene of the other food productions, using a proper identification of health and technologically risky microorganisms.

**Key words:** *Acinetobacter* spp., health risk, technological risk, raw milk, cheeses, identification, sequencing of 16S rRNA, MALDI-TOF MS

## Úvod

V potravinářském průmyslu se mezi technologicky rizikové bakterie řadí i bakterie rodu *Acinetobacter*, které se podílejí na vzniku senzoryckými a texturně nestandardních výrobků, mezi které se často řadí i výrobky mlékárenské (např. syrové mléko, mléko UHT a různé druhy sýrů).

Acinetobakterie jsou klasifikovány jako (nízkostupňové) primární patogeny a řadí se mezi oportunistické patogeny. V nemocničním prostředí, kde se často objevuje jejich rezistence vůči antibiotikům, jsou často rozšířené. Zejména druhy *A. baumannii*, *A. nosocomialis* a *A. pitii* představují zdravotní riziko u imunokompromitovaných jedinců, u kterých způsobují nozokomiální infekce (např. pneumonii, infekci urologického traktu a měkkých tkání, nemoci krve) (Nemec, 2004; Votava, 2005). Infekce, způsobené acinetobakteriemi mimo nemocniční prostředí jsou ojedinělé a týkají se především osob s rizikovými faktory (např. alkoholismus, kouření, chronické záněty dýchacích cest) u nichž úmrtnost dosahuje až 64 % (Nemec, 2004). Pro usnadnění přežití v hostiteli využívají acinetobakterie schopnosti zapouzdření. Mají vysoký sklon k získávání virulence od jiných patogenních bakterií. K virulentním faktorům patří mj. schopnost tvořit biofilm, který přispívá k adhezi bakterií na povrch, pronikání k hostitelským buňkám a získávání železa z hostitelského prostředí (Percival a kol., 2014).

Acinetobakterie se přirozeně nacházejí v půdě, ve vodě, na rostlinách, na živočišných hostitelích. Představují ubikvitní, saprofytické bakterie, které jsou často izolovány z půdy, ze sladkovodní i mořské vody, z ústí řek či kanalizací. Nacházejí se téměř u všech druhů ovoce, zeleniny a obilovin, a také v surovinách živočišného původu (např. v mléce, mase, masných výrobcích) (Hamouda a kol., 2011). Mohou způsobovat kontaminaci vody a potravin (Percival a kol., 2014), a také nevhodně skladovaných potravinářských obalů; zdrojem jejich kontaminace je také nedostatečně sanitované výrobní zařízení (Hamouda a kol., 2011).

Acinetobakterie byly v rámci kontaminace potravin často izolovány z mléka a různých mlékárenských výrobků, a to v celosvětovém měřítku. V Evropě byly např. zjištěny ve výrobcích typu sýru brynza druhy *A. calcoaceticus*, *A. guillouiae* a *A. johnsonii* (Pangallo a kol., 2014). V Asii (Korea) bylo ze syrového mléka skladovaného ve velkoobjemových tancích izolováno 176 izolátů acinetobakterií, z nichž 56 náleželo k druhu *A. baumannii*. Výskyt tohoto druhu byl kmenově různorodý, což znamenalo, že nebyl důsledkem šíření jednoho kmene. Studie prokázala, že je důležité vyšetřovat potravinářské suroviny a výrobky nejen na obsah patogenů způsobujících alimentární onemocnění, ale také na obsah bakterií *Acinetobacter* spp., jejichž přítomnost může mít negativní vliv na lidské zdraví (Tamang a kol., 2014). U mléka UHT byly v souvislosti s jeho kontaminací acinetobakteriemi často zmiňovány texturní a senzorycké vady, projevující se nafukováním obalů a bombážováním výrobků. Výjimku netvořily ani např.

sýry bílé zrající v solných nálevech, u kterých se kontaminace projevila specifickým zápachem.

Dle současné klasifikace je heterogenní skupina acinetobakterií řazena do následující taxonomické skruktury: doména *Bacteria*, oddělení *Proteobacteria*, třída *Gamma-proteobacteria*, řád *Pseudomonadales*, čeleď *Moraxellaceae*, rod *Acinetobacter* (DNA G+C obsah 39-47 %) a druhy (sdružující druhy klinického významu: *A. baumannii*, *A. haemolyticus* a *A. calcoaceticus*) (Doughari a kol., 2011). Rod *Acinetobacter* obsahuje v současné době 32 známých druhů, s 22 účelově platnými jmény a zbytkem účelových čísel, odkazující se na tzv. "genomické skupiny" (Gerischer 2008). V přírodě, potravinách a lidských zdrojích patří k nejčastěji se vyskytujícím následující druhy: *A. baumannii*, *A. baylyi*, *A. beijerinckii*, *A. bereziniae*, *A. bohemicus*, *A. bouvetii*, *A. calcoaceticus*, *A. gernerii*, *A. grimontii*, *A. guillouiae*, *A. gyllenbergii*, *A. haemolyticus*, *A. johnsonii*, *A. junii*, *A. lwoffii*, *A. pittii*, *A. schindleri*, *A. radioresistens*, *A. tandoii*, *A. tjernbergiae*, *A. parvus*, *A. ursingii*, *A. townneri*, *A. venetianus* (Liu, 2011).

První kmen *Acinetobacter* spp. byl izolován z půdy a byl identifikován jako *Micrococcus calcoaceticus* Beijerinckem v roce 1911 (Barbe a kol., 2004). Skupina acinetobakterií byla po dlouhou dobu nedostatečně identifikována a chybně řazena do mnoha různých rodů (např. *Achromobacter*, *Alcaligenes*, *Cytophaga*, *Diplococcus*, *Bacterium*, *Herellea*, *Lingelsheimia*, *Mima*, *Micrococcus*, *Moraxella*, *Neisseria*) (Rossau a kol., 1991; Barbe a kol., 2004). Rod *Acinetobacter* (pocházející z řeckého slova "akinetos", což znamená "nepohyblivý") byl poprvé vytvořen v roce 1954 díky vědcům Brisou a Prevot a sdružoval gramnegativní, nepohyblivé, saprofytické, nepigmentující, oxidasa-pozitivní i oxidasa-negativní bakterie. Baumann a kol. (1968) na základě odlišných nutričních vlastností tyto bakterie blíže charakterizoval jako mikroorganismy pouze oxidasa-negativní a zařadil je do rodu *Acinetobacter*, což bylo akceptováno v roce 1971 (Lessel 1971; Doughari a kol., 2011).

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nepohyblivé, nefermentující, enkapsulované kokobacilové tyčinky se striktně aerobním metabolismem; katalasa-pozitivní, indol-negativní a oxidasa-negativní (Doughari a kol., 2011). Mnoho kmenů není schopno redukovat dusičnany na dusitany (Bergogne-Bérézin, 2009). V exponenciální fázi růstu jsou tyčinky široké 0,9-1,0 µm a dlouhé 1,5-2,5 µm. Optimální teplota růstu acinetobakterií se pohybuje okolo 33-35 °C; některé druhy však vykazují psychrotrofní nebo termofilní vlastnosti (Doughari a kol., 2011). Některé kmeny dokáží přežít až teplotu 53 °C (Yavankar a kol., 2007). Klinické izoláty rostou v rozmezí 28-44 °C, nejlépe však při teplotách 37-42 °C. Ostatní izoláty z přírodního prostředí, včetně potravin, rostou nejlépe v teplotním rozmezí 20-30 °C. Acinetobakterie jsou chemoheterotrofní bakterie (Doughari a kol., 2011).

Ve specializovaných laboratořích lze pro rychlou a citlivou detekci a spolehlivou identifikaci acinetobakterií

pocházejících z různých zdrojů použít jak metody molekulárně-biologické, tak instrumentální či biochemické. U genotypových metod je obecně identifikace bakterií založená na základě odlišností v sekvenci DNA, u fenotypových metod pak např. na analýze enzymů, jejich metabolických produktů a dalších exprimovaných proteinů (Kämpfer a Glaeser, 2012).

Z vhodných genotypových molekulárně-biologických metod lze uvažovat použití metod AFLP, ARDRA, hybridizace DNA, LAMP, ribotypizace, metody PCR v různých modifikacích, sekvenace genového úseku 16S rRNA a jiných (Liu, 2011), přestože jsou poměrně složité a vyžadují nákladné přístrojové vybavení (Soo a kol., 2013). Další z možností detekce a identifikace acinetobakterií představují fenotypové instrumentální metody, ke kterým se řadí např. metody MALDI-TOF MS (Wieser a kol., 2012) a DART MS, navzdory svým omezením v podobě nižší citlivosti. Z biochemických testů je možné uvést použití systému API 20 NE (bioMérieux) a dalších komerčních systémů, jako jsou například Vitek2, Phoenix nebo MicroScan WalkAway. Nicméně, tyto metody neumožňují jednoznačnou identifikaci druhů *Acinetobacter* spp., zejména druhů *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* a acinetobakterií komplexu ACB (tzn. komplexu zahrnujícího *A. baumannii*, *A. calcoaceticus* a genomický druh *Acinetobacter* 13TU) (Liu, 2011).

Cílem této práce byla druhová identifikace technologicky rizikových acinetobakterií, izolovaných z mlékárenských výrobních závodů a způsobujících senzorké a texturní vady výrobků, s využitím sekvenační metody genového úseku 16S rRNA a metody MALDI-TOF MS.

## Materiál a metody

### *Izolace bakterií z mlékárenských výrobků*

Testované bakterie byly izolovány ze syrového mléka, z různých mlékárenských výrobků (např. mléka UHT, sýrů a solných nálevů), dále z výrobního zařízení (např. sýrařských výrobních linek) a pomůcek (např. ze sýrařských tkaninových plachetek). Pro primární záchyt a kultivaci izolátů byla použita plotnová metoda s využitím růstu bakterií na různých agarových růstových médiích (izolace byly provedeny na pracovišti VÚM s.r.o.). Pro následnou rodovou a druhovou identifikaci byl pro růst bakterií použit Columbia agar s 5 % (obj.) beraní krve (Bio-Rad, USA).

### *Kultivace a biochemická identifikace bakteriálních izolátů*

Bakteriální izoláty byly inokulovány frakcionovaným roztěrem na povrch Columbia agaru s 5 % (obj.) beraní krve, kultivovány při teplotě 37 °C (klinický sbírkový izolát) nebo při teplotách 30 °C a 25 °C (izoláty z průmyslu), po dobu 24 h, za aerobních podmínek. Izoláty byly následně podrobeny makroskopickému vyhodnocení morfologie kolonií narostlých na površích Petriho misek, Gramovu barvení, mikroskopickému pozorování morfolo-

gie buněk s využitím optického mikroskopu DFC 320 (Leica, SRN), a také identifikaci pomocí biochemického testu API 20 NE (bioMérieux, FR). Izoláty dobře rostly také v tekutém syntetickém růstovém Trypton-sojovém bujónu (tj. v bujónu z kaseinového a sojového peptonu určeného pro mikrobiologii) (Merck KGaA, SRN), při teplotě 37 °C nebo 30 °C nebo 25 °C dle charakteru izolátů (viz výše), po dobu 18 h, za aerobních podmínek.

### Identifikace acinetobakterií pomocí metody sekvenace

#### a) Izolace chromozomální DNA z acinetobakterií

Izolace DNA z testovaných acinetobakterií probíhala pomocí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN). Čerstvě narostlé kmeny byly odstředěny (4550 g, 10 min, 4 °C) a jejich buňky byly promyty ve sterilní vodě (1 ml). K buňkám byl nejdříve přidán lytický pufr (180 µl) (inkubace při teplotě 37 °C po dobu 45 min), poté proteinasa K (25 µl) (42 U·mg<sup>-1</sup>) a pufr AL (200 µl) (inkubace při 56 °C po dobu 30 min). Ke vzniklému lyzátu byl přidán 98 % ethanol (200 µl) (-20 °C) a zkumavky byly promíchány obrácením až do dosažení homogenity. Inkubace probíhala při teplotě 25 °C po dobu 5 min. Veškeré obsahy zkumavek byly přeneseny do kolonek izolační soupravy (Dneasy Mini spin), kde byla DNA pročištěna a promyta pomocí dvou různých pufrů. Posledním krokem byla eluce DNA. Na střed membrány v kolonkách byl pipetován eluční pufr AE (50 µl), inkubace probíhala při teplotě 25 °C po dobu 2 min. Pro zvýšení výtěžku byl zopakován eluční krok (Qiagen, SRN).

#### b) Příprava produktu PCR pro sekvenaci acinetobakterií

Pro sekvenaci testovaných acinetobakterových izolátů bylo třeba získat nejdříve produkt polymerázové řetězové reakce, PCR produkt. Byla proto použita metoda PCR s primery W001 (AGATTTGATCMTGGCTC) a W002 (GNTACCTTGTTACGACTT). Složení mixu pro PCR je uvedeno v Tab. I. Průběh PCR byl následující: iniciační denaturace (při teplotě 95 °C po dobu 5 min), následovalo 40 reakčních cyklů: denaturace (při teplotě 95 °C po dobu 60 s), připojení primerů (při teplotě 50 °C po dobu 60 s) a prodloužení (elongace) řetězce (při teplotě 72 °C po dobu 90 s). Poslední cyklus proběhl při teplotě 72 °C během 10 min.

Po uskutečněné PCR byla přítomnost produktů PCR zjišťována pomocí horizontální gelové elektroforézy. Gel pro elektroforézu byl připraven z agarosy (1,0 % hm.) a pufru TBE s přísadkou barviva Sybr Safe (10 µl) (Invitrogen, USA). Byl smíchán amplifikát (5 µl) s pufrem Gel Loading Buffer (2 µl) (Invitrogen, USA) a směs pipetována do příslušných otvorů v gelu. Do prvního a posledního otvoru v gelu byl pipetován marker (3 µl) (Invitrogen, USA) a 1 kb DNA Ladder (3 µl) (Invitrogen, USA). Migrace probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 60 min.

Tab. I Složení mixu PCR pro sekvenaci acinetobakterových izolátů

Složení mixu PCR	Výrobce	Reakční objem (µl)
Sterilní voda	-	31
5x FIREPol Master Mix (12,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	Solis BioDyne, Estonsko	10
Primer W001 (10 µM)	Generi Bitech, ČR	2
Primer W002 (10 µM)	Generi Bitech, ČR	2
Izolovaná DNA	QIAGEN, SRN	5
Celkový objem	-	50

#### c) Přečištění produktu PCR před sekvenací acinetobakterií

Přečištění produktů PCR probíhala pomocí komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, SRN). Nejdříve byly produkty PCR smíchány s pufrem PB (v poměru 1:5). Poté byly připravené vzorky umístěny do kolonek a odstředěny (17 900 g, 60 s, 4 °C). Navázané vzorky na kolonkách byly promyty ve třech krocích, v celkovém objemu pufru PE (750 µl), s uskutečněným krokem odstředění (17 900 g, 60 s, 4 °C). Poté byly promývací roztoky odlity ze sběrných zkumavek a odstředění bylo provedeno opětovně za identických podmínek. K eluci byl použit pufr EB (50 µl), který byl pipetován na střed membrán v kolonkách. Následovalo opět odstředění (17 900 g, 60 s, 4 °C). Pro zvýšení účinnosti byl eluční krok opakován 2x. Ke kontrole přečištění byla použita separace v agarosovém gelu za pomoci pulsní gelové elektroforézy. Přečištěné produkty PCR (o objemu 50 µl) byly připraveny do Ependorfových zkumavek a odvezeny na vlastní sekvenční analýzu do Střediska sekvenování DNA, na Mikrobiologický ústav, na Akademii věd České republiky. Získané sekvence genových úseků 16S rRNA u acinetobakterií byly porovnány s genovými sekvencemi uvedenými v genové bance NCBI, s využitím algoritmu ClustalW.

#### d) Vlastní sekvenace úseku 16S rRNA u acinetobakterií

K identifikaci acinetobakterií byla použita tradiční Sangerova sekvenační metoda (Sanger a kol., 1977), nazývaná také jako "dideoxy" metoda (Rédei, 2008). Metoda byla modifikována dle interních pracovních návodů Střediska sekvenování DNA, Mikrobiologického ústavu, Akademie věd České republiky, pod vedením dr. Felsberga. V jedné sekvenační reakci byla určena sekvence vlákna o délce až 1500 nukleotidů, nejčastěji s průměrem 900-1200 nukleotidů. Vlastní sekvenace probíhala na vysoce výkonném sekvenátoru ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Hitachi; nyní Life Technologies) během celkem 35 cyklů s použitím univerzálních primerů pro genový úsek 16S rRNA u acinetobakterií.

### Identifikace acinetobakterií pomocí metody MALDI-TOF MS

#### a) Příprava vzorků acinetobakterií před analýzou MALDI-TOF MS

K identifikaci acinetobakterií byla použita metoda MALDI-TOF MS a analýzy probíhaly na přístroji Bruker

Autoflex Speeds využitím komerční databáze MALDI Biotyper 3.0, spolu s metodami doporučenými výrobcem v závislosti na stavbě buněčné stěny (Anonymous, 2014). Při metodě přímé aplikace byla mikrobiální kultura z jedné izolované kolonie nanášena přímo na spoty kovové desky ve dvou paralelách o rozdílném množství nanášených buněk. Extrakční metoda využívala extrakci s použitím ethanolu a 70% kyseliny mravenčí. Mikrobiální kultura (cca 10 µl) byla resuspendována ve sterilní destilované vodě (300 µl) (vortexování 5-10 s), smíchána s 98% ethanollem (900 µl) (Lachner, ČR) a 2x odstředěna (15 000 g, 2 min). Supernatant byl pokaždé pečlivě odlit. Po vysušení na vzduchu (10 min) byla peleta buněk vortexováním resuspendována v 70% kyselině mravenčí (50 µl) (Sigma Aldrich, SRN), důkladně promíchána s acetonitrilem (50 µl) (Sigma Aldrich, SRN) a odstředěna (15 000 g, 2 min). Na spoty kovové desky byly ihned nanášeny ve dvou paralelách supernatanty (2 µl). Proteinový standard Bruker Bacterial Test Standard (Bruker Daltonics, SRN) byl nanášen v paralele o objemu 1 µl. Zaschlé vzorky (10 min) čteně proteinového standardu byly překryty maticovým roztokem (1 µl) a ponechány krystalizaci (10 min). Maticový roztok představoval nasycený roztok (10 mg.ml<sup>-1</sup>) α-kyano-4-hydroxy kyseliny skořicové (4-HCCA; Sigma Aldrich, USA) v 50 % acetonitrilu s 2,5 % kyseliny trifluoroctové (vše: Sigma-Aldrich, SRN; složení 1 ml: 250 µl sterilní destilované vody, 500 µl acetonitrilu, 250 µl 10% kyseliny trifluoroctové), který se rozpouštěl za intenzivního třepání (25 °C, 10 min).

### b) Vizualizace proteinových profilů acinetobakterií a spolehlivost metody MALDI-TOF MS

Proteinové profily byly vizualizovány s využitím programu mMass 5 (Strohalm a kol., 2010). Spolehlivost metody MALDI-TOF MS byla vyjádřena v kategoriích spolehlivosti (viz Tab. 2) závislých na hodnotě skóre, to znamená na hodnotě dekadického logaritmu míry shody získaného proteinového profilu a referenčního proteinového profilu, nabývajícího hodnot v rozmezí 0 (žádná shoda) až 3 (maximální shoda). Spolehlivost se odvíjela především od počtu proteinových profilů jednotlivých kmenově specifických druhů, uvedených v používané databázi, a zahrnovala i optimalizaci procesu přípravy vzorku, včetně kultivačních podmínek (Croxatto a kol., 2012).

### Výsledky a diskuse

Testované kmeny acinetobakterií byly součástí velké skupiny mikrobiálních izolátů (celkem 641 kmenů), které byly izolovány, charakterizovány a identifikovány v rámci dvou výzkumných projektů. Acinetobakterie byly získány z různých mlékárenských

výrobních, různého výrobního zařízení a pomůcek používaných v mlékárenském průmyslu. Pro tuto práci, podpořenou projektem QJ1210300, bylo vybráno dvacet pět acinetobakterových izolátů, z nichž pro vlastní identifikaci na úroveň druhu bylo cíleně zvoleno jedenáct kmenů (deset průmyslových izolátů a jeden sbírkový referenční kmen).

Mikrobiální izoláty byly nejdříve podrobeny základní fenotypové charakterizaci pomocí mikrobiologických a biochemických testů. Bylo provedeno morfologické (tj. makroskopické i mikroskopické) pozorování kolonií a buněk, a také biochemické testování za pomoci komerčního testu API 20 NE (bioMérieux, FR). Na základě zjištěných výsledků bylo predikováno, že se jedná o zástupce bakteriálního rodu *Acinetobacter*.

Izoláty byly dále podrobeny stanovení tolerance k různým růstovým teplotám, různým hodnotám pH a různým koncentracím NaCl, také k resistenci k různým antibiotikům. Výsledky těchto stanovení nejsou v této práci záměrně publikovány a budou součástí dalších plánovaných publikačně-presentačních aktivit vztahujících se k řešení problematice acinetobakterií ve vazbě na řešení projekt QJ1210300.

Pro hlavní identifikaci acinetobakterových izolátů byly na základě v minulých letech úspěšně a spolehlivě uskutečněných identifikací jiných zdravotně i technologických rizikových bakteriálních a kvasinkových izolátů vybrány dvě sofistikované identifikační metody. Jednak šlo o molekulárně-biologickou metodu sekvenace genového úseku 16S rRNA, jednak o fenotypovou instrumentální metodu MALDI-TOF MS. Výsledky získané za pomoci obou identifikačních metod jsou prezentovány v Tab. 2.

**Tab. 2** Srovnání identifikace acinetobakterových izolátů pomocí metody sekvenování úseku 16S rRNA a metody MALDI-TOF MS

Označení izolátu "M-KVAL"	Označení izolátu interní	Identifikace pomocí sekvenace 16S rRNA Druh	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS		Výsledná shoda
			Druh	Spolehlivost (skóre)	
CCM 4353	CCM 4353	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	+++	A
N35	(12)	<i>A. calcoaceticus</i>	<i>A. pitii</i>	+++**	N
PM27*	(14)	Komplex: <i>A. baumannii</i> kmen RS021 / <i>A. calcoaceticus</i> / <i>A. pitii</i>	<i>A. pitii</i>	+++**	A
M02	(71)	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	+++	A
O6	(325)	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	+++	A
O9	(328)	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	+++	A
O16	(335)	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	+++	A
O73	(478)	<i>A. baumannii</i>	<i>A. baumannii</i>	+++	A
1TBX1	(844)	<i>A. lwoffii</i>	<i>A. lwoffii</i>	++	A
GTKM35	(907)	<i>A. johnsonii</i>	<i>A. johnsonii</i>	+++	A
66-GTKM6,5-0	(1298)	<i>A. guillouiae</i>	<i>A. guillouiae</i>	+++	A

++ ... spolehlivá rodová a pravděpodobná druhová identifikace, +++ ... spolehlivá rodová a druhová identifikace, A ... ano, N ... ne

\* ... označení izolátu "KONBIO"

\*\* ... člen komplexu *A. baumannii* / *A. calcoaceticus* / *A. pitii*; nutnost provedení metody extrakce vzorku před vlastní analýzou MALDI-TOF MS z důvodu spolehlivé identifikace na úroveň druhu

V případě použití metody sekvenování genového úseku 16S rRNA i metody MALDI-TOF MS pro identifikaci neznámých izolátů acinetobakterií bylo zjištěno, že počtem relativně málo četná skupina testovaných izolátů vykazovala nadměrně bohatý druhový profil s tím, že bylo z této kolekce identifikováno šest různých druhů *Acinetobacter* spp. Mezi izoláty se vyskytovaly druhy *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. guillouiae*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* a *A. pittii*; kmen *A. pittii* PM27 byl metodou sekvenace určen jako součást komplexu acinetobakterií sdružujícího druhu *A. baumannii* kmen RS021/ *A. calcoaceticus* / *A. pittii*.

Při srovnání výsledků identifikace neznámých acinetobakterií, získaných s použitím metody sekvenace úseku 16S rRNA a MALDI-TOF MS, lze konstatovat, že všechny testované kmeny byly identifikovány oběmi metodami jak na úroveň rodu, tak na úroveň druhu. Ke shodě na úroveň rodu došlo u všech jedenácti kmenů (obě metody), ke shodě na úroveň druhu došlo u deseti kmenů z jedenácti identifikovaných kmenů. Rozdílný výsledek byl zjištěn pouze u kmene N35, když byl tento pomocí sekvenace určen jako *A. calcoaceticus* a pomocí MALDI-TOF MS jako *A. pittii*. Vzhledem ke skutečnosti, že je druh *A. pittii* součástí komplexu *A. baumannii* / *A. calcoaceticus* / *A. pittii*, bylo v případě nejenom kmene N35, ale i kmene PM27 nezbytné provést metodu extrakce před vlastními identifikačními analýzami na přístroji MALDI-TOF MS z důvodu zajištění přijatelnosti identifikace na úroveň druhu. V případě metody MALDI-TOF MS bylo již dříve zjištěno, že standardně doporučovaná přímá metoda nanesení vzorků na kovovou desku nemusí být vždy dostatečně vhodná pro některé identifikované druhy. Využití MALDI-TOF MS je v diagnostické praxi stále limitováno relativně vysokou pořizovací cenou přístroje a dostupných komerčních databází. Tato metoda se však postupně stává standardním vybavením nejenom klinických laboratoří.

Z literatury je dále známo, že metoda sekvenace úseku 16S rRNA byla zvolena na základě obecně známé a uznávané identifikační strategie, která říká, že od roku 1980 se taxonomické řazení prokaryotních mikroorganismů řídí především primární strukturou genu kódujícího 16S rRNA (Stackebrandt a kol., 2002; Konstantinidis a Tiedje, 2005). Výhodou sekvenace genového úseku 16S rRNA u acinetobakterií je také skutečnost, že sekvenace tohoto úseku nepřináší problémy, což je zapříčiněno mj. také tím, že je ke dnešnímu dni známo a taxonomicky do rodu *Acinetobacter* zařazeno pouze 32 různých druhů. Jinak je tomu u bakterií, které jsou acinetobakteriím podobné díky svému výskytu, charakteristikám a biochemickým projevům, a to např. u bakterií rodu *Pseudomonas*. Pseudomonád je oproti acinetobakteriím v současnosti známo a taxonomicky zařazeno přibližně 200 různých druhů, což představuje obrovskou druhovou variabilitu. U *Pseudomonas* spp. se tedy metoda sekvenace úseku 16S rRNA nedá použít a je nutné použít např. metodu MLSA (Multilocus Sequence Analysis), což představuje experimentálně, časově i finančně náročnou analýzu.

Řešenou problematiku identifikace acinetobakterií lze

uzavřít sdělením, že výběr použitých testovaných metod, tzn. jak metody sekvenace genového úseku 16S rRNA, tak metody MALDI-TOF MS, doplněné o biochemické testy API 20 NE, byl vhodný, a že tyto metody přinesly zajímavé výsledky, kterých je možné využít v kontrolně-diagnostické praxi při vyšetřování mlékárenských surovin, výrobků a výrobního zařízení, s cílem účinně eliminovat populaci technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*, mající nepřímý negativní dopad i na lidské zdraví.

## Závěry

S pomocí obou použitých identifikačních metod, tzn. genotypové metody sekvenace úseku 16S rRNA a fenotypové metody MALDI-TOF MS, se podařilo identifikovat technologicky rizikové izoláty acinetobakterií, izolované z mlékárenských výrobků a výrobního zařízení až na druhovou úroveň. Mezi identifikovanými izoláty figurovalo šest různých druhů *Acinetobacter* spp.: *A. baumannii*, *A. calcoaceticus*, *A. guillouiae*, *A. johnsonii*, *A. lwoffii* a *A. pittii*.

Výsledky získané s použitím metody sekvenování lze považovat za výsledky jednoznačné, poskytované se 100 % jistotou, které mohou být zveřejněny do 72 h od začátku kultivace kmenů, přes izolaci chromozomální DNA, amplifikaci příslušných genů a přečištění DNA, až po vlastní sekvenování konkrétního úseku genů. Tuto metodu lze hodnotit jako metodu rychlou, vysoce citlivou, využívající k analýze stopová množství DNA, a hlavně bezproblémovou. Výsledky získané s použitím fenotypové metody MALDI-TOF MS také potvrdily vhodnost této metody pro identifikaci acinetobakterií. Výsledky lze považovat za výsledky poskytující spolehlivou rodovou a druhovou identifikaci acinetobakterií. Výhodou této metody je možnost rychlé analýzy relativně velkého počtu vzorků, navzdory vysoké pořizovací ceně přístroje a zpoplatnění referenčních databází.

Zkušenosti získané z této práce mohou být aplikovatelné nejenom v mlékárenské potravinářské výrobní praxi, ale i v jiných oblastech potravinářského průmyslu, při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti a požadované jakosti vyráběných potravinářských výrobků.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi (2012-2016, MZE/QJ), v programu QJ - Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 "KUS" (2012-2018).

## Literatura

- ANONYMOUS (2014): MALDI Biotyper CA System, technické materiály společnosti Bruker Divisions, <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldi-biotyper-ca-system/service-support.html>, staženo 29. 5. 2015.
- BARBE V., VALLENE D., FONKNECHTEN N. a kol. (2004): Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, aversatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Research* **32**: 5766-5779.

- BAUMANN P., DOUDOROFF M., STANIER R.Y. (1968): A study of the Moraxella group. II Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology* **95**: 1520-1541.
- BERGOGNE-BÉREZIN E. (2009): Importance of *Acinetobacter* spp. *Acinetobacter* biology and pathogenesis. *Infection Agents and Pathology* **1**: 1-18.
- CROXATTO A., PROD'HOM G., GREUB G. (2012): Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews*: **36**: 380-407.
- DOUGHARI H.J., NDAKIDEMI PA., HUMAN I.S., BENADE S. (2011): The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and Environments* **25**: 101-112.
- GERISCHER U. (2008): *Acinetobacter* spp. V knize: *Acinetobacter Molecular Biology* (Gerischer U.V., Mukua L., Mirgja K., eds.), s. 101-108. Caister Academic Press, Norfolk, UK.
- HAMOUDA A., FINDLAY J., AL HASSAN L., SEBASTIAN G.B.A. (2011): Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* **38(4)**: 314-318.
- KÄMPFER P., GLAESER S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology* **14(2)**: 291-317.
- KONSTANTINIDIS K.T., TIEDJE J.M. (2005): Towards a genome-based taxonomy for prokaryotes. *Journal of Bacteriology* **187**: 6258-6264.
- LESSEL E. (1971): Minutes of the subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* **21**: 213-214.
- LIU D.: *Acinetobacter*. V knize: *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, 1. vydání, kapitola 67, s. 781-785. CRC Press: Florida (USA), 2011.
- NEMEC A.: *Studium lékařsky významných kmenů rodu Acinetobacter*. Habilitační práce, Univerzita Karlova, Praha, 2004.
- PANGALLO D., ŠAKOVÁ N., KORENOVÁ J., PUŠKÁROVÁ A., KRAKOVÁ L., VALIK L., TOMÁŠ K. (2014): Microbial diversity and dynamics during the production of May brnydza cheese. *International Journal of Food Microbiology* **170**: 38-43.
- PERCIVAL L.S., WILLIAMS D.W., GRAY N., YATES M.V., CHALMERS R.: *Acinetobacter*. V knize: *Microbiology of Waterborne Diseases*, 2. vydání, s. 35-48. Academic Press, 2014.
- RÉDEI G.P.: V knize: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*, 3. vydání: Springer, 2008.
- ROSSAUR R., VANLANDSCHOOT M., GILLIS M., DEEY J. (1991). Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter* and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* **41**: 310-319.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**: 5463-5467.
- SOO P., TSENG C., LING S., LIU M., LIU C., CHAO H., LIN T., CHANG K. (2013): Rapid and sensitive detection of *Acinetobacter baumannii* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiological Methods* **92(2)**: 197-200.
- STACKEBRANDT E., FREDERIKSEN W., GARRITY G.M., GRIMONT P.A.D., KÄMPFER P., MAIDEN M.C.J., NESME X., ROSSELLÓ-MORA R., SWINGS J., TRÜPER H.G. (2002): Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **52**: 1043-1047.
- STROHALM M., KAVAN D., NOVÁK P., VOLNY M., HAVLÍČEK V. (2010): mMass 3: s cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry* **82**: 4648-4651.
- TAMANG M., GURUNG M., NAM H., KIM S., JANG G., JUNG S., LIM S. (2014): Short communication: Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* isolates recovered from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* **97(2)**: 704-709.
- VOTAVA M. Lékařská mikrobiologie obecná, 2. vydání. Neptun, Brno, 2005.
- WIESER A., SCHNEIDER L., JUNG J., SCHUBERT S. (2012): MALDI-TOF in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology* **93**: 965-974.
- YAVANKAR S.P., PARDESI K.R., CHOPADE B.A. (2007): Species distribution and physiological characterization of *Acinetobacter* genospecies from healthy human skin of tribal population in India. *Indian Journal of Medical Microbiology* **25**: 336-345.

Přijato do tisku: 18. 5. 2015

Lektorováno: 5. 6. 2015



**POTRAVINÁŘSKÁ  
KOMORA  
ČESKÉ REPUBLIKY**



**Potravinářská komora České republiky  
a  
Česká technologická platforma pro potraviny**

vyhlašují druhý ročník soutěže

## **CENA PREZIDENTA POTRAVINÁŘSKÉ KOMORY ČR O NEJLEPŠÍ INOVATIVNÍ POTRAVINÁŘSKÝ VÝROBEK**

Cílem této soutěže je podpora českých potravin a jejich výrobců a především vyzvednutí českých inovativních potravinářských výrobků.

Prostřednictvím této soutěže bychom zároveň rádi inspirovali ostatní potravinářské společnosti k inovativnímu přístupu k práci.

Přihlášení výrobků do soutěže bude probíhat od 31. 3. do 30. 6. 2015.

Podrobné informace o soutěži najdou zájemci na stránkách  
Potravinářské komory České republiky.