

- SHINGFIELD K.J., BONNET M., SCOLLAN N.D. (2013): Recent developments in altering the fatty acid composition of ruminant-derived foods, *Animal*, 7, s. 132-162.
- TORAL P.G., ROUEL J., BERNARD L., CHILLIARD Y. (2014): Interaction between fish oil and plant oils/starchy concentrates in the diet: Effects on dairy performance and milk fatty acid composition in goats, *Anim. Feed Sci. Tech.*, 198, s. 67-82.
- TORAL P.G., HERVÁS G., CARRENO D., FRUTOS P. (2016): Does supplemental 18:0 alleviate fish oil-induced milk fat depression in dairy ewes? *J. Dairy Sci.*, 99, s. 1133-1144.

Kontaktní informace: Ing. Markéta Borková, Ph.D.,
Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6, email: borkovam@gmail.com

Přijato do tisku: 14. 11. 2016
Lektorováno: 30. 11. 2016

IDENTIFIKACE POTRAVINÁŘSKÝCH PRŮMYSLOVÝCH IZOLÁTŮ RODU *ACINETOBACTER* POMOCÍ METODY PCR S ORIGINÁLNĚ NAVRŽENÝMI, RODOVĚ-SPECIFICKÝMI PRIMERY

Eva Šviráková¹, Andrea Mühlhansová¹,
Sabina Purkrťová¹, Irena Němečková²,
Markéta Jelínková³, Jürgen Felsberg³

¹ Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

² Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o.

³ Mikrobiologický ústav Akademie věd České republiky, v. v. i.

Identification of food industrial isolates of the *Acinetobacter* genus using the PCR method with originally designed genus-specific primers

Abstrakt

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nesporující, nepohyblivé, enkapsulované kokobacilové tyčinky se striktně aerobním metabolismem. Nejčastěji se vyskytují ve vodě nebo v půdě, ovšem nalézány jsou také v potravinářských surovinách a výrobcích, včetně lidských zdrojů. V mlékárenském průmyslu mají statut technologicky rizikových bakterií způsobujících různé sensorické vady a texturní defekty výrobků typu mléko UHT, bryndza, sýry bílé zrající v solném nálevu a jiné. U imunokompromitovaných jedinců představují závažné zdravotní riziko často spojované s nozokomiálními infekcemi. *Acinetobacterie* mohou být identifikovány s vysokou spolehlivostí na úrovni rodu s využitím různých moderních molekulárně biologických metod. Tato práce byla věnována identifikaci *acinetobakterií*, izolovaných z mlékárenských surovin

a výrobků, včetně výrobního zařízení a pomůcek pomocí metody polymerázové řetězové reakce (PCR) s využitím nových, originálně navržených, rodově-specifických primerů *AcinetoFor1* a *AcinetoRev1*. Získané výsledky mohou být užitečné při screeningovém zajišťování hygienické úrovně nejenom mlékárenských, ale i jiných potravinářských výrob s ohledem na eliminaci výskytu rizikových *acinetobakterií*.

Klíčová slova: *acinetobakterie*, rod *Acinetobacter*, technologické riziko, zdravotní riziko, mlékárenské suroviny a výrobky, výrobní zařízení a pomůcky, identifikace, metoda PCR, rodově-specifické primery.

Abstract

Bacteria of the *Acinetobacter* genus belong to the Gram-negative, non-spore-forming, non-motile, encapsulated coccobacilli rods with strictly aerobic metabolism. There are important soil and water bacteria with occurrence in raw food materials and food products, including human sources also. These bacteria represent a significant technological risk in the dairy industry where causing different sensory problems and texture defects in final products as are UHT milk, May bryndza cheese, brined cheeses and the others. They represent serious health risk bacteria causing in immunocompromised individuals mostly nosocomial infections. *Acinetobacteria* can be identified with high reliability at the genus level using different modern molecular-biological methods. This work was aimed at the identification of *acinetobacteria*, which were isolated from raw dairy materials and products including production facilities and aids, using the polymerase chain reaction (PCR) method with new originally designed genus-specific primers *AcinetoFor1* and *AcinetoRev1*. Obtained results may have been useful for screening assurance hygienic level of not only dairy productions, but also others food productions, in connection with elimination of occurrence of risky *acinetobacteria*.

Key words: *acinetobacteria*, *Acinetobacter* genus, technological risk, health risk, raw dairy materials and products, production facilities and aids, identification, PCR method, genus-specific primers.

Úvod

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nesporující, nepohyblivé, nefermentující, enkapsulované kokobacilové, striktně aerobní tyčinky (Doughari a kol., 2011). Nejčastěji se vyskytují v přírodních zdrojích typu půda a voda (Krizova a kol., 2014), nalézány jsou také v potravinářských surovinách a výrobcích (Percival a kol., 2014), na výrobním zařízení (Hamouda a kol., 2011), včetně lidských zdrojů (Tamang a kol., 2014). V mlékárenském průmyslu mají statut technologicky rizikových bakterií způsobujících různé sensorické vady a texturní defekty koncových výrobků (Pangallo a kol., 2014). U imunokompromitovaných jedinců představují závažné zdravotní

riziko nejčastěji spojované s nozokomiálními infekcemi (Nemec, 2004; Votava, 2005; Peleg a kol., 2008).

Dle současně platné taxonomie je heterogenní skupina acinetobakterií řazena sestupně do domény Bacteria, oddělení Proteobacteria, třídy Gammaproteobacteria, řádu Pseudomonadales, čeledi Moraxellaceae, rodu *Acinetobacter*. Poslední skupina sdružuje v současnosti 32 známých druhů, mezi které lze řadit *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* a *Acinetobacter haemolyticus*, představující druhy klinického významu (Doughari a kol., 2011).

Acinetobakterie mohou být vhodně identifikovány s vysokou spolehlivostí a reprodukovatelností na úrovni rodu či druhu pomocí různých genotypových metod. Obecně je jejich identifikace založena na odlišnostech v sekvenci DNA. Implementace molekulárně biologických technik do výzkumných laboratoří přispívá k významnému zlepšení identifikace druhů *Acinetobacter* spp. (Al Altrouni a kol., 2016). Tyto moderní techniky mohou také významně přispět k epidemiologickým studiím sporadických případů vzniku a šíření infekcí v nemocnicích, které jsou spojovány právě s bakteriemi rodu *Acinetobacter* (Vila a kol., 1989; Struelens a kol., 1993).

V současné době je nejčastějším způsobem genotypické identifikace acinetobakterií sekvenování genu kódujícího syntézu 16S rRNA. Produkt tohoto genu, dlouhého 1500 nukleotidů, tvoří s dalšími přibližně 30 proteiny malou ribozomální podjednotku 30S. Další možností identifikace je sekvenování genu β -podjednotky RNA polymerasy (*rpoB*) s využitím metody DGGE (Deperrois-Lafarge a Meheut, 2012; Gurung a kol., 2013). K dalším metodám se dá řadit metoda MLST (Ecker a kol., 2006) či sekvenční analýza spaceru oblasti 16S-23S rRNA (Chang a kol., 2005). Tyto metody mají však i některé nevýhody, které relativně limitují jejich využití v potravinářské, respektive v mlékárenské, průmyslové praxi z důvodu pracnosti, časové náročnosti, složitosti a vysokých pořizovacích nákladů při zavádění metodiky (Soo a kol., 2013). Z dalších vhodných genotypových metod lze dále zvažovat použití metod: AFLP, ARDRA, hybridizace DNA-DNA, LAMP, ribotypizace, PCR v různých modifikacích a jiných metod (Liu, 2011; Al Altrouni a kol., 2016).

K vhodným fenotypovým metodám se pro identifikaci acinetobakterií dají řadit metody: biotypizace, serotypizace, fágové typizace (Bergogne-Berezin a Towner, 1996), MALDI-TOF MS (Croxatto a kol., 2012) a jiné.

Cílem této práce byla identifikace acinetobakterií, izolovaných z mlékárenských surovin a výrobků včetně výrobního zařízení a pomůcek pomocí metody PCR s využitím nových, originálně navržených, rodově-specifických primerů AcinetoFor1 a AcinetoRev1, po jejich předchozí pre-identifikaci/identifikaci.

Materiál a metody

Izolace bakterií z mlékárenských surovin a výrobků, výrobního zařízení a pomůcek

Testované bakterie byly izolovány ze syrového mléka, z různých mlékárenských výrobků (např. z bílých sýrů zra-

zích v solném nálevu, ze solných nálevů, z mléka UHT), dále z výrobního zařízení (např. ze zařízení pro zpracování sýřeniny) a pomůcek (např. z tkanin, konkrétně plachetek pro odkapání syrovátky ze sýřeniny). 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., Praha). Pro následnou 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 a následně kultivovány při teplotě 37 °C (sbírkový izolát) nebo při teplotách 30 °C a 25 °C (průmyslové izoláty), po dobu 24 h, aerobně. Izoláty byly následně podrobeny makroskopickému vyhodnocení kolonií narostlých na povrchu Petriho misek, Gramovu barvení, mikroskopickému pozorování 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 růstovém Trypton-sójovém bujónu (tj. v bujónu z kaseinového a sójového 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.

Izolace chromozomální DNA z bakteriálních izolátů - acinetobakterií

Izolace chromozomální DNA z testovaných izolátů acinetobakterií probíhala pomocí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN) s využitím enzymatické lýze. Čerstvě narostlé kmeny byly (po aerobní kultivaci v Trypton-sójovém bujónu, při individuálních růstových teplotách pro konkrétní kmeny, za 18 h) odstředěny (4 550 g, 10 min, 4 °C) a jejich buňky byly promyty ve sterilní destilované vodě (1 ml). Buňky byly následně podrobeny lýzi. Uvolněná DNA byla poté podrobena reakci s 98 % ethanolem (-20 °C) a nakonec čištěna a promyta pomocí pufrů, které byly součástí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN). Posledním krokem byla eluce DNA na membránách. Pro zvýšení výtěžku byl zopakován eluční krok. DNA byla skladována při teplotě -20 °C.

Ověření kvality a množství chromozomální DNA izolované z bakteriálních izolátů - acinetobakterií

Kvalita a množství chromozomální DNA, izolované z testovaných izolátů acinetobakterií, byly ověřovány elektroforeticky. Na gel byly nanášeny vzorky DNA (5 μ l). Jako standard byl použit GeneRuler DNA Ladder Mix (5 μ l) (Thermo Scientific, USA). Kontrolní elektroforéza byla provedena v 1 % (hm.) agarosovém gelu, při konstantním napětí 60 V. Doba elektroforézy se lišila podle použité velikosti gelu (byly nality dvě různé velikosti gelů) a přibližně se pohybovala v rozmezí 75-90 min.

Dřívější pre-identifikace acinetobakterií pomocí fenotypové metody MALDI-TOF MS

Pre-identifikace acinetobakterových izolátů byla uskutečněna v období let 2014-2015 pomocí fenotypové instrumentální metody MALDI-TOF MS, v modifikaci (Šviráková a kol., 2015a). K identifikaci byl použit přístroj Bruker Autoflex Speeds s využitím komerční databáze MALDI Biotyper 3.0, spolu s metodami doporučenými výrobcem (Anonymous, 2016). Následovala vizualizace proteinových profilů acinetobakterií pomocí programu mMass 5 (Strohalm a kol., 2010).

Dřívější identifikace acinetobakterií pomocí genotypové metody sekvenování úseku 16S rDNA

Identifikace acinetobakterových izolátů byla uskutečněna v období let 2014-2015 pomocí genotypové metody sekvenování úseku 16S rDNA, v modifikaci dle interních pracovních návodů Střediska sekvenování DNA, Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. (Šviráková a kol., 2015a). K identifikaci byla použita tradiční Sangerova sekvenační metoda (Sanger a kol., 1977) nazývaná také jako "dideoxy" metoda (Rédei, 2008). Sekvenování probíhalo 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 rDNA u acinetobakterií.

Nová identifikace acinetobakterií pomocí metody PCR s originálně navrženými rodově-specifickými primery během roku 2015

Specifikace PCR reakční směsi

PCR byla provedena v objemu 50 µl a obsahovala 25 µl Combi PPP Master Mixu (Top-Bio, ČR), 20 µl demineralizované vody, 2 µl každého primeru (10 µmol.l⁻¹) (vždy byl použit jeden forwardový a jeden reverzní primer) a 1 µl roztoku DNA (který obsahoval 50-100 ng chromozomální DNA, a to jak referenčních sbírkových kmenů, tak kmenů izolovaných z prostředí mlékárenského průmyslu, které představovaly různé bakteriální druhy rodu *Acinetobacter*, a který dále obsahoval chromozomální DNA izolovanou z ostatních kmenů případně se vyskytujících v mlékárenských surovinách a výrobcích, včetně výrobního zařízení).

Upravené podmínky PCR s rodově-specifickými primery

Podmínky původní PCR byly upraveny na následující finální: počáteční denaturace probíhala při teplotě 95 °C po dobu 5 min a následovalo 39 cyklů s následujícím amplifikačním profilem: 95 °C po dobu 45 s (denaturace), 67 °C po dobu 45 s (nasedání primerů), 72 °C po dobu 90 s (prodlužování řetězce); konečné prodlužování řetězce probíhalo při teplotě 72 °C po dobu 5 min. PCR byla ukončena při teplotě 4 °C. Podmínky této PCR byly testovány na různých kmenech bakterií rodů *Acinetobacter* a *Pseudomonas*.

Kontrolní elektroforéza finálních PCR produktů

Elektroforéza zde byla použita jako separační technika, založená na separačním principu nabitých molekul v elektrickém poli. Na základě elektroforetického gelu demonstrujícího gradient PCR byly upraveny podmínky PCR tak, aby byla reakce co nejvíce specifická. Kontrolní elektroforéza byla provedena v 1% (hm.) agarosovém gelu, při konstantním napětí 60 V, během 75-90 min. Byl použit standard o známé velikosti (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, USA).

Ověření podmínek PCR na směsích chromozomálních DNA izolovaných z různých bakteriálních kmenů

Podmínky PCR byly následně ověřeny na směsích chromozomálních DNA izolovaných z různých bakteriálních kmenů. Celkem bylo použito 10 různých směsí chromozomálních DNA, z nichž každá obsahovala chromozomální DNA o koncentraci 50-100 ng a pocházela z 5 různých kmenů, a to jak rodu *Acinetobacter*, tak jiných bakteriálních rodů. Jednotlivé negativní kontrolní kmeny jsou uvedeny v Tab. 2. Jednotlivé pozitivní kontrolní kmeny jsou uvedeny v Tab. 3. Směsi bakteriálních kmenů jsou uvedeny v Tab. 4. Pro ověření metody byly finální produkty PCR přečištěny a sekvenovány kitem ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, USA). Produkty sekvenační reakce byly podrobeny analýze na genetickém analyzátoru ABI PRISM 3130xl DNA. Získané sekvence byly porovnány s databází NCBI, která potvrdila přítomnost chromozomální DNA rodu *Acinetobacter* ve směsích bakteriálních kmenů.

Výsledky

Výsledky této práce se týkají genotypové identifikace 10 potravinářských průmyslových izolátů rodu *Acinetobacter*, které byly izolovány z mlékárenských surovin a výrobků, a také z výrobního zařízení a pomůcek, pomocí klasické metody PCR s využitím nových, originálně navržených, rodově-specifických primerů AcinetoFor1 a AcinetoRev1 během roku 2015, a to po již dříve uskutečněné pre-identifikaci a identifikaci těchto izolátů během období let 2014-2015, které jsou souhrnně komentovány dále.

Tab. 1 Nové, originálně navržené, rodově-specifické primery pro rod *Acinetobacter**

Název primeru	Sekvence oligonukleotidu (5' - 3')	Obsah G + C (%)	Teplota tání primeru T _m (°C)
AcinetoFor1	GGT-GAG-TAA-TRC-TTA-GGA-ATC-TG	39,1	52,1
AcinetoFor2	GGT-AAA-GGC-CTA-CCA-AGG-CGA-CG	60,8	71,9
AcinetoRev1	GTA-TTC-ACC-GCG-GCA-TTC-TGA-TC	52,1	70,3
AcinetoRev2	GAT-CCG-CGA-TTA-CTA-GCG-ATT-CC	52,1	68,4

* **Návrh primerů:** Dr. Jürgen Felsberg, CSc. & Ing. Markéta Jelínková, Ph.D. (Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i., Středisko sekvenování DNA) (Šviráková a kol., 2015b)
Poznámka: Primery použité pro experimenty byly označeny podle zkratk a symbolů nomenklatury nukleotidů (Abbreviations and Symbols for Nucleic Acids, Polynucleotides and their Constituents) IUPAC-IUB vydané Komisí pro biochemickou nomenklaturu (CBN) (IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature) (Cornish-Bowden, 1985).

Tab. 2 Negativní kontrolní kmeny pro ověření podmínek PCR

Číslo kmene	Název bakteriálního kmene	Kódové označení kmene	Kultivační podmínky: médium, teplota
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 314	MRS, 37 °C
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	MRS, 37 °C
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	MRS, 37 °C
4	<i>Lactobacillus gasserii</i>	CCM 7009 ATCC 33325	MRS, 37 °C
5	<i>Lactobacillus helveticus</i>	ISLC5	MRS, 37 °C
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	MRS, 37 °C
7	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7089 ATCC 334	MRS, 37 °C
8	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lafti L26	MRS, 37 °C
9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ 1066	M17, 30 °C
10	<i>Escherchia coli</i>	CCM 4517 ATCC 8739	TSB, 37 °C
11	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4516 ATCC 6538	TSB, 37 °C
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1961 ATCC 9027	TSB, 37 °C
13	<i>Pseudomonas fragi</i>	CCM 1974 ATCC 4973	TSB, 30 °C
14	<i>Pseudomonas lundensis</i>	CCM 3503 ATCC 49968	TSB, 25 °C
15	<i>Serratia marcescens</i>	CCM 303 ATCC 13880	TSB, 30 °C
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	CCM 1903 ATCC 10699	TSB, 37 °C
17	<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 1999 ATCC 6633	<i>Bacillus</i> médium, 30 °C
18	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224 ATCC 29212	BHI, 37 °C
19	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CCM 4425	M17, 37 °C
20	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187	M17, 37 °C
21	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	CCM 2655 ATCC 14909	TSB, 30 °C
22	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCM 3994	TSB, 37 °C
23	<i>Burkholderia cepacia</i>	CCM 2656 ATCC 17759	TSB, 30 °C
24	<i>Citrobacter freundii</i>	CCM 4475	TSB, 37 °C
25	<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 169 ATCC 15307	TSB, 30 °C
26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCM 2115 ATCC 13525	TSB, 30 °C

MRS... bujón MRS, M17... bujón M17, TSB... Trypton-sójový bujón, BHI... bujón BHI, *Bacillus* médium... médium 10 - *Bacillus* médium (všechna média: MERCK, KGaA, SRN)

Historie pre-identifikace a identifikace testovaných acinetobakterií

Kolekce testovaných kmenů acinetobakterií byla v dřívějším období, konkrétně během let 2014-2015, podrobena pre-identifikaci pomocí fenotypové metody MALDI-TOF MS a spolehlivé identifikaci pomocí genotypové metody sekvenování úseku 16S rDNA. Výsledky získané pomocí obou metod byly téměř totožné. K identifikační shodě došlo u 9 kmenů z celkových 10 testovaných kmenů na spolehlivé druhové identifikační úrovni. Bylo konstatováno, že pouze jeden izolát N35 patřil do komplexu *Acinetobacter baumannii* - *Acinetobacter calcoaceti-*

Tab. 3 Vybrané pozitivní kontrolní kmeny pro ověření podmínek PCR

Číslo kmene	Název bakteriálního kmene	Kódové označení kmene	Kultivační podmínky: médium, teplota
1A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCM 4353	TSB, 37 °C
2A	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	1298	TSB, 37 °C
3A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	71	TSB, 37 °C
4A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	328	TSB, 37 °C
5A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	335	TSB, 37 °C
6A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	907	TSB, 37 °C
7A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	478	TSB, 37 °C

TSB... Trypton-sójový bujón (MERCK, KGaA, SRN)

cus - *Acinetobacter pittii*, který nebylo snadné jednotně identifikovat. Závěrem bylo uvedeno, že mezi identifikovanými izoláty bylo zjištěno 6 různých druhů *Acinetobacter* spp.: *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Acinetobacter guillouiae*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter lwofii* a *Acinetobacter pittii* (Šviráková a kol., 2015a).

Nejnovější identifikace testovaných acinetobakterií

Na pre-identifikace a identifikace testovaných acinetobakterií během období let 2014-2015 bylo v roce 2015 navázáno novou experimentální identifikací testovaných izolátů acinetobakterií pomocí další genotypové metody, tentokrát pomocí klasické metody PCR s novými, originálně navrženými, rodově-specifickými primery.

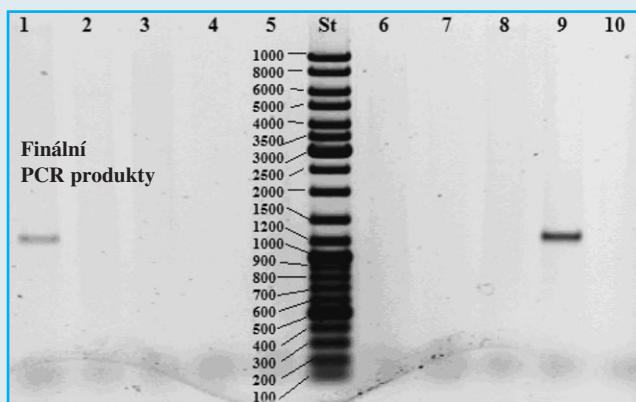
Návrh nových, rodově-specifických primerů pro metodu PCR, pro identifikaci acinetobakterií

Z vědecké databáze Národního centra pro biotechnologické informace (NCBI, National Center for Biotechnology Information, Bethesda MD, USA) byly získány sekvence úseku genů 16S rDNA pro 29 kmenů acinetobakterií. Za použití metody Multiple Sequence Alignment (MSA) byly pomocí genetických algoritmů a při porovnání s programem Clustal W (Larkin a kol., 2007) tyto sekvence porovnány a byly hledány oblasti, které splňovaly níže uvedená kritéria

Tab. 4 Směsi obsahující různé bakteriální kmeny* pro ověření podmínek PCR

Označení směsi	Směs bakteriálních kmenů	Poznámka
1	1 + 10 + 20 + 25 + 3A	Směs PB
2	2 + 11 + 21 + 26 + 19	Směs NB
3	3 + 12 + 22 + 11 + 20	Směs NB
4	4 + 13 + 23 + 12 + 21	Směs NB
5	5 + 14 + 24 + 13 + 22	Směs NB
6	6 + 15 + 14 + 23 + 3	Směs NB
7	7 + 16 + 15 + 24 + 4	Směs NB
8	8 + 17 + 16 + 25 + 5	Směs NB
9	9 + 18 + 17 + 26 + 6A	Směs PB
10	10 + 19 + 18 + 1 + 2	Směs NB

*... směsi bakteriálních kmenů byly připraveny o celkových objemech po 100 µl, každý konkrétní kmen byl připraven o objemu po 20 µl, PB... pozitivní bakteriální kmeny, NB... negativní bakteriální kmeny.



Obr. 1 Elektroforetický gel s finálními PCR produkty (o velikosti 1247 bp) pro 10 směsí obsahujících různé bakteriální kmeny (viz Tab. 4); použité primery: *AcinetoFor1+AcinetoRev1*; pozice vzorků: 1 až 10) směsí různých bakteriálních kmenů (směsi 1 a 9 obsahovaly chromozomální DNA bakterií rodu *Acinetobacter*); St) standard GeneRuler DNA Ladder Mix (Thermo Scientific, USA).

ve vazbě na takzvaná "Obecná pravidla pro design primerů" (Sambrook a Russel, 2001).

Bylo navrženo, že hledané genové oblasti úseku genu 16S rDNA by: a) měly vykazovat v rámci rodu *Acinetobacter* co nejvyšší homologii, b) neměly obsahovat žádné sekundární struktury, c) měly být od sebe vzdálené minimálně 800 nukleotidů, d) měly mít vyvážený obsah nukleotidů G+C, a tím i podobnou teplotu tání T_m (melting temperature), e) navržené primery neměly být delší než 25 nukleotidů. Individuálně navržené rodově-specifické primery pro genotypovou identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* pomocí metody PCR jsou uvedeny v Tab. 1.

Ověření podmínek PCR na směších chromozomálních DNA izolovaných z různých bakteriálních kmenů

Pro ověření podmínek nově navržené PCR byly testovány směsi chromozomálních DNA izolovaných z různých bakteriálních kmenů. Negativní kontrolní kmeny jsou uvedeny v Tab. 2, pozitivní kontrolní jsou uvedeny v Tab. 3. a směsi kmenů obsahující různé bakteriální kmeny jsou uvedeny v Tab. 4. Grafický výsledek z elektroforézy finálních PCR produktů u vyšetřovaných 10 heterogenních bakteriálních směsí je demonstrován na Obr. 1.

Individualita nových, rodově-specifických, primerů pro metodu PCR

Rodově-specifické primery *AcinetoFor1*, *AcinetoFor2*, *AcinetoRev1* a *AcinetoRev2* byly pro detekci bakterií rodu *Acinetobacter* navrženy individuálně a na základě srovnání sekvencí genových úseků oblasti 16S rDNA 29 různých bakteriálních kmenů rodu *Acinetobacter*. Tyto primery byly použity pro PCR jednak s kmeny rodu *Acinetobacter*, jednak s bakteriálními kmeny, které se prediktivně mohou vyskytovat v mlékařenském výrobním prostředí (např. rody: *r. Bacillus*, *r. Burkholderia*, *r. Citrobacter*, *r. Entero-*

bacter, *r. Escherichia*, *r. Lactobacillus*, *r. Micrococcus*, *r. Pseudomonas*, *r. Serratia*, *r. Staphylococcus* a *r. Streptococcus*).

Finální PCR produkty, odpovídající velikosti PCR produktů vznikajících při běžných teplotách nasedání primerů (tzn. při teplotách v rozmezí 55-60 °C), byly přítomny u všech testovaných kmenů. Optimální teplota nasedání primerů byla proto testována pomocí gradientové PCR s teplotou nasedání primerů v rozmezí teplot 60-70 °C. Jako optimální teplota pro nasedání primerů byla vybrána teplota 67 °C.

Při použití primerů *AcinetoFor1+AcinetoRev1* byly zjištěny zřetelné finální PCR produkty o velikosti 1247 nukleotidů, a to u všech použitých kmenů bakterií rodu *Acinetobacter* s dovětkem, že u ostatních použitých kmenů žádné produkty PCR přítomny nebyly.

Při použití ostatních dvojic primerů (*AcinetoFor1+AcinetoRev2*, *AcinetoFor2+AcinetoRev1* a *AcinetoFor2+AcinetoRev2*) byly i při takto vysoké a selektivní teplotě nasedání primeru přítomny PCR produkty, a to i u kmenů jiných než rodu *Acinetobacter*. Šlo především o kmeny rodu *Pseudomonas*.

Závěr

Závěrem je možné konstatovat, že nově navržené rodově-specifické primery *AcinetoFor1+AcinetoRev1* jsou pro genotypovou identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* 100 % specifické. Primery jsou vhodné pro klasickou metodu PCR s jejím využitím obecně v kontrolních laboratořích, ve vědecko-výzkumných laboratořích, v kontrolních laboratořích dozorových orgánů, včetně zkušebních laboratoří poskytujících klientům analýzy formou služeb. Zjištěné výsledky této práce mohou být aplikovány při jednorázovém i screeningovém zajišťování zdravotní bezpečnosti, technologické nerizikovitosti a požadované jakosti vyráběných potravinářských surovin a výrobků, včetně mlékařenských, při cílené eliminaci bakterií rodu *Acinetobacter*.

Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékařenských 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. MALDI Biotyper CA Systém Technické materiály společnosti Bruker Divisions. Staženo z <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometryandseparations/maldi-biotyper-ca-system/service-support.html>, staženo dne 20. 11. 2016.
- AL ATROUNI A., JOLY-GUILLOU M.L., HAMZE M., KEMPF M. (2016). Reservoirs of non-*baumannii* *Acinetobacter* species, mini review. *Frontiers in Microbiology*, 7, 1-12.
- BERGOGNE-BEREZIN E., TOWNER K.J 1996. *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical, and epidemiological features. *Clinical Microbiological Review* 9, 148-165.

- CHANG H.C., WEI Y.F., DIJKSHOORN L., VANECHOUTTE M., TANG C.T., CHANG T.C. (2005): Species-level identification of isolates of the *Acinetobacter calcoaceticus* - *Acinetobacter baumannii* complex by sequence analysis of the 16S-23S r RNA gene spacer region. *Journal of Clinical Microbiology* 43, 1632-1639.
- CORNISH-BOWDEN A. Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984 (1985). *Nucleic Acids Research*, 13(9), 3021-3030.
- CROXATTO, A.; PROD HOM, G.; GREUB, G (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 380-407.
- DEPERROIS-LAFARGE V., MEHEUT T (2012). Use of the *rpoB* gene as an alternative to the *V3* gene for the identification of spoilage and pathogenic bacteria species in milk and milk products. *Letters in Applied Microbiology* 55, 99-108.
- DOUGHARI H.J., NDAKIDEMI P.A., HUMAN I.S., BENADE S (2011). The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes and Environments* 25, 101-112.
- ECKER J.A., MASSIRE C., HALL T.A., RANKEN R., PENNELLA T.D., AGASINO I.C., BLYN L.B., HOFSTADLER S.A., ENDY T.P., SCOTT P.T., LINDLER L., HAMILTON T., GADDY C., SNOW K., PE M., FISHBAIN J., CRAFT D., DEYE G., RIDDELL S., MILSTREY E., PETRUCCCELLI B., BRISSE S., HARPIN V., SCHINK A., ECKER D.J., SAMPATH R., ESHOO M.W. (2006): Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology*, 44, 2921-2932.
- GURUNG M., NAM H.M., TAMANG M.D., CHAE M.H., JANG G.C., JUNG S.C., LIM S.K (2013). Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *Journal of Dairy Science*, 96, 1997-2002.
- 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.
- KRIZOVA L., MAIXNEROVA M., SEDO O., NEMEC A. (2014): *Acinetobacter bohemicus* sp. nov. widespread in natural soil and water ecosystems in the Czech Republic. *Systematic and Applied Microbiology*, 37, 467-473.
- LARKIN M.A., BLACKSHIELDS G., BROWN N.P., CHENNA R., MCGETTIGAN P.A., MCWILLIAM H., VALENTIN F., WALLACE I.M., WILM A., LOPEZ R., THOMPSON J.D., GIBSON T.J., HIGGINS D.G (2007). ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- LIU D. *Acinetobacter*. V: *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, (2011):1. vyd., kap. 67, 781-785. CRC Press, Florida (USA).
- NEMEC A. Studium lékařsky významných kmenů rodu *Acinetobacter* (2004). Habilitační práce, Univerzita Karlova. Univerzita Karlova, Praha.
- PANGALLO D., ŠAKOVÁ N., KOREŇOVÁ J., PUŠKÁROVÁ A., KRAKOVÁ L., VALÍK L., TOMÁŠ K. Microbial diversity and dynamics during the production of May bryndza cheese. *International Journal of Food Microbiology* 2014, 170, 38-43.
- PELEG A.Y., SEIFERT H., PATERSON D.L. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clinical and Microbiological Review* 2008, 21, 538-582.
- PERCIVAL L.S., WILLIAMS D.W., GRAY N., YATES M.V., CHALMERS R.: *Acinetobacter*. V: *Microbiology of Waterborne Diseases*, 2. vyd., 35-48. Academic Press, London (UK), 2014.
- RÉDEI G.P. *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*, 3. vyd. Springer (Springer Netherlands), Germany, 2008.
- SAMBROOK J., RUSSEL D.W. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*, 3. vyd., kap. 8: Amplification of DNA by polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (USA), 2001.
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1977, 74, 5463-5467.
- SOO P., TSENG C., LING S., LIU M., LIU C., CHAO H., LIN T., CHANG K. Rapid and sensitive detection of *Acinetobacter baumannii* using loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Microbiological Methods* 2013, 92(2), 197-200.
- STROHALM M., KAVAN D., NOVÁK P., VOLNÝ M., HAVLÍČEK V. mMass 3: a cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry* 2010, 82, 4648-4651.
- STRUELENS M.J., CARLIER E., MAES N., SERRUYS E., QUINT W.G.V., VAN BELKUM A (1993). Nosocomial colonization and infection with multiresistant *Acinetobacter baumannii*: outbreak delineation using DNA macrorestriction analysis and PCR-fingerprinting. *Journal of Hospital Infections*, 25, 15-32.
- ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBERG J (2015 a). Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy - Zpravodaj*, 150, XIV-XX.
- ŠVIRÁKOVÁ E., MÜHLHANSOVÁ A., PURKRTOVÁ S., NĚMEČKOVÁ I., JELÍNKOVÁ M., FELSBERG J.(2015 b): Uplatněná certifikovaná metodika QJ1210300 CM3: Identifikace bakterií rodu *Acinetobacter*, vyskytujících se v mléce, mlékárenských výrobcích a na výrobním zařízení a pomůckách, pomocí metody polymerázové řetězové reakce s využitím rodově specifických primerů, 1-30. Osvědčení SVS č. SVS/2015/135598-G ze dne 10. 12. 2015. VŠCHT Praha, Praha.
- 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.
- VILA J., ALMELA M., JIMENEZ DE ANTA M.T. (1989): Laboratory investigation of hospital outbreak caused by two different multiresistant *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, 27, 1086-1089.
- VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie obecná*, 2. vyd. Neptun, Brno, 2005.

Korespondenční autor: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.,
Ústav konzervace potravin,
Fakulta potravinářské a biochemické technologie,
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Technická 3/5, 166 28 Praha 6 - Dejvice, Česká republika,
e-mail: eva.svirakova@vscht.cz

Přijato do tisku: 14. 11. 2016

Lektorováno: 21. 11. 2016

MODELOVÝ RŮST *LISTERIA MONOCYTOGENES* NA POVRCHU ZRAJÍCÍCH SÝRŮ

Tereza Gelbíčová, Renáta Karpíšková

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, v. v. i.

**Growth model of *Listeria monocytogenes*
on the surface of ripened cheeses**

SOUHRN

Zrající sýry patří mezi nutričně bohaté, ale z pohledu možné kontaminace *L. monocytogenes*, vysoce rizikové potraviny. Cílem studie bylo provést modelový pokus růstu *L. monocytogenes* na povrchu sýrů zrajících pod mazem. Po inokulaci zrajících sýrů byly sledovány počty *L. monocytogenes* na povrchu sýrů během doby jejich udržitelnosti. Testované zrající sýry byly na základě hodnoty pH zařazeny do skupiny potravin podporujících růst *L. monocytogenes*. Výsledky modelového pokusu toto zařazení potvrdily. Při výchozí kontaminaci log 4 KTJ/10 cm² došlo ke zvýšení počtu *L. monocytogenes* o jeden logaritmus