

METODA PCR KVANTIFIKACE BAKTERIOFÁGA 936 V MLÉČNÝCH PRODUKTECH

Kateřina Olša Fliegerová¹, Lenka Štrosová¹,
Jakub Mrázek¹, Irena Němečková², Jan Kopečný¹

¹ Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Method of PCR quantification of bacteriophage 936 in dairy products

Abstrakt

Virulentní bakteriofágy stále představují vážnou hrozbu pro průmyslové fermentace mléka, a to i při časté dezinfekci a sterilizaci všech zařízení v mlékárenských provozech. Proto je spolehlivá metoda monitorování přítomnosti bakteriofágů, ale zejména jejich kvantifikace, nutnou součástí boje proti virové infekci. Tato práce popisuje kvantifikaci laktokokového bakteriofága 936 pomocí polymerázové řetězové reakce (qPCR) a aplikaci tohoto postupu na vzorky provozních zákysů a syrovátek. Metoda je založena na amplifikaci a fluorescenční detekci nárůstu počtu kopií úseku genu pro hlavní strukturální protein fága 936 a je tudíž nezávislá na kultivaci bakteriofága. Metoda qPCR je rychlá, citlivá, umožňuje kvantifikaci bakteriofága 936 v malých objemech průmyslových vzorků a v kterékoliv fázi fermentačního procesu.

Klíčová slova: bakteriofág; infekce; kvantifikace; qPCR; *Lactococcus*

Abstract

Virulent bacteriophages are still a serious threat to industrial fermentation of milk even with frequent disinfection and sterilization of dairy plants. Therefore, a reliable method for monitoring the presence of bacteriophages, but especially their quantification, is a necessary part of the fight against viral infection. This paper describes the procedure for the quantification of lactococcal bacteriophage 936 by polymerase chain reaction (qPCR) and application of this method to samples of bulks and whey. The method described herein is based on the amplification and fluorescence detection of the number of copies of the gene segment for the major structural protein of phage 936 and is therefore independent of bacteriophage cultivation. This method of qPCR is fast, sensitive, allows the quantification of bacteriophage 936 in small volumes of industrial samples and at any stage of the fermentation process.

Key words: bacteriophage; infection; quantification; qPCR; *Lactococcus*

Úvod

Mlékárenský průmysl využívá bakteriální kultury rodu *Lactococcus* jako základní kultury při výrobě různých fermentovaných mléčných výrobků a zejména sýrů. Tyto bakterie dodávají produktům texturní, organoleptické a konzervační vlastnosti, které mohou vyloučit i růst některých patogenů, avšak mohou být náchylné k napadení viry. Tyto viry, zvané bakteriofágy, jsou nukleoproteinové částice, které nesou genetickou informaci, ale nemají enzymové vybavení pro zajištění základních životních funkcí. Jsou však schopny infikovat vhodnou hostitelskou buňku a využít její enzymatický systém pro svou replikaci (Šilhánková, 1995). Po vniknutí genetické informace bakteriofága do hostitele může nastat buď varianta lysogenní nebo lytická. Při lysogenním cyklu se DNA bakteriofága začlení do bakteriálního chromozómu jako tzv. profág, replikuje se současně s buněčnou DNA, genetický materiál bakteriofága se tedy přenáší do dceřiných buněk, avšak nedochází k lýze hostitelských buněk. Druhou variantu představuje cyklus lytický, kdy po vniknutí bakteriofága do hostitele dochází uvnitř buňky ke vzniku virových komponent, ty se kompletují a vzniká velký počet bakteriofágů, které způsobí lýzu buňky. Ze zlyzované buňky se pak bakteriofágy uvolňují, napadají další buňky a stávají se infekčními. Bakteriofágy, které infikují kmeny mléčných bakterií, zpomalují fermentaci, negativně ovlivňují kvalitu, bezpečnost a hodnotu fermentovaných produktů a mohou způsobit až úplnou ztrátu fermentační kapacity. To následně může vést k významným hospodářským ztrátám (Mahony a kol., 2012). Některé odhady předpokládají, že virulentní fágy jsou přímo zodpovědné za největší ekonomické ztráty v mlékárenských provozech, protože negativně ovlivňují až 10% veškeré fermentace mléka (Emond a Moineau, 2007). Studiu těchto bakteriofágů se proto věnuje mimořádná pozornost a výrazný pokrok v molekulárně biologických metodách v posledních letech postupně odhaluje diverzitu a genetické procesy životních cyklů bakteriofágů a umožňuje pochopení interakcí mezi bakteriofágy a hostitelem (Kleppen a kol., 2011; Fliegerová a kol., 2017). Metody molekulární biologie se také uplatňují jako diagnostické nástroje a umožňují rychlou a spolehlivou detekci bakteriofágů (del Rio a kol., 2007). Několik studií ukázalo, že bakteriofágy skupiny 936 (řád Caudovirales, čeleď Siphoviridae) jsou nejvíce endemické a problematické skupiny laktokokových bakteriofágů ve fermentačních zařízeních (Mahony a kol., 2012; Murphy a kol., 2016). Detekce přítomnosti bakteriofága 936 v mlékárenských a sýrařských provozech však ještě neznamená, že bude negativně ovlivněn vlastní fermentační proces. K problémům dochází až v případě, že nastane lytický cyklus a bakteriofág se začne množit. Pro indikaci tohoto procesu pak nestačí pouhá detekce bakteriofága 936, ale musí se provést jeho kvantifikace.

Klasické mikrobiologické metody používané k testování přítomnosti bakteriofágů, kterými jsou hlavně plakové testy a testy turbidity (Atamer a kol., 2009), jsou založeny

na inhibičním účinku bakteriofágů na růst hostitelského kmene. Ačkoli jsou tyto metody detekce ekonomicky dostupné, mají řadu nevýhod, zejména dlouhou dobu zpracování, problémy související se specifitou bakteriofágů a riziko falešně negativních/pozitivních výsledků. Tyto metody mohou být nahrazeny rychlejší a přesnější metodou genetickou, jako je polymerázová řetězová reakce (PCR). Jedná se o specifickou a citlivou technologii používanou k detekci, identifikaci (tradiční PCR) a také kvantifikaci (kvantitativní PCR) množství bakteriofágové DNA ve vzorcích z mlékárenských provozů. PCR detekce bakteriofága 936 je dobře zavedenou metodou (del Rio a kol. 2007), avšak postup umožňující jeho kvantifikaci je metodou novou, která si rychle nachází uplatnění v laboratorních mléčného průmyslu. V této práci jsme se zaměřili na kvantifikaci bakteriofága 936 ve vzorcích odebraných z provozu, kde se potýkali se zpomalenou fermentací, přičemž jsme aplikovali právě tuto moderní molekulárně biologickou metodu zvanou real time PCR nebo též qPCR.

Materiál a metody

Testované vzorky

Vzorky syrovátek a provozních zákysů byly odebrány v mlékárenském provozu, zamrazeny při teplotě $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ a ve zmraženém stavu transportovány do Ústavu živočišné fyziologie a genetiky. Seznam vzorků je uveden v tabulce č. 1. Jako kontrolní kmeny byly použity *Lactobacillus helveticus* CCDM 66, *Lactococcus lactis* CCDM 731 a *Lactococcus lactis* CCDM 416 (Laktoflora[®], MILCOM a.s., ČR).

Izolace DNA a PCR primery

Ze vzorků odebraných z mlékárny a z kontrolních čistých bakteriálních kmenů byla izolována genomická DNA pomocí komerčního setu DNeasy UltraClean Microbial Kit (Qiagen, Německo) podle instrukcí výrobce. Koncentrace DNA byla měřena na přístroji NanoDrop (Thermo Fisher Scientific). Pro amplifikaci a kvantifikaci bakteriofága byly použity primery 936A - 936B o sekvenci

5'-ATCAGTTGGCTCAATGGAAGACCAAGCGG-3'
a 5'-GTTGCTTCTGCTGTTGGTGCAAATGAGGA-3',

kteří amplifikují fragment genu pro hlavní strukturální protein (major structural protein) *msp* bakteriofága 936 (del Rio a kol., 2007).

PCR kvantifikace

Pro kvantifikaci fága 936 byl použit přístroj Mx3005P (Stratagene, USA), reakční směs qPCR 2x SYBR Master mix (Top-Bio, ČR) a výše uvedené primery v celkovém reakčním objemu 20 μl . Teplotní režim reakce byl následující: počáteční denaturace při $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min), 35 cyklů denaturace při

$94\text{ }^{\circ}\text{C}$ (45 s), nasedání primerů (annealing) při $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min) a syntéza DNA při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (1 min). Na konci syntézy DNA byla v každém cyklu změřena fluorescence barviv SYBR Green. Posledním krokem byla prodloužená polymerázová reakce při $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ (5 min). Srovnání rychlostí qPCR reakce (vyjádřené parametrem C_t "threshold cycle") neznámého vzorku a standardu (odečet z kalibrační křivky) umožnilo stanovení množství bakteriofága 936 v testovaném vzorku. Pro qPCR byl použit vždy 1 μl DNA a všechny vzorky byly měřeny v triplikátech.

Kalibrační křivka

Pro sestrojení standardní kalibrační křivky byl použit přímo bakteriofág 936 (DSM 10 567, izolát P008). Pro jeho namnožení byl použit kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* DSM 4366. Pomnožení a izolace proběhla dle protokolu německé sbírky mikroorganismů DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen). Kalibrační křivka byla měřena v triplikátech s použitím výše uvedených primerů a metod a sériově nařaděného bakteriofága 936.

Výsledky

Sestrojení kalibrační křivky

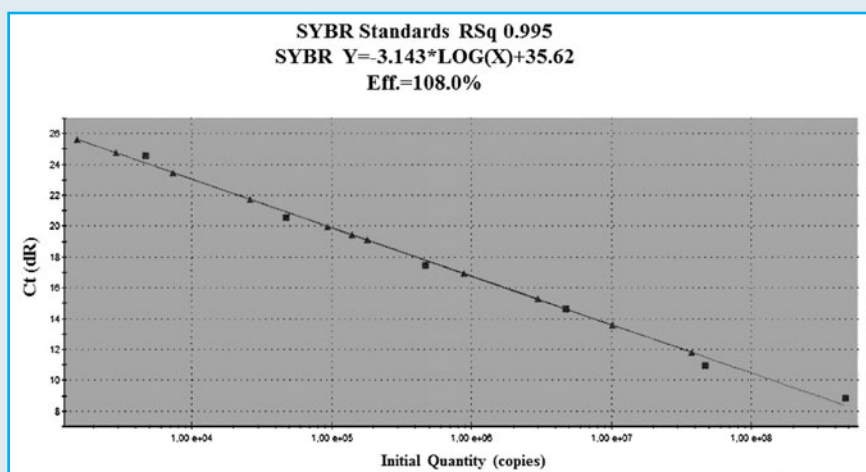
Ze známé DNA koncentrace bakteriofága, která činila 90,6 ng/ μl , a známého počtu bází cíleného genu, který činí 179 pb (viz obr. 1), byl vypočítán počet kopií v neředěném standardu podle následujícího vzorce:

$$\text{Počet kopií} = \frac{X \text{ ng} \cdot 6,0221 \cdot 10^{23} \text{ molekul/mol}}{N \cdot 660 \text{ g/mol} \cdot 1 \cdot 10^9 \text{ ng/g}},$$

kde X je množství amplikonu (ng), N je délka DNA amplikonu a hodnota 660 g/mol představuje průměrnou hmotnost jedné báze dvouřetězcové DNA. S použitím tohoto vzorce bylo spočítáno, že neředěný standard obsahuje $4,71 \cdot 10^{11}$ kopií genu *msp* bakteriofága 936. Standardní křivka vznikla sériovým naředěním bakteriofágové DNA v rozmezí 10^{-1} až 10^{-10} . Pro každé ředění byla provedena qPCR a hodnoty C_T (threshold cycle) byly vyneseny proti počtu kopií genu *msp*. Směrnice (sklon) křivky měla pro primery 936A-B hodnotu -3,143. Úspěšnost amplifikace byla v testovaném rozsahu ředění 108 %. Koefficient determinace (R^2) měl hodnotu 0,995, což ukazuje na velmi malý rozptyl bodů kalibrační přímky, jak je ukázáno na obr. 2. Kalibrační křivku naměřenou v této metodice lze prostřednictvím rovnice kalibrační přímky, která má v tomto případě tvar $Y = -3,143 \cdot \text{LOG}(X) + 35,62$, kde X představuje naměřené hodnoty C_T , přímo využít pro kvan-

```
TCAATGGAAGACCAAGCGGAGACTAACAGCTATCCAGCTGATGACGTGCCAGA
CCATGGAGTGAAAAAAGGTGCTACCTTACTTCAAGCGGAAATGGTATTCAATCAA
ACAGACCAAGCACTTAAAGAGGATATGCTAGGGCAACAAAGAACAGAAAATGGC
TTGGGTTGGTCTCCTAC
```

Obr. 1 Sekvence úseku genu *msp* bakteriofága 936 použitá pro sestrojení kalibrační křivky



Obr. 2 Kalibrační křivka pro kvantifikaci bakteriofága 936 naměřená na přístroji Mx3005P

tifikaci bakteriofága 936, aniž by bylo nutno znovu provádět qPCR s bakteriofágem 936.

Kvantifikace bakteriofága 936 ve vzorcích

Výsledky kvantifikace bakteriofága metodou qPCR ve vzorcích syrovátky a provozních zakysů jsou uvedeny v tabulce 1, která uvádí počet kopií bakteriofága 936 detegovaného v 1 μl roztoku DNA vzorku a také hodnotu přepočítanou na 1 ng DNA, neboť kvantifikace bakteriofága závisí na koncentraci DNA ve vzorku, potažmo tedy na koncentraci hostitelských bakterií ve vzorku. Jako negativní kontrolní vzorek byl použit kmen *Lactobacillus helveticus* CCDM 66, neboť tento druh není hostitelem pro bakteriofága 936, a měření vykazuje velmi nízké hodnoty, které se při vztažení na 1 ng DNA dostávají do záporných hodnot. Další negativní kontrolu představoval kmen *Lactococcus lactis* CCDM 731, u kterého nebyl tradiční

Tab. 1 Kvantifikace bakteriofága metodou qPCR ve vzorcích syrovátky a provozních zakysů

Číslo vzorku	Popis vzorku	Koncentrace DNA [ng/ μl]	Počet kopií fága 936/ μl DNA vzorku	Počet kopií fága 936/ng DNA vzorku
Lh 66	<i>Lactobacillus helveticus</i>	173,5	$8,35 \cdot 10^1$	$4,81 \cdot 10^1$
LI 731	<i>Lactococcus lactis</i>	66,8	$2,1 \cdot 10^3$	$3,14 \cdot 10^1$
LI 416	<i>Lactococcus lactis</i>	85	$3,65 \cdot 10^6$	$4,3 \cdot 10^4$
2/2	Sladká syrovátka - výrobce	2,1	$6,89 \cdot 10^2$	$3,28 \cdot 10^2$
3/2	Provozní zákys	2,6	$3,01 \cdot 10^6$	$7,73 \cdot 10^5$
4/2	Směsná sladká syrovátka - tank	0,4	$7,40 \cdot 10^3$	$1,85 \cdot 10^4$
11/2	Kyselá syrovátka	3	$4,27 \cdot 10^5$	$1,42 \cdot 10^5$
15	Sladká syrovátka - výrobce	2,61	$3,34 \cdot 10^3$	$1,28 \cdot 10^3$
15/1	Pasterovaná sladká syrovátka	1,8	$7,59 \cdot 10^2$	$4,22 \cdot 10^2$
15/2	Pasterovaná sladká syrovátka	1	$1,54 \cdot 10^2$	$1,54 \cdot 10^2$
16	Provozní zákys	4,3	$1,02 \cdot 10^7$	$2,37 \cdot 10^6$
16/1	Provozní zákys	0,8	$8,95 \cdot 10^5$	$1,12 \cdot 10^6$
17	Směsná sladká syrovátka - tank	7	$9,46 \cdot 10^4$	$1,35 \cdot 10^5$
17/1	Směsná sladká syrovátka - tank	0,6	$1,41 \cdot 10^5$	$2,35 \cdot 10^5$
20/1	Pasterovaná sladká syrovátka	0,7	$2,87 \cdot 10^3$	$4,10 \cdot 10^3$
22	Provozní zákys	0,6	$3,79 \cdot 10^7$	$3,32 \cdot 10^7$

metodou PCR detegován viditelný signál pro bakteriofága 936. Jako pozitivní kontrola byl do experimentu zařazen kmen *Lactococcus lactis* CCDM 416, u kterého byl tradiční metodou PCR detegován pozitivní signál pro bakteriofága 936, avšak kmen vykazoval normální fermentační aktivitu, bakteriofág 936 tedy byl ve formě profága. Výsledky ukazují významné rozdíly pro tyto dva kmeny, které dokládají citlivost metody. Na jejich základě může být jako limitní počet kopií bakteriofága 936 ve vzorku, který neovlivní negativně fermentaci, stanoven na hodnotu 10^6 kopií fága/ μl DNA vzorku. Tato hodnota upozorňuje

na přítomnost bakteriofága, avšak neindikuje jeho infekčnost. Hodnoty nad tímto limitem pak lze považovat za indikaci infekčnosti bakteriofága. Takové hodnoty byly naměřeny pouze u dvou vzorků provozních zakysů (viz tab. 1) a indikují, že fermentační proces může být zpomalen v důsledku bakteriofágové infekce. Pokud hodnoty vztáhneme na koncentraci DNA, pak se limitní množství bakteriofága, které neovlivní fermentaci, sníží na 10^4 kopií fága/ng DNA vzorku, a tyto hodnoty byly naměřeny u sedmi testovaných vzorků.

Diskuze

I přes řadu opatření, která provádí každý výrobní provoz, jako je rotace kultur, sanitární strategie a použití kmenů mléčných bakterií rezistentních na bakteriofágy, je kontaminace bakteriofágem během výroby produktů stále hlavní příčinou neúspěšných nebo zpožděných fermentací. Přetrvávání tohoto problému je dáno tím, že mléko a syrovátka jsou stálými rezervoáry pro kontaminaci bakteriofágy, a to zejména v případě nesterilních fermentačních substrátů a lysogenních startovacích kultur (Émond a Moineau, 2007). Navíc se bakteriofágy vyvíjejí a v důsledku mutací a rekombinací se objevují nové varianty, které jsou rezistentní vůči virovému obrannému systému hostitelských bakterií mléčného kvašení (Coffey a Ross, 2002). Včasná kvantifikace bakteriofága 936 metodou qPCR ve fermentovaných výrobcích může být velkým ekonomickým přínosem. V budoucnu by měla být začleněna do rutiny mlékárenského průmyslu k monitorování bakteriofágů a zahrnuta do preventivní strategie kontroly kontaminace.

Závěr

Virulentní laktokokový bakteriofág 936 představuje vážný problém mlékárenského průmyslu a výrobci vedou neustálý boj proti tomuto viru, aby jej udrželi pod kontrolou. Kvantifikace tohoto bakteriofága postupy molekulární biologie může být velmi účinnou součástí prevence, neboť nabízí rychlou a citlivou metodu kvantifikace nezávislou na kultivaci viru. Kvantitativní PCR (qPCR) je technologií založenou na tradiční PCR, avšak vykazuje vyšší specifičnost, přesnost a zejména přináší možnost kvantifikace počtu kopií cílové DNA, v tomto případě bakteriofága v mléčných produktech. Navíc qPCR shromažďuje data v reálném čase v celém rozsahu reakce a nikoliv jen v koncovém bodě jako konvenční PCR. Tato metoda proto může být výrazným pomocníkem pro včasnou identifikaci možných problémů ve fermentačních provozech.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu NAZV MZe ČR č. QJ1510338 v programu KUS a projektu CZ.02.1.01/0.0/0.0/15_003/0000460 v programu OP VVV.

Seznam literatury

- ATAMER Z., DIETRICH J., MÜLLER-MERBACH M., NEVE H., HELLER K.J., HINRICHS J. (2009): Screening for and characterization of *Lactococcus lactis* bacteriophages with high thermal resistance. *Int. Dairy J.*, 19, s. 228-235.
- COFFEY A., ROSS R.P. (2002): Bacteriophage-resistance systems in dairy starter strains: molecular analysis to application. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, s. 303-21.
- DEL RIO B., BINETTI A. G., MARTÍN M. C., FERNÁNDEZ M., MAGADÁN A. H., ALVAREZ M. A. (2007): Multiplex PCR for the detection and identification of dairy bacteriophages in milk. *Food Microbiol.*, 24, s. 75-81.
- EMOND E., MOINEAU S. (2007): Bacteriophages in food fermentations. Ve: MCGRATH S., VAN SINDEREN D. (edit.): *Bacteriophage: genetics and molecular biology* (pp. 93-124). Norfolk, UK, Caister Academic Press.
- FLIEGEROVÁ K., MRÁZEK J., KAVKOVÁ M., MARKOVÁ J., KŘEPELKOVÁ M., NĚMEČKOVÁ I., KOPEČNÝ J. (2017): Přirozené systémy ochrany proti bakteriofágům u bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy*, 28, s. 21-24.
- KLEPPEN H. P., TINE BANG T., INGOLF F. NES I. F., HELGE HOLO H. (2011): Bacteriophages in milk fermentations: Diversity fluctuations of normal and failed fermentations. *Int. Dairy J.*, 21, s. 592-600.
- MAHONY J., MURPHY J., VAN SINDEREN D. (2012): Lactococcal 936-type phages and dairy fermentation problems: from detection to evolution and prevention. *Front. Microbiol.*, 3, s. 335.
- MURPHY J., BOTTACINI F., MAHONY J., KELLEHER P., NEVE H., ZOMER A., NAUTA A., VAN SINDEREN D. (2016): Comparative genomics and functional analysis of the 936 group of lactococcal Siphoviridae phages. *Sci. Rep.*, 6, s. 21345.
- ŠILHÁNKOVÁ L. (1995): *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha, Victoria Publishing, 361 s. ISBN: 80-85605-71-6.

Korespondenční autor:

RNDr. Kateřina Fliegerová, CSc.,
Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, v.v.i.,
Vítěnská 1083, 142 20 Praha 4, Česká republika,
fliegerova@iapg.cas.cz.

Přijato do tisku: 5. 11. 2018
Lektorováno: 27. 11. 2018

VÝVOJ SOFTWAREHO NÁSTROJE (PMCIS) PRO PREDIKCI MLÉČNÝCH SLOŽEK POMOCÍ SPEKTRÁLNÍCH DAT IMPEDANCE

Jan Říha¹, Oto Hanuš², Jaroslav Kopecký²,
Radoslava Jedelská²

¹ Bentley Czech s.r.o., Praha

² Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha

Development of the software tool for prediction of milk components by impedance spectral data (PMCIS)

Abstrakt

Měření impedančního spektra (případně spektra posunu fáze střídavého proudu) je široce používanou metodou pro predikci fyzikálně-chemických parametrů vzorků živočišného původu. Tato práce představuje software PMCIS (Prediction of Milk Components by Impedance Spectral Data), který obsahuje souhrn predikčních modelů pro řadu parametrů složení mléčných vzorků na základě impedančního spektra a spektra posunu fáze. Modely byly vytvořeny s použitím PLS kalibrací a mohou být integrovány do měřicích řešení. Nejlepších výsledků bylo dosaženo pro predikci počtu somatických buněk, obsahu bílkovin a laktózy. Aplikace SW s vhodným měřicím zařízením představuje vhodné screeningové řešení pro predikci mléčných složek.

Klíčová slova: vzorek mléka, tuk, bílkoviny, laktóza, počet somatických buněk, impedanční spektroskopie

Abstract

Impedance and phase shift measurement represent widely used methods for prediction of physical and chemical properties of biological samples. PMCIS (Prediction of Milk Components by Impedance Spectral Data) software incorporates prediction models for milk components parameters based on impedance and phase shift spectra. Models are created by using PLS calibration and they can be incorporated into different technology based measuring devices. The best results have been obtained for somatic cell count, protein and lactose content in the milk samples. SW application together with corresponding technology could be used as screening solution for prediction of milk components.

Keywords: milk sample, fat, protein, lactose, somatic cell count, impedance spectroscopy

Úvod

Měření impedance (bioimpedance) je metoda široce používaná pro charakterizaci vzorků živočišného původu