

V poslední testované šarži byl tvaroh, který prakticky nejevil známky zrání. V porovnání s tvarohem ze šarže 3 v tomto tvarohu rovněž převažovaly proteolytické mikroorganismy, avšak tvaroh obsahoval relativně méně kvasinek. Přídavek některých kmenů s proteolytickou aktivitou přispěl k alespoň mírnému rozvoji tvarůžkového aroma, avšak nelze to zevšeobecnit. Zřejmě závisí na celkové biochemické vybavenosti jednotlivých kmenů a na tom, které biochemické aktivity, resp. jejich původci, ve výchozí surovině chyběly.

## Závěr

Na souboru 4 šarží průmyslového tvarohu a 41 kmenů bakterií a kvasinek byl studován vliv jednotlivých mikroorganismů na výsledek Pavlákovy zrači zkoušky. Výsledek této zkoušky byl ovlivněn jak přirozenou mikroflórou daného vzorku tvarohu, tak vlastnostmi naočkovaného kmene. Predikce výsledku Pavlákovy zrači zkoušky na základě zastoupení jednotlivých mikrobiálních čeledí, rodů, druhů nebo skupin s danou enzymatickou aktivitou se jeví jako obtížná. Pravděpodobně důležitější bude převaha kulturní kyselinotvorné mikroflóry a vyvážené zastoupení různě biochemicky vybavených kontaminujících mikroorganismů, aby se během zrání mohla plně rozvinout metabióza. Pochopení těchto procesů v celé své komplexnosti je však výzvou pro další studie.

## Poděkování

Tato práce vznikla s finanční podporou Národní agentury pro zemědělský výzkum Ministerstva zemědělství České republiky při řešení projektu QJ1210300 v programu KUS a s využitím institucionální podpory na rozvoj výzkumné organizace dle rozhodnutí MZE-RO1418.

## Literatura

- ČSN EN ISO 4833-1 (2014): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metoda pro stanovení počtu mikroorganismů - Část 1: Technika převlívem a počítáním kolonií vykultivovaných při 30 °C.
- ČSN ISO 6611 (2009): Mléko a mléčné výrobky - Stanovení počtu jednotek vytvářejících kolonie kvasinek a/nebo plísni - Technika počítání kolonií vykultivovaných při 25 °C.
- ČSN ISO 21528-2 (2006): Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody pro průkaz a stanovení bakterií čeledi *Enterobacteriaceae* - Část 2: Technika počítání kolonií.
- FORMAN L., STRMISKA J. (1984): Výroba tvarohu, tvarohových výrobků a kyselých sýrů. *Mlékárenství II pro 3. ročník SOU* (s. 17-44). ČR, SNTL - Nakladatelství technické literatury.
- NĚMEČKOVÁ I., CHRAMOSTOVÁ J., KLIMEŠOVÁ M., NEJESCHLEBOVÁ L., SMOLOVÁ J., HAVLÍKOVÁ Š., ROUBAL P. (2018): Kultivační metoda pro stanovení Gram-negativních aerobních bakterií v syrovém mléce. *Mlékařské listy - zpravodaj*, 169, s. 8-12.
- NĚMEČKOVÁ I., PECHAČOVÁ M., ROUBAL P. (2009): Problems with detection of proteolytic micro-organisms and their undesirable activities in milk. *Czech Journal of Food Sciences*, 27, s. S2/82-S2/89.

**Korespondující autor:** Ing. Irena Němečková, Ph.D.,  
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a,  
160 00 Praha 6, Česká republika, nemeckova@milcom-as.cz.

*Přijato do tisku: 16. 11. 2018*

*Lektorováno: 30. 11. 2018*

# VYUŽITÍ MALDI-TOF MS PRO IDENTIFIKACI BAKTERIÍ ZPŮSOBUJÍCÍCH KAŽENÍ MLÉKÁRENSKÝCH VÝROBKŮ

Sabina Purkrťová<sup>1</sup>, Lenka Zdeňková<sup>1</sup>, Petr Fanta<sup>1</sup>,  
Petra Junková<sup>1</sup>, Šárka Havlíková<sup>2</sup>, Irena Němečková<sup>2</sup>,  
Kateřina Demnerová<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Ústav biochemie a mikrobiologie, Vysoká škola  
chemicko-technologická v Praze

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

## Application of MALDI-TOF MS for the identification of bacteria causing spoilage of dairy products

### Abstrakt

Identifikace bakterií patří mezi důležité úkony laboratorní mikrobiologické praxe mlékárenského průmyslu. Metoda MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby průletu) je rychlou a moderní metodou identifikace mikroorganismů, zvláště pak bakterií. V této práci byla provedena MALDI-TOF MS identifikace celkem 711 bakteriálních izolátů z mlékárenských výrobků a provozoven. Celkem 91 % izolátů bylo spolehlivě identifikováno na alespoň rodové úrovni. Úroveň spolehlivosti rodové a druhové identifikace ovlivňuje nejen výběr vhodné metody přípravy vzorku pro danou taxonomickou skupinu, ale i fylogenetické vztahy v rámci rodů a přítomnost odpovídajících proteinových profilů v referenční databázi. Druhá identifikace je poté více náročná pro jednotlivé druhy druhových skupin (např. *Bacillus cereus* group, *Enterobacter cloacae* komplex, druhové skupiny *Pseudomonas* spp.). Bylo zjištěno, že databáze Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, Německo) rodově i druhově dostatečně pokrývá běžnou bakteriální mikroflóru mlékárenských výrobků, kdy s využitím této databáze byly metodou MALDI-TOF MS identifikovány bakteriální izoláty patřící do celkem 39 rodů.

**Klíčová slova:** MALDI-TOF MS, Biotyper, identifikace, bakterie způsobující kažení, mlékárenské výrobky.

### Abstract

The identification of bacteria belongs to important operations in laboratory microbiological practice in dairy industry. The MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) method is a rapid and reliable method for microorganisms identification, specially for the identification of bacteria. In

this work it was performed MALDI-TOF MS identification of totally 711 bacterial isolates from dairy products and dairy plants. In sum 90.9 % isolates was identified reliably at least on the genus level. The reliability level of the genus and species identification is influenced not only by the choice of an appropriate method for the sample preparation, but also by the phylogenetic relations within the genera scope and by the presence of accordant proteins profiles in the reference database. The species identification is then more fastidious for single species in the species groups (e.g. the *Bacillus cereus* group, the *Enterobacter cloacae* complex, the *Pseudomonas* spp. species groups). It was also found, that the Biotyper 3.1 database (Bruker Daltonics, Germany) covers sufficiently the common bacterial microflora of dairy products, when by use this database and the MALDI-TOF MS method they were identified bacterial isolates totally ranking into 39 genera.

**Key words:** MALDI-TOF MS, Biotyper, identification, spoilage bacteria, dairy products.

## Úvod

Identifikace bakterií patří mezi důležité úkony laboratorní mikrobiologické praxe mlékárenského průmyslu s tím, že v mnoha případech se však jedná o náročný úkol vzhledem k současným nárokům na rychlost, přesnost a zároveň jednoduchost stanovení.

Tradiční bakteriální taxonomie byla a prozatím stále je založena na fenotypových vlastnostech bakterií. Mezi sledované fenotypové vlastnosti patří taková kritéria jako morfologie kolonií a buněk, optimální kultivační podmínky, nároky na výživu a zvláště průkaz aktivity specifických enzymů (Moore *et al.*, 2010; Kampfer a Glaeser, 2012). Všechny tyto fenotypové znaky jsou přitom pouze pozorovatelným důsledkem exprese genů kódovaných v bakteriální DNA, kdy je tato exprese široce ovlivněna environmentálními a dalšími podmínkami. Fenotypové znaky jsou dále snadno rozpoznatelné a velmi komplexní (Moore *et al.*, 2010; Kampfer a Glaeser, 2012). Hlavním úkolem fenotypového způsobu identifikace je tedy výběr takové reprezentativní skupiny znaků (morfologických, fyziologických a biochemických vlastností), která umožní spolehlivou identifikaci a/nebo alespoň dostatečně odlišení cílové skupiny mikroorganismů (např. čeledi, rodu, druhu). Pro okruhy cílových, fenotypově dobře definovaných bakteriálních rodů a/nebo druhů významných v potravinářské praxi jsou takové skupiny znaků stanoveny. Testovaný izolát je obvykle nejdříve na základě několika základních znaků (Gramovo barvení a tvar buněk, vhodné kultivační podmínky - atmosféra, teplota aj., produkce katalázy, oxidázy, způsob utilizace glukózy, případně další) zařazen do některé větší taxonomické skupiny bakterií (např. gram-pozitivní kataláza pozitivní koky), pro kterou jsou navrženy další, již specifické identifikační biochemické testy (např. STAPHYtest 24, Erba Lachema). Alternativou tohoto postupu je využití vhodných selektivně-diagnostických médií s případnou další confirmací suspektních kolonií.

Praktickou nevýhodou těchto kultivačních postupů je jejich náročnost na práci, materiál a čas i odečet výsledků (obvykle barevné změny indikátorů, zvláště acidobazických). Výhodou poté je, že tyto postupy nejsou náročné na přístrojové vybavení a samotné provedení. Specifickým problémem této metody je výběr testovaných biochemických vlastností. Pro rutinní identifikaci jednotlivých skupin mikroorganismů (např. G<sup>+</sup> koků, kataláza pozitivních) lze z praktických důvodů vybrat pouze omezený počet testů. Tyto testy by přitom měly pro jednotlivé identifikované skupiny (např. pro jednotlivé druhy stafylokoků) poskytovat co nejvíce shodný výsledek (tzn. být dostatečně specifické) a naopak, pro blízce příbuzné odlišné skupiny poskytovat co nejčastěji odlišný výsledek (tzn. být dostatečně selektivní). Často jsou však dostatečně podrobně fenotypově popsány jen některé rody a druhy, nebo vybrané testy nemohou rozlišit některé druhy či identifikace selhává u kmenů daného druhu s atypickými fenotypovými znaky, pokud jsou tyto znaky dostatečně významné pro identifikaci. Celkově lze tedy říci, že přesnost identifikace je úměrná znalostem o fenotypových vlastnostech daného rodu či druhu a počtu provedených testů.

Další metodou pro identifikaci bakterií je identifikace založená na analýze jejich DNA. Taxonomie založená na srovnání DNA jednotlivých mikroorganismů začala být zaváděna a vyvíjena od 60. let 20. století (Kampfer a Glaeser, 2012). Míra shody DNA různých rodů a druhů umožňuje jejich hierarchizace v závislosti na tom, jak docházelo v průběhu evoluce k jejich diverzifikaci. Základní metodou pro fylogenetickou analýzu je srovnání kompletních DNA sekvencí (Wayne *et al.*, 1987), kdy v rámci druhu by tato shoda měla být minimálně 70 % a výše. Jednodušším, avšak funkčním přístupem je srovnání pouze DNA sekvencí konzervovaných genů, jejichž počet je ve všech prokaryotických organismech odhadován na méně než 50 (Koonin a Wolf, 2008). Pro identifikaci bakterií je nejčastěji používána sekvence genu pro 16S rRNA podjednotku ribozómu (v rámci druhu shoda obvykle minimálně 97,5 %), navzdory některým nevýhodám jako je chybějící standardizace experimentálních protokolů či 2-5 % odchylka v sekvencích jednotlivých kopií tohoto genu v rámci jednoho genomu (Stackebrandt, 2002; Ludwig, 2010; Moore *et al.*, 2010). Mezi další geny, jejichž DNA sekvence jsou často srovnávány v případě nejednoznačné identifikace na základě sekvenace genu 16S rRNA, patří např. gen pro 23S rRNA podjednotku ribozómu, geny kódující translační, elongační a iniciační faktory, geny kódující podjednotky RNA polymerázy, ATPázy, DNA gyrázy či geny kódující RecA proteiny či proteiny tepelného a chladového šoku. Evoluční změny u těchto konzervovaných genů probíhají podobně velmi pomalou rychlostí, a proto při svém využití pro identifikaci poskytují i velmi shodné výsledky, v některých případech však přesnější (Ludwig, 2010). Míra shody mezi srovnáním kompletních sekvencí DNA-DNA a sekvencí vybrané části genu pro 16S rRNA není úplná, navzájem si však odpovídají a doplňují se (Stackebrandt a Goebel, 1994). Sekvenace části genu pro 16S rRNA je

považována za vhodnou pro odlišení rodů a pouze málo příbuzných druhů, pro něž je vzájemná míra shody sekvencí pro gen 16S rRNA nižší než 97,5 %. Naopak srovnání kompletních molekul DNA-DNA zůstává vhodnou metodou pro definici druhu a stanovení míry mezidruhové příbuznosti a nemůže být nahrazeno srovnáním sekvencí genů pro 16S rRNA, z důvodu jeho konzervované a oproti ostatním sekvencím genomu příliš pomalu se měnící struktury. Zároveň je však doporučováno vhodně do procesu odlišení jednotlivých druhů zahrnout i analýzu sekvencí genů kódujících proteiny (Stackebrandt *et al.*, 2002), čehož se využívá např. při použití multilokusové sekvenční analýzy (MLSA). Výhodou identifikace na základě sekvencí DNA je univerzálnost daného postupu pro všechny taxonomické skupiny a vysoká spolehlivost této metody. Při metodě sekvenace vybraných genů je nutno provést izolaci DNA, PCR amplifikaci vybraných sekvencí včetně přečištění získaných PCR amplikonů a následně provést samotnou sekvenaci, obvykle formou externí služby u specializovaných společností. I tato metoda má určité nároky na čas a práci, především však na laboratorní vybavení a náklady spojené s nákupem potřebných reagentů a provedení sekvenace.

Metoda identifikace bakterií pomocí MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, hmotnostní spektrometrie pomocí laserové desorpce/ionizace za účasti matrice s analyzátozem doby průletu) patří též mezi fenotypové metody. Jedná se však o proteomickou metodu, která pro identifikaci využívá hmotnostní spektrum intracelulárních proteinů přítomných v buňce. Od prvního použití v roce 1975 nastal její bouřlivý rozvoj, kdy v současné době se již stává běžnou identifikační metodou identifikace, zvláště v klinických laboratořích (Croxatto *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2013;). Identifikace mikroorganismů metodou MALDI-TOF MS se skládá z následujících kroků: kultivace mikroorganismů, příprava vzorku a jeho nanesení na ocelovou desku, překrytí vzorku na ocelové desce matricí, získání hmotnostního spektra v hmotnostním spektrometru MALDI-TOF a srovnání získaného průměrného proteinového spektra s databází průměrných proteinových spekter vybraných referenčních kmenů mikroorganismů. Testovaný vzorek je nanesen na jednotlivé spoty ocelové desky a překryt kyselou organickou matricí (obvykle  $\alpha$ -kyano-4-hydroxyskořicová kyselina rozpuštěná v kyselině trifluoroctové a acetonu), se kterou kokrytalizuje a následně je ozářen laserem. Pro látky, které obsahují funkční skupiny schopné přijmout proton, jako jsou aminoskupiny v případě proteinů, je používán tzv. pozitivní ionizační módus. Právě matrice absorbuje energii po ionizaci laserem a při svém vypařování s sebou strhává i molekuly vzorku. Excitované molekuly matrice zároveň slouží vůči vzorku jako donor protonů a vznikají tak dominantně jednomocné pseudomolekulární ionty vzorku typu  $[A+H]^+$ , případně dle podmínek minoritně doprovázené dvojmocnými kationty, dimery či solnými adukty. Matrice tak umožňuje (asistuje) molekulám vzorku přejít do plyn-

ného stavu ve formě kationtů. Tyto kationty jsou následně urychleny elektromagnetickým polem a poté prolétávají vakuovanou letovou trubicí. V lineárním módu je dráha letu lineární, kdy detektor je umístěn za letovou trubicí. Druhá mocnina doby letu (času potřebného k dosažení detektoru) každého kationtu je úměrná poměru jeho hmotnosti a náboje, který je obvykle roven jedné. Výsledkem je tak hmotnostní spektrum testovaného mikroorganismu.

Základní metodou přípravy vzorku je tzv. přímý nános. Jako vzorek je použita přímo mikrobiální kultura, jejíž malé množství je rozetřeno přímo na spoty ocelové desky. Úspěšné použití metody přímého nánosu vyžaduje, aby k dostatečné lýzi buněčné stěny, a tím i k uvolnění intracelulárních proteinů, došlo již pouze působením silně kyselé matrice, případně i během ionizace laserem. Pokud je však buněčná stěna vůči takovému působení odolná (což platí pro některé grampozitivní bakterie, případně kvasinky a plísně), je nutno buněčnou stěnu nejdříve narušit např. aplikací 70% kyseliny mravenčí na již nanesenou kulturu či provést extrakci intracelulárních proteinů samostatně (např. s využitím ethanolu a 70% kyseliny mravenčí) a jako vzorek použít takto získaný extrakt.

Získané proteinové spektrum poté v rozsahu 2 000–20 000 Da obsahuje zejména bazické, středně hydrofobní a hojně se vyskytující proteiny. Jedná se zvláště o ribozomální proteiny, dále proteiny vážící se na DNA, RNA chaperony, proteiny zahrnuté v základních buněčných procesech (reakce na tepelný a chladový šok, dělení buňky, proteiny základních metabolických drah) (Welker, 2011). Sekvence těchto proteinů, esenciálních pro životní pochody buňky podléhají minimálním evolučním změnám a jsou vysoce konzervované v rámci fylogenetických skupin, tj. i v rámci rodů a dostatečně fylogeneticky odlišných druhů a tudíž rodově a druhově specifické. Tento fakt umožňuje spojit na proteomice založenou identifikaci MALDI-TOF MS s identifikací založenou na DNA sekvencích konzervovaných proteinů. Metoda MALDI-TOF MS je tak technikou s vysokým potenciálem pro identifikaci mikroorganismů díky svojí rychlosti, redukovaným nákladům a minimální přípravě vzorku ve srovnání s konvenčními biochemickými a molekulárními technikami (Böhme *et al.*, 2012).

Pro identifikaci získaného proteinového profilu dominuje v současné době (též v použitém systému MALDI Biotyper) tzv. "fingerprintový" přístup (Böhme *et al.*, 2012), spočívající ve využití identifikačních molekulárních otisků. Identifikace je tak prováděna srovnáním proteinového profilu neznámého vzorku s proteinovými profily referenčních kmenů databáze (Welker, 2011; Böhme *et al.*, 2012; Sandrin *et al.*, 2013). Pro identifikaci neznámého vzorku mikroorganismu je získané hmotnostní spektrum převedeno na seznam vrcholů spolu s jejich intenzitou, což představuje identifikační molekulární otisk (tzv. "fingerprint") nebo-li specifický proteinový profil. V dalším kroku je tento identifikátor jako seznam vrcholů spolu s jejich intenzitou srovnáván pomocí srovnávacího algoritmu se stejným identifikátorem pro referenčních kmeny přítomné v databázi. Referenční databáze MALDI Biotyper 3.1 obsahuje



v použité verzi průměrná proteinová spektra 5632 kmenů mikroorganismů pro celkem 2290 druhů převážně bakterií a kvasinek. Pro jednotlivé získané proteinové spektrum je takto stanoveno deset nejvíce shodných referenčních proteinových spekter ("identifikací").

Při srovnání obou spekter (neznámé, identifikované spektrum a referenční spektrum v databázi) se stanoví hodnoty tří základních charakteristik jejich shody z hlediska počtu shodných signálů a jejich intenzity. Násobek těchto hodnot je poté normalizován na maximální hodnotu 1000 (odpovídá úplné shodě). Dekadický logaritmus tohoto skóre se poté označuje jako skóre shody a může nabývat maximální hodnoty 3. Hodnota tohoto skóre shody pak umožňuje klasifikovat spolehlivost identifikace získané na základě srovnání testovaného a referenčního spektra. Databáze MALDI Biotyper 3.1 rozeznává dle hodnoty skóre shody celkem čtyři třídy spolehlivosti: skóre shody v rozsahu 2,300–3,000 (+++) je hodnoceno jako vysoce pravděpodobná druhová identifikace; 2,000–2,299 (++) jako bezpečná rodová identifikace a pravděpodobná druhová identifikace; 1,700–1,999 (+) jako pravděpodobná rodová identifikace; a 0,000–1,699 (–) jako nespolehlivá identifikace. Výsledky jsou též hodnoceny z hlediska konzistence. Druhová konzistence znamená, že byla získána identifikace se skóre shody vyšším nebo rovným 2,0, kdy všechny další výsledky identifikace (celkem 10) se skóre shody vyšším nebo rovným 2,0 se s ní shodují v druhu a výsledky se skóre shody rovným nebo vyšším než 1,7 alespoň v rodě. Při pouze rodové konzistenci se však výsledky identifikace se skóre shody vyšším nebo rovným 2,0 shodují pouze v rodu.

Výhodou metody MALDI-TOF MS oproti fenotypovým biochemickým metodám je přímá detekce samotných proteinů, nikoliv nepřímá detekce jejich předpokládané aktivity. Metoda MALDI-TOF MS disponuje navíc vysokým potenciálem pro identifikaci mikroorganismů s ohledem na její rychlost, redukované náklady a nízké nároky na přípravu vzorku (Böhme *et al.*, 2012). Nevýhodou a značnou překážkou ještě většího rozšíření této metody do mikrobiologické praxe je velmi vysoká pořizovací cena přístroje a referenční databáze.

Mezi hlavní faktory ovlivňující úspěšnou identifikaci metodou MALDI-TOF MS patří vhodnost použité metody přípravy vzorku (v závislosti na buněčné stěně), přítomnost daného druhu/rodu v databázi referenčních spekter a jeho dostatečné pokrytí (rozmanitost proteinových profilů v rámci druhu a jejich zastoupení v databázi) a dobrá definovanost daného druhu, tj. dostatečná odlišitelnost od jiných druhů.

## Materiál a metody

### Testované izoláty bakterií

Testované izoláty bakterií byly poskytnuty pracovištěm VÚM s.r.o., kde byly izolovány ze syrového mléka, z různých mlékárenských výrobků (např. z mléka UHT, ze sýrů a solných nálevů), dále z výrobního zařízení (např. ze sýrařských výrobních linek) a pomůcek (např. ze sýrařských tkaninových plachetek) pomocí plotnové metody.

### Identifikace bakteriálních izolátů metodou MALDI-TOF MS

Pro identifikaci metodou MALDI-TOF MS byla použita bakteriální kultura rostoucí na Columbia agaru s 5 % obj. beraní krve (Bio-Rad, USA) za takových experimentálně nalezených kultivačních podmínek, které umožnily dostatečný nárůst bakteriální kultury v co nejkratším čase. Testovány byly celkem tři kombinace kultivačních podmínek: 24 h, 37 °C; 48 h, 30 °C; 72 h, 25 °C. Identifikace byla provedena na Ústavu biochemie a mikrobiologie, VŠCHT Praha, pomocí přístroje Bruker Autoflex Speed a komerční databáze MALDI Biotyper 3.1 (Bruker Daltonics, SRN). Při práci bylo postupováno podle metod doporučených výrobcem (Anonymous, 2014). Při metodě přímého nánosu byla čistá bakteriální kultura z jedné izolované kolonie nanesena přímo na spoty kovové desky v alespoň dvou paralelách o rozdílném množství nanesených buněk. Při metodě rozšířeného přímého nánosu byly vzorky do 30 min převrstveny 2 µl 70% vodného roztoku kyseliny mravenčí. Extrakční metoda využívala extrakci s použitím ethanolu a 70% kyseliny mravenčí. Bakteriální kultura (cca 10 µl) byla resuspendována ve sterilní destilované vodě (300 µl) (vortexování 5–10 s), smíchána s 98% ethanolem (900 µl) (Lachner, ČR) a 2x odstředěna (15 000 g, 2 min). Supernatant byl pokaždé pečlivě odstraněn. 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 naneseny 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 (15 min) včetně proteinového standardu byly překryty matricovým roztokem (1 µl) a ponechány krystalizaci (10 min). Matricový 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).

Metodou první volby pro přípravu vzorků byla u všech bakteriálních izolátů metoda přímého nánosu. V případě, že tato metoda neposkytla dostatečně spolehlivé výsledky (skóre spolehlivosti nižší než 2,0) byla jako metoda druhé volby použita metoda rozšířeného přímého nánosu a jako metoda třetí volby extrakce ethanolem a 70% kyselinou mravenčí.

### Výsledky a diskuse

Identifikace metodou MALDI-TOF MS byla provedena u celkem 711 izolátů získaných z mlékárenských produktů. Celkem 91 % bakteriálních izolátů bylo při metodě přímého nánosu (metoda první volby) identifikováno minimálně na úrovni pravděpodobné rodové identifikace

**Tab. 1** Procentuální vyjádření výskytu jednotlivých skupin bakterií a bakteriálních rodů mezi testovanými bakteriálními izoláty a počet odpovídajících referenčních proteinových profilů přítomných v databázi Biotyper 3.1

	Rod	Četnost výskytu izolátů		Biotyper 3.1	
		Počet izolátů %	% testovaných izolátů	Počet referenčních profilů	Počet druhů
G+ tyčinky	<i>Bacillus</i>	145	20,4	131	103
	<i>Lactobacillus</i>	16	2,3	230	97
	<i>Microbacterium</i>	4	0,6	48	38
	<i>Paenibacillus</i>	2	0,3	112	67
	<i>Cellulosimicrobium</i>	2	0,3	2	1
	<i>Brevibacillus</i>	1	0,1	14	10
	<i>Lysinibacillus</i>	1	0,1	12	6
	<i>Corynebacterium</i>	1	0,1	169	72
	<i>Dietzia</i>	1	0,1	6	3
	<b>Celkem</b>	<b>173</b>	<b>24,3</b>	<b>724</b>	<b>397</b>
G+ koky, kataláza pozitivní	<i>Staphylococcus</i>	87	12,2	162	39
	<i>Kocuria</i>	18	2,5	22	11
	<i>Micrococcus</i>	8	1,1	21	4
	<i>Macrococcus</i>	4	0,6	7	1
	<i>Aerococcus</i>	1	0,1	32	5
<b>Celkem</b>	<b>118</b>	<b>16,6</b>	<b>244</b>	<b>60</b>	
G+ koky, kataláza negativní	<i>Enterococcus</i>	65	9,1	70	34
	<i>Lactococcus</i>	21	3,0	16	5
	<i>Leuconostoc</i>	9	1,3	20	9
	<i>Streptococcus</i>	4	0,6	143	68
<b>Celkem</b>	<b>99</b>	<b>13,9</b>	<b>249</b>	<b>116</b>	
Čeleď <i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Enterobacter cloacae</i> komplex	37	5,2	22	6
	<i>Klebsiella</i>	26	3,7	31	3
	<i>Escherichia</i>	23	3,2	20	5
	<i>Serratia</i>	20	2,8	37	12
	<i>Citrobacter</i>	13	1,8	21	10
	<i>Raoultella</i>	10	1,4	24	3
	<i>Lelliottia</i>	4	0,6	5	1
	<i>Proteus</i>	3	0,4	32	5
	<i>Delftia</i>	2	0,3	10	2
	<i>Kluyvera</i>	2	0,3	6	4
	<i>Shewanella</i>	2	0,3	9	6
	<i>Hafnia</i>	1	0,1	7	1
	<i>Morganella</i>	1	0,1	16	1
	<b>Celkem</b>	<b>144</b>	<b>20,3</b>	<b>240</b>	<b>59</b>
Ostatní G- tyčinky	<i>Pseudomonas</i>	49	6,9	151	85
	<i>Acinetobacter</i>	30	4,2	82	22
	<i>Stenotrophomonas</i>	16	2,3	14	5
	<i>Aeromonas</i>	6	0,8	45	18
	<i>Chryseobacterium</i>	6	0,8	9	15
	<i>Empedobacter</i>	2	0,3	2	1
	<i>Psychrobacter</i>	2	0,3	3	2
	<i>Sphingobacterium</i>	1	0,1	16	6
	<b>Celkem</b>	<b>112</b>	<b>15,8</b>	<b>322</b>	<b>154</b>

(skóre shody rovno nebo vyšší než 1,7). Pro další zvýšení spolehlivosti identifikace až na úroveň bezpečné rodové a/nebo vysoce pravděpodobné druhové identifikace byla proto u izolátů identifikovaných se skóre shody nižším než 2,0, případně 2,3 provedena reidentifikace za využití metod rozšířeného přímého nánosu či extrakce ethanolem a 70% kyselinou mravenčí. U vybraných izolátů rodů *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Staphylococcus*, *Lactococcus*, *Serratia*,

*Pseudomonas* a *Acinetobacter* byl poté výsledek identifikace metodou MALDI-TOF MS úspěšně potvrzen i dalšími metodami (biochemické testy, sekvenace, PCR detekce) (Jebavá *et al.*, 2013; Šviráková *et al.*, 2014; Šviráková *et al.*, 2015; Šviráková *et al.*, 2017). Výsledky rodového stanovení pro jednotlivé vyšší taxonomické skupiny bakterií včetně počtu referenčních proteinových spekter přítomných v použité databázi Biotyper 3.1 jsou uvedeny v Tab. 1.

V případě grampozitivních tyčinek bylo identifikováno celkem 9 rodů, které tak tvořily 24,3 % všech testovaných izolátů. Nejčetněji byl zastoupen rod *Bacillus* (20,4 %), zvláště druhy *B. licheniformis* (11,7 %), *B. subtilis* (2,7 %), *B. cereus* group (2,4 %) a *B. pumilus* (2,1 %). Výrazně méně byly poté zastoupeny izoláty rodu *Lactobacillus* (2,3 %) a dalších sedmi rodů, které tvořily pouze 1,7 % všech izolátů. Nejvíce spolehlivou metodou přípravy vzorku pro identifikaci izolátů grampozitivních tyčinek, zvláště bacilů, na minimálně bezpečné rodové a pravděpodobné druhové úrovni (skóre shody rovno nebo vyšší 2,0) či vysoce pravděpodobné druhové úrovni (skóre shody rovno nebo vyšší 2,3) je extrakce s ethanolem a 70% kyselinou mravenčí. Ve srovnání s dostupnými soupravami biochemických testů umožňuje pak MALDI-TOF MS identifikaci většího spektra rodů i druhů, kdy např. biochemická souprava Microgen™ Bacillus-ID (Microgen, Velká Británie) umožňuje identifikaci mezofilních *Bacillus* spp. a rodů *Paenibacillus* a *Brevibacillus* a souprava API® Coryne (bioMérieux, Francie) poté identifikace rodu *Corynebacterium*. Žádný z těchto testů však neumožňuje spolehlivou identifikaci rodů *Microbacterium*, *Cellulosimicrobium* či *Dietzia*. Další testy však mohou být potřebné pro dostatečné

druhové odlišení jednotlivých druhů druhové skupiny *Bacillus cereus* group (*B. cereus*, *B. mycoides*, *B. pseudomycoides*, *B. thuringiensis*, *B. weihenstephanensis*; *B. anthracis* není zastoupen v databázi Biotyper 3.1).

Grampozitivní koky poté tvořily 30,5 % všech testovaných izolátů. Grampozitivní koky kataláza pozitivní byly zastoupeny rody *Staphylococcus* (12,2 % všech izolátů), nejčastěji se jednalo o *S. epidermidis* (3,4 %), *S. sapro-*

*phyticus* (2,3 %), *S. warneri* (1,5 %) a *S. equorum* (1,0 %). Ostatní čtyři rody *Aerococcus*, *Micrococcus*, *Macrococcus* a *Kocuria* tvořily celkem 4,4 % všech testovaných izolátů. Pro identifikaci se skóre shody alespoň rovným či vyšším než 2,0 je vhodné pro všechny tyto druhy použít alespoň metodu rozšířeného přímého nánosu. Grampozitivní koky kataláza negativní tvořily 13,9 % všech testovaných izolátů, nejčastěji se jednalo o zástupce rodů *Enterococcus* (9,1 %), případně *Lactococcus* (3,9 %), ostatní rody *Leuconostoc* a *Streptococcus* byly již méně časté (1,3 %, resp. 0,6 %). Pro tuto skupinu bakterií je velmi dobrého skóre spolehlivosti dosahováno již při použití metody přímého nánosu, zvláště pak pro *E. faecium* (5,3 % všech izolátů) a *E. faecalis* (2,1 %).

Bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*, které byly identifikovány na alespoň rodové úrovni, tvořily 20,3 % všech izolátů a patřily do celkem 13 rodů. Nejčastěji se jednalo o příslušníky druhové skupiny *Enterobacter cloacae* komplex (5,2 %) a rodů *Klebsiella* (3,7 %), *Escherichia* (3,2 %) a *Serratia* (2,8 %). V případě, že jsou druhy těchto rodů dobře definované a dostatečně odlišitelné od ostatních, je dosahováno vysokých skóre shody již metodou přímého nánosu. Výjimkou je např. nejčastěji zastoupená druhová skupina *Enterobacter cloacae* komplex, která zahrnuje velmi blízké fenotypově i genotypově příbuzné druhy *E. asburiae*, *E. cloacae*, *E. hormaechei*, *E. kobei* a *E. ludwigii*. U některých izolátů těchto druhů je pak pro dostatečné druhové odlišení nutno použít i další identifikační metody. Možným problémem je i fakt, že proteinová spektra *E. coli* a *Shigella* spp., jejíž spektrum ovšem v databázi Biotyper 3.1 není zahrnuto, nelze použitými metodami identifikace (srovnání proteinových spekter) vzhledem k vysoké genotypové příbuznosti odlišit (při posouzení pouze podle míry shody DNA by náležely *E. coli* a *Shigella* spp. do jediného druhu) (Croxatto et al., 2012).

Ostatní gramnegativní tyčinky tvořily 15,8 % všech testovaných izolátů. Dominantními rody zde byly *Pseudomonas* (6,9 %) a *Acinetobacter* (4,2 %), případně *Stenotrophomonas* (2,3 %). I zde platí, že pokud se jedná o dobře definované a navzájem odlišitelné druhy rodů *Acinetobacter* a *Stenotrophomonas*, postačuje k vysoce spolehlivé identifikaci na rodové i druhové úrovni již metoda přímého nánosu. V případě rodu *Pseudomonas* může být opět problémem vysoká genotypová příbuznost některých druhů v rámci tzv. druhových skupin (*Pseudomonas fluorescens* group, *Pseudomonas putida* group apod.). U některých izolátů v rámci těchto druhových skupin je pak opět pro dostatečné druhové odlišení nutno použít i další metody identifikace.

Celkem 64 izolátů (9 % všech izolátů) se nepodařilo identifikovat ani na úrovni pravděpodobné rodové identifikace (skóre shody nižší než 1,7). U celkem 34 izolátů (4,8 % všech izolátů) nebyl získán žádnou z uvedených metod dostatečně kvalitní proteinový profil. U dalších 30 izolátů (4,2 % všech izolátů) byl získán kvalitní proteinový profil, nebyly však identifikovány na dostatečné úrovni skóre shody s žádným proteinovým spektrem v referenční databázi Biotyper 3.1. Lze tedy předpokládat, že se

jedná o některý rod či druh, jehož referenční spektra v databázi Biotyper 3.1 přítomna nejsou. Tento předpoklad se potvrdil např. u jednoho z těchto izolátů, který byl následně úspěšně biochemicky identifikován jako *Cronobacter malonaticus*, který však prozatím v databázi Biotyper 3.1 není zahrnut.

## Závěr

Úspěšná identifikace 711 bakteriálních izolátů s využitím fenotypové metody MALDI-TOF MS potvrdila vhodnost této metody pro identifikaci bakterií způsobujících kažení mlékařských produktů. Použité metody přípravy vzorku a databáze Biotyper 3.1 umožnily na alespoň rodové úrovni identifikovat 91 % izolátů. Databáze Biotyper 3.1 tedy dostatečně pokrývá běžné bakteriální rody a druhy přítomné v mlékařských výrobcích. Výhodou této metody je možnost rychlé analýzy relativně velkého počtu vzorků, naopak nevýhodou je naopak vysoká pořizovací cena přístroje a zpoplatnění referenčních databází. Poznatky z této práce mohou být aplikovatelné do potravinářské praxe při zavádění metody MALDI-TOF MS pro identifikaci mikroorganismů, kdy přináší praktické poznatky o volbě vhodných metod přípravy vzorku pro jednotlivé skupiny bakterií.

## Poděkování

Tato práce byla podpořena Ministerstvem zemědělství České republiky, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékařských 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/massspectrometry-and-separations/maldi-biotyper-ca-system/service-support.html>; staženo 14.11.2018.
- BÖHME K., FERNÁNDEZ-NO I., BARROS-VELÁZQUEZ J., GALLARDO M. J., CANAS B., CALO-MATA P. (2012). *Species Identification of Food Spoilage and Pathogenic Bacteria by MALDI-TOF Mass Fingerprinting*. Food Quality, Kostas Kapis, IntechOpen: <https://www.intechopen.com/books/food-quality/species-identification-of-food-spoilage-and-pathogenic-bacteria-by-maldi-tof-mass-fingerprinting>.
- CROXATTO A., PROD'HOM G., GREUB G. (2012). Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 36 (2): 380-407.
- JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S., HANUŠOVÁ J., SAVICKÁ D., ŠVIRÁKOVÁ E., NĚMEČKOVÁ I., DEMNEROVÁ K. (2013). Identifikace mikrobiálních původců vad mlékařských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. *Mlékařské listy* 138: 10-14.
- KAMPFER P., GLAESER S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environ Microbiol* 14 (2): 291-317.
- KOONIN E. V., WOLF Y. I. (2008). Genomics of bacteria and archaea: the emerging dynamic view of the prokaryotic world. *Nucleic Acids Res* 36 (21): 6688-719.
- LUDWIG W. (2010). Molecular phylogeny of microorganisms: is rRNA still a useful marker? In: Papke R.T., Oren A. (eds.), *Molecular Phylogeny of Microorganisms*. Caister Academic Press: Poole, Great Britain.



- MOORE E. R., MIHAYLOVA S. A., VANDAMME P., KRICHEVSKY M. I., DIJKSHOORN L. (2010). Microbial systematics and taxonomy: relevance for a microbial commons. *Res Microbiol* 161 (6): 430-8.
- SANDRIN T. R., GOLDSTEIN J. E., SCHUMAKER S. (2013). MALDI TOF MS profiling of bacteria at the strain level: a review. *Mass Spectrometry Reviews* 32 (3): 188-217.
- STACKEBRANDT E. (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 (3): 1043-47.
- 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., VAUTERIN L., WARD A. C., WHITMAN W. B. (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 (3): 1043-47.
- STACKEBRANDT E., GOEBEL B. M. (1994). Taxonomic note: a Place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology* 44 (4): 846-49.
- ŠVIRÁKOVÁ E., HANUŠOVÁ J., MÚHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S. (2014). Identifikace *Bacillus* sp. izolovaných z mlékařenských výrobků a výrobních zařízení pomocí molekulárně-biologických metod. *Mlékařské listy* 146: 25-28.
- ŠVIRÁKOVÁ E., MÚHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., PURKRTOVÁ S., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J. (2015). Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. *Mlékařské listy* 150: 14-20.
- ŠVIRÁKOVÁ E., PURKRTOVÁ S., NĚMEČKOVÁ I., KARPÍŠKOVÁ R., JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J. (2017). Metody identifikace a charakterizace potravinářských průmyslových izolátů *Pseudomonas* spp. *Mlékařské listy* 161: 13-20.
- WAYNE L. G., BRENNER D. J., COLWELL R. R., GRIMONT P. A. D., KANDLER O., KRICHEVSKY M. I., MOORE L. H., MOORE W. E. C., MURRAY R. G. E., STACKEBRANDT E., STARR M. P., TRUPER H. G. (1987). Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International Journal of Systematic Bacteriology* 37 (4): 463-64.
- WELKER M. (2011). Proteomics for routine identification of microorganisms. *Proteomics* 11 (15): 3143-53.

Přijato do tisku: 30. 11. 2018

Lektorováno: 3. 12. 2018

#### INFORMACE

## MÁME JÍST NÍZKOTUČNÉ, NEBO PLNOTUČNÉ MLÉČNÉ VÝROBKY? ODBORNÍCI SE NESHODNOU

Pokud nemáte jasno o tom, zda je lepší jíst a pít nízkotučné mléčné výrobky, nebo volit raději ty plnotučné, nejste v tom sami. Ani odborníci na výživu nebo lékaři nezastávají jednoznačný názor. Poslední lékařské výzkumy ale naznačují, že z pohledu rizika kardiovaskulárních chorob podíl tuku nehraje roli.

Je lepší si ráno dopřát s ovesnými vločkami plnotučné mléko, nebo nízkotučné? Podobné pochyby může mít spotřebitel, když zvažuje, jaký koupit jogurt, tvaroh, sýry. Je zdravější plnotučná verze mléčných výrobků bez dalších přidaných látek, nebo naopak nízkotučná, respektive "light verze"?

Australský epidemiolog a odborník na výživu Malcom Riley tvrdí, že v případě, že člověk chce zredukovat váhu, je lepší vybírat nízkotučné varianty mléčných výrobků. Většinou obsahují o 25 až 100 procent méně mléčných tuků než plnohodnotné varianty výrobků.

### Pozor na cukr

Dietologové většinou doporučují, aby lidé preferovali nízkotučné mléko, jogurt i sýry. "Je třeba si ale uvědomit, že některé light mléčné výrobky mohou obsahovat větší množství cukru. Že obsahují méně tuků neznamená, že mají nižší energetickou hodnotu. Je potřeba věnovat pozornost složení konkrétního výrobku," zdůraznil Riley.

Lékařka a expertka na výživu Evangeline Mantziorisová z univerzity South Australia upozorňuje, že odpověď na otázku, zda první varianta je lepší než druhá, není vůbec jednoznačná. Sama by preferovala spíše plnotučnou neupravenou variantu mléčných výrobků.

Podle ní nedávná americká studie, která sledovala vybranou skupinu lidí po dobu 22 let, neprokázala, že konzumace plnotučného mléka má negativní dopad na výskyt kardiovaskulárních chorob. Naopak jedna z mastných kyselin obsažená v mléce naopak snižuje riziko úmrtí na infarkt nebo mrtvici.

Další studie publikovaná v roce 2017 rovněž neprokázala, že by konzumace nízkotučných mléčných výrobků měla vliv na výskyt kardiovaskulárních nemocí.

"V současné době závěry studií naznačují, že konzumace nízkotučných mléčných výrobků oproti plnotučným neznamená rozdíl, pokud jde o riziko nemocí srdce a předčasné úmrtí," uvedla Mantziorisová. Pokud ale lidé bojují s nadváhou, měli by si příjem tuků hlídat.

Dostupné na WWW: (<https://www.euro.cz/light/jist-nizkotucne-nebo-plnotucne-mlece-vyroby-odbornici-se-neshodnou-1428628>) /Gryc/