



## Certifikovaná metodika QJ1210300-3

s názvem

**„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“.**

**Certifikovaná uplatněná metodika, doporučení a postupy v systému kontroly technologické nerizikovosti mlékárenských surovin a výrobků, včetně výrobního zařízení, s důrazem na eliminaci kontaminujících bakterií rodu *Acinetobacter*, za pomoci moderních genotypových metod využitelných v kontrolních laboratořích.**

### **Náplň certifikované uplatněné metodiky**

Implementace dosažených výsledků získaných na základě předchozího teoretického studia a experimentálního výzkumu v rámci řešení projektu podpořeného Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem QJ1210300 - Systémy jištění kvality a bezpečnosti mlékárenských výrobků vhodnými metodami aplikovatelnými v praxi (2012-2016, MZE/QJ), v programu QJ - Komplexní udržitelné systémy v zemědělství 2012-2018 „KUS“ (2012-2018).

### **Zdroj certifikované uplatněné metodiky**

Projekt Ministerstvem zemědělství, Národní agentury pro zemědělský výzkum, projekt KUS QJ1210300.

**Certifikovaná metodika byla zpracována dne: 10. 11. 2015.**

**Autory certifikované metodiky jsou:**

**Ing. Eva Šviráková, Ph.D.:**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav konzervace potravin,  
procento podílu práce: 52 %,

**Ing. Andrea Mühlhansová:**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav mléka, tuků a kosmetiky,  
procento podílu práce: 20 %,

**Ing. Sabina Purkrťová, Ph.D.:**

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Ústav biochemie a mikrobiologie,  
procento podílu práce: 2 %,

**Ing. Irena Němečková, Ph.D.:**

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,  
procento podílu práce: 2 %,

**Ing. Markéta Jelínková, Ph.D.:**

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i, Středisko sekvenování DNA,  
procento podílu práce: 12 %,

**Dr. Jürgen Felsberg, CSc.:**

Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i, Středisko sekvenování DNA,  
procento podílu práce: 12 %.

**Zástupcem autorského týmu je: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.**

**Uplatnění bylo provedeno zavedením všech principů a postupů metodiky ode dne:  
19. 11. 2015.**

**OBSAH CERTIFIKOVANÉ METODIKY**

**I. CÍL METODIKY**

**II. VLASTNÍ POPIS METODIKY**

**III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“**

**IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY**

**V. EKONOMICKÉ ASPEKTY**

**VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY**

**VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE**

## I. CÍL METODIKY

Cílem předkládané certifikované metodiky je navržení metody podmínek polymerázové řetězové reakce (PCR), konkrétně rodově specifických primerů designovaných se znalostí sekvence genové oblasti 16S rRNA, která umožňuje zjistit přítomnost bakterií rodu *Acinetobacter*, izolovaných primárně ve formě kolonií z tekutých i pevných mlékárenských výrobků, včetně kontaminovaného mlékárenského výrobního zařízení a pomůcek.

## II. VLASTNÍ POPIS METODIKY

### A) ÚVOD

V mlékárenském průmyslu se často vyskytuje mikrobiální kontaminace způsobená různými nepatogenními mikroorganismy, mezi které patří například i bakterie rodu *Acinetobacter* spadající do skupiny technologicky rizikových mikroorganismů, které negativně ovlivňují chuť, vůni i texturu mléčných výrobků. Bakterie rodu *Acinetobacter* patří do skupiny gramnegativních, nesporulujících, nefermentujících, striktně aerobních bakterií. Představují důležité půdní a vodní bakterie s širokým výskytem v přírodě, potravinářských surovinách, potravinách a lidských zdrojích. Acinetobakterie představují zdravotní riziko u imunokompromitovaných jedinců, nejčastěji ve formě nozokomiálních infekcí. V mlékárenském průmyslu jsou technologicky rizikové a způsobují zde vážné problémy ve spojitosti s mnoha senzoryckými a texturními vadami výrobků, například s bombážováním mlék UHT.

Klasické mikrobiologické metody stanovení bakterií rodu *Acinetobacter*, které využívají schopnosti jejich růstu na selektivních médiích, nejsou bohužel dostatečně spolehlivé (Quigley a kol., 2013). Vhodným řešením spolehlivé identifikace acinetobakterií jsou molekulárně-biologické metody, konkrétně metoda polymerázové řetězové reakce (PCR) využívající rodově nebo druhově specifické primery. Acinetobakterie mohou být takto identifikovány relativně rychle a především s vysokou spolehlivostí.

### B) SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

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

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

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

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

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

Buňky rodu *Acinetobacter* tvoří gramnegativní, nepohyblivé, nefermentující, enkapsulované, kokobacilové tyčinky se striktně aerobním metabolismem; katalasa-pozitivní, indol-negativní a oxidasa-negativní (Doughari a kol., 2011). Mnoho kmenů není schopno redukovat dusičnany na dusitany (Bergogne-Bérézin 2009). V exponenciální fázi růstu jsou

tyčinky široké 0,9-1,0  $\mu\text{m}$  a dlouhé 1,5-2,5  $\mu\text{m}$ . Optimální teplota růstu acinetobakterií se pohybuje okolo 33-35  $^{\circ}\text{C}$ ; některé druhy však vykazují psychrotrofní nebo termofilní vlastnosti (Doughari a kol., 2011). Některé kmeny dokáží přežít až teplotu 53  $^{\circ}\text{C}$  (Yavankar a kol., 2007). Klinické izoláty rostou v rozmezí 28-44  $^{\circ}\text{C}$ , nejlépe však při teplotách 37-42  $^{\circ}\text{C}$ . Ostatní izoláty z přírodního prostředí, včetně potravin, rostou nejlépe v teplotním rozmezí 20-30  $^{\circ}\text{C}$ . Acinetobakterie jsou chemoheterotrofními bakteriemi (Doughari a kol., 2011).

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

V současné době je nejčastějším způsobem genotypické identifikace bakterií sekvenování genu kódujícího syntézu 16S rRNA. Produkt tohoto genu, dlouhého 1500 nukleotidů, tvoří s dalšími přibližně 30 proteiny malou ribozomální podjednotku 30S. Sekvenování tohoto genu o délce alespoň 500 nukleotidů se ukázalo být nejpřesnější a nejrychlejší metodou identifikace širokého spektra bakterií, a to jak aerobních, tak anaerobních. Další možností identifikace bakterií je například amplifikace a sekvenování genu  $\beta$ -podjednotky RNA polymerasy (*rpoB*) s využitím metody denaturační gradientové gelové elektroforézy (DGGE, Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) (Deperrois-Lafarge a Meheut, 2012; Gurung a kol., 2013). K dalším genotypizačním metodám se dá řadit metoda multilokusové sekvenční typizace (MLST, MultiLocus Sequence Typing) (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 genotypových molekulárně-biologických metod lze dále zvažovat použití metod AFLP, ARDRA, hybridizace DNA, LAMP, ribotypizace, metody PCR v různých modifikacích (Liu, 2011).

Další z možností detekce a identifikace acinetobakterií představují fenotypové instrumentální metody, ke kterým se řadí např. metody MALDI-TOF MS (Wieser a kol., 2012) a DART MS, navzdory svým omezením v podobě nižší citlivosti. Z biochemických testů je možné uvést použití systému API 20 NE (bioMérieux) a dalších komerčních systémů, jako jsou například Vitek2, Phoenix nebo MicroScan WalkAway. Nicméně, tyto metody neumožňují jednoznačnou identifikaci druhů *Acinetobacter* spp., zejména druhů *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* a acinetobakterií komplexu ACB (tzn. komplexu zahrnujícího *Acinetobacter baumannii*, *Acinetobacter calcoaceticus* a *Acinetobacter* genomický druh 13TU) (Liu, 2011).

## C) MATERIÁL A METODY

### Izolace bakterií z mlékárenských výrobků

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

Columbia agar s 5 % (obj.) beraní krve (Bio-Rad, USA). V Tabulce I jsou uvedeny použité izoláty acinetobakterií. Jedná se o 10 izolátů získaných z potravinářského průmyslu a jeden sbírkový izolát získaný z České sbírky mikroorganismů (CCM).

**Tabulka I Použité izoláty acinetobakterií a jejich původ**

Označení izolátu	Název rodu a druhu izolátu	Původ izolátu
CCM 4353	<i>Acinetobacter baumannii</i>	OLMA, a.s. Izolát z pasterovaného mléka Skupina biologického nebezpečí: 2 Deponováno: Česká sbírka mikroorganismů, Brno
N35	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	Solný nálev Datum výroby: 25. 7. 2011 Šarže 206, zapáchající bílé sýry
PM27	<i>Acinetobacter</i> komplex: <i>Acinetobacter baumannii</i> kmen RS021- - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - - <i>Acinetobacter pittii</i>	Syrové mléko Úchovný tank č. 4
MO2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Mléko UHT Bombážované mléko
O6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Syrové mléko Cisterna č. 4
O9	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Syrové mléko Cisterna č. 7
O16	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Syrové mléko Cisterna č. 9
O73	<i>Acinetobacter baumannii</i>	Syrové mléko Bazén
1TBX1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	Tvarohárna, obraceč Stěr: 22. 7. 2013
GTKM35	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	Plachetka před balením bílých sýru Sýrárna
66- GTKM6,5-0	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	Solný nálev Datum výroby: 5. 7. 2011 Šarže 206, zapáchající bílé sýry

## Kultivace a biochemická identifikace bakteriálních izolátů

Bakteriální izoláty byly inokulovány frakcionovaným roztěrem na povrch Columbia agaru s 5 % (obj.) beraní krve, kultivovány při teplotě 37 °C (klinický sbírkový izolát) nebo při teplotách 30 °C a 25 °C (izoláty z průmyslu), po dobu 24 h, za aerobních podmínek. Izoláty byly následně podrobeny makroskopickému vyhodnocení morfologie kolonií narostlých na površích Petriho misek, Gramovu barvení, mikroskopickému pozorování morfologie buněk s využitím optického mikroskopu DFC 320 (Leica, SRN), a také identifikaci pomocí biochemického testu API 20 NE (bioMérieux, FR). Izoláty dobře rostly také v tekutém syntetickém růstovém Trypton-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.

## Pre-identifikace bakteriálních izolátů pomocí metody MALDI-TOF MS

Z důvodu zjištění základních identifikačních informací, o jaké průmyslové izoláty se vlastně jedná, byla uskutečněna jejich pre-identifikace pomocí zvolené fenotypové instrumentální metody, kterou byla MALDI-TOF MS. Analýzy probíhaly na přístroji Bruker Autoflex Speeds (SRN) s využitím komerční databáze MALDI Biotyper 3.0, spolu s metodami doporučenými výrobcem v závislosti na stavbě buněčné stěny (Anonymous, 2014). Při metodě přímé aplikace byla mikrobiální kultura z jedné izolované kolonie nanesena přímo na spoty kovové desky ve dvou paralelách o rozdílném množství nanesených buněk. Extrakční metoda využívala extrakci s použitím ethanolu a 70% kyseliny mravenčí. Mikrobiální kultura (cca 10 µl) byla resuspendována ve sterilní destilované vodě (300 µl) (vortexování 5-10 s), smíchána s 98% ethanolem (900 µl) (Lachner, ČR) a 2x odstředěna (15 000 g, 2 min). Supernatant byl pokaždé pečlivě odlit. Po vysušení na vzduchu (10 min) byla peleta buněk vortexováním resuspendována v 70% kyselině mravenčí (50 µl) (Sigma Aldrich, SRN), důkladně promíchána s acetonitrilem (50 µl) (Sigma Aldrich, SRN) a odstředěna (15 000 g, 2 min). Na spoty kovové desky byly ihned 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 (10 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).

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

## Identifikace izolátů acinetobakterií pomocí metody sekvenace úseku genů 16S rRNA

### • Izolace chromozomální DNA z acinetobakterií

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

### • Příprava produktu PCR pro sekvenaci acinetobakterií

Pro sekvenaci 16S rDNA testovaných acinetobakterových izolátů bylo třeba získat nejdříve produkt polymerázové řetězové reakce - PCR produkt. Byla proto použita metoda PCR s primery W001 (AGATTTGATCMTGGCTC) a W002 (GNTACCTTGTTACGACTT). Složení PCR mixu je uvedeno v Tabulce II. Průběh PCR byl následující: iniciační denaturace (při teplotě 95 °C po dobu 5 min), následovalo 40 reakčních cyklů: denaturace (při teplotě 95 °C po dobu 60 s), připojení primerů (při teplotě 50 °C po dobu 60 s) a prodloužení (elongace) řetězce (při teplotě 72 °C po dobu 90 s). Poslední krok proběhl při teplotě 72 °C po dobu 10 min. Po uskutečnění PCR amplifikace byla přítomnost produktů PCR reakce zjišťována pomocí horizontální gelové elektroforózy. Gel pro elektroforózu byl připraven z agarosy (1,0 % hm.) a pufru TBE s přísadkou barviva Sybr Safe (10 µl) (Invitrogen, USA). Byl smíchán amplifikát (5 µl) s pufrem Gel Loading Buffer (2 µl) (Invitrogen, USA) a směs pipetována do příslušných otvorů v gelu. Do prvního a posledního otvoru v gelu byl pipetován marker (3 µl) (Invitrogen, USA) a 1 kb DNA Ladder (3 µl) (Invitrogen, USA). Migrace probíhala při konstantním napětí 100 V po dobu 60 min.

**Tabulka II Složení PCR mixu pro sekvenování acinetobakterových izolátů**

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



- **Přečištění produktu PCR před sekvenční reakcí**

Přečištění produktů PCR reakce probíhalo pomocí komerční soupravy QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, SRN). Nejdříve byly produkty PCR smíchány s pufrem PB (v poměru 1:5). Poté byly připravené vzorky naneseny na kolonky a odstředěny (17 900 g, 60 s, 4 °C). Navázaná DNA na kolonkách byla promyta promývacím pufrem PE (750 µl), s uskutečněným krokem odstředění (17 900 g, 60 s, 4 °C). Poté byl promývací roztok odlit ze sběrných zkumavek a odstředění bylo provedeno opětovně za identických podmínek. K eluci byl použit pufr EB (50 µl), který byl pipetován na střed membrán v kolonkách. Následovalo opět odstředění (17 900 g, 60 s, 4 °C). Pro zvýšení účinnosti byl eluční krok opakován 2x. Ke kontrole přítomnosti PCR produktů po přečištění byla použita separace v agarosovém gelu za pomoci gelové elektroforézy. Přečištěné produkty PCR (o objemu 50 µl) byly připraveny do zkumavek typu Ependorf a odvezeny na vlastní sekvenační analýzu na Středisko sekvenování DNA, Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i. Získané sekvence genových úseků 16S rDNA u acinetobakterií byly porovnány s genovými sekvencemi uvedenými v genové bance NCBI, s využitím algoritmu BLAST (Basic Local Alignment Sequencing Tool).

- **Vlastní sekvenace úseku 16S rDNA u acinetobakterií**

K identifikaci acinetobakterií byla použita tradiční Sangerova sekvenační metoda (Sanger a kol., 1977), nazývaná také jako „dideoxy“ metoda (Rédei, 2008). Metoda byla modifikována dle interních pracovních návodů Střediska sekvenování DNA, Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i., pod vedením dr. Jürgena Felsberga, CSc. Délka sekvenovaného úseku 16S rDNA byla nejčastěji 900-1200 nukleotidů, maximálně 1500 nukleotidů. Sekvenační reakce proběhla za použití sekvenačního kitu BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) s použitím univerzálních primerů pro genový úsek 16S rRNA v 35 cyklech. Vlastní sekvenační analýza probíhala na vysoce výkonném sekvenátoru ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser (Applied Biosystems, Hitachi; nyní Life Technologies).

## **D) VÝSLEDKY**

### **Srovnání pre-identifikace acinetobakterových izolátů pomocí metody MALDI-TOF MS a vlastní identifikace pomocí sekvenování úseku 16S rDNA**

Testované acinetobakterie byly pre-identifikovány pomocí fenotypové metody MALDI-TOF MS a spolehlivě identifikovány pomocí genotypové metody sekvenace úseku 16S rRNA; tyto výsledky jsou uvedeny v Tabulce III.

**Tabulka III Srovnání výsledků pre-identifikace acinetobakterových izolátů pomocí metody MALDI-TOF MS a identifikace pomocí metody sekvenování úseku 16S rRNA**

Označení izolátu	Identifikace pomocí MALDI-TOF MS	Spolehlivost (skóre)	Identifikace pomocí sekvenace 16S rRNA	Výsledná shoda
	Druh		Druh	
CCM 4353	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+++	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A
N35	<i>Acinetobacter pittii</i>	+++**	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	N
PM27*	<i>Acinetobacter pittii</i>	+++**	Acinetobacter komplex: <i>Acinetobacter baumannii</i> - - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> - - <i>Acinetobacter pittii</i>	A
MO2	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+++	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A
O6	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	A
O9	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	A
O16	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	A
O73	<i>Acinetobacter baumannii</i>	+++	<i>Acinetobacter baumannii</i>	A
1TBX1	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	++	<i>Acinetobacter lwoffii</i>	A
GTKM35	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	+++	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	A
66-GTKM6,5-0	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	+++	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	A

++... spolehlivá rodová a pravděpodobná druhová identifikace; +++... spolehlivá rodová a druhová identifikace; A... ano; N... ne; \*... označení izolátu „KONBIO“; \*\*... člen komplexu *Acinetobacter baumannii* / *Acinetobacter calcoaceticus* / *Acinetobacter pittii*; nutnost uskutečnění metody extrakce vzorku před vlastní analýzou MALDI-TOF MS z důvodu spolehlivosti identifikace na úrovni druhu.

Výsledky získané pomocí obou metod byly téměř totožné, pouze izolát N35 patřil do komplexu *Acinetobacter baumannii* / *Acinetobacter calcoaceticus* / *Acinetobacter pittii* a nebylo proto snadné stanovit jeho konkrétní druh.

### **Izolace chromozomální DNA z bakterií rodu *Acinetobacter***

Izolace DNA je základním procesem získávání DNA pro další práci, například pro PCR. Izolace chromozomální DNA z testovaných acinetobakterií probíhala pomocí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN) s využitím enzymatické lýze. Čerstvě narostlé kmeny acinetobakterií byly (po kultivaci v Trypton-sójovém bujónu, při individuálních růstových teplotách pro každý konkrétní kmen, po 18 h, za aerobních podmínek), odstředěny (4550 g, 10 min, 4 °C) a jejich buňky byly promyty ve sterilní destilované vodě (1 ml). K buňkám byl nejdříve přidán lytický pufr (180 µl), který se skládal ze zásobního roztoku: 20 mM Tris-HCl (pH 8,0), 2mM EDTA, 1,2 % Tritonu X-100

(před použitím byl přidán lysozym o koncentraci  $40 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ ) (inkubace probíhala při teplotě  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , po dobu 45 min), poté proteinasa K ( $25 \text{ } \mu\text{l}$ ) ( $42 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) a pufr AL ( $200 \text{ } \mu\text{l}$ ) (inkubace probíhala při teplotě  $56 \text{ }^\circ\text{C}$ , po dobu 30 min). Ke vzniklému lyzátu byl přidán 98 % ethanol ( $200 \text{ } \mu\text{l}$ ) ( $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) a zkumavky byly promíchány šetrným obrácením až do dosažení homogenity. Inkubace probíhala při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 5 min. Veškeré obsahy zkumavek byly přeneseny do kolonek izolační soupravy Dneasy Mini spin (Qiagen, SRN), kde byla DNA čištěna a promyta pomocí dvou různých pufrů (AW1, AW2), které byly součástí komerční soupravy DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen, SRN). Posledním krokem byla eluce DNA. Na střed membrány v kolonkách byl pipetován eluční pufr AE ( $50 \text{ } \mu\text{l}$ ), inkubace probíhala při teplotě  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 2 min. Pro zvýšení výtěžku byl zopakován eluční krok. DNA byla skladována při teplotě  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ .

### Návrh rodově specifických primerů pro metodu PCR

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) pomocí genetických algoritmů a porovnáním s programem Clustal W (Larkin a kol., 2007) byly tyto sekvence porovnány a byly hledány oblasti, které splňovaly níže uvedená kritéria ve vazbě na takzvaná „Obecná pravidla pro design primerů“ (Sambrook a Russel, 2001).

Hledané genové oblasti úseku genů 16S rDNA by tedy:

- měly vykazovat v rámci rodu *Acinetobacter* co nejvyšší homologii,
- neměly obsahovat žádné sekundární struktury,
- měly být od sebe vzdálené minimálně 800 nukleotidů,
- měly mít vyvážený obsah nukleotidů G+C, a tím i podobnou teplotu tání  $T_m$  (melting temperature).

Navržené primery by neměly být delší než 25 nukleotidů.

Sekvence úseku genů 16S rDNA byly následně porovnány s odpovídajícími sekvencemi úseku 16S rDNA u odlišných bakteriálních kmenů, které se mohou potenciálně vyskytovat v prostředí společně. A naopak, při tomto porovnání byly hledány oblasti, které se od sebe co nejvíce lišily. Na základě konečného porovnání byly poté navrženy čtyři primery; dva forwardové (AcinetoFor1 a AcinetoFor2) a dva reverzní (AcinetoRev1 a AcinetoRev2). Všechny oligonukleotidové primery byly syntetizovány firmou Sigma-Aldrich (USA).

Předpokládané délky finálních produktů PCR, vzniklých při reakci s níže specifikovanými páry primerů, byly následující:

- AcinetoFor1 + AcinetoRev1: 1 247 nukleotidů,
- AcinetoFor1 + AcinetoRev2: 1 229 nukleotidů,
- AcinetoFor2 + AcinetoRev1: 1 100 nukleotidů,
- AcinetoFor2 + AcinetoRev2: 1 082 nukleotidů.

Individuálně navržené rodově specifické primery pro genotypovou identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* pomocí metody PCR jsou uvedeny v Tabulce IV.

**Tabulka IV Individuálně navržené rodově specifické primery pro genotypovou identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* pomocí metody PCR**

Název primeru	Sekvence oligonukleotidu (5' → 3')	Obsah G+C (%)	Teplota tání primeru T <sub>m</sub> (° C)
<b>AcinetFor1</b>	GGT-GAG-TAA-TRC-TTA-GGA-ATC-TG	39,1	52,1
<b>AcinetFor2</b>	GGT-AAA-GGC-CTA-CCA-AGG-CGA-CG	60,8	71,9
<b>AcinetRev1</b>	GTA-TTC-ACC-GCG-GCA-TTC-TGA-TC	52,1	70,3
<b>AcinetRev2</b>	GAT-CCG-CGA-TTA-CTA-GCG-ATT-CC	52,1	68,4

*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).

#### Vlastní reakce PCR s rodově specifickými primery

Reakce 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<sup>-1</sup>) (vždy byl použit jeden forwardový a jeden reverzní primer) a 1µl 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).

#### Podmínky vlastní reakce PCR s rodově specifickými primery

Podmínky reakce PCR s rodově specifickými primery byly následující:

- počáteční denaturace probíhala při teplotě 95 °C po dobu 5 min a následovalo 39 cyklů s následujícím amplifikačním profilem:
  - 95 °C po dobu 30 s (denaturace),
  - 56 °C po dobu 30 s (nasedání primerů),
  - 72 °C po dobu 90 s (prodlužování řetězce),
- konečné prodlužování řetězce probíhalo při teplotě 72 °C po dobu 5 min,
- reakce PCR byla ukončena při teplotě 4 °C.

Finální produkty PCR byly analyzovány na 1 % (hm.) agarosovém gelu v 1 x TAE pufru, a při následném barvení gelu ethidium bromidem. Detekce byla provedena s použitím dokumentačního systému s video kamerou (Biometra, SRN).

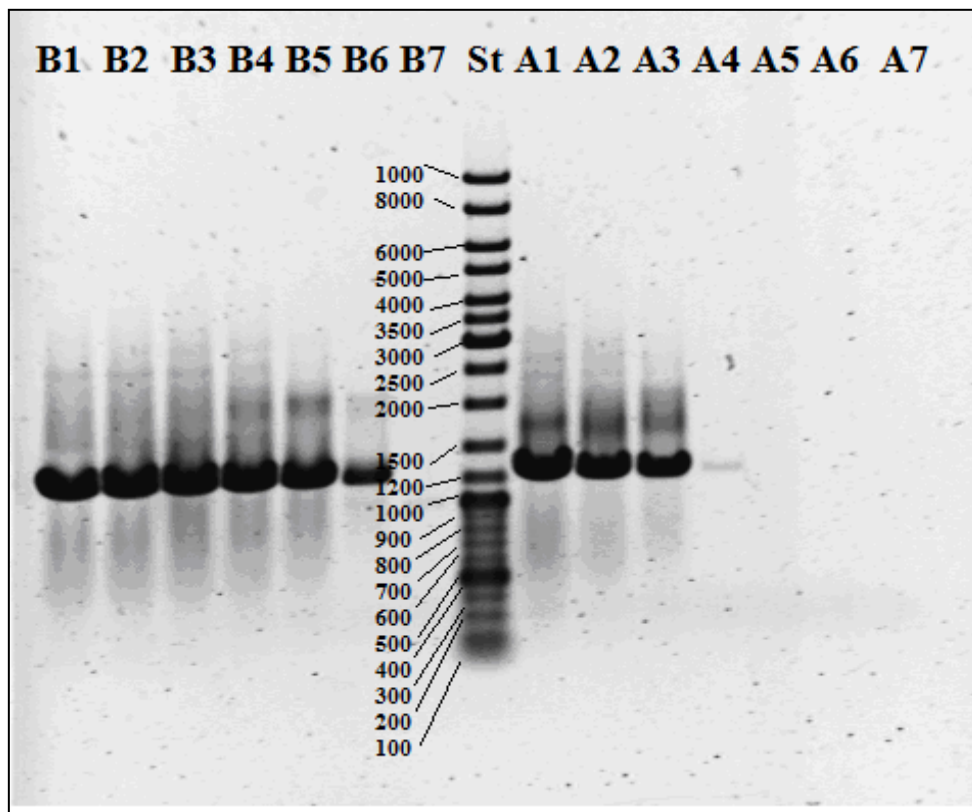
#### Zjištění rozsahu gradientu teploty pro nasedání primerů pro optimalizaci PCR

Na základě výše uvedených podmínek PCR byly detekovány finální produkty PCR odpovídající předpokládané velikosti u všech testovaných kmenů. Pro stanovení optimální

teploty nasedání primerů pro rod *Acinetobacter* byla provedena gradientová PCR (rozsah gradientu teploty pro nasedání primerů byl 60-70 °C). Jako optimální teplota pro nasednutí primerů AcinetoFor1 + AcinetoRev1 se ukázala teplota 67 °C. U ostatních kombinací primerů docházelo k tvorbě finálních PCR produktů u všech testovaných kmenů.

### Kontrolní elektroforéza finálních produktů PCR

Elektroforéza zde byla použita jako separační technika, založená na separačním principu nabitých molekul v elektrickém poli. Hlavním nositelem náboje nukleových kyselin jsou negativně nabitě fosfátové skupiny, a proto se nukleové kyseliny v elektrickém poli pohybují k opačně nabitě elektrodě-anodě. Velikost molekuly DNA nebo jejího fragmentu lze stanovit srovnáním jejich elektroforetické pohyblivosti s elektroforetickou pohyblivostí molekul nebo fragmentů DNA o známé velikosti, tedy se standardem o známé velikosti neboli markerem (GeneRuler DNA Ladder Mix, Thermo Scientific, USA). Molekuly DNA byly na agarosovém gelu detekovatelné jako proužky (bandy), jejichž intenzita byla úměrná koncentraci DNA.



**Obrázek 1 Elektroforetický gel demonstrující gradient PCR;** pozice A1 až A7) *Pseudomonas fragi* CCM 1974; pozice B1 až B7) *Acinetobacter baumannii* CCM 4353; použité primery pro reakci PCR: AcinetoFor1+AcinetoRev1; testování teplot pro nasednutí primerů: 1: 58,3 °C, 2: 60,4 °C, 3: 61, 8 °C, 4: 64,7 °C, 5: 66,1 °C, 6: 67,6 °C, 7: 69,7 °C; velikost PCR produktů byla 1247 nukleotidů.

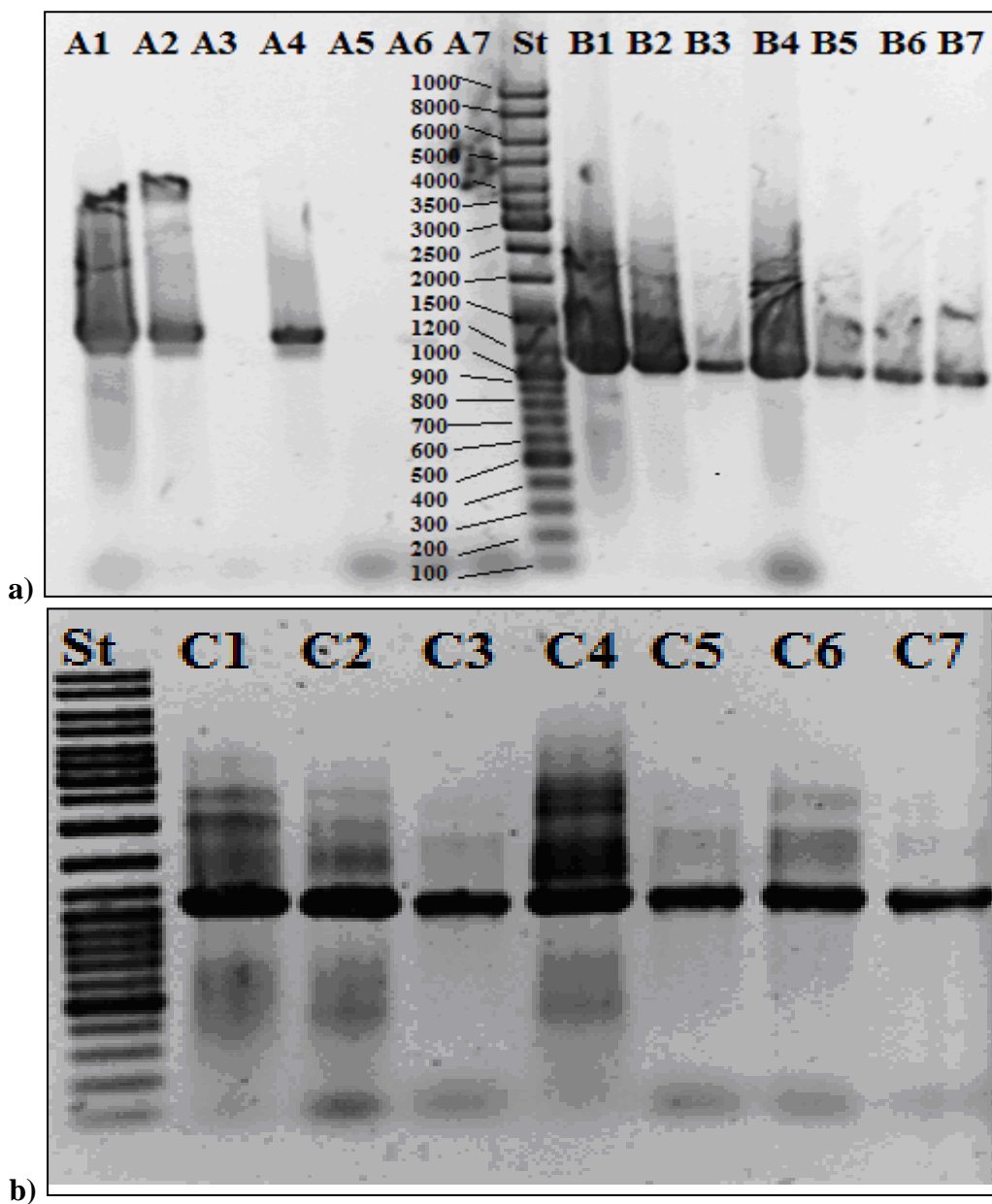
Na základě elektroforetického gelu demonstrujícího gradient PCR byly upraveny podmínky reakce PCR tak, aby byla reakce co nejvíce specifická.

## Úprava podmínek původní reakce PCR

Podmínky původní reakce PCR byly upraveny na následující:

- 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,
- reakce PCR byla ukončena při teplotě 4 °C.

Podmínky této reakce PCR byly testovány na různých kmenech bakterií rodu *Acinetobacter* a *Pseudomonas*.



**Obrázek 2: části a) i b) Reakce PCR s různými bakteriálními kmeny a různými kombinacemi primerů;** pozice A1 až A7) kombinace primerů: AcinetoFor1+AcinetoRev2; pozice B1 až B7) kombinace primerů: AcinetoFor2+AcinetoRev1; pozice C1 až C7) kombinace primerů: AcinetoFor2+AcinetoRev2;

**pozice kmenů dávkovaných na gel:** pozice 1) *Acinetobacter lwoffii* 1PBX1 (průmyslový izolát), pozice 2) *Pseudomonas putida* CCM 7156, pozice 3) *Pseudomonas lundensis* CCM 3503, pozice 4) *Acinetobacter pittii* Z53 (průmyslový izolát), pozice 5) *Pseudomonas* sp. 80 (průmyslový izolát), pozice 6) *Pseudomonas* sp. 152 (průmyslový izolát), pozice 7) *Pseudomonas* sp. 146 (průmyslový izolát).

### Ověření podmínek reakce PCR na směsích chromozomální DNA izolovaných z různých bakteriálních kmenů

Podmínky reakce 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 pocházející z 5 různých kmenů jak rodu *Acinetobacter*, tak rodů jiných bakterií. Směsi jsou uvedeny v Tabulce V. Pro ověření metody byly výsledné produkty reakce 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 směsi.

**Tabulka V Vybrané kmeny různých bakterií pro ověření podmínek reakce PCR: negativní kontrolní kmeny (tabulka dělená na str. 15-16)**

Označení	Bakterie	Označení kmene	Kultivační podmínky: teplota, médium
1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 314	37 °C, MRS
2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	ATCC 4356	37 °C, MRS
3	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	ATCC 11842	37 °C, MRS
4	<i>Lactobacillus gasseri</i>	CCM 7009 ATCC 33325	37 °C, MRS
5	<i>Lactobacillus helveticus</i>	ISLC5	37 °C, MRS
6	<i>Lactobacillus plantarum</i>	ATCC 8014	37 °C, MRS
7	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>casei</i>	CCM 7089 ATCC 334	37 °C, MRS
8	<i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>paracasei</i>	Lafti L26	37 °C, MRS
9	<i>Streptococcus thermophilus</i>	CNRZ 1066	30 °C, M17
10	<i>Escherchia coli</i>	CCM 4517 ATCC 8739	37 °C, TSA

11	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCM 4516 ATCC 6538	37 °C, TSA
12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CCM 1961 ATCC 9027	37 °C, TSA
13	<i>Pseudomonas fragi</i>	CCM 1974 ATCC 4973	30 °C, TSA
14	<i>Pseudomonas lundensis</i>	CCM 3503 ATCC 49968	25 °C, TSA
15	<i>Serratia marcescens</i>	CCM 303 ATCC 13880	30 °C, TSA
16	<i>Enterobacter cloacae</i>	CCM 1903 ATCC 10699	37 °C, TSA
17	<i>Bacillus subtilis</i>	CCM 1999 ATCC 6633	30 °C, <i>Bacillus médium</i>
18	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCM 4224 ATCC 29212	37 °C, BHI
19	<i>Streptococcus pyogenes</i>	CCM 4425	37 °C, M17
20	<i>Streptococcus agalactiae</i>	CCM 6187	37 °C, M17
21	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	CCM 2655 ATCC 14909	30 °C, TSA
22	<i>Enterobacter aerogenes</i>	CCM 3994	37 °C, TSA
23	<i>Burkholderia cepacia</i>	CCM 2656 ATCC 17759	30 °C, TSA
24	<i>Citrobacter freundii</i>	CCM 4475	37 °C, TSA
25	<i>Micrococcus luteus</i>	CCM 169 ATCC 15307	30 °C, TSA
26	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	CCM 2115 ATCC 13525	30 °C, TSA

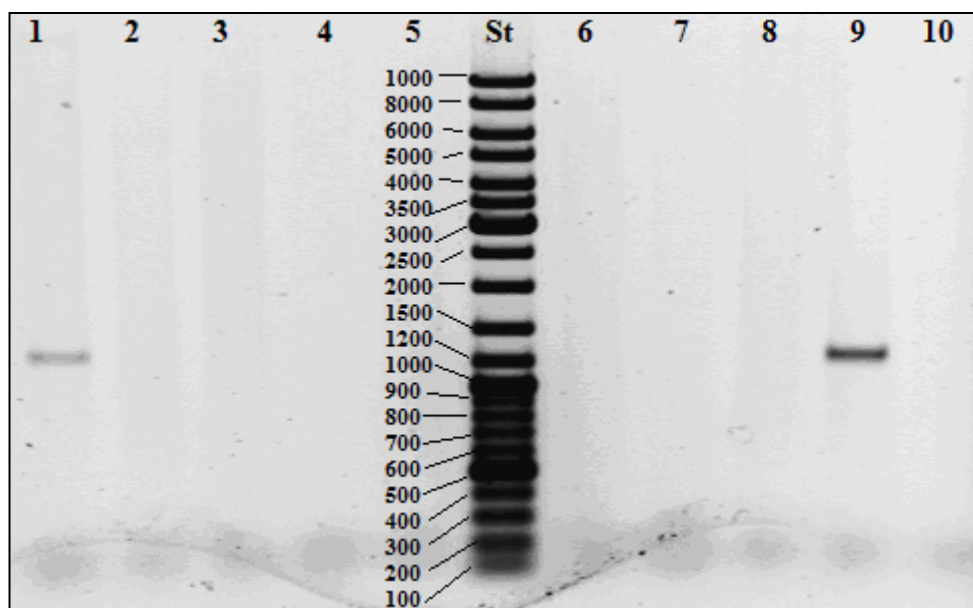


**Tabulka VI Vybrané kmeny různých bakterií pro ověření podmínek reakce PCR: pozitivní kontrolní kmeny**

Označení	Bakterie	Označení kmene	Kultivační podmínky: teplota, médium
1A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	CCM 4353	37 °C, TSA
2A	<i>Acinetobacter guillouiae</i>	1298	37 °C, TSA
3A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	71	37 °C, TSA
4A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	328	37 °C, TSA
5A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	335	37 °C, TSA
6A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	907	37 °C, TSA
7A	<i>Acinetobacter baumannii</i>	478	37 °C, TSA

**Tabulka VII Ověření podmínek reakce PCR: rozpis přípravy 10 směsí s různými obsahy bakterií (v celkovém objemu 100 µl, a po 20 µl od konkrétního kmene)**

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



**Obrázek 3** Elektroforetický gel produktů reakce PCR provedené u 10 směsí obsahující různé bakteriální kmeny (viz tabulka VII); použité primery: AcinetoFor1+AcinetoRev1; pozice vzorků kmenů: 1 až 10) směsi různých kmenů bakterií (směsi 1 a 9 obsahovaly chromozomální DNA bakterií rodu *Acinetobacter*).

## E) ZÁVĚRY

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 reakce jednak s kmeny bakterií rodu *Acinetobacter*, jednak s kmeny bakterií, které se prediktivně mohou vyskytovat v mlékárenských výrobních prostorech (například bakterie následujících rodů: *Bacillus*, *Burkholderia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* *Escherichia*, *Lactobacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Serratia*, *Staphylococcus* a *Streptococcus*).

Produkty PCR reakce odpovídající velikosti produktů vznikajících při běžných teplotách nasedání primerů (což jest při teplotách v rozmezí 55-60 °C) byly přítomny u všech testovaných kmenů. Optimální teplota nasedání primerů byla proto testována pomocí gradientové PCR reakce 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 produkty PCR reakce o velikosti 1247 nukleotidů, a to u všech použitých kmenů bakterií rodu *Acinetobacter* s dovětkem, že u ostatních použitých kmenů nebyly přítomny žádné produkty PCR reakce. Při použití ostatních dvojic primerů (AcinetoFor1+AcinetoRev2, AcinetoFor2+AcinetoRev1 a AcinetoFor2+AcinetoRev2) byly i při takto vysoké a selektivní teplotě nasedání primeru přítomny produkty PCR reakce i u kmenů jiných než rodu *Acinetobacter*; šlo především o kmeny rodu *Pseudomonas*.

Závěrem je možné konstatovat, že individuálně navržené rodově specifické primery AcinetoFor1+AcinetoRev1 jsou pro genotypovou identifikaci bakterií rodu *Acinetobacter* 100% specifické, a že jsou vhodné k použití výše specifikované metodiky, a to jak v prostředí vědecko-výzkumných laboratořích, tak v laboratořích poskytujících analýzy klientům na komerční bázi, při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti, technologické nerizikovosti a požadované jakosti vyráběných mlékárenských surovin a výrobků.

### III. SROVNÁNÍ „NOVOSTI POSTUPŮ“

- Vyvinutá certifikovaná metodika QJ1210300-3 s názvem „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“ byla předána do užívání STÁTNÍHO VETERINÁRNÍHO ÚSTAVU JIHLAVA, a to jak v elektronické, tak i písemné formě dne 19. 11. 2015.
- Tato certifikovaná metodika představuje nový, originální, postup interpretace výsledků sledování, kontroly a zajišťování technologicky nerizikové a jakostně standardní výroby mléka a mlékárenských výrobků.
- Předložené skutečnosti jsou doloženy příloženými vlastními publikovanými výsledky. Uvedené postupy interpretace nebyly zavedeny a nebyly používány ani ve vědecko-výzkumných laboratořích ani v laboratořích poskytujících analýzy klientům na komerční bázi, při cíleném zajišťování zdravotní bezpečnosti, hygienické nerizikivosti a požadované jakosti vyráběných mlékárenských surovin a výrobků v České republice. Jedná se tedy o zcela novou neznámou metodiku podle § 2, odst. 1, písm. b) a písm. c) zákona č. 130/2002 Sb.

### IV. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

- **Popis uplatnění certifikované metodiky**

Certifikovaná metodika obsahuje laboratorní postupy a experimentální doporučení týkající se kroků vhodných pro účinnou a systematickou kontrolu hygienické nerizikivosti mléka a mlékárenských výrobků, včetně výrobního zařízení a pomůcek, v souvislosti s eliminací případného výskytu kontaminujících bakterií rodu *Acinetobacter*, pomocí metody polymerázové řetězové reakce s využitím nově navržených rodově specifických primerů.

- **Kontrola certifikované metodiky**

Kontrola existence a aplikovatelnosti certifikované uplatněné metodiky jako pracovního postupu, specifikovaného v bodě výše, je proveditelná na základě předložené certifikované metodiky QJ1210300-3 sepsané a připravené pro uživatele, kterým je STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV JIHLAVA.

- **Certifikovaná metodika byla zpracována v 5 vyhotoveních a předána v kroužkové vazbě na níže uvedená příslušná pracoviště:**

- a) STÁTNÍ VETERINÁRNÍ ÚSTAV JIHLAVA,
- b) Ministerstvo zemědělství, Národní agentura pro zemědělský výzkum,
- c) Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.,
- d) Mikrobiologický ústav AV ČR, v. v. i.,
- e) Vysoká škola chemicko-technologická v Praze.

## V. EKONOMICKÉ ASPEKTY

V současné době je v oblasti mlékárenství kladen značný důraz nejenom na výrobu zdravotně bezpečných a jakostních mlékárenských výrobků, ale také na ekonomický dopad výroby. Nedostatečná mikrobiologická jakost vstupní mlékárenské suroviny, kterou je syrové mléko, ze kterého se vyrábí široká řada mlékárenských výrobků, může negativně ovlivnit jakost konečných výrobků, pokud jsou tyto kontaminovány technologickými rizikovými bakteriemi rodu *Acinetobacter*, podílejícími se na nejrůznějších texturních i senzorických změnách a až defektech výrobků. Zlepšení mikrobiologické jakosti mléka a mlékárenských výrobků by se mělo uskutečňovat nejenom díky jednorázovým kontrolám, ale především díky pravidelným periodickým kontrolám v přímé vazbě na kontrolní laboratoře vybavené moderními detekčními metodami, včetně metod z oblasti molekulární biologie.

V následujícím textu je předložena specifikace, kalkulace a rozdělení nákladů, tržeb a zisku, které certifikovaná metodika uživateli metodiky - STÁTNÍMUVETERINÁRNÍMU ÚSTAVU JIHLAVA, přinese.

### Náklady spojené se zavedením a aplikací certifikované metodiky

#### a) Investiční náklady

Vzhledem k tomu, že je pracoviště uživatele certifikované metodiky, STÁTNÍHO VETERINÁRNÍHO ÚSTAVU JIHLAVA, vybaveno přístroji a laboratorními pomůckami pro molekulárně-biologické práce, není zapotřebí, aby uživatel metodiky investoval do přístrojů typu PCR cykler, apod. Celkové investiční náklady pro praktické zrealizování certifikované metodiky nejsou tedy uvažovány a plánovány. Obecné investiční náklady určené pro laboratoř, která by nebyla dostatečně erudovaně vybavena pro práce z oblasti molekulární biologie, by měly být věnovány na nákup nejdůležitějšího základního přístroje, a to laboratorního PCR cykleru (s orientační pořizovací cenou do 200 000 Kč bez DPH), dále například chlazené odstředivky (s orientační pořizovací cenou do 80 000 Kč bez DPH)

#### b) Provozní náklady

Provozní náklady spojené s realizací a periodickou aplikací certifikované metodiky na pracovišti uživatele budou tvořeny položkami, specifikovanými níže:

- specifické oligonukleotidy (primery); 1 pár primerů (cena cca 800 Kč včetně DPH; postačí pro 1500 reakcí),
- kit pro izolaci DNA (cena: 4500 Kč včetně DPH; postačí pro 50 reakcí),
- enzym lysozym (cena cca 1200 Kč včetně DPH; 1 g),
- drobný laboratorní spotřební materiál (např. špičky s filtry, zkumavky typu Eppendorf; cena cca do 3000 Kč včetně DPH).

Provozní náklady na jednu reakci PCR s rodově specifickými primery byly kalkulovány a jsou plánovány ve výši 150 Kč (včetně DPH).

## Přínos pro uživatele výsledků certifikované metodiky

- Finanční přínos pro uživatele výsledků certifikované metodiky, charakterizovaný tržbami a ziskem, se odrazí - co se týká tržeb - především v oblasti rozšíření spektra a počtu analýz PCR s rodově specifickými primery, a také v oblasti provádění rutinního skreeningu a servisního poradenství v oblasti zajišťování bezpečnosti a jakosti vyráběných mlékárenských výrobků.
- Dle kvalifikovaného odhadu může roční finanční přínos pro uživatele metodiky činit přibližně až 20 000 Kč (včetně DPH), což za 5leté období aplikování metodiky může činit částku až 100 000 Kč (včetně DPH), za předpokladu finanční kalkulace 500 Kč (včetně DPH) za jednu uskutečněnou reakci PCR, v souvislosti s identifikací bakterií rodu *Acinetobacter* pocházejících z reálných mlékárenských surovin, výrobků a případně i výrobního zařízení a pomůcek.
- Dle kvalifikovaného odhadu může roční finanční zisk pro uživatele metodiky činit až 14 000 Kč (včetně DPH), za předpokladu finanční kalkulace ceně 500 Kč (včetně DPH) za jednu uskutečněnou reakci PCR spojenou s identifikací vzorku na úroveň rodu *Acinetobacter*, při provozních nákladech 150 Kč (včetně DPH), a při kalkulaci 40 reakcí PCR uskutečněných během jednoho roku. Tato finanční kalkulace je provedena bez úvahy mzdových nákladů, které nejsou poskytovateli certifikované metodiky známy.

## VI. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

ANONYMOUS: MALDI Biotyper CA System, technické materiály společnosti Bruker Divisions, <http://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/maldibiotyper-ca-system/service-support.html>, staženo 09. 11. 2015.

BARBE V., VALLENE D., FONKNECHTEN N.: Unique features revealed by the genome sequence of *Acinetobacter* sp. ADP1, aversatile and naturally transformation competent bacterium. *Nucleic Acids Research* 32, 5766–5779 (2004).

BAUMANN P., DOUDOROFF M., STANIER R.Y.: A study of the *Moraxella* group. II Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). *Journal of Bacteriology* 95, 1520–1541 (1968).

BERGOGNE-BÉREZIN E.: Importance of *Acinetobacter* spp. *Acinetobacter* biology and pathogenesis. *Infection Agents and Pathology* 1, 1–18 (2009).

CORNISH-BOWDEN A.: Nomenclature for incompletely specified bases in nucleic acid sequences: recommendations 1984. *Nucleic Acids Research* 13(9), 3021-3030 (1985).

CHANG H.C., WEI Y.F., DIJKSHOORN L., VANECHOUTTE M., TANG C.T., CHANG T.C.: 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 (2005).

CROXATTO A., PROD'HOM G., GREUB G.: Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiology Reviews* 36, 380–407 (2012).

DEPERROIS-LAFARGE V., MEHEUT T.: 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 (2012).

DOUGHARI H.J., NDAKIDEMI P.A., HUMAN I.S., BENADE S.: The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes and Environments* 25, 101–112 (2011).

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., PETRUCCELLI B., BRISSE S., HARPIN V., SCHINK A., ECKER D.J., SAMPATH R., ESHOO M.W.: Identification of *Acinetobacter* species and genotyping of *Acinetobacter baumannii* by multilocus PCR and mass spectrometry. *Journal of Clinical Microbiology* 44, 2921-2932 (2006).

GERISCHER U.: *Acinetobacter* spp. V: Gerischer U.V., Mukua L., Mirgja K. (eds.), s. 101-108. *Acinetobacter Molecular Biology*. Caister Academic Press: Norfolk, UK, 2008.

GURUNG M., NAM H.M., TAMANG M.D., CHAE M.H., JANG G.C., JUNG S.C., LIM S.K.: Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* from raw bulk tank milk in Korea. *Journal of Dairy Science* 96, 1997-2002 (2013).

HAMOUDA A., FINDLAY J., AL HASSAN L., SEBASTIAN G.B.A.: Epidemiology of *Acinetobacter baumannii* of animal origin. *International Journal of Antimicrobial Agents* 38(4), 314–318 (2011).

KÄMPFER P., GLAESER S. P.: Prokaryotic taxonomy in the sequencing era--the polyphasic approach revisited. *Environmental Microbiology* 14(2), 291–317 (2012).

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.: ClustalW and ClustalX version 2. *Bioinformatics* 23(21), 2947-2948 (2007).

LESSEL E.: Minutes of the subcommittee on the taxonomy of *Moraxella* and allied bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology* 21, 213–214 (1971).

LIU D.: *Acinetobacter*. V: *Molecular Detection of Human Bacterial Pathogens*, 1. vydání, kapitola 67, s. 781-785. CRC Press: Florida (USA), 2011.

NEMEC A.: *Studium lékařsky významných kmenů rodu Acinetobacter*. Habilitační práce, Univerzita Karlova: Praha, 2004.

PANGALLO D., ŠAKOVÁ N., 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* 170, 38–43 (2014).

PERCIVAL L.S., WILLIAMS D.W., GRAY N., YATES M.V., CHALMERS R.: *Acinetobacter*. V: *Microbiology of Waterborne Diseases*, 2. vydání, s. 35-48. Academic Press: New York, 2014.

QUIGLEY L., O'SULLIVAN O., STANTON C., BERESFORD T.P., ROSS R.P., FITZGERALD G.F., COTTER P.D.: The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiological Revue* 37, 664-698 (2013).

ROSSAUR R., VANLANDSCHOOT M., GILLIS M., DEEY J.: Taxonomy of Moraxellaceae fam. nov., a new bacterial family to accommodate the genera *Moraxella*, *Acinetobacter*, and *Psychrobacter* and related organisms. *International Journal of Systematic Bacteriology* 41, 310–319 (1991).

RÉDEI G.P.: V: *Encyclopedia of Genetics, Genomics, Proteomics, and Informatics*, 3. vydání: Springer, 2008.

SAMBROOK J., RUSSEL D.W.: *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (3<sup>rd</sup> ed.), Chapter 8: *In vitro* amplification of DNA by polymerase chain reaction. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, N.Y. (USA), 2001.

SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 74, 5463–5467 (1977).

SOO P., TSENG C., LING S., LIOU 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* 92(2), 197–200 (2013).

STROHALM M., KAVAN D., NOVÁK P., VOLNÝ M., HAVLÍČEK V.: mMass 3: s cross-platform software environment for precise analysis of mass spectrometric data. *Analytical Chemistry* 82, 4648–4651 (2010).

TAMANG M., GURUNG M., NAM H., KIM S., JANG G., JUNG S., LIM S.: Short communication: Genetic characterization of antimicrobial resistance in *Acinetobacter* isolates recovered from bulk tank milk. *Journal of Dairy Science* 97(2), 704–709 (2014).

VOTAVA M. *Lékařská mikrobiologie obecná*, 2. vydání. Neptun: Brno, 2005.

WIESER A., SCHNEIDER L., JUNG J., SCHUBERT S. (2012): MALDI-TOF in microbiological diagnostics - identification of microorganisms and beyond. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93, 965-974 (2012).

YAVANKAR S.P., PARDESI K.R., CHOPADE B.A.: Species distribution and physiological characterization of *Acinetobacter genospecies* from healthy human skin of tribal population in India. *Indian Journal of Medical Microbiol* 25, 336-345 (2007).

## VII. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

MATOUKOVÁ D., FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., KUBIZNIAKOVÁ P.: Výskyt anaerobních bakterií v pivovarském provozu a rizika kontaminace piva. 26. Pivovarsko-sladařské dny, datum 22. - 23. 10. 2015, Olomouc, Česká republika. (Poster; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., MATOUKOVÁ D.: Oligonukleotidové sekvence pro detekci bakterií druhu *Selenomonas lacticifex* a způsob detekce bakterií druhu *Selenomonas lacticifex*. PV 2014-191. (Přihláška vynálezu; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., MATOUKOVÁ D.: Oligonukleotidové sekvence pro detekci bakterií rodu *Zymophilus* a způsob detekce bakterií rodu *Zymophilus*. PV 2014-282. (Přihláška vynálezu; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., KUBIZNIAKOVÁ P., MATOUKOVÁ D.: Development of a species-specific PCR assay for identification of the strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lacticifex* found in biofilm-covered surfaces in brewery bottling halls. *Journal of Applied Microbiology* 117, 1328-1335 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

KOPECKÁ J., MATOUKOVÁ D., FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., NĚMEC M.: Genotypové odlišnosti technologických kmenů kvasinek rodu *Saccharomyces*. Čo nového v mikrobiologii - Zborník krátkých článkov, str. 98-103. Československá spoločnosť mikrobiologická: Bratislava-Praha, 2014. ISBN 978-80-971422-2-3. (Příspěvek ve sborníku; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

FELSBERG J., JELÍNKOVÁ M., KUBIZNIAKOVÁ P., MATOUKOVÁ D.: Identification of strictly anaerobic bacterium *Selenomonas lacticifex* by PCR using species-specific primers targeting 16S rDNA. 37. Pivovarsko-sladařský seminář, datum, 23. - 24. 10. 2014, Plzeň, Česká republika. (Poster; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

KAPLAN O., BEZOUŠKA K., MALANDRA A., VESELÁ A.B., PETŘÍČKOVÁ A., FELSBERG J., RINÁGELOVÁ A., KŘEN V., MARTÍNKOVÁ L.: Genome mining for the discovery of new nitrilases in filamentous fungi. *Biotechnology Letters* 33(2), 309-312 (2011). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: GA AV ČR IAA500200708; GA MŠk (CZ LC06010; GA MŠk OC09046; GA MPO FT-TA5/043; GA ČR GD305/09H008.)

.....  
MATOUKOVÁ D., KUBIZNIAKOVÁ P., JELÍNKOVÁ M., FELSBERG J.: Anaerobes and beer - bacteria *Megasphaera*, *Pectinatus*, *Selenomonas*, *Zymophilus* and methods for their detection. 9<sup>th</sup> International Symposium on Anaerobic Microbiology, 25. - 27. 6. 2015, Portorož, Slovinsko. (Přednáška; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)

MATOUKOVÁ D., KOSAŘ K., KUBIZNIAKOVÁ P., JELÍNKOVÁ M., FELSBERG J.: Incidence of strict anaerobes in brewery bottling halls. 15<sup>th</sup> International Belgian Brewing Conference – Chair J. De Clerck XV, 6. – 8. 9. 2015, Leuven, Belgie. (Přednáška; dedikace: projekty: RVO61388971, GAP503/12/1424.)



KOPECKÁ, J., MATOULKOVÁ, D., NĚMEC, M., **JELÍNKOVÁ, M., FELSBURG, J.**: Comparison of DNA extraction methods in terms of yield, purity, long-term storage and downstream manipulation with brewer's yeast chromosomal DNA. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* 72(1), 1-5 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM0021622413, FRVS 424/2013, RO1012, AV0Z50200510, 61388971).

NAJMANOVA L., ULANOVA D., **JELINKOVA M.**, KAMENIK Z., KETTNEROVA E., KOBERSKA M., GAZAK R., RADOJEVIC B., JANATA J.: Sequence analysis of porothramycin biosynthetic gene cluster. *Folia Microbiologica* 59, 543–552 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: CZ.1.07/2.3.00/20.0055, CZ.1.07/2.3.00/30.0003, BIOCEV-№. CZ.1.05/1.1.00/02.0109.)

KOPECKÁ J., NĚMEC M., MATOULKOVÁ D., ČEJKA P., **JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J.**, SIGLER K.: Effect of growth conditions on flocculation and cell surface hydrophobicity of brewing yeast. 37. Pivovarsko-sladařský seminář, datum, 23. - 24. 10. 2014, Plzeň, Česká republika. (Poster; dedikace: projekty: FRVS 424/2013, AV0Z50200510, 61388971, MUNI/A/0787/2012, the Institutional Support of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic for long-term development of RIBM.)

SULC M., FADRHOŇCOVÁ I., **JELÍNKOVÁ M.**, CHUDOMELOVÁ M., **FELSBURG J.**, OLŠOVSKÁ J.: Determination of sibiromycin and its natural derivatives using new analytical and structural approaches. *Journal of Chromatography A*. 1218(1), 83-91 (2011). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: 1M06011, 204/05/0616, AV0Z50200510.)

BUKOVSKÁ P., **JELÍNKOVÁ M.**, HRSELOVÁ H., SÝKOROVÁ Z., GRYNDRER M.: Terminal restriction fragment length measurement errors are affected mainly by fragment length, G+C nucleotide content and secondary structure melting point. *Journal of Microbiological Methods* 82(3), 223-228 (2010). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MŠMT 1M0571, AV0Z50200510.)

.....  
HORÁČKOVÁ Š., **MÜHLHANSOVÁ A.**, SLUKOVÁ M., SCHULZOVÁ V., PLOCKOVÁ M.: Fermentation of soymilk by yoghurt and bifidobacteria strains. *Czech Journal of Food Sciences* 33 (4), 313-319 (2015). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt QI 101B090.)

HORÁČKOVÁ Š., MARTÍNKOVÁ K., **MÜHLHANSOVÁ A.**, PLOCKOVÁ M.: Enkapsulace probiotických bakterií. X. Symposium Společnosti pro probiotika a prebiotika, 14. 4. 2015, Praha, Česká republika. (Přednáška; dedikace: projekt QI 101B090.)

HORÁČKOVÁ Š., **MÜHLHANSOVÁ A.**, HOUŠKOVÁ K., PLOCKOVÁ M.: *Lactobacillus casei* a jeho selektivní stanovení ve směsích s ostatními bakteriemi mléčného kvašení. *Mlékařské listy - Zpravodaj* 147, 9-12 (2014). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QI 101B090.)

**MÜHLHANSOVÁ A.**, HORÁČKOVÁ Š., JEBAVÁ I., PLOCKOVÁ M.: Quantification of *Lactobacillus acidophilus* in fermented milk products using real-time quantitative PCR. *Chemie je život, VUT v Brně, Fakulta Chemická*, 4. - 5. 12. 2014, Brno, Česká republika. (Přednáška; dedikace: projekt QI 101B090.)

HORÁČKOVÁ Š., MÜHLHANSOVÁ A., ŠTÁSTKOVÁ K., PLOCKOVÁ M.: Functional properties of intestinal lactobacilli. 2<sup>nd</sup> International Congress on Food Technology, Kusadasi, Turecko, 5. – 7. 11. 2014. (Poster; dedikace: projekt QI101B090.)

MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., PLOCKOVÁ M.: Kvantitativní stanovení *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* pomocí qPCR. Mléko a sýry, 23. 1. 2014, Praha, Česká republika. Celostátní přehledky sýrů 2014, Praha, Česká republika, 23. - 24. 1. 2014. V: Sborník „Celostátní přehledky sýrů 2014, Výsledky přehledek a sborník přednášek konference Mléko a sýry“, str. 55-60, ISBN 978-80-7080-909-9. (Příspěvek ve sborníku; dedikace projekt: bez dedikace.)

MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., PLOCKOVÁ M.: Determination of yogurt culture using qPCR, BioTech 2014 and 6<sup>th</sup> Czech-Swiss Symposium with Exhibition, 11. - 14. 6. 2014, Praha, Česká republika. (Poster; dedikace: projekt MSMT 20/2014.)

ZHEXENBAY N., MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., ALIMARDANOVA M., KULAZHANOV T., KOZYBAEV A., PLOCKOVÁ M.: Stanovení *Lactobacillus helveticus* a *Streptococcus thermophilus* v tradičních kazašských sýrech vyrobených ze směsi kravského a kozího mléka pomocí qPCR. Celostátní přehledky sýrů 2014, Praha, Česká republika, 23. - 24. 1. 2014. V: Sborník „Celostátní přehledky sýrů 2014, Výsledky přehledek a sborník přednášek konference Mléko a sýry“, str. 155-160, ISBN 978-80-7080-909-9. (Poster, příspěvek ve sborníku; dedikace: projekt QI101B090.)

MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., HORÁČKOVÁ Š., PLOCKOVÁ, M.: Aplikace probiotických laktobacilů do mlékárenských výrobků a jejich selektivní stanovení. Mlékařské listy - Zpravodaj 141, XLVIII-LII (2013). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QI101B090.)

NĚMEČKOVÁ I., CHRAMOSTOVÁ J., MÜHLHANSOVÁ A., JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S.: Gramovo barvení a další jednoduché testy pro rozlišení mikroorganismů. Mlékařské listy – Zpravodaj 141, XIII-XVIII (2013). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

.....

VONDRÁKOVÁ L., PURKRTOVÁ S., PAZLAROVÁ J., DEMNEROVÁ K.: Species differentiation of thermotolerant campylobacters based on distinctive banding patterns obtained by multiplex PCR. Czech Journal of Food Sciences 33, 27-31 (2015). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt MSMT No 21/2013.)

LAKNEROVÁ I., ZDEŇKOVÁ K., PURKRTOVÁ S., PIKNOVÁ E., VYROUBALOVÁ Š., HANÁK P.: Interlaboratory identification of Black seabream (*Spondyliosoma cantharus*) as a model species on basis of PCR targeting the second intron of the parvalbumin gene. Journal of Food Quality 37, 429-436 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt MZE0002702202.)

ALIBAYOV B., ZDEŇKOVÁ K., PURKRTOVÁ S., DEMNEROVÁ K., KARPÍŠKOVÁ R.: Detection of some phenotypic a genotypic characteristics of *Staphylococcus aureus* isolated from food items in the Czech. Annals of Microbiology 64, 1587-1596 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: bez dedikace.)

PAZLAROVÁ J., **PURKRTOVÁ S.**, BABULÍKOVÁ J., DEMNEROVÁ K.: Effect of ampicillin a vancomycin on *Staphylococcus aureus* biofilms. Czech Journal of Food Sciences 32, 137-144 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: 14-23597S, LD 14097-COST-CZ.)

**PURKRTOVÁ S.**, BABULÍKOVÁ J., DEMNEROVÁ K., PAZLAROVÁ J.: Antimicrobial factors effect on biofilm formation in *Staphylococcus aureus*. Czech Journal of Food Sciences 29, S1-S10 (2011). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM 2B08074, FP6-2006-FOOD-036272.)

**PURKRTOVÁ S.**, TUROŇOVÁ H., PILCHOVÁ T., DEMNEROVÁ K., PAZLAROVÁ J.: Resistance of *Listeria monocytogenes* biofilms to disinfectants. Czech Journal of Food Sciences 28, 326-332 (2010). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: FP6-2006-FOOD-036272, MSM 2B08050.)

**PURKRTOVÁ S.**, PILCHOVÁ T., ĎURIŠOVÁ J., DEMNEROVÁ K., PAZLAROVÁ J.: Podmínky tvorby biofilmu u *Listeria monocytogenes*. Mlékařské listy - Zpravodaj 112, 12-15 (2009). (Článek recenzovaný; dedikace: projekty: 2B08050, 6.FP EU Biotracer.)

**PURKRTOVÁ S.:** Biohydrometalurgie. Bioprospect 17, 10-14 (2007). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt: MSM6046137305.)

.....  
**ŠVIRÁKOVÁ E.**, MÜHLHANSOVÁ A., NĚMEČKOVÁ I., JUNKOVÁ P., **PURKRTOVÁ S.**, JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J.: Identifikace technologicky rizikových bakterií rodu *Acinetobacter*. Mlékařské listy - Zpravodaj 150, XIV-XX (2015). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

**ŠVIRÁKOVÁ E.**, MÜHLHANSOVÁ A., JUNKOVÁ P., **PURKRTOVÁ S.**, JELÍNKOVÁ M., FELSBURG J.: Identification of *Acinetobacter* spp. isolated from dairy products and production facility using sequencing and MALDI-TOF MS. IDF World Dairy Summit 2015, Litva, Vilnius, 20. - 24. 9. 2015. (Poster; dedikace: projekt QJ1210300.)

SLOŽILOVÁ I., **PURKRTOVÁ S.**, KOSOVÁ M., MIHULOVÁ M., **ŠVIRÁKOVÁ E.**, DEMNEROVÁ K.: Antilisterial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* strains originating from different sources. Czech Journal of Food Sciences 32(2), 145-151 (2014). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM 2B08050, MSM 6046137305, MSM 21/2012.)

**ŠVIRÁKOVÁ E.**, PURKRTOVÁ S., JEBAVÁ I., HANUŠOVÁ J., DEMNEROVÁ K.: Identifikace *Bacillus* sp. izolovaných z mlékárenských výrobků a výrobních zařízení pomocí PCR a MALDI TOF-MS. Mlékařské listy - Zpravodaj 146, XXV-XXVII (2014). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.) (Kapitola v recenzované elektronické knize; dedikace projekt: bez dedikace.)

CURDA L., **SVIRAKOVA E.:** Electrical Techniques: Food Spoilage Flora and Total Viable Count (TVC). V: Encyclopedia of Food Microbiology, 2<sup>nd</sup> edition, Batt C.A., Tortorello M.L. (eds.), sv. 1, s. 627-629. Elsevier Ltd., Academic Press: Oxford, UK, 2014. (Kapitola v recenzované elektronické knize; dedikace projekt: bez dedikace.)

**ŠVIRÁKOVÁ E.:** Potravinářské technologie a biotechnologie: Technologie mléka a mlékárenských výrobků, kapitola 4; Technologie olejů a tuků, kapitola 5; Technologie detergentů a kosmetiky, kapitola 6. E-learningový projekt FPBT, VŠCHT Praha, předmět N321001. E-learningový portál VŠCHT Praha: <https://e-learning.vscht.cz/> (Spuštěno 2014.)

**JEBAVÁ I., PURKRTOVÁ S., HANUŠOVÁ J., SAVICKÁ D., ŠVIRÁKOVÁ E., NĚMEČKOVÁ I., DEMNEROVÁ K.:** Identifikace mikrobiálních původců vad mlékárenských výrobků moderními molekulárně-biologickými metodami. Mlékařské listy - Zpravodaj 138, XX-XIV (2013). (Článek recenzovaný; dedikace: projekt QJ1210300.)

**SLOŽILOVÁ I., ŠVIRÁKOVÁ E., DEMNEROVÁ K.:** Vliv bakterií mléčného kvašení produkujících bakteriociny na růst kmenů *Listeria monocytogenes* na povrchu sýrů zrajících pod mazem. Výživa a potraviny, 1, 22-24 (2013). (Článek recenzovaný; dedikace: projekty: 2BOB050, MEB111004.)

**NĚMEČKOVÁ I., SOLICHOVÁ K., ROUBAL P., UHROVÁ B., ŠVIRÁKOVÁ E.:** Methods for detection of *Bacillus* sp., *B. cereus*, and *B. licheniformis* in raw milk. Czech Journal of Food Sciences 29, Special Issue, S55-S60 (2011). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM2672286101, 2B06048.)

**KOZÁKOVÁ D., SOLICHOVÁ K., ONDRÁČKOVÁ I., ŠVIRÁKOVÁ E., PLOCKOVÁ M.:** Effect of some environmental factors on the autolysis of lactococci used for cheese production. Journal of Food and Nutrition Research 49, 1-9 (2010). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt: MSM6046137306.)

**HANUŠOVÁ K., KLAUDISOVÁ KL., MILATOVÁ E., ŠVIRÁKOVÁ E., DOBIÁŠ J., OLDŘICH M., KOZA V., MAREK M.:** Release of nisin from polyvinylidene chloride lacquer coated on a polyethylene film. Journal of Food and Nutrition Research 49, 21 - 29 (2010). (Článek impaktovaný; dedikace projekty: QF3158, MSMT6046137305, FOOD-CT-2006-016264.)

**ŠVIRÁKOVÁ E., SLOŽILOVÁ I., TICHOVSKÝ P., PLOCKOVÁ M.:** Effect of *Lactococcus* sp. on the growth of *Listeria* sp. in the model UHT milk system. Czech Journal of Food Sciences 27 (Special Issue 2), 8-11 (2009). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt: MSM2B06048, MSM6046137305.)

**KUČEROVÁ K., KORBOVÁ I., HORÁČKOVÁ Š., ŠVIRÁKOVÁ E., PLOCKOVÁ M.:** Influence on enterococci and lactobacilli on listeria. Czech Journal of Food Sciences 27 (Special Issue 2), 12-17 (2009). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: MSM6046137305, MSM2B08050.)

**KREJČOVÁ O., ŠVIRÁKOVÁ E., DOBIÁŠ J., PLOCKOVÁ M.:** Inhibition of lactic acid bacteria and *Bacillus* sp. growth in cheese and meat products due to effect of polymer packaging film with incorporated nisin. Czech Journal of Food Sciences 22 (Special Issue), 303-305 (2004). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt QF3158.)

**ŠVIRÁKOVÁ E., PLOCKOVÁ M., HORNÍKOVÁ L.:** Vliv nisinu na kmeny *Escherichia coli* DMF 7502 a *Pseudomonas fluorescens* DMF 9010 poškozené působením EDTA nebo směsi organických kyselin. Bulletin potravinářského výskumu 42 (1-2), 75-86 (2003). (Článek impaktovaný; dedikace: projekty: 104/00/D087, CEZ:J19/98/223300004.)

PLOCKOVÁ M., ŘIHÁKOVÁ Z., ŠVIRÁKOVÁ E.: The efficacy of nisin and nisin producing strain *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in thermisized quarg desserts. *Advances in Food Sciences* 20, 17-22 (1998). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt 51/95/0990.)

PLOCKOVÁ, M., ŠTĚPÁNEK, M., DEMNEROVÁ, K., ČURDA, L., ŠVIRÁKOVÁ, E.: Effect of nisin for improvement in shelf-life and quality of processed cheese. *Advances in Food Sciences* 18, 78-83 (1996). (Článek impaktovaný; dedikace: projekt 510/95/0990.)

ČURDA L., PLOCKOVÁ M., ŠVIRÁKOVÁ E.: Growth of *Lactococcus lactis* in the presence of nisin evaluated by impedance method. *Chemie, Mikrobiologie, Technologie der Lebensmittel* 17, 53-57 (1995). (Článek impaktovaný; dedikace: bez dedikace.)

.....

<b>Za zhotovitele:</b>	
V Praze dne: 10. 11. 2015	<p>.....</p> <p>Ing. Eva Šviráková, Ph.D.</p>

**Certifikovaná metodika QJ1210300-3 pro laboratorní kontrolní praxi  
byla podporována řešením projektu Ministerstva zemědělství,  
Národní agentury pro zemědělský výzkum,  
projektem KUS QJ1210300.**

---

**OPONENTI DVOU NEZÁVISLÝCH OPONENTNÍCH POSUDKŮ**

**1. posudek odborníka v daném oboru:**

**Ing. Lukáš Valihrač, Ph.D.,**  
Biotechnologický ústav AV ČR, v. v. i.

**2. posudek ze státní správy:**

**MVDr. Jiří Hlaváček**  
*odborný rada*  
Odbor veterinární hygieny a ekologie,  
Ústřední veterinární správa Státní veterinární správy.

---

**PŘÍLOHY K CERTIFIKOVANÉ METODICE**

- **Uzavřená smlouva s uživatelem.**
- **Dva nezávislé oponentní posudky:**
  - 1 posudek odborníka v daném oboru,
  - 1 posudek ze státní správy.
- **Osvědčení odborného orgánu státní správy nebo certifikace.**