

Miroslava Kačániová, Elena Horská, Peter Haščik, Soňa Felšöciová

**Detekcia patogénov rodu *Salmonella* a *Listeria* s využitím
StepOne real time PCR**

NITRA 2015

Názov: Detekcia patogénov rodu *Salmonella* a *Listeria* s využitím StepOne real time PCR

Autori: **prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD.**

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva,
Katedra mikrobiológie

prof. Dr. Ing. Elena Horská

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta ekonomiky a manažmentu,
Katedra marketingu

doc. Ing. Peter Haščik, PhD.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva,
Katedra hodnotenia a spracovania živočíšnych produktov

Ing. Soňa Felšöciová, PhD.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva,
Katedra mikrobiológie

Recenzenti: **prof. Ing. Stanislav Kráčmar, DrSc.**

Univerzita Tomáša Baťu v Zlíne,
Technologická fakulta,
Ústav technológie potravín

Ing. Simona Kunová, PhD.

Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre,
Fakulta biotechnológie a potravinárstva,
Katedra hygieny a bezpečnosti potravín

Schválil rektor Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre 25. 11. 2015
ako vedeckú monografiu.

ISBN 978-80-552-1433-7

PodĀakovanie:

Práca bola realizovaná a financovaná za podpory projektu **VEGA 1/0611/14**.

Autori

Obsah

Obsah.....	4
Zoznam ilustrácií.....	6
Zoznam tabuliek.....	7
Zoznam skratiek a značiek.....	8
Slovník termínov.....	12
Úvod.....	14
1 Súčasný stav riešenej problematiky doma a v zahraničí.....	16
1.1 Rod <i>Listeria</i>	16
1.1.1 Klasifikácia.....	16
1.1.2 Sérotypizácia.....	16
1.1.3 Morfológia.....	17
1.1.4 Organizácia genómu.....	19
1.1.5 Fyziológia.....	21
1.1.6 Biochemické vlastnosti.....	23
1.1.7 Výskyt listérií.....	24
1.1.8 <i>Listeria monocytogenes</i>	31
1.1.9 Listerióza.....	34
1.2 <i>Salmonella</i> sp.....	39
1.2.1 Klasifikácia a nomenklatúra.....	40
1.2.2 Antigénna štruktúra.....	42
1.2.3 Hostitelia.....	43
1.2.4 Prenos.....	43
1.2.4 Salmonelóza u ľudí a zvierat.....	44
1.2.5 Výskyt salmonelóz v Slovenskej republike.....	45
1.2.6 Sekrečný systém typu III.....	46
1.2.7 Ostrovy patogenity.....	47
1.2.8 Quorum sensing.....	48
1.2.9 R plazmid.....	49
1.2.10 Rezistencia.....	49

1.2.11 Diagnostika salmonelózy.....	50
1.3 Metódy stanovenia patogénnych baktérií.....	51
1.3.1 Klasické mikrobiologické metódy.....	51
1.3.2 Používané metódy.....	51
1.3.3 Imunologické metódy.....	52
1.3.4 Fyzikálno-chemické metódy.....	54
1.3.5 Molekulárno-biologické metódy.....	54
1.3.5.1 PCR (polymerase chain reaction).....	54
1.3.5.2 Real-time PCR.....	56
1.1.5.3 Real-time PCR pri stanovení baktérií rodu <i>Salmonella</i>	57
1.3.5.4 Real-time PCR a kvantifikácia pri stanovení baktérií druhu <i>Listeria monocytogenes</i>	58
1.3.6 Microarrays.....	60
1.3.7 Ďalšie možnosti stanovenia.....	61
2 Cieľ práce.....	64
3 Metodika práce a metódy skúmania.....	65
3.2 Polymerázová reťazová reakcia (PCR).....	65
3.2.1 Izolácia bakteriálnej DNA (PrepSEQ Rapid Spin Sample Preparation Kit).....	65
3.2.3 Real-time PCR.....	67
4 Výsledky práce.....	69
4.1 Výskyt <i>Listeria monocytogenes</i> vo vzorkách mäsových a mliečnych výrobkov.....	66
4.2 Výskyt <i>Salmonella</i> sp. vo vzorkách mäsových a mliečnych výrobkov.....	77
5 Diskusia.....	86
5.1 Detekcia patogénu <i>Listeria monocytogenes</i>	86
5.2 Detekcia patogénu <i>Salmonella</i> sp.....	91
Záver.....	95
Abstrakt v slovenskom jazyku.....	97
Abstrakt v anglickom jazyku.....	99
Zoznam použitej literatúry.....	101

Zoznam ilustrácií

Obr. 1 Rôzne spôsoby vstupu <i>Listeria monocytogenes</i> v procese z farmy na stôl (Pagotto et al., 2005)	30
Obr. 2 Postupné kroky ľudskej listeriózy (Lecuit, 2007)	36
Obr. 3 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v mäsovom výrobku Lečo-klobása MMV	70
Obr. 4 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v trvanlivých tepelne opracovaných mäsových výrobkoch Turistická saláma a Inovecká saláma	71
Obr. 5 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v mäsových výrobkoch Lečo-klobása MMV a Turistická saláma TTO	72
Obr. 6 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v mäsových výrobkoch Jemné párky MMV a Šunková saláma MMV	73
Obr. 7 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v analyzovaných mäkkých mäsových výrobkoch Ipeľská klobása a Ľudová saláma	74
Obr. 8 Real-time detekcia <i>Listeria monocytogenes</i> v mäsových a mliečnych výrobkoch	76
Obr. 9 Vyhodnotenie RT PCR vzoriek surového kravského mlieka	80
Obr. 10 Vyhodnotenie RT PCR z mletého mäsa	81
Obr. 11 Vyhodnotenie RT PCR pre mliečne a mäsové výrobky	84
Obr. 12 Vyhodnotenie RT-PCR pre mleté a trvanlivé tepelne opracované mäsové výrobky	85

Zoznam tabuliek

Tab. 1 Aktuálna nomenklatúra rodu <i>Salmonella</i> (Su-Chiu, 2007)	42
Tab. 2 Vzorky analyzovaného mäsového výrobku Lečo-klobása MMV	69
Tab. 3 Vzorky trvanlivých tepelne opracovaných mäsových výrobkov Turistická saláma a Inovecká saláma	70
Tab. 4 Vzorky analyzovaných mäsových výrobkov Lečo-klobása MMV a Turistická saláma TTO	72
Tab. 5 Vzorky mäsových výrobkov Jemná saláma MMV a Šunková saláma MMV použité na analýzu	75
Tab. 6 Vzorky analyzovaných mäkkých mäsových výrobkov Ipeľská klobása a Ľudová saláma	74
Tab. 7 Vzorky mäsových a mliečnych výrobkov použitých na analýzu	75
Tab. 8 Výskyt <i>Listeria monocytogenes</i> v analyzovaných vzorkách	77
Tab. 9 Výskyt <i>Salmonella</i> sp. v analyzovaných vzorkách kravského mlieka	79
Tab. 10 Výskyt <i>Salmonella</i> sp. v analyzovaných vzorkách mletých mäsových výrobkov	81
Tab. 11 Výskyt <i>Salmonella</i> sp. v analyzovaných vzorkách mliečnych a mäsových výrobkov	83
Tab. 12 Výskyt <i>Salmonella</i> sp. v analyzovaných vzorkách mäsových výrobkov	84

Zoznam skratiek a značiek

μ mikro, 10^{-6}

Å ångström

actA Actin assembly-inducing protein

AFLP dĺžkový polymorfizmus amplifikovaných fragmentov

ALOA Agar listeria ottaviani agosti

Apal restričný enzým od *Acetobacter pasteurianus* sub. *pasterurianus*

AscI restričný enzým od *Arthrobacter* species

a_w vodná aktivita

BCAA aminokyseliny s rozvetveným reťazcom

BHIB mozgovo-srdcové infúzne médium

bp bázoový pár

C cytozín

C5 pozostávajúci z 5 uhlíkov

CAMP test Christie, Atkins and Munch-Petersen test

cDNA komplementárna DNA

CFU.g⁻¹ kolóniu tvoriace jednotky na gram

clpP s virulenciou asociovaný gén (caseinolytic peptidase)

CSF cerebrospinálna tekutina

Dal s virulenciou asociovaný gén (alanine racemase)

D-Ala pravotočivý alanín

dNTP deoxyribonukleotid trifosfát

E. Escherichia

EC Nariadenie komisie

EcoRI *Escherichia coli* RI restričný enzým

EGDe kmeň *Listeria monocytogenes*

EFSA Európsky úrad pre bezpečnosť potravín

ELFA Enzyme-linked fluorescent assay

ELISA Enzyme-linked immunosorbent assay

FAME metylestery mastných kyselín
FDA Úrad pre kontrolu potravín a liekov
G guanín
GlcNAc N-acetyl-D-glucosamine
gltA* a *gltB gény sérotypovo špecifickej génovej kazety u 4b-4d-4e
gtcA gén existujúci v genóme listeriálneho kmeňa 1/2a
HgCl₂ chlorid ortuťnatý
hly hemolyzínové gény
hlyA gén kódujúci listeriolyzín O
HTST high temperature short time
Iap s inváziou asociovaný proteín
inlA internalín A
inlB internalín B
inlC internalín C
ISO Medzinárodná normalizačná organizácia
kb kilobáza
kDa kiloDalton
kGy kilogray
L. Listeria
lisR s virulenciou asociovaný gén
LLO listeriolysine O
LPM lithium chloride-phenyl ethanol-moxalactam
LTAs lipoteichoic acids
Mb megabáza
Mbp megabázový pár
m-Dap diamino aminokyselina na peptidovej strane reťazca
MIS Mikrobiálny identifikačný systém
MLA McBride *Listeria* agar
MLST mnoholokusové sekvenčné určenie typov

mM milimol, 10^{-3} mol

MOXA Modified Oxford agar

MurNAc N-acetylmuramic acid

NASBA amplifikácia sekvencie nukleovej kyseliny

ORF rámec otvorený čítací

oriC origin of replication C

p60 s inváziou asociovaný proteín

PALCAM Polymyxin acriflavine lithium chloride ceftazidime aesculin mannitol

PAM₅₅ kmeň *Listeria ivanovii*

PCR Polymerase chain reaction

PCR-RFLP PCR dĺžkový polymorfizmus restričných fragmentov

PFGE gélová elektroforéza v pulznom poli

PFGE CHEF PFGE vhlbeného elektrického poľa

PG peptidoglykán

PgdA enzým deacetylujúci N-acetylglukozamínové zvyšky peptidoglykánu

PI fosfatidylinozitol

PLC-A gén pre fosfatidylinozitol špecifickú fosfolipázu C

PLO pneumolyzín

PrfA transkripčný aktivátor množstva listeriálnych virulentných génov

PTS phosphotransferase system

PtsH gén kódujúci proteín fosfotransferázového systému

PvuII *Proteus vulgaris* restričná endonukleáza

R. Rhodococcus

rRNA ribozomálna ribonukleotidová kyselina

RTE ready-to-eat

RT-PCR real-time PCR

s sekunda

S. Staphylococcus

SLCC₃₉₅₄ kmeň *Listeria seeligeri*

SLO streptolyzín O

SmaI *Serratia marcescenes* restriční enzym

sp. druh

spp. druh (množné číslo)

syn. synonymum

TAs teichiové kyseliny

THP1 Human acute monocytic leukemia cell line

VIA Visual Immunoassay

w/v hmotnostná koncentrácia

XhoI *Xanthomonas holcicola* I restriční enzym

Slovník termínov

Absces je dutina vzniknutá zápalom tkaniva, obvykle spôsobená infekciou, ktorá je vyplnená hnisom a obklopená zapáleným tkanivom.

anteiso-C_{15:0} je 12-metyltetradekánová kyselina prítomná u mnohých baktérií ako hlavná zložka membránových lipidov.

Bakterémia je prítomnosť baktérií v krvi. Ide o abnormálnu situáciu. Baktérie sa môžu dostať do krvného riečišťa ako vážna komplikácia infekcií, pri chirurgických výkonoch, prostredníctvom cievkovača alebo iných cudzích telies vsúvaných do tepien a žíl.

Bicistronický operón kóduje vznik dvoch proteínov.

D-hodnota je decimálna redukcia času. Ide o čas potrebný pri určitej teplote na zabitie 90 % študovaných organizmov.

Encefalitída je infekčné vírusové ochorenie napadajúce mozog a mozgové blany pacienta. Prenos pôvodcov zo skupiny *Flaviviridae* sa uskutočňuje kliešťami alebo alimentárnou cestou.

F₀F₁ATP syntáza, alebo ATP-áza je enzým, ktorý v tisíckach kópií vystieľa matricovú stranu vnútornej mitochondriálnej membrány. Pozostáva z F₀ časti, čo je hydrofóbny segment vo vnútornej mitochondriálnej membráne a F₁ časti, ktorá vyčnieva do matrix mitochondrie a je nositeľom katalytickej aktivity.

Flagelín je druhovo špecifická globulárna bielkovina vlákna bičičku, ktorej molekuly sú usporiadané tak, aby bolo vlákno vo vnútri duté. Syntetizuje sa v cytoplazme a prechádza dutinou vlákna na rastúci koniec bičička.

Gastroenteritída je charakterizovaná ako zápal tráviaceho traktu, zahŕňajúci žalúdok a tenké črevo, ktorý spôsobuje hnačky, vracanie, brušné bolesti a kŕče.

Hepatocyty, pečeňové bunky sú základnou stavebnou jednotkou tkaniva pečene a sú zodpovedné za väčšinu metabolických procesov prebiehajúcich v pečeni. Majú značnú regeneračnú schopnosť a pri poškodení tkaniva pečene sa pečeň pomerne dobre regeneruje.

Keratokonjunktivitída je zápal rohovky a spojiviek.

Kotrimoxazol je to chemoterapeutikum, zložené zo trimetoprimu a sulfametoxazolu v pomere 1:5. Používa sa pri liečbe množstva bakteriálnych infekcií. Je k dispozícii ako generikum. Niektoré zdroje uvádzajú, že ide o liečivo bakteriocídne, iní o ňom hovoria ako o bakteriostatickom.

Kupfferové bunky sú makrofágy, ktoré sa nachádzajú v pečeni ako súčasť výstelky krvných kapilár s fenestrovaným endotelom. Bunky patria do tzv. mononukleárneho fagocytárneho systému, ktorý je tvorený cirkulujúcimi monocytmi v krvi a makrofágmi v tkanivách.

LPXTG proteíny sú povrchové proteíny tvorené konzervatívnym motívom leucín-prolín-x (aminokyselina)-treonín-glycín. Sú charakterizované krátkym C-terminálnym signálom, ktorý je nasmerovaný kovalentným upevnením na peptidoglykán.

LRR proteíny sú proteíny bohaté na opakovanie leucínov. Sú charakteristické opakovaním 26-29 zvyškov, ktoré prijali štruktúru pravidelného solenoidu, α -helixu na vonkajšej strane a β -helixu na vnútornej strane.

Mastitída je zápal mliečnej žľazy. Tkanivo má špongiovitú štruktúru vytvorenú z tisícok alveol. Každá alveola je uzavretá, a keď sa do tohto miesta dostane baktéria, kde sú pre ňu vytvorené ideálne rastové podmienky, baktéria začne spotrebúvať mlieko produkované mliečnou žľazou.

Meningitída je zápal mäkkých blán mozgu a miechy, spôsobený rôznymi pôvodcami, predovšetkým baktériami alebo aj vírusmi, hubami a parazitmi.

Septikémia je charakteristická prítomnosťou baktériami v krvi (bakterémia), ktorá je často spojená s vážnymi infekciami, ktoré ohrozujú zdravie. Môže pochádzať z infekcie pľúc, brucha a močových ciest. Môže sa objaviť ako súčasť infekcie kostí, centrálného nervového systému, srdca a ostatných tkanív.

Verotoxín tiež známy ako Shiga podobný toxín. Je produkovaný niektorými kmeňmi *Escherichia coli*. Jeho druhotný názov sa používa preto, lebo má podobnosť k AB5 Shiga toxínu produkovaného baktériou *Shigella dysenteriae*.

ÚVOD

Alimentárne ochorenia sú celosvetovo jedným z najrozšírenejších zdravotných problémov. Je známych mnoho mikroorganizmov (baktérií, vírusov a parazitov) spôsobujúcich ochorenia zažívacieho traktu, prípadne ďalších zdravotných komplikácií, ktoré môžu v niektorých prípadoch končiť aj smrťou.

Salmonella je dlhodobo významným zoonotickým patogénom ľudí a zvierat, spôsobujúcim značné ekonomické straty. Dnes je známych viac ako 2 500 sérovarov s rozdielnou prevalenciou a významom pre ľudí a zvieratá. Aj viac ako po 120 rokoch je salmonelóza v mnohých krajinách na prvom alebo na jednom z prvých miest v počte epidémií a v počte ochorení ľudí.

Hoci väčšina sérotypov *Salmonella* má široké spektrum hostiteľov, sú typicky také druhy, ktoré spôsobujú gastroenteritídu často bez komplikácií a nutnosti liečby, sú aj druhy, ktoré môžu u mladých ako aj starších pacientov s oslabenou imunitou spôsobiť vážne ochorenie. Táto skupina zahŕňa *Salmonella* Enteridis, *Salmonella* Typhimurium, dva najdôležitejšie sérotypy prenášané zo zvierat na človeka.

Gram-pozitívna baktéria *Listeria monocytogenes* je všadeprítomný, fakultatívny intracelulárny patogén, ktorý nevyžaduje špeciálne nutričné požiadavky. Tento mikroorganizmus sa veľmi dobre adaptoval na život v cytosole rôznych hostiteľských buniek cicavcov ako aj v pôde a vo vode. Baktéria je rozšírená v životnom prostredí, pričom sa predpokladá, že žije ako saprofyt rozkladajúceho sa rastlinného materiálu. *Listeria monocytogenes* je schopná kontaminovať kaly, krmivá, lesnú pôdu, kŕmne základne a výkaly voľne žijúcich živočíchov a vtákov, obrábané a neobrábané polia. Jej fyziologické vlastnosti: schopnosť existovať v aeróbnom a anaeróbnom prostredí, psychrofilnosť, schopnosť tolerovať vysoké koncentrácie chloridu sodného, široký rozsah pH a pod. umožňujú existenciu v mäsových výrobkoch, mliečnych výrobkoch a hotových jedlách.

Listeria monocytogenes ako patogénny mikroorganizmus je vážnym nebezpečenstvom potravín. Je schopná odolávať mnohým modifikovaným atmosféram, spôsobom ošetrovania potravín a chladiarenským teplotám. Aj keď nedisponuje špeciálnou rezistenciou na bakteriostatiká, je schopná vytvárať perzistentné biofilmy na povrchoch, ktoré prichádzajú do kontaktu s potravou a tým ju kontaminovať. Jej výskyt

vo varených potravinách je výsledkom krížovej kontaminácie a u hotových jedál ako dôsledok nedostatočnej hygieny.

Molekulárne metódy sa používajú na rýchly dôkaz patogénov v potravinách. Najväčšou výhodou nových molekulárnych metód na detekcie a identifikáciu patogénov je skrátenie času od odberu vzorky po vyhodnotenie výsledku. Metóda polymerázovej reťazovej reakcia je veľmi spoľahlivá a citlivá na identifikáciu patogénov.