

APLIKACE METODY LAMP PRO DETEKCI NEŽÁDOUCÍCH BAKTERIÍ V SYROVÁTCE

EVA ŠVIRÁKOVÁ^a, KATEŘINA LOUPANCOVÁ^a
a IRENA NĚMEČKOVÁ^b

^a Ústav konzervace potravin, Fakulta potravinářské a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Technická 3/5, 166 28 Praha 6,

^b Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha 6

eva.svirakova@vscht.cz

Došlo 15.8.22, přijato 3.10.22.

Klíčová slova: metoda LAMP, detekce bakterií, nežádoucí bakterie, syrovátka

• <https://doi.org/10.54779/chl20220693>

Úvod

Metoda LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification), překládaná do jazyka českého jako „izotermální amplifikace zprostředkovaná smyčkou“, patří mezi molekulárně biologické metody využívané pro amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA), zejména v souvislosti s detekcí patogenů. Tato metoda disponuje širokou škálou možných aplikací, včetně testování *in vitro* v místech péče o pacienty (tzv. point-of-care testing), genetického testování v prostředí s nedostatkem zdrojů (například v rozvojových zemích) a rychlého testování potravinářských výrobků a vzorků životního prostředí¹. Metoda LAMP našla své využití primárně v oblasti klinické laboratorní praxe, kde je v současnosti běžně využívána jako spolehlivá a robustní metoda pro detekci a identifikaci mikrobiálních a virových patogenů². Na trhu jsou k dispozici různé komerčně dostupné kity pro metodu LAMP, designované pro detekci patogenních nebo podmíněných patogenních bakterií, nejčastěji ze vzorků krve. Z široké nabídky kitů je možné zmínit např. kit Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU)³, jenž je navržený pro detekci následujících grampozitivních patogenních či podmíněně patogenních bakterií: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus* sp., *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus* sp., vancomycin rezistentní enterokoky (VRE) s geny *vanA* a *vanB*. Další kit, Eazyplex[®] BloodScreen GN Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU)³, je navržený pro detekci následujících gramnegativních patogenních a podmíněně patogenních bakterií: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*/

Pseudomonas fluorescens/*Pseudomonas putida*, bakterii čeledi *Enterobacteriaceae*, a také pro detekci bakterií s geny pro produkci β -laktamasy CTX-M-1 a β -laktamasy CTX-M-9. Metoda LAMP začíná postupně nalézat uplatnění i v potravinářské laboratorní praxi. Prozatím je využívána spíše na půdách vědecko-výzkumných a akademických pracovišť než v komerčním sektoru. Z pragmatické nutnosti je cíleno nejčastěji na detekci patogenů způsobujících alimentární onemocnění (jakými jsou např. *Salmonella* spp., *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*) ohrožující veřejné zdraví, způsobující vážná onemocnění až úmrtí přenášená potravinami a vodou⁴. Vzhledem k tomu, že se v potravinách tyto patogeny nenacházejí ve velkých množstvích, jsou zapotřebí detekční metody schopné detekovat i jejich menší množství⁵. Metody detekce potravinových patogenů založené na kultivačních metodách jsou časově náročné a pracné⁶. Přestože je použití metody PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázové řetězové reakce) pro detekci potravinových patogenů v současnosti standardně rozšířené, metoda LAMP ji může při zvážení některých aspektů vhodně nahradit⁷. Metoda LAMP tedy představuje alternativní metodu významně urychlující a zjednodušující detekci alimentárních patogenů v praxi⁸. Na trh začaly pronikat různé komerční kity pro metodu LAMP navržené pro detekci potravinových patogenů. Např. vybrané kity řady Loopamp Detection Kit (Eiken Chemical Co., JPN)⁹ jsou vhodné pro detekci patogenních bakterií a virů v potravinových surovinách a výrobcích a cílí na detekci následujících bakterií a virů: *Salmonella* spp., verotoxin-produkující *E. coli* (VTEC), *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., norovirus, *Alicyclobacillus acidoterrestris* (AAT), *Flavobacterium psychrophilum*. Výhodou kitů pro metodu LAMP je jejich snadná uživatelská aplikovatelnost. Kity obsahují veškeré reagenty potřebné pro uskutečnění reakce LAMP, která probíhá v jedné zkumavce, za podmínky celkového času detekce bakterií nejdéle do 1 h, a to od přípravy vzorku až po dokončení amplifikace LAMP. Za významnou výhodu metody LAMP se tedy považuje úspora času pro detekci bakterií za 15–60 min (cit.¹⁰), a to při srovnání času jejich detekce s využitím jiných molekulárně biologických metod (např. u metody PCR se doba detekce pohybuje v rozmezí 60–120 min) nebo metod klasické mikrobiologie (např. u plotnové metody s využitím selektivních médií se doba detekce pohybuje v rozmezí 24–48 h). Pokud dojde k transferu metody LAMP z klinické oblasti do oblasti potravinářství, významně se rozšíří její pole využitelnosti. Nezbytností je však design nových pracovních postupů/metod a jejich bezproblémová experimentální realizace. Aplikace metody LAMP pro rychlou detekci nežádoucích bakterií může být perspektivní v různých oblastech potravinářského průmyslu, avšak doposud je toto uplatnění málo probádané. Cílem této práce je ověřit možnost detekce grampozitivních a gramnegativních bakterií se statutem zdravotně a technologicky nežádoucích bakterií v tekuté sladké syrovátce, s využitím molekulárně biologické metody LAMP za podmínek *in vitro* v laboratoři.

Experimentální část

Použité bakteriální kmeny

K experimentům bylo použito celkem 12 bakteriálních kmenů, z nichž tři představovaly zástupce gram-pozitivních bakterií (GP) (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* sp.) a 9 představovalo zástupce gramnegativních (GN) bakterií (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*). Sbírkové kmeny (CCM) byly získány z České sbírky mikroorganismů (CCM, Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity, Brno). Další kmeny (LEV) byly izolovány z prostředí české průmyslové výroby sýrů a následně identifikovány na úroveň druhu metodou hmotnostní spektrometrie MALDI-TOF MS ve VÚVeL v. v. i. (Brno). Kmeny jsou umístěny ve Sběrce mikroorganismů (Ústav konzervace potravin, VŠCHT v Praze). Specifikace použitých kmenů jsou uvedeny v tab. I.

Kultivace bakteriálních kmenů

Kmeny byly zaočkovány (inokulum 1,0 obj.%) do sterilního bujónu z mozkosrdcové infuze (Brain Heart Infusion Broth, Merck KGaA, DEU) (dále jen bujón BHI) (10 ml), a poté kultivovány za aerobních podmínek při teplotě 37 °C po dobu 24 h.

Stanovení počtu bakterií

Pro stanovení počtu bakterií byla použita plotnová metoda¹¹. Aerobní kultivace bakterií probíhaly na agaru BHI (inokulum 1,0 ml, přeliv) při teplotě 37 °C po dobu 72 h. Narostlé kolonie byly spočítány užitím počítače kolonií Stuart SC-6 (P-LAB a.s., CZE).

Příprava rekonstituované sladké syrovátky

Rekonstituovaná sladká syrovátka byla připravena smícháním sušené demineralizované syrovátky (Mogador s.r.o., CZE) (10,0 g) a destilované vody (90,0 g). Směs byla homogenizována v mixeru DI 25 Basic (IMLAB, FRA), pasterována v autoklávu PS 20A (Chirana Group, CZE) při teplotě 98 °C po dobu 20 min (v režimu proudící páry).

Příprava vzorků pro metodu LAMP

Testované kmeny byly aerobně kultivovány v bujónu BHI (10 ml) (inokulum 1,0 obj.%) při teplotě 37 °C, do dosažení požadované exponenciální fáze jejich růstu. Ta byla zjišťována s využitím laboratorního spektrofotometru ONDA VIS V-10 Plus (Giorgio Bormac, ITA). Konkrétně byla měřena optická hustota buněčných suspenzí při 600 nm (OD₆₀₀) a jako limit pro dosažení exponenciální

Tabulka I

Použité bakteriální kmeny

Bakteriální kmen	Původ kmene
<i>Enterococcus faecalis</i> CCM 7247	Potravinový izolát: sýr bryndza (SVK)
<i>Enterococcus faecium</i> CCM 2308	Potravinový izolát: sýr (FRA)
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> CCM 4685	Klinický izolát: puchýř kůže (onemocnění: epidermolysis bullosa)
<i>Escherichia coli</i> CCM 7395	Potravinový izolát (neznámý původ)
<i>Escherichia coli</i> LEV 682/17	Izolát ze solovny: kanál, pulzotyp EC-Xba-14 (CZE)
<i>Escherichia coli</i> LEV 687/17	Izolát ze solovny: stěna solné lázně, šum (bílorůžový), pulzotyp EC-Xba-7 (CZE)
<i>Escherichia coli</i> LEV 1456/17	Izolát ze solovny: solný roztok, pulzotyp EC-Xba-19 (CZE)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> subsp. <i>pneumoniae</i> CCM 8843	Potravinový izolát: mlékárenské výrobky z kravského mléka (neznámý původ)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 700/17	Izolát ze solovny: stěna solné lázně, šum (růžový), pulzotyp KP-Xba-90 (CZE)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 1009/17	Izolát ze solovny: solný roztok, pulzotyp KP-Xba-91 (CZE)
<i>Klebsiella pneumoniae</i> LEV 1022/17	Izolát ze solovny: solný roztok (CZE)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCM 7930	Izolát z láhve na vodu: místnost pro zvířata (USA)

fáze růstu bylo bráno překročení hodnoty 0,300.

Kmeny byly poté pipetovány (1,0 ml) do pasterované syrovátky (9,0 ml). Alikvot každého vzorku syrovátky (5 μ l) ve čtyřech paralelách byl pipetován do Eppendorfových zkumavek s roztokem pro resuspendaci a lýzi buněk (500 μ l). Jednalo se o roztok RALF (AmplexDiagnostic GmbH, DEU). Obsahy zkumavek byly zahřáty v termobloku pro LAMP (Genie[®] HotBlock MiniT-30; Hangzhou Allsheng Instruments CO., LTD, CHN) na teplotu 99 °C s výdrží 2 min. Směs byla následně odstředěna na laboratorní odstředivce Mikro 200 R (Andreas Hettich GmbH & Co. KG, DEU) při 1700 \times g, po dobu 30 s. Alikvot (25 μ l) supernatantů ve čtyřech paralelách byl pipetován do mikrozkušavek (které byly spojeny do stripu) kitů pro LAMP. Byly použity kity: Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay (dále jen Eazyplex[®] GP) a kit Eazyplex[®] BloodScreen GN Assay (dále jen Eazyplex[®] GN) (oba: AmplexDiagnostic GmbH, DEU) obsahující lyofilizované reagenzie. Následovala vlastní analýza LAMP. Postup přípravy vzorků byl navržen a pilotně testován pro použití s tekutou sladkou syrovátkou, a to na základě individuálních konzultací se specialistou firmy AmplexDiagnostics GmbH (DEU).

Vlastní analýza LAMP – detekce bakterií v syrovátce

Mikrozkušavky se vzorky (ve stripu) kitu Eazyplex[®] GP/GN (viz část „Příprava vzorků pro metodu LAMP“) byly vloženy do reakčního termobloku pro LAMP (Genie[®] II; AmplexDiagnostic GmbH, DEU), kde probíhala vlastní analýza – tj. amplifikační reakce LAMP – při teplotě 65 °C po dobu 20 min s využitím fluorimetrické detekce amplikonů v reálném čase. Při experimentech bylo postupováno podle návodu výrobce reakčního termobloku Genie[®] II.

Vyhodnocení výsledků analýzy LAMP

Metoda LAMP může poskytnout jak kvalitativní výsledky (bakterie přítomny +, bakterie nepřítomny–), tak kvantitativní výsledky (např. KTJ·ml⁻¹, resp. v KTJ·LAMP reakce⁻¹). Přestože poskytuje vysoce spolehlivé výsledky rychle a v profilu jednoduché experimentální realizovatelnosti, životaschopnost bakterií určit nedokáže, jelikož je designovaná na amplifikaci specifických sekvencí nukleových kyselin (DNA nebo RNA). V případě pozitivního záchytu bakterií (tj. bakterie přítomny +) bylo provedeno mikrobiologické kultivační stanovení s využitím plotnové metody¹¹, tzn., byla zjištěna životaschopnost sledovaných bakterií.

Specifita kitů Eazyplex[®] GP/GN pro metodu LAMP

Vlastní analýze LAMP, tj. detekci GP/GN bakterií v syrovátce, předcházelo testování specifity kitů Eazyplex[®] GP/GN pro metodu LAMP, a to na úroveň detekovaného bakteriálního druhu. K tomu byly použity 24 h staré buňky tří sbírkových GP bakterií a tří sbírkových GN bakterií. Bakterie byly pipetovány (1,0 ml) do pasterované

syrovátky (9,0 ml) v exponenciální fázi jejich růstu (OD₆₀₀ vyšší než 0,300). Vzorky byly připraveny dle postupu výše (viz část Příprava vzorků pro metodu LAMP), a poté proměřeny pro každý kit Eazyplex[®] GP/GN během dvou stanovení LAMP ve dvou paralelách. Amplifikační reakce LAMP probíhaly v reakčním termobloku Genie[®] II. Specifita pro jednotlivé GP/GN bakterie byla potvrzena amplifikací specifického genu pro konkrétní bakteriální druh, projevující se vznikem amplikonů, zaznamenaných softwarem přístroje Genie[®] II. Průměrné počty bakterií detekované kity pro GP/GN bakterie se pohybovaly v rozmezí řádů 10⁸–10⁹ KTJ·ml⁻¹.

Výsledky a diskuse

Specifita metody LAMP

V tabulce II jsou uvedeny výsledky testu specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex[®] GP pro detekci tří sbírkových GP bakterií. V tabulce III jsou uvedeny výsledky testu specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex[®] GN pro detekci tří sbírkových GN bakterií.

Na základě výsledků uvedených v tab. II a III bylo konstatováno, že specificky navržené master mixy obsahující specifické primery, a také individuálně navržené postupy příprav vzorků pro analýzu LAMP, poskytly 100% specifitu pro danou skupinu vyšetřovaných GP a GN bakterií. Z analýz LAMP vyplynulo, že testované GP a GN bakterie obsahovaly specifické geny, pro které byly navrženy konkrétní specifické primery (obsažené v master mixech). Stran GP bakterií se konkrétně jednalo o geny kódující protein EF0027 pro regulaci transkripce u *Ent. faecalis*¹², gen *tufA* pro *Enterococcus* sp.¹³ a gen *tuf* pro *Streptococcus* sp.¹⁴. Geny *tuf* kódují elongační faktor Tu, který představuje protein vázající nukleotid guanosintrifosfát (GTP), který hraje ústřední roli při syntéze proteinů u bakterií¹³. Stran GN bakterií se konkrétně jednalo o gen *yfiL* kódující lipoproteinový signální peptid YfiL u *E. coli*¹⁵, gen *phoE* kódující fosforin PhoE lokalizovaný ve vnější membráně u *Kl. pneumoniae*¹⁶, gen *oprL* kódující peptidoglykanový prekurzor lipoproteinu OprL u *Ps. aeruginosa*¹⁷ a geny kódující úsek 16S rRNA u bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*¹⁸.

Aplikace metody LAMP pro detekci nežádoucích bakterií v syrovátce

Z důvodu zjištění vhodnosti metody LAMP pro aplikaci do mlékárenské laboratorní praxe, a také pro posouzení vhodnosti komerčních kitů Eazyplex[®] GP/GN, byla uskutečněna evaluace této metody. Konkrétně byla provedena detekce nežádoucích GP a GN bakterií v tekuté sladké syrovátce. Výsledky experimentů jsou uvedeny v tab. IV pro GP bakterie a také v tab. V pro GN bakterie.

Z výsledků uvedených v tab. IV je patrné, že u všech tří GP bakterií (*Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, *Strep. dysgalactiae*) došlo k jejich detekci v syrovátce ze 100 %, a to s využitím kitu Eazyplex[®] GP. Z tab. V vyplývá, že

Tabulka II

Test specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU) pro detekci grampozitivních bakterií (GP)

Bakteriální kmen	Analyty detekované kitem Eazyplex [®] GP													
	VRE <i>vanA</i>		VRE <i>vanB</i>		<i>Enterococcus faecalis</i>		<i>Enterococcus</i> sp.		<i>Streptococcus pneumoniae</i>		<i>Streptococcus</i> sp.		Kontrola inhibice reakce	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>Ent. faecalis</i> CCM 7247	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	P	P
<i>Ent. faecium</i> CCM 2308	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	P	P
<i>Strep. dysgalactiae</i> CCM 4685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	P	P
Slepý pokus (syrovátka)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P

+ / -... pozitivní/negativní reakce, P... platná, VRE... vankomycin-rezistentní enterokoky, *vanA* a *vanB*... geny zodpovědné za rezistenci enterokoků k vankomycinu

Tabulka III

Test specifity pro metodu LAMP s využitím kitu Eazyplex[®] BloodScreen GN Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU) pro detekci gramnegativních bakterií (GN)

Bakteriální kmen	Analyty detekované kitem Eazyplex [®] GN													
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>		<i>Ps. aeruginosa/ Ps. fluorescens/ Ps. putida</i>		<i>Enterobacteria- cee</i>		CTX-M-1		CTX-M-9		Kontrola inhibice reakce	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
<i>E. coli</i> CCM 7395	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	P	P
<i>Kl. pneumoniae</i> CCM 8843	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	P	P
<i>Ps. aeruginosa</i> CCM 7930	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	P	P
Slepý pokus (syrovátka)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P

+ / -... pozitivní/negativní reakce, P... platná, CTX-M-1... bakterie s geny produkce β -laktamasy CTX-M-1, CTX-M-9... bakterie s geny produkce β -laktamasy CTX-M-9

u všech 9 GN bakterií (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*) došlo k jejich detekci v syrovátce také ze 100 %, a to s využitím kitu Eazyplex[®] GN. Na základě těchto zjištění lze metodu LAMP a kity Eazyplex[®] GP/GN označit za slibné pro detekci výše uvedených bakterií v tekuté sladké syrovátce. Tekutá sladká syrovátka byla pro aplikační experimenty s využitím metody LAMP zvolena záměrně, a to z několika důvodů. Především díky tomu, že šlo o tekuté médium simulující reálný potravinový systém, na

ktej se daly aplikovat kity Eazyplex[®] GP/GN originálně navržené pro vyšetření vzorků tekuté lidské krve, vč. zjištění možnosti transferu metody LAMP z klinické laboratorní praxe do mlékárenské laboratorní praxe. Dalším důvodem byl fakt, že tekutá sladká syrovátka, jako hlavní vedlejší produkt při výrobě sladkých (tj. syřidlem srážěných) sýrů, bývá často sekundárně kontaminována nejrůznějšími zdravotně nebezpečnými a technologicky rizikovými bakteriemi, mezi které se řadí např. enterokoky, strep-

Tabulka IV

Detekce grampozitivních bakterií (GP) v tekuté syrovátce s využitím metody LAMP a kitu Eazyplex[®] BloodScreen GP Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU)

Bakteriální kmen	Analyty detekovatelné kitem Eazyplex [®] GP																				Kontrola inhibice reakce											
	VRE <i>vanA</i>				VRE <i>vanB</i>				<i>Enterococcus faecalis</i>				<i>Enterococcus</i> sp.				<i>Streptococcus pneumoniae</i>					1	2	3	4							
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4												
<i>Ent. faecalis</i> CCM 7247	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P				
<i>Ent. faecium</i> CCM 2328	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Strep. dysgalactiae</i> CCM 4685	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	P	P	P	P				
Slepý pokus (syrovátka)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P

+ / -... pozitivní/negativní reakce, P... platná, VRE... vankomycin-rezistentní enterokoky, *vanA* a *vanB*... geny rezistence enterokoků k vankomycinu

tokoky, pseudomonády, klebsiely, bakterie *E. coli* a jiné bakterie čeledi *Enterobacteriaceae*. Pro některé způsoby využití syrovátky vyžadující vysokou mikrobiologickou kvalitu (např. pro výrobu potravin/nápojů na bázi syrovátky, biotechnologické zpracování) je zapotřebí mikrobiologicky co nejkvalitnější syrovátka, prostá podmíněně patogenních bakterií a bakterií způsobujících kažení. Při použití tekuté sladké syrovátky bylo zjištěno a v pozitivním náhledu na experimentálně řešenou problematiku konstatováno, že dílčí složky syrovátky (tj. mléčný tuk, laktosa, bílkovina a minerální látky) negativně neovlivňovaly reakci LAMP, a že bylo prakticky možné syrovátku používat bez nutnosti ji dále upravovat (ředit). Tekutá sladká syrovátka byla pro zkoumání vybrána také z důvodu originality uskutečňovaných pilotních experimentů, které v tomto provedení nebyly doposud realizovány. V budoucnu by bylo možné na tuto problematiku navázat dalšími experimenty, a to např. testováním jiných kitů (komerčně dostupných či individuálně navržených pro analýzu LAMP), jiných testovaných nežádoucích bakterií, jiných vhodných potravinových maticí, a to vše při zohlednění finanční náročnosti experimentů LAMP.

Závěr

Z výsledků aplikace metody LAMP při detekci 12 nežádoucích bakterií v reálné potravinové matici (tekuté sladké syrovátce) vyplynuly následující závěry. U všech tří grampozitivních bakterií (*Ent. faecium*, *Ent. faecalis*, *Strep. dysgalactiae*) došlo k jejich detekci v syrovátce ze 100 %, a to při využití kitu Eazyplex[®] GP navrženého pro grampozitivní bakterie. U všech 9 gramnegativních bakterií (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*, *Ps. aeruginosa*) došlo k jejich detekci v syrovátce také ze 100 %, a to při využití kitu Eazyplex[®] GN určeného pro gramnegativní bakterie.

Na základě uskutečněných experimentů bylo konstatováno, že metoda LAMP představuje rychlou moderní molekulárně biologickou metodu, která poskytuje průkazné a jednoznačné výsledky při detekci zdravotně a technologicky nežádoucích bakterií v tekutých potravinových maticích, jako je např. tekutá sladká syrovátka.

Výsledky z analýz LAMP získané v rámci této práce přispěly k zhodnocení potenciálu této metody a potvrzení, že její transfer z klinické laboratorní praxe do mlékárenské laboratorní praxe je možný. Možnosti a omezení aplikace metody LAMP odpovídají možnostem a omezením metody PCR. Obě tyto metody mají podobná omezení, z nichž se dá vyzdvihnout společná náročnost navrhování vhodných primerů. Přestože existují on-line softwary, které s návrhy primerů mohou pomoci, ne vždy je možné se na ně spolehnout. Pro reakci LAMP je zapotřebí navrhnout 4 až 6 primerů, které cílí na 6 až 8 oblastí, které musí být dostatečně konzervativní a specifické, aby nedocházelo k falešně pozitivním výsledkům. Pro reakci PCR stačí navrhnout pouze 2 primery, které cílí většinou na jednu konzervativní oblast. Metoda LAMP je oproti metodě PCR náročnější, nicméně na druhou stranu specifičtější a spolehlivější.

Navzdory výhodám molekulárně biologických metod se dá predikovat, že tyto metody nemohou v blízkém budoucnu klasické mikrobiologické kultivační metody zcela nahradit.

Tato práce byla finančně podpořena Ministerstvem zemědělství, Národní agenturou pro zemědělský výzkum, projektem č. QK1710156 (02/2017–12/2021, MZE/QK) v programu "ZEMĚ" (2017–2025), a také díky institucionální podpoře dlouhodobého koncepčního rozvoje výzkumné organizace dle rozhodnutí č. MZE-RO1421. Autoři by

Tabulka V

Detekce gramnegativních bakterií (GN) v tekuté syrovátce s využitím metody LAMP a kitu Eazyplex® BloodScreen GN Assay (AmplexDiagnostic GmbH, DEU)

Bakteriální kmen	Analyty detekovatelné kitem Eazyplex® GN																															
	<i>Escherichia coli</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>				<i>Ps. aeruginosa/ Ps. fluorescens/ Ps. putida</i>				<i>Enterobacteriaceae</i>				CTX-M-1				CTX-M-9				Kontrola inhibice reakce							
	Paralela stanovení																															
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4				
<i>E. coli</i> CCM 7395	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>E. coli</i> LEV 682/17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>E. coli</i> LEV 687/17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>E. coli</i> LEV 1456/17	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Kl. pneumoniae</i> CCM 8843	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Kl. pneumoniae</i> LEV 700/17	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Kl. pneumoniae</i> LEV 1009/17	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Kl. pneumoniae</i> LEV 1022/17	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
<i>Ps. aeruginosa</i> CCM 7930	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P
Slepý pokus (syrovátka)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	P	P	P

+ / -... pozitivní/negativní reakce, P... platná, CTX-M-1... bakterie s geny produkce β-laktamasy CTX-M-1, CTX-M-9... bakterie s geny produkce β-laktamasy CTX-M-9

chtěli poděkovat Martině Tylečkové, Bc. (Axon Lab spol. s r.o., CZE) za zapůjčení reakčního termobloku LAMP a Dr. Larsi Wassillovi (AmplexDiagnostics GmbH, DEU) za odborné konzultace k přípravě vzorků pro metodu LAMP.

LITERATURA

- Notomi T., Mori Y., Tomita N., Kanda H.: J. Microbiol. 53 (1), 1 (2015).
- Garg N., Ahmad F. J., Kar S.: Curr. Res. Microb. Sci. 3, 100120 (2022).
- <https://www.eazyplex.com/BloodScreen>, staženo 10. 8. 2022.
- Osaili T. M., Hasan F., Dhanasekaran D. K., Obaid R. S., Al-Nabulsi A. A., Ayyash M., Karam L., Savvaidis I. N., Holley R.: Int. J. Food Microbiol. 337, 108947 (2021).
- Chai C., Oh S. W.: Food Sci. Biotechnol. 29, 879 (2020).
- Kim J. H., Oh S. W.: Food Chem. 327, 127036 (2020).
- Šviráková E., Kyznar J., Loupancová K.: Mlékařské listy – Zpravodaj 28 (1), 31 (2017).
- Moon Y. J., Lee S. Y., Oh S. W.: Foods 11, 322 (2022).
- <https://www.eiken.co.jp/en/products/lamp/>, staženo 10. 8. 2022.
- Nzeli C. O., Cáceres A. G., Guerrero-Quincho S., Tineo-Villafuerte E., Rodríguez Delfin L., Mimori T., Uezato H., Katakura K., Gomez E. A., Guevara G. A., Hashiguchi Y., Kato H.: Acta Trop. 153, 116 (2016).
- ČSN EN ISO 7218: Mikrobiologie potravin a krmiv – Všeobecné požadavky a doporučení pro mikrobiální zkoušení (duben 2008).
- Abranches J., Tijerina P., Aviléz-Reyes A., Gaca A. O., Kajfasz J. K., Lemos J. K.: Plos One 8 (6), e64875 (2013).
- Ke D., Boissinot M., Huletsky A., Picard F. J., Frenet-

- te J., Ouellette M., Roy P. H., Bergeron M. G.: *J. Bacteriol.* 182, 6913 (2000).
14. Picard F. J., Ke D., Boudreau D. K., Boissinot M., Huletsky A., Richard D., Ouellette M., Roy P. H., Bergeron M. G. J.: *Clin. Microbiol.* 42, 3686 (2004).
 15. <https://biocyc.org/gene?orgid=ECOLI&id=EG12446-MONOMER>, staženo 10. 8. 2022.
 16. <https://loinc.org/LP185688-1/>, staženo 10. 8. 2022.
 17. <https://www.pseudomonas.com/feature/show?id=104708>, staženo 10. 8. 2022.
 18. Woo P. C. Y., Leung P. K. L., Leung K. W., Yuen K. Y.: *J. Clin. Pathol.: Mol. Pathol.* 53, 211 (2000).

E. Šviráková^a, K. Loupancová^a, and I. Němečková^b (^a *University of Chemistry and Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Department of Food Preservation, Prague*, ^b *Dairy Research Institute, Ltd., Prague*): **Application of the LAMP Method for Detection of Undesirable Bacteria in Whey**

The LAMP method (Loop-Mediated Isothermal Amplification) is a molecular biological method for the amplification of specific DNA and RNA sequences suitable for the detection of various pathogenic, semi-pathogenic and technological undesirable microorganisms. The aim of the work is using the LAMP method for the option verification of detection of health and technologically undesirable bacteria in liquid sweet whey under laboratory conditions. Experiments were carried out with 12 bacterial strains, including three representatives of Gram-positive bacteria (*Enterococcus* spp., *Streptococcus* sp.) and 9 representatives of Gram-negative bacteria (*E. coli*, *Kl. pneumoniae*,

Ps. aeruginosa). The Eazyplex[®] BloodScreen GP/GN Assay kits (AmplexDiagnostic GmbH, Germany), designed for Gram-positive (GP) and Gram-negative (GN) bacteria and commonly used in clinical laboratory practice, were used for the LAMP experiments. Based on the obtained results it was concluded that the LAMP method was suitable for the detection of tested bacteria at the level of the species in liquid sweet whey. The results of this work can be used in the application of the LAMP method in dairy laboratory practice, in the targeted assurance of health safety and quality of food raw materials and products, especially liquids.

Keywords: LAMP method, detection of bacteria, undesirable bacteria, whey

- Šviráková E., Loupancová K., Němečková I.: *Chem. Listy* 116, 693–699 (2022).
- <https://doi.org/10.54779/chl20220693>

Acknowledgements

This work was financially supported by the Ministry of Agriculture, by the National Agency for Agriculture Research, by the project No. QK1710156 (02/2017–12/2021, MZE/QK) in the programme 'ZEMĚ' (2017–2025) and by the institutional support for the long-term conceptual development of research organization according to the decision No. MZE-RO1421. The authors would like to thank Martina Tylečková, B.Sc. (Axon Lab spol. s r.o., CZE) for lending the LAMP reaction termoblok and Dr. Lars Wassill (AmplexDiagnostics GmbH, DEU) for expert advice on sample preparation for the LAMP method.