

FAKTORY VIRULENCE A TVORBA BAKTERIÁLNÍHO BIOFILMU U ARKOBACTERŮ

VACKOVÁ BARBORA, ŠILHOVÁ LUCIE, ŠILHA DAVID*

Katedra biologických a biochemických věd

* Garant

ÚVOD

Mikroorganismy se vyskytují ve dvou formách, a to jak ve formě planktonní, tak také ve formě biofilmu ¹. Mezi mikroorganismy tvořící biofilm patří také bakterie rodu *Arcobacter*. Tento rod zahrnuje jak patogenní, tak i volně žijící druhy ².

S patogenitou mikroorganismů souvisí, kromě biofilmu, také další virulenční faktory. Zdá se, že toto platí i u bakterií rodu *Arcobacter*, nicméně jejich virulentní mechanismy nejsou stále dostatečně vysvětleny a pochopeny. V genomu některých druhů rodu *Arcobacter* bylo detekováno několik genů kódujících faktory virulence. Těmito virulenčními faktory jsou protein vázající fibronektin (*cj134*, *cadF*), filamentární hemagglutinin (*hecA*), protein aktivující hemolysin (*hecB*), hemolysin a fosfolipáza (*tlyA*, *pldA*), integrální membránový protein (*mviN*), *Campylobacter* invazivní antigen B (*ciaB*) a vnější membránový protein (*irgA*) ^{3,4}.

K detekci virulentně asociovaných genů se využívá celá řada metod. Mezi nejvyužívanější techniky v současné době patří metody molekulárně-biologické, založené na polymerázové řetězové reakci ⁵. Pro hodnocení tvorby biofilmu se využívají například metody kulturační a mikroskopické, avšak především metody molekulárně-biologické či spektrofotometrické ^{5,6}.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

K detekci virulenčních faktorů a pro sledování tvorby biofilmu a jeho ovlivnění přírodními extrakty byly použity referenční a sbírkové kmeny rodu *Arcobacter*. Jako srovnávací kmeny byly použity *Cronobacter sakazakii* CCM 3461, *Escherichia coli* CCM 3954 a *Staphylococcus aureus* CCM 3953.

Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu *Arcobacter* pomocí *mPCR*

Pro detekci a identifikaci genů kódujících virulenční faktory vybraných kmenů druhu *Arcobacter* byla využita metoda multiplex PCR (*mPCR*). Nejprve byly připraveny buněčné suspenze, a to pipetováním 200 μ l 10 \times TE pufru, který byl následně zaočkován několika koloniemi testovaného bakteriálního kmene. Dále byly zkumavky vortexovány a lyzovány

(110 °C po dobu 15 minut). Následovala příprava tří různých sad *m*PCR směsí (1, 2, 3). Primery použité na přípravu směsí jsou vypsány níže.

Primery pro PCR (Generi biotech, ČR)

cadF-F (1251K1), *cadF*-R (1251K2), *ciaB*-F (1251K3), *ciaB*-R (1251K4), *cj1349*-F (1251K5), *cj1349*-R (1251K6), *irgA*-F (1251K7), *irgA*-R (1251K8), *hecA*-F (1251K9), *hecA*-R (1251L0), *hecB*-F (1251L1), *hecB*-R (1251L2), *mviN*-F (1251L3), *mviN*-R (1251L4), *pldA*-F (1251L5), *pldA*-R (1251L6), *tlyA*-F (1251L7), *tlyA*-R (1251L8)

Připravené směsi o celkovém objemu 25 μ l byly následně pro každý testovaný bakteriální kmen vloženy do termocykleru s teplotním programem zahrnujícím 5 fází, a to počáteční denaturaci (95 °C; 4 minuty), denaturaci (95 °C; 30 sekund), annealing (56 °C; 45 sekund), extenzi (72 °C; 45 sekund) a závěrečnou polymerační syntézu (72 °C; 5 minut). Prostřední tři fáze (denaturace, annealing, extenze) byly cyklicky 35x opakovány.

Vzniklé PCR produkty byly separovány elektroforézou v 2% agarózovém gelu. Po ochlazení a následném přidání 4 μ l ethidium bromidu byl připravený gel nalit do elektroforetické vany s hřebínky a ponechán ztuhnout. Následně byl gel zalit 1x TBE puřem a před samotným dávkováním do gelu bylo vždy 10 μ l PCR produktu promícháno s 5 μ l vkládacího puřru. Do jedné z pozic bylo také dávkováno 5 μ l DNA markeru o velikosti produktů 200 – 1500 bp. Po proběhnutí elektroforézy (90 minut, 100 V) byla provedena vizualizace pomocí UV transluminátoru při vlnové délce 300 nm a získané záznamy byly zpracovány pomocí softwaru Bio-Capt. V rámci každé PCR reakce byla zahrnuta i pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828) a negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461).

Christensenova metoda pro detekci biofilmu arkobakterů

Pro detekci vytvořeného biofilmu bakterií rodu *Arcobacter* byla použita Christensenova metoda v mikrotitračních destičkách. Metodika byla provedena dle postupu, který je uveden již v předchozí studii ⁷.

Dále byla připravena negativní kontrola, a to pipetováním 100 μ l BHI bujónu do každé z jamek mikrotitrační destičky. Naměřená hodnota tohoto nezaočkovaného média ($A_{595} = 0,1119$) dále sloužila pro výpočet tvorby čistého biofilmu u vybraných bakteriálních kmenů. Stejným způsobem byly proměřeny jednotlivé koncentrace pro čisté extrakty, a takto získané hodnoty byly stejně jako v případě negativní kontroly použity pro zmíněný výpočet.

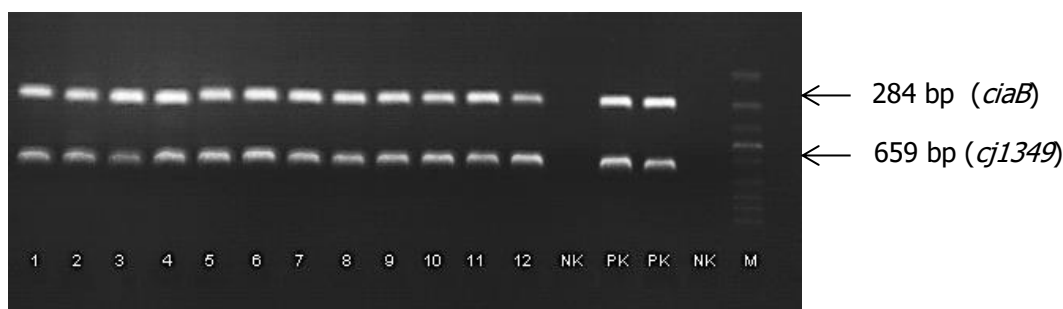
Za biofilm pozitivní byly označeny kmeny, jejichž $A_{595} > A_{595, \text{BHI bujónu}}$ a jako biofilm negativní byly označeny kmeny, jejichž $A_{595} \leq A_{595, \text{BHI bujónu}}$. Naměřené hodnoty byly statisticky hodnoceny, a to pomocí programu Excel 2010 MS Office (Microsoft, USA) a Statistica 12 (StatSoft, USA). Extrémní hodnoty byly testovány Deanovým-Dixonovým testem a případné odlehlé hodnoty byly s pravděpodobností 95 % vyloučeny. Ze zbylých hodnot byl určen medián a směrodatná odchylka (StDev).

VÝSLEDKY A DISKUSE

Detekce virulenčních faktorů bakterií rodu *Arcobacter*

Metoda multiplexní polymerázové řetězové reakce popsána v dřívější studii ⁴, byla aplikována pro detekci virulentně asociovaných genů bakterií rodu *Arcobacter*. Pozitivní kontrola *Arcobacter butzleri* LMG 10828 byla zvolena na základě předešlých literárních poznatků a zjištění, že tento kmen zahrnuje ve svém genomu všechny testované geny ^{4,8}.

Příklad výsledku elektroforetického záznamu, který je viditelný na Obrázku 1, znázorňuje způsob detekce virulenčních faktorů vybraných testovaných kmenů arkobakterů.



Obrázek 1: Elektroforetický záznam mPCR pro detekci virulenčních faktorů arkobakterů, mPCR směs 1

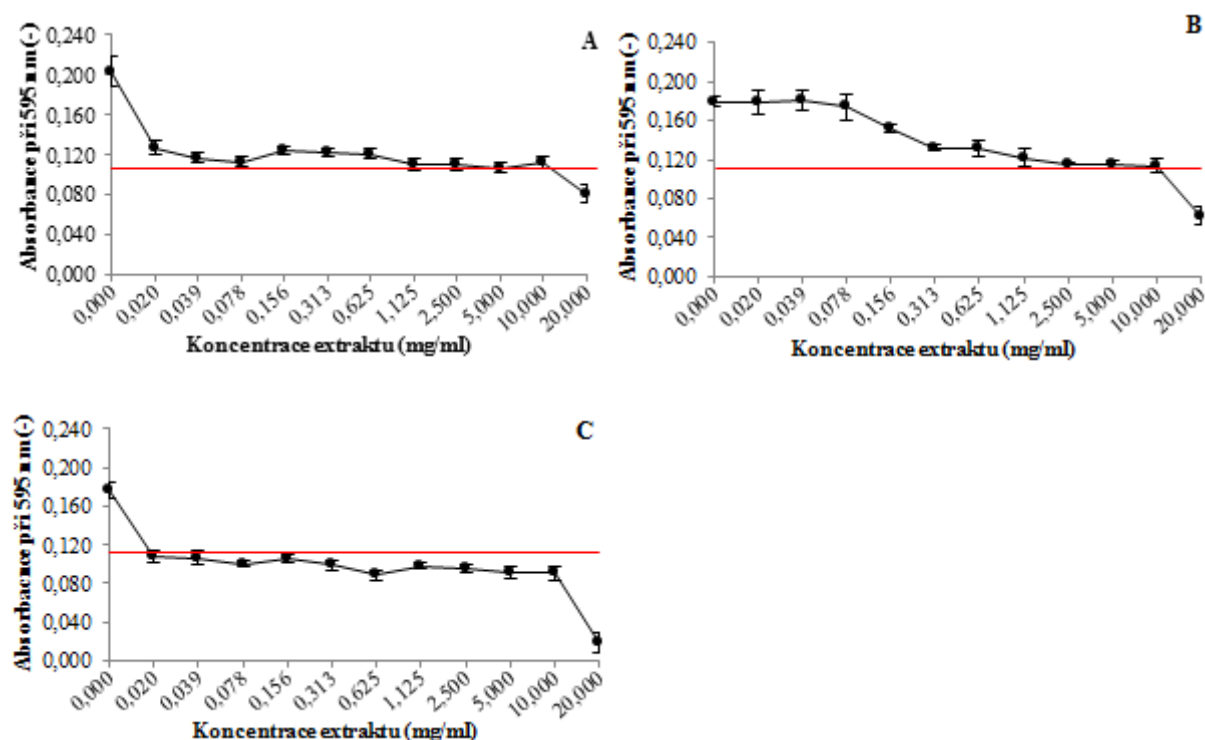
1 – Ab. UPa 2013/38; 2 – Ab. UPa 2013/39; 3 – Ab. UPa 2013/40; 4 – Ab. UPa 2013/41; 5 – Ab. UPa 2013/42; 6 – Ab. UPa 2013/43; 7 – Ab. UPa 2013/44; 8 – 2013/45; 9 – Ab. UPa 2013/46; 10 – Ab. UPa 2013/47; 11 – Ab. UPa 2013/48; 12 – Ab. UPa 2013/49; PK – pozitivní kontrola (*Arcobacter butzleri* LMG 10828); NK – negativní kontrola (*Cronobacter sakazakii* CCM 3461); M – DNA marker 200– 1500 bp

Takovým to způsobem byly vyhodnoceny elektroforetické záznamy všech tří sad mPCR směsí u 76 testovaných kmenů arkobakterů. Na jejich základě lze říci, že z celkového počtu 76 testovaných kmenů byl u 96,1 % kmenů detekován gen *ciaB*, u 71,1 % gen *cj1349*, u 76,1 % gen *pldA*, u 11,8 % gen *irgA*, u 26,3 % gen *hecA*, u 82,9 % gen *tlyA*, u 94,7 % gen *mviN* a u 26,3 % testovaných kmenů byl detekován gen *hecB*. Zjištění, že geny *ciaB* a *mviN* byly detekovány u nejvyššího počtu kmenů potvrzuje také další dřívější studie ⁴. Z výsledků této studie dále vyplývá, že z celkového počtu 76

testovaných kmenů, bylo pouze u čtyř kmenů, tedy u 5,2 %, detekováno všech 8 virulentně asociovaných genů. Jednalo se o zástupce druhu *Arcobacter butzleri*, čemuž se přiklání také doposud publikované výsledky [8](#), kde z testovaných druhů arkobakterů byla pouze v případě druhu *A. butzleri* detekována přítomnost všech testovaných genů. Naopak, ani jeden z virulentně asociovaných genů nebyl v rámci této studie detekován u kmene *Arcobacter cryaerophilus* UPa 2014/58, což tedy představuje pouhé 1,3 % ze všech testovaných kmenů.

Testování tvorby biofilmu arkobakterů v přítomnosti extraktů z přírodních látek

Christensenovou metodou v mikrotitračních destičkách byla u 9 kmenů arkobakterů testována schopnost tvorby biofilmu a možnost jejího ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku. Příklad grafického znázornění výsledků, tj závislosti naměřených hodnot absorbancí, které odpovídají množství vytvořeného biofilmu kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8, na jednotlivých koncentracích daného extraktu, zobrazuje Obrázek 2.



Obrázek 2: Tvorba biofilmu u kmene *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 v přítomnosti přírodních extraktů

A – extrakt z hřebíčku; B – extrakt z badyánu; C – extrakt z muškátového oříšku; červená čírná linie – hodnota absorbance pro BHI ($A_{595} = 0,112$)

Takovým to způsobem bylo vyhodnoceno všech 9 testovaných kmenů arkobakterů. Výsledky předložené studie ukazují, že jsou tyto bakterie skutečně schopné tvorby biofilmu, jak ve svých publikacích uvádějí také další autoři ⁹. Obecně lze konstatovat, že z devíti testovaných kmenů arkobakterů, vykazoval nejvyšší biofilmovou aktivitu kmen *Arcobacter butzleri* UPa 2013/8 s hodnotou naměřené absorbance $A_{595} = 0,180 - 0,200$, která odpovídá množství biofilmu vytvořeného bez přítomnosti přírodních extraktů.

Dále lze říci, že testované extrakty, tj. extrakt z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku, vykazovaly velmi podobné účinky na tvorbu biofilmu u všech kmenů arkobakterů. Také u všech testovaných kmenů těchto bakterií došlo při hodnotě koncentrace extraktu 20 mg/ml k poklesu biofilmové aktivity hluboko pod stanovenou limitní hranici ($A_{595} = 0,112$).

ZÁVĚR

Pomocí multiplexní polymerázové řetězové reakce byly detekovány virulentně asociované geny celkem u 76 kmenů druhu *A. butzleri*, *A. cryaerophilus* a *A. skirrowii*. U jednotlivých kmenů byly detekovány geny v různých kombinacích, což naznačuje značnou variabilitu ve virulenčních vlastnostech těchto bakterií.

Dále byla pomocí modifikované Christensenovy metody v mikrotitračních destičkách testována tvorba biofilmu u vybraných kmenů rodu *Arcobacter* a jeho ovlivnění extrakty z hřebíčku, badyánu a muškátového oříšku. U všech testovaných kmenů došlo k eliminaci biofilmové aktivity, a to zejména v přítomnosti extraktu z hřebíčku. Mezi jednotlivými druhy ani kmeny však nebyla zaznamenána významná variabilita.

Tento projekt byl realizován za finanční podpory prostředků z projektu SGFChT 07/2017.

LITERATURA

1. Bjarnsholt, T.: The role of bacterial biofilms in chronic infections. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 121, 1-58 (2013).
2. Whiteduck-Léveillé, J., Cloutier, M., Topp, E., Lapena, D. R., Talbot, G., Villermur, R., Khan, I. U. H.: Development and evaluation of multiplex PCR assays for rapid detection of virulence-associated genes in *Arcobacter* species. *Journal of Microbiological Methods*. 121, 59-65 (2016).
3. Ferreira, S., Queiroz, J. A., Oleastro, M., Domingues, F., C.: Genotypic and phenotypic features of *Arcobacter butzleri* pathogenicity. *Microbial Pathogenesis*. 76, 19-25 (2014).

4. Tabatababei M., Aski, H. S., Shayegh, H., Khoshbakht, R.: Occurrence of six virulence-associated genes in *Arcobacter* species isolated from various sources in Shiraz, Southern Iran. *Microbial Pathogenesis*. 66, 1-4 (2014).
5. Christensen, G. D., Simpson, W. A., Younger, J. J., Baddour, L. M., Barrett, F. F., Melton, D. M., Beachey, E. H.: Adherence of Coagulase-Negative *Staphylococci* to Plastic Tissue Culture Plates: a Quantitative Model for the Adherence of *Staphylococci* to Medical Devices. *Journal of clinical mikrobiology*. 22 (6), 996-1006 (1985).
6. Stepanović, S. Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M.: A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Journal of Microbiological Methods*. 40 (2), 175-179 (2000).
7. Šilhová-Hrušková L., Motřková P., Šilha D., Vyřasová J.: Hodnocení tvorby biofilmu vybraných patogenů vyskytujících se v potravinářském průmyslu. *EPIDEMIOLOGIE, MIKROBIOLOGIE, IMUNOLOGIE*. 64 (3), 169-174 (2015).
8. Doudah, L., De Zutter, L., Baré, J., De Vos, P., Vandamme, P., Vandenberg, O., A-M., Van den Abeele, Houf, K.: Occurrence of Putative Virulence Genes in *Arcobacter* Species Isolated from Humans and Animals. *Journal of Clinical Microbiology*. 50 (3), 735-741 (2012).
9. Ferreira, S., Fraqueza, M. J., Queiroz, J. A., Domingues, F., C., Oleastro, M.: Genetic diversity, antibiotic resistance and biofilm-forming ability of *Arcobacter butzleri* isolated from poultry and environment from a Portuguese slaughterhouse. *International Journal of Food Microbiology*. 162, 82-88 (2013).