

# Certifikovaná metodika

## Stanovení přítomnosti *E. coli* ve vzorku pomocí kapilární izoelektrické fokusace

### **Metodiku vypracoval:**

Za Ústav analytické chemie AV ČR, v.v.i., Veveří 97, 602 00 Brno

Marie Horká

Karel Šlais

Za Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Ke Dvoru 12a, 160 00 Praha

Martin Jakubec

Iveta Hynštová

**Metodika vznikla v rámci projektu:** VG20102015023 - Systémy rychlého rozhodování pro bezpečnost potravin (2010-2015, MV0/VG)

### **Uživatelem metodiky je**

Zdravotní ústav se sídlem v Ostravě

Partyzánské nám. 7

Ostrava, 70200

tel.: 596 200 111.IČ:71009396

zastoupena RNDr. Petrem Hapalou

### **Oponentní posudek zpracoval:**

MVDr. Jiří Hlaváček

Státní veterinární správa

Slezská 100/7, Praha 2, 12056

Adresa WWW: [www.svscr.cz](http://www.svscr.cz)

Telefon: 227 010 14

## Obsah

1. Úvod .....	3
2. Cíle metodiky .....	4
3. Popis metodiky, srovnání se stávajícími postupy .....	4
3.1. Popis stávající metodiky .....	4
3.2. Chemikálie a přístroje .....	4
3.3. Odběr vzorku .....	5
3.4. Příprava vzorku .....	5
3.5. Stanovení přítomnosti <i>E. coli</i> .....	6
4. Novost postupů a jejich zdůvodnění .....	7
5. Popis uplatnění certifikované metodiky .....	8
6. Seznam použité literatury .....	8
7. Seznam literatury předcházející metodice .....	8

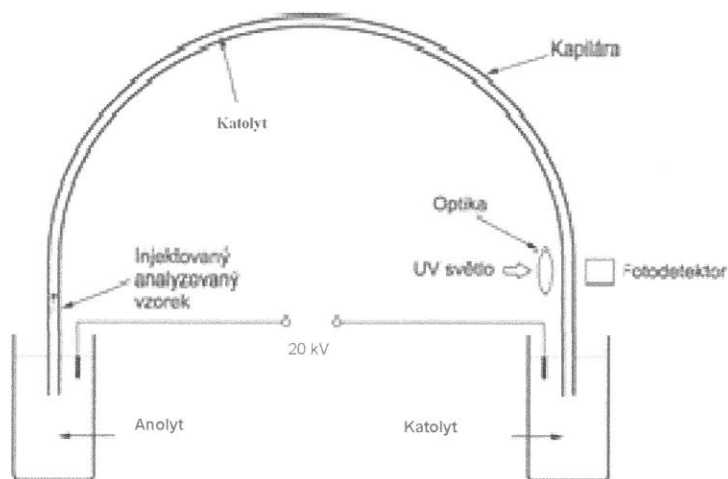
## 1. Úvod

Přítomnost buněk *Escherichia coli* ve vodách nebo potravinách je ukazatelem recentního fekálního znečištění analyzovaného vzorku. Ve střevním traktu se jednotlivé kmeny chovají jako patogeny s různým mechanismem účinku, podle kterého se dělí do čtyř skupin. První skupinou jsou enteropatogenní kmeny (EPEC), druhou skupinou jsou enterotoxigenní kmeny (ETEC), třetí skupinou jsou enteroinvazivní kmeny (EIEC) *E. coli* a poslední čtvrtá skupina je enterohemoragická (EHEC) [1]. Nutnost rychlé identifikace patogenních a potenciálně patogenních mikroorganismů vede k využívání nových technik (flowcytometrie, PCR) mezi které patří i kapilární izoelektrická fokusace (CIEF).

Jedná se o metodu, při níž jsou amfoterní látky rozdělovány na základě svých rozdílných izoelektrických bodů (dle distribuce kladných a záporných nábojů na molekule). Elektromigrace probíhá v prostředí gradientu pH, který se tvoří působením elektrického pole na komplexní směs amfolytů a jednoduchých elektrolytů (spacerů, tabulka 1), které tvoří nosný elektrolyt. Na rozdíl od plošných gelových uspořádání je třeba v CIEF po dosažení ustáleného stavu fokusované zóny mobilizovat, aby mohly být detekovány v místě např. optického detektoru, který je u jednoho z konců kapiláry. K přirozené mobilizaci zón dochází v křemenných kapilárách v důsledku přítomnosti elektroosmotických sil [2].

Předností CIEF je rychlost separace mikroorganismů, vysoká účinnost a nízká spotřeba vzorku i ostatních používaných látek. Analýzy je možno provádět v běžných mikrobiologických, biochemických či analytických laboratořích při zachování všech předpisů souvisejících s prací s biologickým materiálem.

V použitém základním zapojení CIEF, viz schéma, jsou oba konce křemenné kapiláry (100  $\mu\text{m}$ ) ponořeny do nádobek se základními elektrolyty, anolytem (+) a katolytem (-), kterým je na počátku analýzy naplněna také kapilára. Využívá se vysokých intenzit elektrického pole (desítky kV/m) neboť díky kapilárnímu formátu lze relativně účinně odvádět Jouleovo teplo. Tím je možno dosáhnout vysokých účinností a rychlostí separace.



Dávkovaný objem při CIEF je zpravidla 10-100 nL. Roztok vzorku je dávkován do konce kapiláry na straně anolytu, tedy konce vzdálenějšího od detektoru. Dávkování vzorku je prováděno hydrostaticky, což znamená rozdílem hladin mezi koncem kapiláry ponořeném

v anolytu oproti konci kapiláry vnořeném v katolytu. Jedná se o princip spojitých nádob, kdy se konec kapiláry ponořený do roztoku se vzorkem zvedne o 5-20 cm vzhledem k druhému konci kapiláry (podle délky separační kapiláry a dávkovaného objemu).

Objem dávkovaného vzorku je funkcí rozměrů kapiláry, viskozity nosného elektrolytu, aplikovaného tlaku a času [2].

On-column optická detekce je nejčastěji používaná pro identifikaci separovaných zón vzorku, jednotlivých analytů. Pomocí UV-VIS absorpční detektoru je v daném místě křemenné kapiláry s odstraněnou povrchovou vrstvou polyimidu sledován pohyb zón vzorku v nosném elektrolytu. Díky změně absorpce nebo rozptylu světla určité vlnové délky (v našem případě 280 nm) oproti nosnému elektrolytu je získán záznam časového průběhu změny absorpce nazývaný elektroforeogram. Z tohoto záznamu lze následně zjistit kvalitativní i kvantitativní složení zkoumaného vzorku. Kvalita daných analytů je dána migračními časy detekovaných zón analytů a následně zjištěnými izoelektrickými body. Jejich hodnota se graficky extrapoluje ze znalosti izoelektrických bodů tzv. pI markerů, které se injektují do kapiláry spolu se vzorkem. Kvantita je pak přímo úměrná výšce resp. ploše detekovaných zón analytů.

## 2. Cíle metodiky

Cílem představené metodiky je urychlit identifikaci přítomnosti fekální kontaminace masa. Přítomnost *Escherichia coli* na analyzované potravíně je marker nedávného fekální znečištění a vzorek potom nesplňuje hygienické požadavky z hlediska na bezpečnost a zdraví uživatele. Současné metodiky se spoléhají hlavně na analýzu CFU, která zahrnuje metodu kultivace vzorku. Tato certifikovaná metodika slouží jako doplnění pro velmi rychlý screening přítomnosti *E. coli* ve vzorku.

## 3. Popis metodiky, srovnání se stávajícími postupy

### 3.1. Popis stávající metodiky

Stávající postup je uveden v analýze. – Metodě ISO 7251. V krátkosti se jedná o kontinuální kultivaci vzorku v selektivní EC půdě, peptonové vodě bez indolu v 37 °C a následně v 44 °C. Každý krok kultivace je přítom až 48 hodinový, důkaz presumptivní přítomnosti *E. coli* tedy podle této ISO normy je možno doložit až za 8 dní kontinuální kultivace.

### 3.2. Chemikálie a přístroje

#### Chemikálie

Použité chemikálie: 0,3 - 2 hmot. % Poly(ethylenglykol), Mw 10 000, 3 obj. % etylalkohol,  $4 \times 10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$  NaOH,  $0,1 \text{ mol.l}^{-1}$  kyseliny fosforečné, morfolin, kyselina chloroctová, nikotinová kyselina (Nic), L-glutamová kyselina (Glu) vše dodáno firmou Sigma (USA). Dále: monohydrát morfolinethansulfonové kyseliny (MES), 3-morfolinpropansulfonová kyselina (MOPS), N-[tris-(hydroxymethyl)-methyl]-3-amino-2-hydroxypropansulfonová kyselina (TAPSO) dodáno firmou Fluka (Švýcarsko); N-(2-acetamido)-2-eminoethansulfonová kyselina (ACES), 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperaziny]-ethansulfonová kyselina (HEPES) dodáno firmou Merk (Německo); amfolyt Biolyte pH 3-10 dodáno firmou Bio-Rad Laboratoriem (USA); amfolyt High resolution pH 2-4; 3-4,5 dodáno firmou Servatyl

Electrophoresis (Německo); L-asparagová kyselina (Asp) dodána firmou LOBA Chemie (Rakousko) a pI markery, pI 2,7; 4,0; 5,3 (25 µg ml<sup>-1</sup>) a kyselina morfolinoctová (MAA) syntetizované na Ústavu analytické chemie AV ČR, v.v.i.

**Tabulka 1. Složení roztoku spacerů - \*pK<sub>a1</sub>, pK<sub>a2</sub> [3; 4].**

Spacer	Koncentrace (×10 <sup>-3</sup> mol.l <sup>-1</sup> )	pK <sub>a1</sub> *	pK <sub>a2</sub> *	pI
Nic	0,15	2,07	4,81	3,44
Asp	0,15	1,88	3,66	2,77
Glu	0,15	2,19	4,25	3,22
MES	0,15	1,30	6,10	3,70
ACES	0,15	1,30	6,75	4,02
MOPS	0,45	1,40	7,20	4,30
TAPSO	0,15	1,30	7,60	4,45
MAA	0,15	2,10	7,40	4,75
HEPES	0,15	3,05	7,50	5,27

### **Přístroje**

Zdroj vysokého napětí Spellman CZE 1000 R, (-) 20 kV (Spellman, USA); křemenné kapiláry potažené polyimidem vnitřní průměr, 0,1 mm, vnější průměr 0,25 mm, celková délka, 350 mm, délka do detektoru 250 mm (Agilent Technologies, Německo); modifikovaný on-column UV/Vis detektor LCD 2082, 280 nm (Ecom; ČR); DU 520 UV-Vis spektrofotometr, 550 nm (Beckman Instruments; USA); ultrazvuková lázeň Sonorex (Bandelin electronic, Německo); Yellowline TTS 3 Digital Orbital Shaker (IKA works, USA); program na sběr dat z analýz (Chromatography Data Station Clarity, ČR).

Veškerý materiál používaný při analýzách je nutno sterilizovat (sterilace 121°C/20min. nebo chemicky). Stejně tak se používají sterilní všechny roztoky a k jejich přípravě se používá 18MΩ voda.

### **3.3. Odběr vzorku**

Při odběru vzorku je nutné postupovat podle existujících ISO norem, konkrétně ISO 6887-2. V krátkosti je nutné důkladně setřít definovanou plochu povrchu masa vhodnou sterilní stěrkou. Vzorek je následně intenzivně homogenizován v selektivním EC pufru.

### **3.4. Příprava vzorku**

Před samotným měřením jsou mikroorganismy zahřáty na teplotu 37°C. Poté jsou mikroorganismy rozsuspendovány ve fyziologickém roztoku (0,8 % roztok NaCl) a pomocí McFarlandových standardů zakalení BaSO<sub>4</sub> je odečtena koncentrace buněk v suspenzi. Jedná se o škálu suspenzí vzniklou reakcí 1 % roztoku bezvodého BaCl<sub>2</sub> a 1% roztoku H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> v různém poměru, které tvoří BaSO<sub>4</sub>.

Hustotu mikrobiální suspenze je možno zjistit rovněž změřením absorpce světla na spektrofotometru při vlnové délce 550 nm. Z takto naměřené hodnoty se následně z kalibrační křivky standardu odečte hustota buněčné suspenze, viz tabulka 2.

**Tabulka 2. McFarlandovy standardy zakalení**

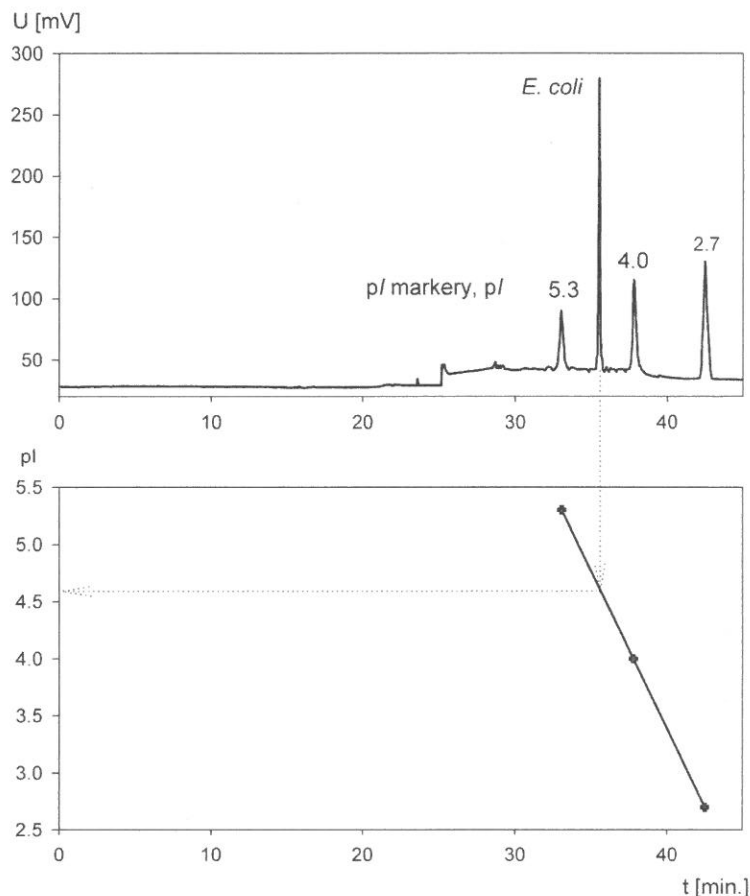
Číslo McFarlandovy stupnice	Objem			Absorbance (550 nm)
	1 % BaCl <sub>2</sub>	1 % H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Bakterie ( × 10 <sup>8</sup> )	
	[ml]			
0,5	0,05	9,95	1,75	0,12
1	0,1	9,9	3,0	0,19
2	0,2	9,8	6,0	0,36
3	0,3	9,7	8,6	0,49
4	0,4	9,6	12,87	0,73
5	0,5	9,5	14,79	0,84
6	0,6	9,4	18,0	1,05
7	0,7	9,3	21,0	1,11
8	0,8	9,2	24,0	1,28
9	0,9	9,1	27,0	1,41
10	1,0	9,0	30,0	1,45

### 3.5. Stanovení přítomnosti *E. coli*

Aparatura pro CIEF separace je složena ze zdroje vysokého napětí (-) 20kV, křemenné kapiláry, on-column detektoru UV-Vis a počítače s programem pro vyhodnocení naměřených dat. Proud se v průběhu měření mění tak, že na začátku experimentu dosahoval hodnot 40-60  $\mu$ A a v době detekce jeho hodnota byla 3-6  $\mu$ A. Křemenná kapilára o vnitřním průměru, I.D., 0,1 mm a vnějším průměrem, O.D., 0,25 mm je 350 mm dlouhá, s délkou do detektoru 250 mm. Oba konce kapiláry jsou umístěny ve skleněných vialkách o objemu 3 ml, v nichž jsou roztoky katolytu nebo anolytu a v každé je zasunuta elektroda, pro přívod stejnosměrného proudu. K detekci je používán UV-Vis on-column detektor s nastavenou vlnovou délkou 280 nm. Pro vyhodnocení dat se používá program Chromatography Data Station Clarity. Vzorek se dávkuje hydrostaticky segmentově z konce kapiláry na straně anolytu, při rozdílu hladin ( $\Delta h$ ) v rozmezí 100–200 mm po dobu 12-40 s. Před dávkováním je vzorek vystaven působení ultrazvuku o frekvenci 35 kHz, při teplotě 30°C po dobu 30 s.

Všechna měření jsou prováděna minimálně třikrát a reprodukovatelnost metody vyhodnocená z 10 měření se pohybuje pod 2%. Po každé analýze je nutno kapiláru pečlivě promývat hydrostaticky 2 min. etylalkoholem ( $\Delta h = 20$  cm).

Izoelektrický bod bakterie *E.coli* je 4,6. Tato hodnota je zjištěna odečtem ze závislosti izoelektrických bodů pI markerů na jejich migračních časech t, min., znázorněné na elektroforeogramu níže.



Přítomnost píku v této oblasti tedy znamená pozitivní vzorek s výskytem *E. coli*.

#### 4. Novost postupů a jejich zdůvodnění

Použití isoelektrické fokusace pro identifikaci bakterií ve vzorku je relativně nová metoda. K této metodě identifikace předcházeli publikace uvedené v bodu č. 7. Standardně jsou pro tyto metody identifikace využity selektivní kultivace s biochemickým potvrzením identifikace. Tyto metody jsou značně zdlouhavé a vyžadují minimálně jednodenní kultivaci vzorku. Dále jsou čím dál tím více vyvíjeny a využívány metody nevyžadující kultivaci jako je flowcytometrie, MALDI hmotnostní spektroskopie nebo PCR reakce. Zatímco první dvě zmíněné metody vyžadují velmi nákladnou instrumentaci, jejichž pořízení je otázkou desítek milionů, PCR reakce vyžaduje velmi kvalitní úpravu vzorku před vlastní analýzou, která není vždy možná.

Jednotná metodika identifikace *E. coli* na vzorku masa pomocí isoelektrické fokusace představuje spojení nejlepších vlastností výše zmíněných metod. Není nutná několikadenní před analýzou a základní instrumentace je dostupná ve všech laboratořích využívajících klasickou HPLC metodiku.

## 5. Popis uplatnění certifikované metodiky

Jednotná metodika bude prezentována pro využití v laboratořích provádějících rutinní i nárazové kontroly fekální kontaminace vzorku masa. Mezi které například patří:

- Státní zemědělská a potravinářská inspekce
- Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský
- Mikuláš Pavel, MVDr. Potravinářská Laboratoř
- Státní hygienická stanice
- a další.

## 6. Seznam použité literatury

- [1] M. Bednář, V. Fraňková, J. Schindler, A. Souček, and J. Vávra, *Lékařská mikrobiologie*, Marvil, 1999.
- [2] V. Kašička, *Teoretické základy a separační principy kapilárních elektromigračních metod*. Chem. listy (1997) 320-329.
- [3] T. Hirokawa, M. Nishino, N. Aoki, Y. Kiso, Y. Sawamoto, T. Yagi, and J. Akiyama, Table of isotachophoretic indexes: 1. Simulated qualitative and quantitative indexes of 287 anionic substances in the range pH 3 – 10. J. Chromatogr. (1983) D1-D106.
- [4] F. Acevedo, Use of discrete spacers for the separation of proteins by gel isotachopheresis. J. Chromatogr. (1991) 391-396.

## 7. Seznam literatury a příspěvků předcházející metodice

1. Šalplachta, J., Kubesová, A., Horká, M., Latest improvements in CIEF: From proteins to microorganisms. Proteomics 2012, 19-20, 2927-2936.
2. Horká, M., Karásek, P., Šalplachta, J., Růžička, F., Vykydalová, M., Kubesová, A., Dráb, V., Roth, M., Šlais, K., Capillary isoelectric focusing of probiotic bacteria from cow's milk in tapered fused silica capillary with off-line matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry identification. Anal. Chim. Acta 2013, 788, 193-199.
3. Šalplachta, J., Horká, M., Růžička, F., Vykydalová, M., Kubesová, A., Šlais, K., *Changes in protein profiles and isoelectric points of different Candida species in response to antifungal agents*, 20<sup>th</sup> Internat. Symp. on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, 6.10. – 9. 10. 2013, ITP 2013, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Islands, Spain, PS1-05, str. 127.
4. Horká, M., Šalplachta, J., Růžička, F., Vykydalová, M., Šlais, K., *Detection of residual concentrations of ampholytic antibiotics and microorganisms in biological samples by electrophoretic techniques and MALDI-TOF MS*, 20<sup>th</sup> Internat. Symp. on Electro- and Liquid Phase-separation Techniques, 6.10. – 9. 10. 2013, ITP 2013, Puerto de la Cruz, Tenerife, Canary Islands, Spain, PS1-04, str. 126.
5. Horká, M., Růžička, F., Holá, V., Šalplachta, J., Vykydalová, M., Kubesová, A., Šlais, K., Capillary electrophoretic techniques – the possibilities for rapid separation and

- detection of microorganisms and their resistance monitoring in the future. II Internat. conference on antimicrobial research, 21. 11. – 23. 11. 2012, Lisbon, Portugal, P. T113, str. 373.
6. Šalplachta, J., Horká, M., Suele, S., Moravcová, D., Kubesová, A., Horký, J. Characterizaion of Agrobacterium Species by CIEF and MALDI-TOF Mass Spectrometry. Nordic Separation Science Society 6th Conference, 24. 8. -27. 8. 2011, Riga, Latvia, Poster PP 45, str. 95.