

614.3-078:636:576.8.097.21

VYUŽITIE POZNATKOV O PLAZMIDOCH PRE MIKROBIOLOGICKÚ KONTROLU PROSTREDIA POTRAVINÁRSKEHO ZÁVODU

MVDr. Jozef LENÁRT, MVDr. Vladimír KMEŤ, CSc., pplk. MVDr. Boris MURÁR, npor. MVDr. Jozef ČIŽMÁR
Vojenský veterinárny doškolovací a výskumný ústav, Košice
(náčelník: pplk. MVDr. Boris Murár)
Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice
(riaditeľ: akademik Koloman Boďa)

Je všeobecne známou skutočnosťou, že potravínarsky výrobok nesmie obsahovať patogénne a potenciálne patogénne mikroorganizmy a nesmie obsahovať ani ich toxíny. Pod pojmom patogénne, potenciálne patogénne a toxikogénne mikroorganizmy sa označujú zárodoky rodu *Salmonella*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Proteus inconstans*, *Hafnia*, *Yersinia enterocolitica*, *Plesiomonas*, *Aeromonas hydrophilla*, *Mycobacterium tbc*, patogénne *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, NAG vibriá, *Vibrio parahaemolyticus*, *Streptococcus beta haemolyticus*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* (8).

Okrem uvedených patogénnych a potenciálne patogénnych mikroorganizmov schopných priamo ohroziť ľudské zdravie treba pokladať za podmienené patogénny, prípadne patogénny, aj výskyt väčšieho počtu saprofytických zárodokov v jednom grame potravy ako 10^4 enterokokov, 10^2 proteov, 10^4 *Bacillus cereus*, 10^4 koliformných zárodokov, 10^4 kvasiniek a 10^6 celkový počet zárodokov.

Pre tieto všetky vymenované skupiny mikroorganizmov nie je normatívne stanovená hranica, od ktorej treba ich pokladať za patogénne.

Cieľom našej práce je poukázať na možnosti využitia poznatkov o plazmidoch rezistencie a plazmidoch virulencie pri určovaní patogenity potenciálne patogénnych a saprofytických zárodokov. Ako je známe, existujú príslušné ČSN pre potraviny živočíšneho pôvodu, v ktorých sú kritériá pre mikrobiologické hodnotenia. Avšak pre mikrobiologickú kontrolu prostredia potravinárskych závodov sú zaužívané len všeobecné princípy platné pre potraviny živočíšneho pôvodu. Touto prácou chceme poukázať na potenciálne patogénne a saprofytické zárodoky, vyskytujúce sa vo výrobnom prostredí ako na zdroj plazmidov rezistencie a plazmidov virulencie pre potraviny živočíšneho pôvodu.

Údaje z posledných desiatich rokov hovoria, že potenciálne patogénne *E. coli*, ale aj ostatné enterobaktérie, sa prijatím plazmidov virulencie stávajú patogénnymi (2). Vo svetle týchto poznatkov rozdeľovanie *E. coli* do tzv. dyspeptických sérotypov má len druhoradý význam.

Plazmidy sú definované ako cytoplazmatic-

ké, genetické elementy, ktoré sú uložené mimo chromozóm a sú schopné stabilne autonómne sa replikovať (1, 3). Takmer všetky bakteriálne plazmidy sú kovalentne uzavreté dvojvláknité molekuly DNA. Prirodzene sa vyskytujúce plazmidy majú molekulovú hmotnosť od 1,5 do 150 megadaltónov. Tieto hmotnosti plazmidov majú kódujúcu kapacitu od 3 do 300 génov (10). Hoci gény nesené plazmidmi nie sú esenciálne pre život bunky, poskytujú však selektívnu ekologickú výhodu baktériám, ktoré ich vlastnia. Rozdelenie plazmidov podľa špecifických fenotypických vlastností je znázornené v tabuľke 1 podľa V e l t k a m p a.

Najčastejšia forma získania plazmidov je mechanizmus horizontálneho prenosu. Frekvencia horizontálneho prenosu plazmidov sa pohybuje v rozmedzí od 10^{-5} do 10^{-2} na jednu generáciu, čo znamená, že tento spôsob nadobudnutia genetickej informácie o rezistencii alebo virulencii je tisíckrát až miliónkrát častejšie ako získanie genetickej informácie o rezistencii alebo virulencii cestou mutácie (5). Hoci plazmidy boli prvýkrát objavené u zástupcov čeľade Enterobacteriaceae, v súčasnosti sa zdá, že prítomnosť plazmidov sa dá dokázať u každého bakteriálneho druhu (tabuľka 2). Okrem plazmidov rezistencie a virulencie pri mikrobiologickej diagnostike majú veľký význam aj plazmidy kódujúce metabolické vlastnosti a plazmidy alterujúce fyziologické funkcie baktérií. U *Escherichia coli* Re a n n e y (6) popísal, že gény pre ureázu, lyzín dekarboxylázu, fenylalanín deaminázu, sulfit reduktázu, atď., ktoré nie sú obsiahnuté v chromozóme *E. coli*, môžu sa dostať do koliformných enterických baktérií pomocou plazmidov a bakteriofágov (schéma 1).

Rozšírenie plazmidmi podmienených vlastností je závislé na selekčných tlakoch prostredia. Takým selekčným tlakom je aj používanie antibiotík vo veľkochovoch pri terapii a prevencii, ktoré podmieňujú zvýšený počet kmeňov s R-plazmidmi. Výraznou vlastnosťou takejto prenosnej rezistencie je aj to, že jej hlavným rezervoárom sú pravdepodobne kmene, ktoré sú normálnou saprofytickou, ba potrebnou zložkou organizmu človeka a zvierat a bežne sa vyskytujú aj v ich prostredí (5).

Cirkulácia plazmidov *E. coli* medzi človekom a jeho biosférou je znázornená na schéme 2. Zo schémy je zrejmé, že prostredie potravinárskych závodov, resp. potraviny vyrábané v tých-

Tab. 1

Klasifikácia a vlastnosti bakteriálnych plazmidov

Znak	Charakteristika	Výskyt
F	Plazmid fertility, ktorý má schopnosť prenosu genetického materiálu konjugáciou.	E. coli, V. cholerae Pseudomonas, Streptomyces
R	Plazmid rezistencie, ktorý odovzdáva hostiteľovi rezistenciu k AB, ťažkým kovom, UV lúčom a bakteriofágom.	26 rôznych bakteriálnych druhov
B	Plazmid bakteriocinogénie, ktorého špecifitou je produkcia bakteriocidného proteínu.	Clostridium, Streptomyces a mnoho G-baktérií
M	Plazmid, ktorý dáva hostiteľovi nové metabolické vlastnosti ako fermentácia laktózy, produkcia H ₂ S alebo ureázy.	Salmonella, Proteus, E. coli, Erwinia, Klebsiella, Streptococcus
E	Plazmid umožňujúci baktérii obstať v nových ekologických podmienkach a využívať zvláštne energetické zdroje (fixácia dusíka, degradácia toluénu, naftalénu apod.).	E. coli, Pseudomonas
P	Plazmid, ktorý prispôsobuje fyziologické funkcie svojho hostiteľa k sporulácii, produkcii pigmentu alebo k sekrécii aminokyselín.	Bacillus, E. coli, Erwinia, Streptomyces
T	Plazmid indukujúci tvorbu tumoru.	Agrobacterium
V	Plazmid bakteriálnej virulencie a patogenity (napr. : produkcia enterotoxínu alebo ureázy).	E. coli, Streptococcus, Proteus
C	Skrytý plazmid, ktorý dáva svojmu hostiteľovi neznámu fenotypickú vlastnosť.	16 rôznych bakteriálnych druhov
D	Plazmid, ktorý je fágom alebo defektným fágom druhu.	E. coli

Tab. 2

Bakteriálne rody schopné prijať za prirodzených podmienok plazmidy

Achromobacter	Clostridium	Proteus
Aerobacter	Enterobacter	Providencia
Aeromonas	Erwinia	Pseudomonas
Agrobacterium	Escherichia	Rhizobium
Arthrobacter	Hafnia	Salmonella
Azotobacter	Klebsiella	Serratia
Bacteroides	Micrococcus	Shigella
Bacillus	Micromonospora	Staphylococcus
Bartonella	Mycobacterium	Streptococcus
Caulobacter	Neisseria	Streptomyces
Chromobacterium	Nocardia	Vibrio
Citrobacter	Paracaulobacterium	Yersinia

to závodoch, môžu byť vektorom kmeňov s plazmidmi rezistencie.

Podobná možnosť cirkulácie plazmidov medzi človekom a jeho biosférou platí aj pre plazmidy virulencie.

Medzi doteraz známe plazmidy virulencie *Escherichia coli* zaraďujeme: K 88, K 99, CFA, Col Ib, Ent, Hly, Col V a Vir.

Plazmidy K 88 a K 99 kódujú fimbriálne výrastky — bielkovinové povrchové antigény buniek, ktoré sú zodpovedné za adhérenciu hostiteľského kmeňa *E. coli* na epiteliálne bunky tenkého čreva ciciakov, teliat a jahniat. V kooperácii medzi rozličnými plazmidmi virulencie plazmid kódujúci antigény adhérencie má dominantnú úlohu, pretože umožňuje zárodkom, ktoré ich nesú, zdolávať nielen črevnú mobilitu, ale aj adherovať sa na stenu tenkého čreva a rozmnožiť sa tam vo veľkom počte (4). Ďalším typom antigénu adhérencie je antigén 987 P, o ktorom však doteraz nie je známe, či je kódovaný plazmidovou alebo chromozómalnou DNK. U humánnych kmeňov *E. coli* je za adhérenciu zodpovedný plazmidom kódovaný „kolonizačný faktor“ — CFA a Col Ib plazmid (7).

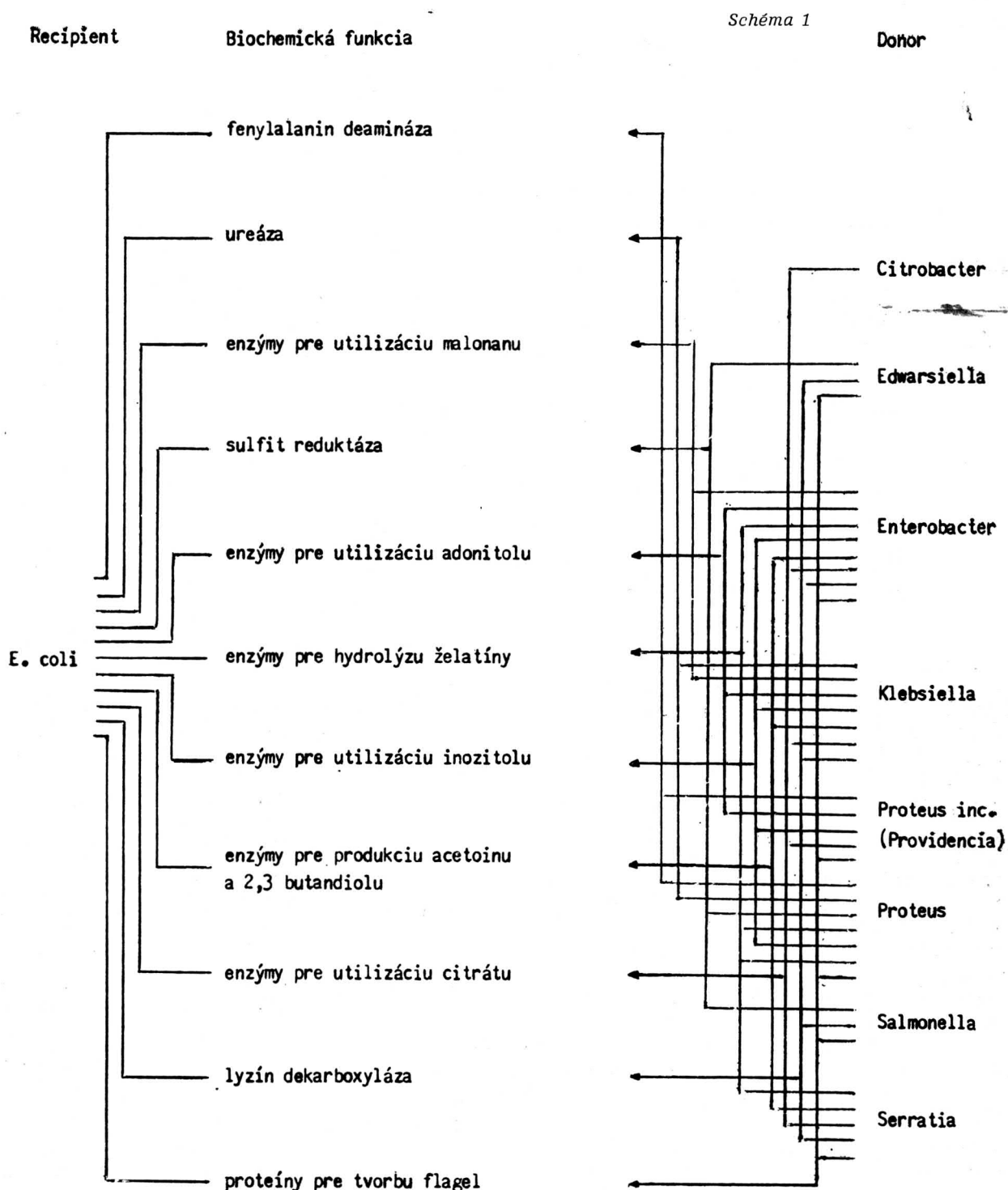
Ent plazmid kontroluje produkciu termolabilného (LT) a termostabilného (ST) enterotoxínu. Tu treba poznamenať, že LT toxín je imunologicky totožný s choleroým toxínom.

Col V plazmid je zodpovedný za invazivitu kmeňov *E. coli*, t. j. za vyvolávanie koliseptikémie.

Vir plazmid bol zistený u kmeňov *E. coli* za prítlačujúcich kolibakteriémie jahniat.

Hly plazmid kontroluje produkciu alfa a beta hemolýzínu u *E. coli*.

Plazmidy virulencie sú najviac zastúpené u kmeňov *E. coli*, ale aj u ostatných zástupcov čeľade *Enterobacteriaceae*, izolovaných z prípadov neonatálnych hnačiek.



Gény rôznych proteinov neobstiahnuté v chromozónoch väčšiny kmeňov E. coli môžu sa dostať do koliformných buniek pomocou plazmidov

Z hľadiska metodického vyšetřovane kmene pestujeme na prítomnosť plazmidov virulencie, rezistencie a konjugatívniosti nasledovne:

K 88 a K 99 plazmidy — metódou sklíčkovvej aglutinácie pri použití monošpecifických K 88 ab, K 88 ac a K 99 antisér.

Ent plazmidy — metódou podviazaných črevných kľučiek na homológnom zvierati.

Col plazmid — metódou dvojvrstvového agaru,

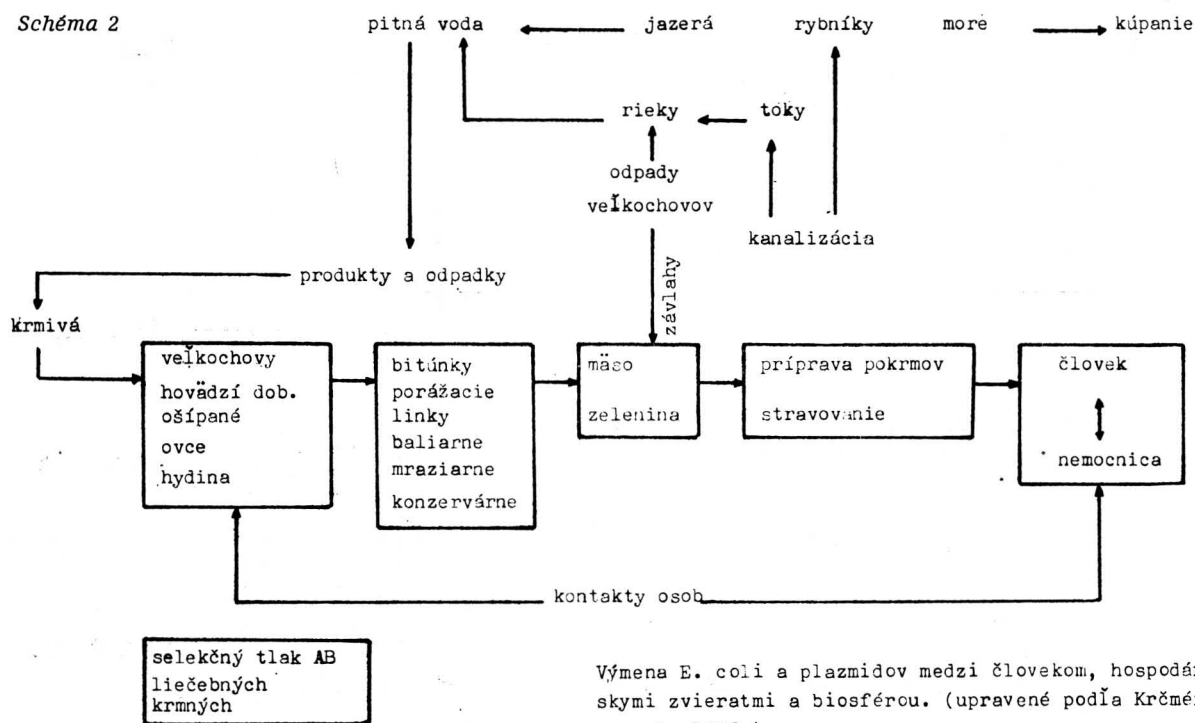
Hly plazmid — metódou naočkovania testovaných kmeňov na povrch agaru s 2,5 % baraných erytrocytov.

R plazmidy — bežne používanou agarovou dilučnou metódou pri použití tetracyklínu, chloramfenikolu, ampicilínu a neomycínu.

Kongujatívny (Pil) plazmid — metódou jednoduchého konjugačného testu.

Pre rutinné testovanie veľkého počtu kmeňov na prítomnosť Ent plazmidov však meto-

Schéma 2



Výmena E. coli a plazmidov medzi človekom, hospodárskymi zvieratami a biosférou. (upravené podľa Krčméryho a spol. 1980.)

dika podviazaných črevných kľúčiek je nevhodná pre svoju pracovnosť a potrebu ciciakov alebo teliat. Perspektívne vhodnejšie bude zrejme používanie modifikovaného Elekovho testu (9) pre detekciu termolabilného enterotoxínu za použitia monošpecifického antiséra.

Táto metodika je v súčasnom období vo vývoji a v ČSSR sa ňou zaoberajú na VÚPL v Bratislave. Ostatné metodiky na preukaz plazmidov virulencie (K 88, K 99, Col V a Hly) sú bežne použiteľné v každom mikrobiologickom laboratóriu. Monošpecifické K 88 ab, K 88 ac, K 99 antiséra vyrába u nás n. p. Imuna Šarišské Michalany.

Zvieratá v jatočnej hmotnosti majú kmene s plazmidmi virulencie síce v menšom počte, avšak aj toto nižšie zastúpenie nie je zanedbateľné pre kontamináciu prostredia porážkových liniek a výrobní a nasledovne aj potravinárskych výrobkov.

Podľa našich predbežných výsledkov vyšetrovania kmeňov enterobakterií, ale aj ďalších druhov zárodkov sa ako pravidlo vyskytujú konjugatívne plazmidy rezistencie. Nižšie zastúpenie plazmidov virulencie je priamo závislé od epizootologickej situácie v chove, z ktorého jatočné zvieratá pochádzajú.

Táto práca je úvodom do štúdia výskytu plazmidov rezistencie a virulencie u zárodkov izolovaných z prostredia potravinárskeho závodu. Radi by sme v tomto časopise sériou niekoľkých článkov chceli poukázať na praktické možnosti využitia poznatkov o plazmidoch pri posudzovaní mikrobiologickej nezávadnosti prostredia závodov na výrobu potravín živočíšneho pôvodu.

Súhrn

V práci sa zdôrazňuje pohľad na potenciálne patogénne a saprofytické zárodky v prostredí potravinárskych závodov z hľadiska poznatkov o prenosnosti plazmidov rezistencie a virulencie a tým aj zmeny ich patogenity.

Literatúra

1. ELWELL, L. P. - SHIPLEY, P. L.: Plasmid-mediated factors associated with virulence of bacteria to animals. *Ann. Rev. Microbiol.*, 34, 1980, č. 1, s. 465—496.
2. FALKOV, S.: Plasmids which contribute to the pathogenicity of enteric organisms. In: *Infectious multiple drug resistance*. London, Pion Limited, 1975.
3. HAYES, W.: What are episomes and plasmids. In: *Episomes and plasmids*. London, J. A. Churchill 1969. G. E. W. Wolstenholme and M. O'Connor: *Bacterial*.
4. KMEŤ, V. - MIKULA, I. - SOVA, O.: Výskyt plazmidov virulencie a rezistencie u enterobakterií. *Veter.*, 12, 1980, č. 30, s. 543—545.
5. KRČMÉRY aj.: Zdravotnícke problémy rezistencie na antibiotiká. In: *Rezistencia na antibiotiká*. Osveta 1980, s. 269—272.
6. REANNEY, D.: Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. *Bact. Rev.*, 40, 1976, č. 2, s. 552—590.
7. SOKOL, A. - KMEŤ, V.: Lepšie využiť domáce poznatky o obmedzovaní cirkulácie plazmidov. *Veter.*, 8, 1977, č. 26, s. 20—22.
8. STANKOVSKÝ, I. - SÁSIK, M.: Interpretácia niektorých ukazovateľov hygienickej hodnoty potravín v praxi. In: *Zborník Štátnej veterinárnej správy MPVŽ SSR*. 5. 1979, s. 171.
9. TAKESHI, H. - SEKIHO, T. - YOSHIFUMI, T. - TO-SHIO, M.: Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J. clin. Microbiol.*, 48, 1981, č. 1, s. 1—5.
10. VELTKAMP, E.: Bacterial plasmids and their impact on food microbiology. *Antonie van Leeuwenhoek*, 45, 1979, s. 637—643.

Kľúčová slová: Plazmidy; Mikrobiologická kontrola prostredia.