

# *Serratia* fajok jellemzése, valamint *Serratia marcescens* kvalitatív kimutatása nyers és pasztörözött tejből polimeráz láncreakción alapuló vizsgálati módszerrel

**Kulcsszavak:** nozokomiális fertőzés, *Serratia* fajok, *Serratia marcescens*, patogén, prodigiozin, pigment, polimeráz láncreakció (PCR), élelmiszer-diagnosztika

## 1. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Serratia* fajok elsősorban nozokomiális (kórházhygiénés fertőzés – a Szerk.) fertőzőként ismert opportunista patogén mikroorganizmusok, amelyek élelmiszer-minőségi elváltozásokat is okozhatnak. Az extracelluláris pigment-termelő *Serratia marcescens* tehéntejben való megjelenése annak piros elszíneződését okozza, kihívások elé állítva a tejpárt és az élelmiszer-minősítő laboratóriumokat. A baktérium kimutatása hagyományos mikrobiológiai módszereken alapuló eljárásokkal idő- és munkaigényes, ezen túlmenően sok esetben nem is vezet eredményre, a kísérő mikroflóra kompetitív gátló hatása miatt. A vonatkozó szakirodalom elemzését követően a *S. marcescens* kimutatása kapcsán publikált végpont PCR módszereket és alkalmazott primereket *in silico* és *in vitro* vizsgálatban értékeltük, majd az eljárást üzemi tejmintákon teszteltük. A módszer alkalmazásával összesen 60 db nyers, illetve pasztörözött tejmintát vizsgáltunk meg, amelyeknek több mint felét (32 db-ot) azonosítottuk *S. marcescens* pozitívként. Munkánk jelentőségét legfőképp a publikált vizsgálati módszerek élelmiszeripari gyakorlatban való alkalmazása adja. Eredményeink felhívják a figyelmet e baktériumfaj detektálásának a fontosságára.

<sup>1</sup> Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár

<sup>2</sup> Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktoriskola, Mosonmagyaróvár

<sup>3</sup> Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék, Mosonmagyaróvár

## 2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Napjainkban az élelmiszerek kifogástalan minősége és hosszú eltarthatósági ideje a vásárlók által támasztott alapkövetelmény. Ennek megfelelően fokozódik az igény az egyre gyorsabb, pontosabb, megbízhatóbb élelmiszer-diagnosztikai eljárások iránt is. A molekuláris diagnosztikai módszerek ezzel összefüggésben mind nagyobb teret nyernek, például a kórokozó mikroorganizmusok gyors kimutatásában. Számos gyártó állít elő polimeráz láncreakción (PCR) alapuló, patogén mikrobák azonosítására alkalmas diagnosztikai kitéket, amelyeket sikerrel alkalmaznak magyarországi élelmiszervizsgáló laboratóriumokban is. Ezek a molekuláris biológiai tesztek főleg olyan mikrobák kimutatására alkalmasak, amelyek jelenléte nagy közegészségügyi kockázatot jelent (például *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria* spp.). Kisebbségi figyelem irányul azokra a kórokozókra, amelyek vizsgálatát jogszabály nem teszi kötelezővé. Ilyen mikrobák például a nyers és pasztörözött tejben előforduló *Serratia* fajok is.

A *Serratia* fajok a környezetünkben sokfelé megtalálhatók [1]. Szaprofiták, illetve opportunistáknak [2]. Fakultatív anaerob, biofilmképző élőlények [1, 3]. A *S. marcescens* különösen jól szaporodik foszfortartalmú környezetben (például szappanok, samponok), és ellenáll egyes fertőtlenítőszernek is [4, 5], így különböző nozokomiális betegségek okozója lehet [6, 7, 8]. A szakirodalom beszámol a *S. marcescens* fokozódó antibiotikum-rezisztenciájáról is [8, 9, 10]. A baktérium tehát könnyen túlél, szaporodik, így nem megfelelő higiénés körülmények között az élelmiszerekbe kerülhet. A fogyasztói tejbe is feltehetően a higiéniai szabályok áthágása következtében juthat, ott elszaporodik és többek között az élelmiszer minőségét is rontja [1, 11, 12]. A romlást némely faj esetén jellegzetes piros színárnyalat jelezi.

A magyarországi tejágazat esetében nem állnak rendelkezésre pontos adatok arról, hogy milyen mértékű a *Serratia* fajok, illetve a *S. marcescens* elterjedtsége, és hogy mely fajok okozzák a fertőzéseket, valamint rontják a tej minőségét. Arra vonatkozóan sincs hazai felmérés, hogy milyen mértékű a tejüzemek *Serratia*-szennyezettsége. Néhány publikációt leszámítva nemzetközi szinten is szegényesek a rendelkezésre álló információk a tejipar *Serratia* érintettségéről. Ilyen kivétel egy, a finn tejtermelő gazdaságokban tapasztalt, *S. marcescens* okozta tőgygyulladás-járványt bemutató tudományos cikk [1], valamint egy régebbi beszámoló, amely pigmentképző *Serratia* fajok masztitiszben játszott szerepét tárgyalja [13].

A tej piros elszíneződéséért a következő *Serratia* fajok lehetnek felelősek: *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *S. plymuthica* és *S. nematodiphila* (1. táblázat). Előfordulási gyakoriságuk szerint a *S. marcescens*-nek van nagyobb jelentősége. Jellegzetes pigmentjük a vörös prodigiozin, amely vízben nem oldódó másodlagos anyagcseretermék, és amely meghatározott környezeti körülmények között termelődik [14, 15, 16, 17] (1. ábra). A táptalajon megjelenő tipikus piros telepek önmagukban még nem hordoznak elegendő információt a *Serratia* azonosításához, ugyanis számos egyéb, nem az enterobaktériumok közé tartozó nemzetség egyes fajai szintén termelhetnek prodigiozint [14, 18].

1. táblázat. *Serratia* fajok és pigmenttermelésük jellemzése [19–22]

Faj	Pigmenttermelés jellemzése	Forrás
<i>Serratia aquatilis</i>	Krémszínű	[23]
<i>Serratia entomophila</i>	Nincs pigmenttermelés	[24]
<i>Serratia ficaria</i>	Nincs pigmenttermelés	[25, 26]
<i>Serratia fonticola</i>	Nincs pigmenttermelés	[27]
<i>Serratia grimesii</i>	Nincs pigmenttermelés	[28]
<i>Serratia inihbens</i>	Halvány rózsaszín	[29]
<i>Serratia liquefaciens</i>	Nincs pigmenttermelés	[28]
<i>Serratia marcescens</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés / Rózsaszínes pyrimine	[16, 30, 31]
<i>Serratia microhaemolytica</i>	Nincs pigmenttermelés	[32]

Faj	Pigmenttermelés jellemzése	Forrás
<i>Serratia myotis</i>	Nincs pigmenttermelés	[33]
<i>Serratia nematodiphila</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[34]
<i>Serratia odorifera</i>	Nincs pigmenttermelés	[35, 36]
<i>Serratia oryzae</i>	Nincs pigmenttermelés	[37]
<i>Serratia plymuthica</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[35, 38, 39]
<i>Serratia proteamaculans</i>	Nincs pigmenttermelés	[28, 40, 41]
<i>Serratia quinivorans</i>	Nincs pigmenttermelés	[28, 36, 42]
<i>Serratia rubidaea</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[16, 43, 44]
<i>Serratia symbiotica</i>	Nincs pigmenttermelés	[45]
<i>Serratia ureilytica</i>	Nincs pigmenttermelés	[46]
<i>Serratia vespertilionis</i>	Nincs pigmenttermelés	[33]



1. ábra. *Serratia marcescens* tisztatenyésztete tripton-szója agaron (TSA) (30 °C, 48 óra)

A *Serratia* fajok élelmiszerekből történő kimutatására ISO szabvány jelenleg nem áll rendelkezésre. Grimont és Grimont 2006-ban megjelent könyvfejezetében [9] foglalkozik a *Serratia* nemzetség jellemzőivel, az izolálás és az azonosítás szempontjaival is. A klasszikus mikrobiológiai módszerekkel történő azonosítás azonban meglehetősen körülményes, és a kísérőflóra gátló hatása miatt gyakran eredménytelen is, annak ellenére, hogy a tejminta rózsaszínes elszíneződése szemmel látható. A baktérium szelektív tenyésztésére elérhető ugyan táptalajok [47], a gyakorlatban viszont ezek használata nem nyújt kielégítő megoldást. A hagyományos eljárások ráadásul idő- és munkaigényesek.

*S. marcescens* meghatározására létezik kereskedelmi forgalomban lévő gyorsmódszer, például a bioMérieux cég Rapid ID 32 E elnevezésű miniatürizált tesztkészlete, amely megfelel az ISO 7218 szabvány előírásainak [48]. A vizsgálat kivitelezéséhez azonban táptalajon felnevelő telep szükséges. A kimutatás nehézségeinek kiküszöbölésére a már korábban említett, PCR módszeren alapuló diagnosztikai tesztek nyújthatnának megoldást. Jelenleg azonban egyedül a Primerdesign cég Genesig fantázianevű terméke említhető *S. marcescens* kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai egységcsomagként [49].

Az élelmiszeripari és azon belül a tejipari vonatkozású szakirodalom meglehetősen szegényes a *Serratia* fajok és köztük *S. marcescens* végpont PCR vagy real-time PCR módszerrel történő kimutatásának témakörében. Hejazi és munkatársai [50] *S. marcescens* szerotipizálását végezték el RAPD-PCR technikával. Vizsgálataikhoz kórházi ellátásra szoruló páciensek szerológiai mintáit használták. Iwaya és munkatársai [6] szintén vérmintákat teszteltek *S. marcescens* törzsekre, real-time PCR módszert alkalmazva. Zhu és munkatársai [51] *S. marcescens* törzsek molekuláris jellemzését RFLP és PCR módszerrel végezték, míg Joyner és munkatársai [2] real-time PCR vizsgálattal detektáltak *S. marcescens* törzseket tengeri és egyéb vízi környezeti mintákból (például korall nyák, szivacs pórusvíz, üledék, csatornavíz, szennyvíz és hígított szennyvíz). Bussalleu és Althouse 2018-ben megjelent tanulmánya *S. marcescens* azonosítására alkalmas, hagyományos végpont PCR-technikáról számol be, amely hatékonyan detektálja a mikroorganizmus jelenlétét vaddisznó spermájában [52].

Célul tűztük ki *S. marcescens* tejből történő kimutatására alkalmas klasszikus PCR módszer beállítását. Munkánk jelentősége abban áll, hogy a szakirodalomban leírt, PCR vizsgálaton alapuló módszereket és alkalmazott primereket elemeztük, majd a megfelelőnek ítélt eljárást átültettük az élelmiszer-higiéniai vizsgálati gyakorlatba. Kísérleteinkben üzemi, nyers és pasztörözött tejminták elszíneződésének a háttérben álló esetleges *S. marcescens* szennyeződés kvalitatív meghatározását végeztük.

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. *In silico* vizsgálatok

Szakirodalmi közlések alapján kiválasztottunk három primerpárt (2. táblázat), amelyeket számítógépes modellezéssel, ún. *in silico* analízis során, valamint *in vitro* kísérletekben értékeltünk abból a célból, hogy a későbbi PCR vizsgálatok megvalósításához megtaláljuk a legalkalmasabbat.

2. táblázat. Alkalmazott *Serratia marcescens*-specifikus primerpárok

Oligo neve	Szekvencia	TM [°C]	Fragment hossza	Forrás
Fpfs1	CCGGCATCGGCAAAGTCT	58,2	193 bp	[53]
Rpfs2	ATCTGGCCCGGCTCGTAGCC	65,5		
FluxS1	GCTGGAACACCTGTTCGC	58,2	102 bp	
RluxS2	ATGTAGAAACCGGTGCGG	56,0		
<i>Serratia</i> 2-for	GGTGAGCTTAATACGTTTCATCAA	57,1	107 bp	[52]
<i>Serratia</i> 2-rev	AATTCCGATTAACGCTTGAC	55,9		

*In silico* vizsgálatainkban a primer szekvenciák specifikusságát DNS-adatbázissal (NCBI BLAST) [54] történő összehasonlítás útján ellenőriztük. Az adatbázissal történő összevetés a homológia-keresést („blasztolás”) teszi lehetővé. Ezt követően a primerek megfelelőségét, azaz választott genomokon egy lehetséges PCR reakció megvalósulását, molekuláris biológiai szoftverrel (SnapGene 5.1.5.) teszteltük [55]. Az utóbbi esetben az NCBI adatbázisából letöltöttünk pozitív és negatív kontroll genomokat, majd a SnapGene szoftver alkalmazásával vizsgáltuk, hogy *in silico* módon a primerpárokkal megvalósulhat-e PCR reakció. A referenciának használt pozitív és negatív kontrollok teljes kromoszóma genomok voltak (3. táblázat).

3. táblázat. *In silico* elemzésben pozitív és negatív kontrollként alkalmazott baktériumtörzsek genomjai, valamint a primerpárookra adott reakcióik

Alkalmazott baktériumtörzs		GenBank szekvencia azonosító	Primerpárokkal történő <i>in silico</i> amplifikáció eredménye*		
			A.	B.	C.
Pozitív kontroll genomok	<i>Serratia marcescens</i> Db11	HG326223.1			
	<i>Serratia marcescens</i> WW4	CP003959.1			
	<i>Serratia marcescens</i> B3R3	CP013046.2			
	<i>Serratia marcescens</i> N4-5	CP031316.1			
	<i>Serratia marcescens</i> 1274	CP019927.2			
	<i>Serratia marcescens</i> AR_0099	CP027539.1			
	<i>Serratia marcescens</i> AS-1	AP019009.1			
	<i>Serratia marcescens</i> S2I7	CP021984.1			
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 274	AP021873.1			
	<i>Serratia marcescens</i> LY1	CP053918.1			
Negatív kontroll genomok	<i>Serratia grimesii</i> BXF1	LT883155.1			
	<i>Serratia grimesii</i> NCTC11543	NZ_UGYI01000001.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	NC_021741.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> FG3	CP033893.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DH-S01	CP038662.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	NZ_JPUX01000001.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> 1122	CP014474.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> NCTC10848	NZ_LS483492.1			
	<i>Escherichia coli</i> 58-3	CP050036.1			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	CP000946.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp52.145	FO834906.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N16-03892	CP047271.1			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	CP000438.1			
	<i>Pseudomonas putida</i> T25-27	CP043576.1			

\* Primerrek: A. Fpfs1 és Rpfs2; B. FluxS1 és RluxS2; C. *Serratia*2-for és *Serratia*2-rev.

Jelmagyarázat:

	a primerpárral fragment amplifikálható
	a primerpárral nincs amplifikáció

### 3.2. *In vitro* kísérletes vizsgálatok

Az *in silico* vizsgálatok megerősítéseként *in vitro* kísérleteket végeztünk, amelyek során a kiválasztott primerpárokat laboratóriumi PCR vizsgálatban teszteltük baktériumok (pozitív kontroll törzsként több *S. marcescens*, negatív kontroll törzsként pedig *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* és *Micrococcus luteus*) választott törzseinek genomi DNS mintáján. A mikroorganizmusok az MTKI Kft. gyűjteményébe tartozó, üzemi környezetből származó, genetikai azonosítással meghatározott baktériumtörzsek voltak.

A PCR reakcióhoz szükséges komponensek összemérése során egy reakcióra 5,2 µL PCR tisztaságú steril vizet, 10 µL DreamTaq Green 2× PCR Master Mixet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), 0,4–0,4 µL (10 pmol/µl) primert és 4 µL izolált bakteriális genomi DNS-t használtunk. A reakciók negatív kontrollja PCR tisztaságú steril víz volt. A PCR berendezés (Mastercycler Nexus Gradient; Eppendorf International, Hamburg, Németország) programjának paraméterei a következőképpen alakultak: 95 °C 1 perc, majd 40 cikluson keresztül 95 °C 15 másodperc, 59,5 °C 15 másodperc, 72 °C 10 másodperc, végül 72 °C 7 perc [52].

A PCR reakció során képződött DNS szakaszok méret szerinti elválasztáshoz 10 µL mintát vizsgáltunk 2%-os agaróz gélben [TBE puffer (Tris-borate-EDTA) (10×), Thermo Fisher Scientific; Agarose DNA Pure Grade, VWR International, Debrecen, Magyarország; ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20.000×, Pacific Image



Electronics, Torrance, Kalifornia, Egyesült Államok]. A DNS méretmarker a GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) volt. A géldokumentálás a Gel Doc Universal Hood II géldokumentációs berendezés és program (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) alkalmazásával történt.

### 3.3. Nyers és pasztörözött tejminták vizsgálata

Vizsgálatainkban egyrészt olyan, üzemi nyers és pasztörözött tejmintákat alkalmaztunk, amelyek kapcsán felmerült a *S. marcescens* szennyeződés gyanúja azok rózsaszínes elszíneződése miatt. Másrészt teszteltünk az előbbiekkal együtt a laboratóriumba érkezett, elszíneződést azonban nem mutató, szintén üzemi nyers és pasztörözött tejmintákat is.

A DNS-feltáró és -tisztító folyamathoz NucleoSpin Microbial DNA kitet (Macherey-Nagel, Düren, Németország) alkalmaztunk a gyártói előírások szerint. Az eluált DNS-t tartalmazó reakciócsöveket fagyasztóban tároltuk, -20 °C-on.

A következőkben 16S rDNS polimeráz láncreakcióval kontrolláltuk a DNS izolálás megfelelőségét és a minták amplifikálhatóságát, melyhez a 27f (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3') és 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primert alkalmaztuk. A PCR reakció összemérési térfogata 1 mintára: 5,6 µL PCR tisztaságú steril víz, 10 µL DreamTaq Green 2x PCR Master Mix, 0,2–0,2 µL (10 pmol/µl) primerek és 4 µL izolált bakteriális genomi DNS. A reakció negatív kontrollja PCR minőségű steril víz volt. A PCR berendezés programjának paraméterei a következők voltak: 95 °C 4 perc, majd 40 cikluson keresztül 95 °C 20 másodperc, 54 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, végül 72 °C 5 perc.

A PCR reakció során képződött DNS szakaszok elválasztáshoz 5 µL mintát vizsgáltunk 1%-os agaróz gélben. DNS méretmarker a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) volt. A vizsgált DNS mintát további PCR vizsgálatra alkalmasnak értékeltük, amennyiben az amplifikált DNS fragment kópiáinak hossza a várt méret (~1500 bp) szerint alakult.

Következő lépésben a minták *S. marcescens*-specifikus PCR vizsgálata és a gélelektroforézis történt **a 3.2. In vitro kísérletes vizsgálatok** című alfejezetben ismertetett módon. Az eredményeket jelenlét-hiány elv alapján értékeltük.

A módszer megfelelőségének ellenőrzése céljából kontrollvizsgálatban tejminták PCR eredményeit hasonlítottuk össze a néhány esetben meglévő API (bioMérieux, Budapest, Magyarország) vizsgálat eredményeivel. A módszert ezt követően alkalmaztuk *S. marcescens* jelenlétének nyers és pasztörözött tejkéből történő kimutatására.

## 4. Eredmények

*In silico* vizsgálatainkban a primerek homológia vizsgálata során azok elsősorban *S. marcescens* kromoszóma genomokkal mutattak hasonlóságot. Találtunk azonban egyezést *S. rubidaea* és *S. nematodiphila* törzseknél és néhány nem *Serratia* fajnál is. Az eredményeket figyelembe vettük a SnapGene szoftveres vizsgálatainkhoz tervezett referencia genomok kiválasztásánál. További vizsgálat szükségességét indokolta, hogy a megfelelő homológia, a bázisok illeszkedése még nem jelenti automatikusan egy PCR reakció megvalósulását, mert például a primerek iránya, olvadási hőmérséklete és a képződő PCR termék mérete is meghatározó.

A SnapGene vizsgálatban PCR reakciókat a következő paraméterek mellett prediktáltunk: elemzéseinket legalább 15 bázis egyezése és eltérés (ún. single isolated mismatch) kizárása mellett végeztük. Az olvadási hőmérséklet (melting temperature) legkisebb értéke 50 °C, az amplifikáció eredményeképpen keletkezett fragmentum maximális hossza pedig 3 kbp volt.

Ahogy a **3. táblázat**ban látható, a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpár *S. marcescens* genomokra illetve minden esetben mutatott amplifikációt. A PCR reakció általában hat-hét amplikont is eredményezett a 16S rDNS szakaszokon. Az Fpfs1–Rpfs2 és a FluxS1–RluxS2 primerpárok tapadási helye a 16S rDNS-en kívül található a legtöbb *S. marcescens* törzsből, viszont néhány esetben nem mutattak *in silico* amplifikációt, érzékenységük tehát nem bizonyult megfelelőnek. A negatív kontroll genomoknál a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpár néhány esetben PCR reakció lezajlását jelzi előre bizonyos *S. rubidaea* és *S. nematodiphila* törzseknél. Az Fpfs1–Rpfs2 primerek alkalmazásával a PCR reakció egy *S. nematodiphila* törzs esetén játszódna le. A FluxS1–RluxS2 primerek nem jelezték előre reakció lezajlását egyik választott negatív kontroll genomon sem (**3. táblázat**).

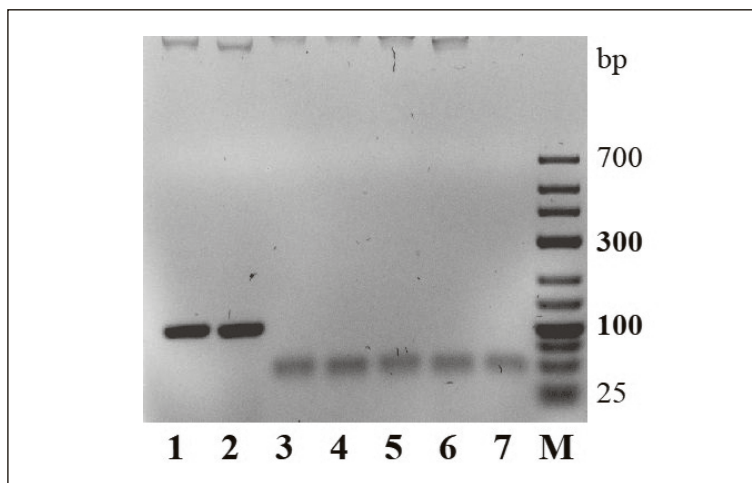
Az *in vitro* kísérletekben a pozitív kontrollnak választott *S. marcescens* genomokon mindhárom primerpár adott jelet a várt fragmentméret szerint, és egyik sem adott jelet a negatív kontrollokon. A *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpárral végzett vizsgálatot mutatja be a **2. ábra**. A negatív mintáknál az 50 bp magasságban megjelenő gyenge jeleket a melléktermékként keletkező aspecifikus DNS darabok, a primer-dimerek felszaporodása okozza.

Az *in silico* analízisek és az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján további munkánkhoz a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primereket ítéltük megfelelőnek, annak ellenére, hogy azok specifikussága nem tökéletes. A döntés alapja egyrészt a *S. marcescens* előfordulásának valószínűsíthető gyakorisága, másrészt a fals negatív vizsgálati eredmények elkerülésének a fontossága volt.

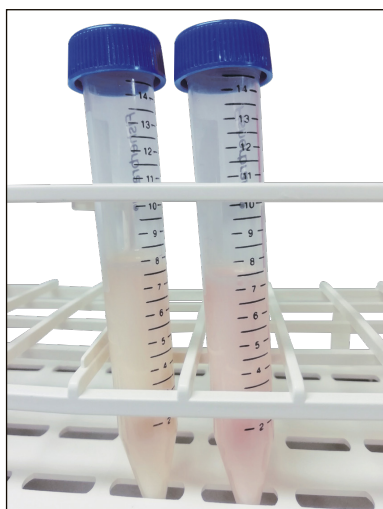
A beállított módszer megfelelőségét ellenőrizendő, kontroll vizsgálatban üzemi tejmintákat teszteltünk. A tejminták ( $n=10$ ) közül néhány rózsaszínes elszíneződést mutatott. Vizsgálati módszerünkkel kilenc mintát pozitívnak ítéltünk a keresett mikrobára. A minták közül négy esetben API vizsgálati eredménnyel is rendelkezünk. A négy API-pozitív minta a PCR vizsgálatban is pozitívnak bizonyult. A módszert ezt követően alkalmazzuk *S. marcescens* nyers és pasztőrözött tejekből történő kimutatására.

A tejminták egy része barackos-rózsaszínes elszíneződést mutatott (**3. ábra**), ez azonban számos esetben nem volt egyértelmű, a halvány vagy sárgásba hajló színárnyalat miatt. Összesen 60 minta vizsgálatát végeztük el. Ebből 32 db (53,3%) pozitív és 28 db (46,7%) negatív eredményt adott *S. marcescens* jelenlétére.

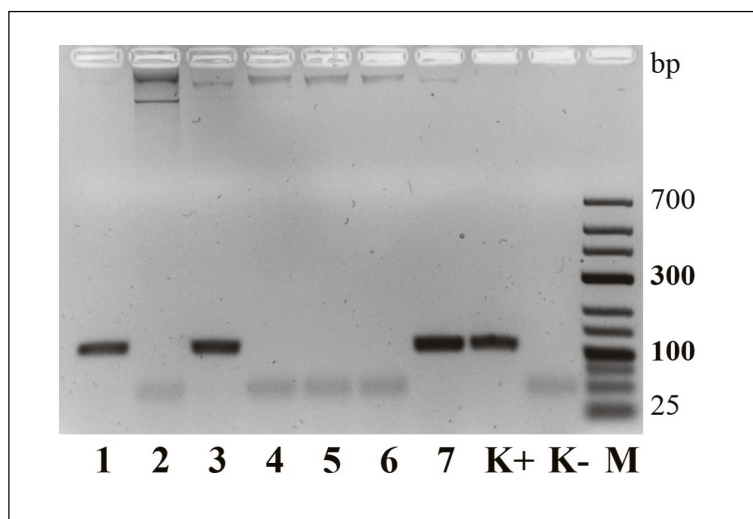
A **4. ábrán** egyik vizsgálatunk eredményét, a gélelektroforézissel végzett elválasztás képét mutatjuk be. Jól látható, hogy a pozitív kontroll törzs pozitív, a negatív kontroll minta negatív jelet adott, mindemellett három vizsgálati minta esetében pozitív jelet kaptunk. A negatív mintáknál megjelenő gyenge jeleket ebben az esetben is a primer-dimerek felszaporodása okozta.



2. ábra. *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpárral végzett PCR vizsgálat eredménye választott baktériumtörzsek genomján. Sorok: 1. *Serratia marcescens* 551R; 2. *Serratia marcescens* 1911; 3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 0801; 4. *Streptococcus thermophilus* 1102; 5. *Enterococcus faecalis* 1101; 6. *Micrococcus luteus* CLTB1; 7. Negatív kontroll (steril víz); M: Molekulasúly marker



3. ábra. Tejminták. Baloldali minta: *Serratia marcescens*-negatív, jobboldali minta: *Serratia marcescens*-pozitív a PCR vizsgálat eredménye alapján



4. ábra. *Serratia marcescens*-specifikus PCR vizsgálat gélelektroforézis képe. 1.–7.: Tejminták; K+: Pozitív kontroll (*Serratia marcescens* genomi DNS); K-: Negatív kontroll (steril víz); M: Molekulasúly marker

## 5. Megbeszélés

Eredményeink értékelésekor fontos figyelembe venni, hogy a PCR vizsgálat a mintában található cél DNS amplifikálására, detektálására alkalmas módszer, amelynek alapján nem lehet megállapítani, hogy az amplifikált *S. marcescens*-specifikus DNS vajon szaporodóképes, elpusztult, vagy ún. VBNC állapotú sejtekből származik-e. VBNC („viable but not culturable”) állapotban a sejtek életképesek, metabolikusan aktívak, viszont klasszikus, tenyésztéses módszerekkel nem szaporíthatók fel. Az állapot reverzibilis.

Munkánk célja *S. marcescens* kimutatását szolgáló klasszikus PCR módszer beállítása volt. Az alkalmazott vizsgálati eljárással elvégezhető a tejminták elszíneződésének háttérében álló *S. marcescens* szennyeződés kvalitatív meghatározása.

Noha itt bemutatott kísérleteinkben a pigmenttermelő *S. marcescens* kimutatására összpontosítottunk, egy jövőbeli, nemzetség-szintű vizsgálat során mind a 20 *Serratia* faj (**1. táblázat**) azonosítása megvalósulhatna. A többi *Serratia* faj detektálásának jelentőségét az adja, hogy jóllehet a *Pseudomonas* nemzetség a hűtött nyerstej romlásának legfőbb okozója, ismeretesebbek a *Serratia* fajok e tekintetben kimutatható veszélyei is [56]. *Pseudomonas* törzsekkel együtt ugyanis számos esetben *Serratia* törzseket is azonosítottak a tej romlásának okozóiként. A *Serratia* nemzetség tagjait kimutatták tejfeldolgozó üzemekben [3, 12], 4 °C-on tárolt nyerstej-mintákban [56, 57, 58] és tejtartályokban is [59]. Grimont és Grimont [9] már másfél évtizeddel ezelőtt megállapította, hogy a nyerstej-tételek esetenként *Serratia* fajokkal szennyeződhetnek, a tejtermékekben megjelenő leggyakoribb fajok pedig a *S. liquefaciens* és a *S. grimesii*.

A pszichotróf *Serratia* fajok (például a *S. liquefaciens*) nyerstejben való előfordulása a hőkezelés után is minőségromlást okozhat. Baglinière és munkatársai úgy találták, hogy a *S. liquefaciens* által termelt hőstabil Ser2 proteáz az UHT tej destabilizációjának jelentős tényezője lehet [11, 60].

Következtetésképpen megállapítható, hogy érdekes és hiánypótló kutatás lenne egy nemzetség-szintű vizsgálat, amelynek révén lehetőség nyílna a nyerstejek ilyen szempontú monitorozására, a *Serratia* fajok széleskörű detektálására. Az eredmények vélhetően nemcsak a tejjgazdaság, tejipar szereplői számára nyújtanának hasznos információkat, hanem a hazai szabályozási és ellenőrzési gyakorlatra is hatással lehetnének.



## 6. Irodalom

- [1] Friman, M.J., Eklund, M.H., Pitkälä, A.H., Rajala-Schultz, P.J., Rantala, M.H.J. (2019): Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61, pp. 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- [2] Joyner, J., Wanless, D., Sinigalliano, C.D., Lipp, E.K. (2014): Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, pp. 1679-1683. <https://doi.org/10.1128/AEM.02755-13>
- [3] Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., Vieira, M.J. (2012): Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*. 7(6), e40189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>
- [4] Langsrud, S., Møretrø, T., Sundheim, G. (2003): Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology*. 95, pp. 186-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01968.x>
- [5] Møretrø, T., Langsrud, S. (2017): Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16, pp. 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- [6] Iwaya, A., Nakagawa, S., Iwakura, N., Taneike, I., Kurihara, M., Kuwano, T., Gondaira, F., Endo, M., Hatakeyama, K., Yamamoto, T. (2005): Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real-time PCR assay: Its clinical application and evaluation in a mouse infection model. *FEMS Microbiology Letters*. 248, pp. 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.041>
- [7] Bayramoglu, G., Buruk, K., Dinc, U., Mutlu, M., Yilmaz, G., Aslan, Y. (2011): Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 44, pp. 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.02.002>
- [8] Moradigaravand, D., Boinett, C.J., Martin, V., Peacock, S.J., Parkhill, J. (2016): Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*. 26, pp. 1101-1109. <https://doi.org/10.1101/gr.205245.116>
- [9] Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2006): The genus *Serratia*. *Prokaryotes*. 6, pp. 219-244. [https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X\\_11](https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11)
- [10] Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., Morales-Espinosa, R. (2018): The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*. 9, pp. 828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>
- [11] Baglinière, F., Tanguy, G., Salgado, R.L., Jardin, J., Rousseau, F., Robert, B., Harel-Oger, M., Dantas Vanetti, M.C., Gaucheron, F. (2017): Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*. 229, pp. 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.054>
- [12] Salgado, C.A., Baglinière, F., Vanetti, M.C.D. (2020): Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. *LWT - Food Science and Technology*. 126, 109289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109289>
- [13] Barnum, D.A., Thackeray, E.L., Fish, N.A. (1958): An outbreak of mastitis caused by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Comparative and Medical Veterinary Science*. 22, pp. 392-395.
- [14] Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S. (2012): Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*. 1 (4), pp. 361-365.
- [15] Petersen, L.M., Tisa, L.S. (2013): Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian Journal of Microbiology*. 59, pp. 627-640. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0343>
- [16] Darshan, N., Manonmani, H.K. (2015): Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*. 52, pp. 5393-5407. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>
- [17] Srimathi, R., Priya, R., Nirmala, M., Malarvizhi, A. (2017): Isolation, identification, optimization of prodigiosin pigment produced by *Serratia marcescens* and its applications. *International Journal of Latest Engineering and Management Research*. 2 (9), pp. 11-21.
- [18] Giri, A.V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., Pennathur, G. (2004): A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 4, pp. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
- [19] Mahlen, S.D. (2011): *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 24, pp. 755-791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-11>

- [20] Analyzer of Bio-resource Citations (2020): Microorganism Search for Paper, Patent, Genome and Nucleotic. <http://abc.wfcc.info/index.jsp>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [21] Birla Institute of Scientific Research, Bioinformatics Centre (2015): Database of Biochemical Tests of Pathogenic Enterobacteriaceae Family. <https://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/docter/serratia.cgi>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [22] LPSN (2020): List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [23] Kämpfer, P., Glaeser, S.P. (2016): *Serratia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, pp. 407-413. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000731>
- [24] Grimont, P.A.D., Jackson, T.A., Ageron, E., Noonan, M.J. (1988): *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-1>
- [25] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1979): *Serratia ficaria* sp. nov., a bacterial species associated with Smyrna figs and the fig wasp *Blastophaga psenes*. *Current Microbiology*. 2, pp. 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF02602859>
- [26] Anahory, T., Darbas, H., Ongaro, O., Jean-Pierre, H., Mion, P. (1998): *Serratia ficaria*: A misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, pp. 3266-3272. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3266-3272.1998>
- [27] Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P.A., Leclerc, H., Lefebvre, B., Mossel, D.A.A. (1979): *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29, pp. 92-101. <https://doi.org/10.1099/00207713-29-2-92>
- [28] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Irino, K. (1982): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov.. *Current Microbiology*. 7, pp. 69-74. <https://doi.org/10.1007/BF01568416>
- [29] Hennessy, R.C., Dichmann, S.I., Martens, H.J., Zervas, A., Stougaard, P. (2020): *Serratia inhibens* sp. nov., a new antifungal species isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, pp. 4204-4211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004270>
- [30] Bizio, B. (1823): Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Biblioteca Italiana, o sia Giornale di Letteratura, Scienze, e Arti* (Anno VIII). 30, pp. 275-295.
- [31] Williams, R.P., Gott, C.L., Qadri, S.M.H., Scott, R.H. (1971): Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 106, pp. 438-443. <https://doi.org/10.1128/JB.106.2.438-443.1971>
- [32] Wang, J., Zheng, M.L., Jiao, J.Y., Wang, W.J., Li, S., Xiao, M., Chen, C., Qu, P.H., Li, W.J. (2019): *Serratia microhaemolytica* sp. nov., isolated from an artificial lake in Southern China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 112, pp. 1447-1456. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01273-9>
- [33] García-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., Kolařík, M. (2015): *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, pp. 90-94. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.066407-0>
- [34] Zhang, C.X., Yang, S.Y., Xu, M.X., Sun, J., Liu, H., Liu, J.R., Liu, H., Kan, F., Sun, J., Lai, R., Zhang, K.Y. (2009): *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, pp. 1603-1608. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.003871-0>
- [35] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Richard, C., Davis, B.R., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. (1978): Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain: ICPB 3995). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 453-463. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-453>
- [36] Van Houdt, R., Moons, P., Jansen, A., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W. (2005): Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS Microbiology Letters*. 246, pp. 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.016>

- [37] Zhang, C.W., Zhang, J., Zhao, J.J., Zhao, X., Zhao, D.F., Yin, H.Q., Zhang, X.X. (2017): *Serratia oryzae* sp. nov., isolated from rice stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67, pp. 2928-2933. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002049>
- [38] Lehman, K.B., Neumann, R. (1896): *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik*, Volume 11st Ed. J.F. Lehmann, München.
- [39] Breed, R.S., Murray, E.G.D., Hitchens, A.P. (Eds.) (1948): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. pp. 1-1529.
- [40] Paine, S.G., Stansfield, H. (1919): Studies in bacteriosis. III. A bacterial leaf spot disease of *Peotea cynaroides*, exhibiting a host reaction of possibly bacteriolytic nature. *Annals of Applied Biology*. 6, pp. 27-39. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1919.tb05299.x>
- [41] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1978): *Serratia proteamaculans* (Paine and Stansfield) comb. nov., a senior subjective synonym of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 503-510. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-503>
- [42] Ashelford, K.E., Fry, J.C., Bailey, M.J., Day, M.J. (2002): Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1982 to *Serratia quinovorans* corrig., sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, pp. 2281-2289. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2281>
- [43] Stapp, C. (1940): *Bacterium rubidaenum* nov. spec. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. II*. 102, pp. 252-260.
- [44] Ewing, W.H., Davis, B.R., Fife, M.A., Lessel, E.F. (1973): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. (formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23, pp. 217-225. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-3-217>
- [45] Sabri, A., Leroy, P., Haubruge, E., Hance, T., Frère, I., Destain, J., Thonart, P. (2011): Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, pp. 2081-2088. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.024133-0>
- [46] Bhadra, B., Roy, P., Chakraborty, R. (2005): *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, pp. 2155-2158. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63674-0>
- [47] Starr, M.P., Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, P.B. (1976): Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 4, pp. 270-276.
- [48] BioMérieux (2015): API & ID 32 Identification Databases. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [49] Primerdesign (2019): *Serratia marcescens* Genesig kit. <https://www.genesig.com/products/9405-serratia-marcescens>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [50] Hejazi, A., Keane, C.T., Falkiner, F.R. (1997): The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 46, pp. 913-919. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-913>
- [51] Zhu, H., Zhou, W.Y., Xu, M., Shen, Y.L., Wei, D.Z. (2007): Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Letters in Applied Microbiology*. 45, pp. 174-178. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02166.x>
- [52] Bussalleu, E., Althouse, G.C. (2018): A PCR detection method for discerning *Serratia marcescens* in extended boar semen. *Journal of Microbiological Methods*. 151, pp. 106-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.012>
- [53] Zhu, H., Sun, S.J., Dang, H.Y. (2008): PCR detection of *Serratia* spp. using primers targeting *pfs* and *luxS* genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Current Microbiology*. 57, pp. 326-330. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9197-6>
- [54] National Center for Biotechnology Information (2020): Search database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hozzáférés 2020.03.20.
- [55] Insightful Science (2020): SnapGene Software. <https://www.snapgene.com/>. Hozzáférés 2020.03.20.

- [56] Machado, S.G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M.C.D., De Block, J., Heyndrick, M. (2017): The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 8, p. 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>
- [57] Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004): Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, pp. 5644-5650. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004>
- [58] Ribeiro Jr., J.C., de Oliveira, A.M., de G. Silva, F., Tamanini, R., de Oliveira, A.L.M., Beloti, V. (2018): The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*. 101, pp. 75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>
- [59] Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M. (2014): Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*. 79, pp. 81-90. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- [60] Baglinière, F., Salgado, R.L., Salgado, C.A., Dantas Vanetti, M.C. (2017): Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk. *Journal of Food Science*. 82, pp. 952-959. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13660>