

Príprava a použitie vnútorného štandardu pri dôkaze salmonel polymerázovou reťazovou reakciou

HANA DRAHOVSKÁ - JÁN TURŇA - VIERA BOHÁČOVÁ
- LUBICA PIKNOVÁ - TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. Pripravil sa rekombinantný plazmid vhodný na použitie ako vnútorný štandard pri dôkaze salmonel polymerázovou reťazovou reakciou (PCR) s primermi ST11 a ST15. Plazmid obsahuje fragment DNA získaný nešpecifickou amplifikáciou templátovej DNA z *Escherichia coli* s použitím uvedených primerov za zníženej teploty anelácie. Pri použití pripraveného vnútorného štandardu sa v prítomnosti menších množstiev salmonelovej DNA amplifikoval fragment veľkosti približne 800 bp, čo umožnilo vylúčenie falošne negatívnych výsledkov bez obmedzenia citlivosti metódy. Pripravený vnútorný štandard sa použil na hodnotenie niekoľkých spôsobov lýzy bakteriálnych buniek pri príprave templátu pre PCR.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Salmonella*; polymerázová reťazová reakcia; vnútorný štandard

Salmonely sú fakultatívne anaeróbne gramnegatívne baktérie patriace do čeľade *Enterobacteriaceae*. Všetky druhy, sérotypy a kmene patriace do rodu *Salmonella* sú považované za patogénne pre človeka, spôsobujú gastrointestinálne ochorenie salmonelózu. Zdrojom nákazy býva kontaminovaná voda a potraviny, najčastejšie hydina, mäso a mäsové výrobky, vajcia a mliečne výrobky [1,2]. Na zabezpečenie zdravotnej neškodnosti je potrebné mať spoľahlivú metódu na dôkaz salmonel v potravinách. Klasické metódy dôkazu sú založené na kultivácii baktérií v neselektívnych a selektívnych médiach, raste na diferenciálnych tuhých médiach a konečnom sérologickom potvrdení. Majú veľmi dobrý detekčný limit a selektivitu, ale definitívne výsledky sú známe až za 5 - 6 dní [3]. Použitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je možné tento čas skrátiť bez zníženia analytických para-

RNDr. Hana DRAHOVSKÁ, RNDr. Ján TURŇA, CSc., Mgr. Viera BOHÁČOVÁ, Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta UK, Bratislava.
e-mail: drahovska@fns.uniba.sk
RNDr. Lubica PIKNOVÁ, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava.

metro. V odbornej literatúre boli publikované práce zaoberajúce sa výberom primerov na amplifikáciu DNA zo salmonel a postupmi ich dôkazu metódou PCR [4-7].

Pri použití PCR ako metódy dôkazu sa môže vyskytnúť problém falošne pozitívnych a falošne negatívnych výsledkov. Zdrojom falošne pozitívnych výsledkov je nedostatočná selektivita primerov alebo kontaminácia vzoriek cudzou DNA. Na druhej strane sa môžu získať falošne negatívne výsledky, ak nenastane amplifikácia DNA v dôsledku prítomnosti inhibítorov DNA polymerázy. Viacero zložiek potravín, kultivačných médií a extrakčných činidiel má takýto inhibičný účinok [8]. Falošne negatívne výsledky sú nebezpečnejšie ako falošne pozitívne, pretože za zdravotne neškodnú môže byť v tomto prípade považovaná aj kontaminovaná potravina.

Na sledovanie falošne negatívnych výsledkov je možné použiť vnútorný štandard, ktorý sa na rozdiel od externého štandardu môže amplifikovať v tej istej PCR reakcii ako DNA zo vzorky a ktorý tvorí amplifikačný produkt s inou veľkosťou [9]. Prítomnosť štandardného produktu po PCR signalizuje úspešnú amplifikáciu a teda neprítomnosť inhibítorov pochádzajúcich zo vzorky.

V literatúre sa opisuje niekoľko spôsobov ako pripraviť DNA templát slúžiaci ako vnútorný štandard. Je možné použiť nepríbuzný templát a druhý pár primerov v jednej reakcii alebo je možné pôvodný templát modifikovať metódami PCR a molekulárneho klonovania tak, aby modifikovaný templát produkoval PCR produkt so zmenenou veľkosťou pri použití originálnych primerov [9,10]. V tejto práci sme použili na konštrukciu vnútorného štandardu nešpecifické produkty, ktoré vznikli v PCR reakcii so zníženou teplotou anelácie. Získaný štandard sme použili na dôkaz salmonel pomocou primerov špecifických pre salmonely.

Materiál a metódy

Použil sa kmeň *Salmonella typhimurium* 34 (zo zbierky Výskumného ústavu potravinárskeho, Bratislava) a laboratórny kmeň *Escherichia coli* 35 (zo zbierky Katedry molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty Univerzity Komenského, Bratislava). Baktérie sa kultivovali v médiu LB (Luria-Bertani) pri 37 °C cez noc [11]. Chromozomálna DNA sa pripravila metódou podľa Flamma [12].

Na stanovenie detekčného limitu sa kultúra *S. typhimurium* desiatkovo riedila v médiu LB. Počet živých baktérií sa určil vyočkovaním na Živý agar č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany). 1 ml zriedenej bunkovej suspenzie

sa centrifugoval na stolnej centrifúge 10 min pri maximálnej rýchlosti a sediment sa premyl 1 ml fyziologického roztoku NaCl. K sedimentu sa pridalo 100 μ l lyzačného roztoku (1 % Triton X-100 alebo 0,05 mol.l⁻¹ NaOH s 0,125 % dodecylsulfónan sodný) a supenzia sa inkubovala 17 min pri 95 °C.

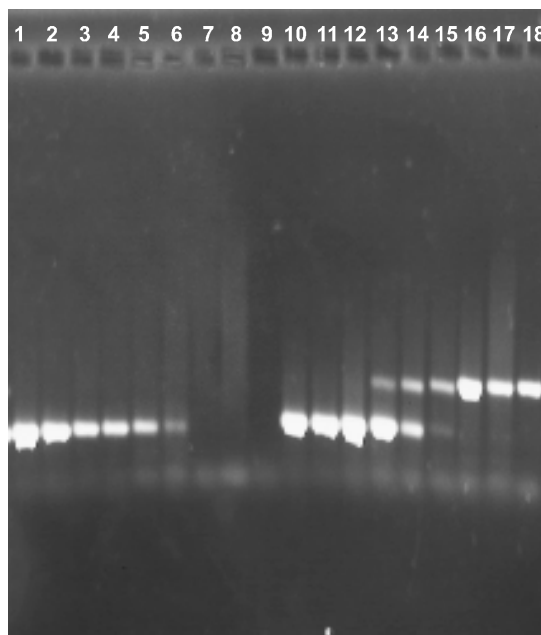
PCR sa realizovala v 20 μ l reakčnej zmesi, ktorá mala nasledujúce zloženie: 200 μ mol.l⁻¹ každého dNTP, 250 nmol.l⁻¹ primerov ST11 (AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGCA) a ST15 (GGT ACA AAT TCC CAG CGG GTA CTG) [4], 0,05 % Tween 20, 0,4 U Taq DNA polymerázy (Amersham), a tlmivý roztok dodávaný s polymerázou (koncentrácia MgCl₂ 1,5 mmol.l⁻¹). K reakčnej zmesi sa pridávalo 0,5 μ l bunkového lyzátu a 1 μ l vnútorného štandardu, ktorý bol nariadený na optimálnu koncentráciu vo vode a uchovávaný pri -20 °C v množstvách pre jednorazové použitie. Teplotný program pozostával z počiatočnej denaturácie (1 min pri 93 °C), 40 cyklov amplifikácie (15 s pri 90 °C, 15 s pri 58 °C, 30 s pri 72 °C) a záverečnej polymerizácie 8 min pri 72 °C. Pri vyhodnotení sa 10 μ l produktu PCR analyzovalo elektroforézou v 1,2 % agarózovom géli s následným vyfarbením roztokom etídiumbromidu a vizualizáciou v UV-svetle [11]. Použil sa štandard molekulových hmotností n.100 bp (TaKaRa Shuzo).

Vnútorný štandard sa pripravil PCR reakciou, pričom ako templát sa použila chromozomálna DNA z *E. coli*. Podmienky reakcie boli identické ako pri dôkaze salmonel, iba teplota anelácie sa znížila na 40 °C. Elektroforézou produktov amplifikácie sa detegovalo niekoľko DNA fragmentov. Fragment veľkosti približne 800 bp sa extrahoval z gélu metódou QIAEX II (Qiagen) a klonoval do plazmidu pCR2.1 (Invitrogen) podľa návodu výrobcu. Získaný rekombinantný plazmid pMIM3 sa ďalej používal ako vnútorný štandard.

Výsledky a diskusia

Úlohou vnútorného štandardu v PCR je vylúčenie falošne negatívnych výsledkov tým, že vo vzorkách obsahujúcich cieľovú templátovú DNA v množstve menšom, ako je detekčný limit metódy, dôjde k amplifikácii štandardu. Ako vnútorný štandard pre PCR na dôkaz salmonel s použitím primerov ST11 a ST15 sa použil fragment DNA amplifikovaný v PCR so zníženou teplotou anelácie, pri použití tých istých primerov a templátovej DNA z *E. coli*. Z niekoľkých fragmentov DNA, ktoré vznikli pri nešpecifickej amplifikácii, sa vybral produkt veľkosti približne 800 bp, čo je asi dvojnásobok veľkosti špecifického salmonelového produktu. Dôvodom pre výber vnútorného štandardu väčšieho ako špecifický salmonelový produkt bolo

vylúčenie uprednostnenia amplifikácie kratšieho špecifického produktu v prítomnosti oboch templátov - vnútorného štandardu aj špecifickej DNA. Dostatočný rozdiel vo veľkosti vnútorného štandardu a špecifického salmonelového produktu pritom umožňuje ich ľahké odlíšenie pri elektroforetickej analýze. Na amplifikáciu vnútorného štandardu sa ako templát použila



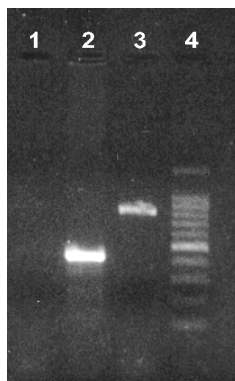
OBR. 1. Detekčný limit dôkazu salmonel bez a s použitím vnútorného štandardu. 1 až 8 - amplifikácia bakteriálnych lyzátov bez prítomnosti vnútorného štandardu, 9 - negatívna kontrola, 10 až 17 - amplifikácia bakteriálnych lyzátov v prítomnosti vnútorného štandardu (0,5 pg pMIM3 v reakcii). Počet buniek *S. typhimurium*: 1 a 10 - $5 \cdot 10^8$ KTJ.ml⁻¹, 2 a 11 - $5 \cdot 10^7$ KTJ.ml⁻¹, 3 a 12 - $5 \cdot 10^6$ KTJ.ml⁻¹, 4 a 13 - $5 \cdot 10^5$ KTJ.ml⁻¹, 5 a 14 - $5 \cdot 10^4$ KTJ.ml⁻¹, 6 a 15 - $5 \cdot 10^3$ KTJ.ml⁻¹, 7 a 16 - $5 \cdot 10^2$ KTJ.ml⁻¹, 8 a 17 - $5 \cdot 10^1$ KTJ.ml⁻¹ (všetky lyzáty boli pripravené v prítomnosti 10^9 KTJ.ml⁻¹ baktérií *E. coli* 35), 18 - negatívna kontrola v prítomnosti vnútorného štandardu.

FIG. 1. Detection limit for *Salmonella* with and without the use of the internal standard. 1 to 8 - amplification of bacterial lysates without the internal standard, 9 - negative control, 10 to 17 - amplification of bacterial lysates in the presence of the internal standard (0.5 pg pMIM3 per reaction). Numbers of cells of *S. typhimurium*: 1 and 10 - $5 \cdot 10^8$ CFU.ml⁻¹, 2 and 11 - $5 \cdot 10^7$ CFU.ml⁻¹, 3 and 12 - $5 \cdot 10^6$ CFU.ml⁻¹, 4 and 13 - $5 \cdot 10^5$ CFU.ml⁻¹, 5 and 14 - $5 \cdot 10^4$ CFU.ml⁻¹, 6 and 15 - $5 \cdot 10^3$ CFU.ml⁻¹, 7 and 16 - $5 \cdot 10^2$ CFU.ml⁻¹, 8 and 17 - $5 \cdot 10^1$ CFU.ml⁻¹ (lysates were prepared in the presence of 10^9 CFU.ml⁻¹ *E. coli* 35), 18 - negative control in the presence of the internal standard.

DNA z *E. coli*, pretože pri použití DNA zo salmonely by bola možnosť kontaminácie štandardu špecifickým produktom. Ďalšou výhodou použitého postupu je, že štandard má okrem počiatkovej oblasti primerov inú sekvenciu nukleotidov ako špecifický fragment a preto pri reakcii nie je možná tvorba heteroduplexných produktov. V prvých experimentoch sa ako vnútorný štandard použil priamo amplifikovaný fragment DNA po prečistení gélovou elektroforézou. V tomto prípade sa však podstatne zvyšovala tvorba krátkych nešpecifických produktov (primer - dimérov). Tento nedostatok sa odstránil tak, že sa uvedený fragment klonoval a pripravil sa plazmid pMIM3, ktorý sa v ďalšej práci používal ako vnútorný štandard.

Pri použití vnútorného štandardu v PCR je dôležité zabezpečiť jeho správnu koncentráciu v reakčnej zmesi tak, aby sa vnútorný štandard reprodukovateľne amplifikoval, ale aby sa nezvýšil detekčný limit špecifickej reakcie kompetíciou vnútorného štandardu s originálnym templátom [10]. Koncentrácia vnútorného štandardu sa optimalizovala empiricky v PCR s desiatkovými riedeniami salmonelovej chromozomálnej DNA. Pri použití optimálnej koncentrácie vnútorného štandardu, ktorá bola približne 10^4 až 10^5 kópií plazmidu pMIM3 v PCR reakcii, nedochádzalo k negatívnemu ovplyvneniu detekčného limitu metódy (obr. 1).

Význam vnútorného štandardu pri dôkaze salmonel metódou PCR ukaže obr. 2. V prvej a tretej dráhe nie je prítomný žiadny špecifický amplifikačný produkt o veľkosti 429 bp, a preto by mohli byť obe vzorky posudzované ako negatívne. Avšak v prvej dráhe, so vzorkou salmonel kultivovaných v médiu Rappaport-Vassiliadis, nie je prítomný ani produkt amplifikácie vnútorného štandardu, a preto je nutné považovať túto vzorku za falošne negatívnu. Zlyhanie PCR reakcie bolo v tomto prípade spôsobené inhibíciou Taq DNA polymerázy pravdepodobne niektorou zo zložiek kultivačného média [8]. Prítomnosť amplifikovaného vnútorného štandardu v tretej dráhe



OBR. 2. Výsledky amplifikácie salmonelových lyzátov v prítomnosti vnútorného štandardu.

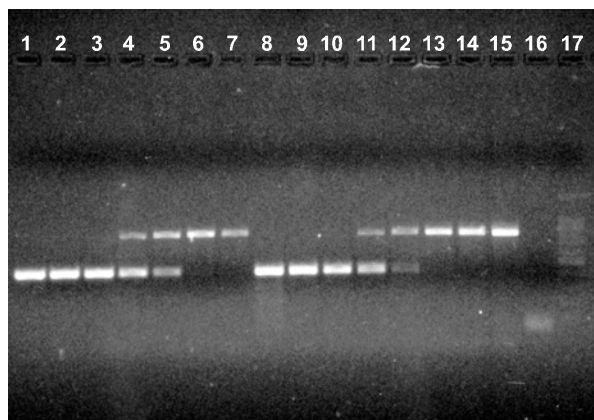
1 - lyzát z kultúry *S. typhimurium* (10^7 KTJ.ml⁻¹) v médiu Rappaport-Vassiliadis, 2 - lyzát z kultúry *S. typhimurium* (10^7 KTJ.ml⁻¹) v médiu LB, 3 - lyzát z kultúry *E. coli* (10^9 KTJ.ml⁻¹) v médiu LB, 4 - štandard molekulových hmotností.

FIG. 2. Results of the amplification of *Salmonella* lysates in the presence of the internal standard.

1 - lysate of the *S. typhimurium* culture (10^7 CFU.ml⁻¹) in Rappaport-Vassiliadis broth, 2 - lysate of the *S. typhimurium* culture (10^7 CFU.ml⁻¹) in LB broth, 3 - lysate of the *E. coli* culture (10^9 CFU.ml⁻¹) in LB broth, 4 - molecular weight standard.

je dôkazom, že vo vzorke nie sú prítomné žiadne salmonely, alebo je ich množstvo nižšie ako detekčný limit metódy. V druhej dráhe bol detegovaný len fragment špecifický pre salmonely, pretože v reakcii bol prítomný veľký nadbytok špecifického templátu, ktorý neumožnil amplifikáciu vnútorného štandardu.

S využitím pripraveného vnútorného štandardu sa porovnávalo niekoľko metód rýchlej prípravy templátovej DNA pre použitie pri dôkaze salmonel metódou PCR. Porovnanie alkalickej lýzy a lýzy v prítomnosti Tritonu X-100 uvádza obr. 3. Z obrázka vyplýva, že oboma metódami sa pripravili lyzáty, ktoré nespôsobovali inhibíciu amplifikačnej reakcie a v oboch prípadoch sa dosiahol detekčný limit 10^4 KTJ.ml⁻¹. Pri príprave lyzátu sa ukázala kritická doba a intenzita centrifugácie veľmi zriedených bakteriálnych suspenzií. Dosiahnutý detekčný limit predstavuje približne 100 KTJ na reakciu



OBR. 3. Porovnanie dvoch spôsobov lýzy buniek salmonel pri príprave templátovej DNA. 1 až 7 - lyzáty kultúry *S. typhimurium* v roztoku NaOH a SDS, 8 až 14 - lyzáty kultúry *S. typhimurium* v roztoku Triton X-100. Počet baktérií: 1 a 8 - 10^8 KTJ.ml⁻¹, 2 a 9 - 10^7 KTJ.ml⁻¹, 3 a 10 - 10^6 KTJ.ml⁻¹, 4 a 11 - 10^5 KTJ.ml⁻¹, 5 a 12 - 10^4 KTJ.ml⁻¹, 6 a 13 - 10^3 KTJ.ml⁻¹, 7 a 14 - 10^2 KTJ.ml⁻¹, 15 - negatívna kontrola v prítomnosti interného štandardu, 16 - negatívna kontrola v neprítomnosti vnútorného štandardu, 17 - štandard molekulových hmotností.

FIG. 3. Comparison of two methods of the lysis of *Salmonella* cells at the preparation of the template DNA.

1 to 7 - lysates of the *S. typhimurium* culture in the solution of NaOH and SDS, 8 to 14 - lysates of the *S. typhimurium* culture in the solution of Triton X-100. Numbers of cells: 1 and 8 - 10^8 CFU.ml⁻¹, 2 and 9 - 10^7 CFU.ml⁻¹, 3 and 10 - 10^6 CFU.ml⁻¹, 4 and 11 - 10^5 CFU.ml⁻¹, 5 and 12 - 10^4 CFU.ml⁻¹, 6 and 13 - 10^3 CFU.ml⁻¹, 7 and 14 - 10^2 CFU.ml⁻¹, 15 - negative control in the presence of the internal standard, 16 - negative control in the absence of the internal standard, 17 - molecular weight standard.

a je porovnateľný s detekčným limitom PCR, keď sa ako templát použije prečistená chromozomálna DNA izolovaná zo salmonely. Podobné výsledky sa dosiahli pri použití lýzy baktérií varom vo vode a pri opracovaní baktérií pronázou E pred lýzou varom. Detekčný limit reakcie bol rovnaký i v prítomnosti baktérií *E. coli* v koncentrácii 10^9 KTJ.ml⁻¹ (obr.1).

Na základe výsledkov môžeme skonštatovať, že pripravený vnútorný štandard umožňuje vylúčenie falošne negatívnych výsledkov pri dôkaze salmonel pomocu PCR s primermi ST11 a ST15, pričom nedochádza k zvýšeniu detekčného limitu metódy. Pripravený vnútorný štandard je výhodnejší ako štandard použitý v práci Rijpens a kol. [13], pretože je väčší ako špecifický DNA produkt. Užitočnosť použitia pripraveného vnútorného štandardu sa potvrdila pri monitorovaní prítomnosti inhibítorov PCR pri dôkaze salmonel. Použitá metóda prípravy vnútorného štandardu je v porovnaní s inými spôsobmi jednoduchá, univerzálna a nevyžaduje použitie žiadnych nových primerov. Túto metódu je možné využiť aj pri konštrukcii vnútorných štandardov na dôkaz iných patogénnych mikroorganizmov.

Literatúra

1. ROSICKÝ, B. - SIXL, W.: Salmonelózy. Praha : Scientia Medica 1994. 208 s.
2. TIETJEN, M. - FUNG, D. Y. C.: *Salmonellae* and food safety. Critical Reviews in Microbiology, 21, 1995, s. 53-83.
3. STN ISO 6579. Všeobecné pokyny pre metódy na dôkaz baktérií rodu *Salmonella*. 1993.
4. AABO, S. - RASMUSSEN, O. F. - ROSSEN, L. - SORENSEN, P. D. - OLSEN, J. E.: *Salmonella* identification by polymerase chain reaction. Molecular and Cellular Probes, 7, 1993, s. 171-178.
5. STONE, G. G. - OBERST, R. D. - HAYS, M. P. - McVEY, S. - CHENGAPPA, M. M.: Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation-PCR procedure. Journal of Clinical Microbiology, 32, 1994, s. 1742-1749.
6. COHEN, H. J. - MECHANDA, S. M. - LIN, W.: PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. Applied and Environmental Microbiology, 62, 1996, s. 4303-4308.
7. KUČTA, T. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - DRAHOVSKÁ, H.: Dôkaz salmonel v potravinách metódami založenými na polymerázovej reťazovej reakcii. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 153-161.
8. ROSSEN, L. - NORSKOV, P. - HOLMSTROM, K. - RASMUSSEN, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. International Journal of Food Microbiology, 17, 1992, s. 37-45.
9. LAMBERTZ, S. T. - BALLAGI-PORDANY, A. - LINDQUIST, R.: A mimic as internal standard to monitor PCR analysis of food-borne pathogens. Letters in Applied Microbiology, 26, 1998, s. 9-11.
10. SACHADYN, P. - KUR J.: The construction and use of a PCR internal control. Molecular and Cellular Probes, 12, 1998, s. 259-262.

11. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. New York : Cold Spring Harbor Laboratory 1982. 545 s.
12. FLAMM, R. K. - HINRICHS, D. J. - THOMASHOW, M. F.: Introduction of pAM beta 1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infection and Immunity*, 44, 1984, s. 157-161.
13. RIJSENS, N. - HERMAN, L. - VEREECKEN, F. - JANNES, G. - DE SMEDT, J. - DE ZUTTER, L.: Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 1999, s. 37-44.

Do redakcie došlo 9.4.1999.

**Preparation and application of the internal standard
for the detection of *Salmonella* by the polymerase chain reaction**

DRAHOVSKÁ, H. - TURŇA, J. - BOHÁČOVÁ, V. - PIKNOVÁ, L. - KUČHTA, T.:
Bull. potrav. Výsk., 38, 1999, p. 95-102.

SUMMARY. A recombinant plasmid was prepared for the application as an internal standard at the detection of salmonella by the polymerase chain reaction (PCR) using primers ST11 and ST15. The plasmid contains a DNA fragment obtained by a non-specific amplification of the template DNA from *Escherichia coli* using given primers at a decreased annealing temperature. When the prepared internal standard was used in the presence of lower amounts of salmonella DNA, a fragment of approx. 800 bp was amplified, which allowed to exclude false-negative results without negatively affecting the detection limit of the method. The prepared internal standard was used at the evaluation of several methods of lysis of bacterial cells at the preparation of the template for PCR.

KEYWORDS: *Salmonella*; polymerase chain reaction; internal standard