

Detekcia salmonel polymerázovou reťazovou reakciou

MÁRIA ZIGOVÁ - ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ
- NANCY RIJPENS - TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. Zaviedli sme metódu detekcie salmonel založenú na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) s použitím primerov ST11 a ST15 a amplifikáciu úseku DNA veľkosti 429 bp. Do PCR sme použili lyzáty buniek, pripravené lýzou dodecylsulfátom sodným v prostredí NaOH pri 95 °C. Produkt PCR sme detegovali elektroforézou v agarózovom géli. Vlastná analýza pripravenej bakteriálnej kultúry trvala menej ako 6 h a mala citlivosť 10^5 KTJ/ml. Vysokú selektivitu metódy potvrdili pozitívne výsledky s kmeňmi salmonel (*Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* a *S. adelaide*) a negatívne výsledky s príbuznými baktériami (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. a i.).

K najrozšírenejším alimentárnym ochoreniam patria salmonelózy. Sú to ochorenia spôsobené baktériami *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* alebo menej často inými druhmi salmonel. Tieto baktérie môžu kontaminovať potraviny, najmä hydinu, vajcia a výrobky z nich [1].

Okrem iných faktorov, ako je predovšetkým dodržiavanie hygieny pri výrobe potravín, prispieva k zvýšenému výskytu salmonelóz aj časová náročnosť štandardnej metódy na detekciu salmonel v potravinách [2]. Prax preto prejavuje veľký záujem o nové metódy, ktoré by boli menej časovo náročné a pritom porovnateľne citlivé i špecifické ako doterajšia štandardná metóda. V posledných rokoch sa objavilo viacero alternatívnych rýchlych metód na detekciu salmonel, založených na imunochemickej detekcii špecifických bielkovín, alebo na hybridizácii nukleových kyselín [3]. Ďalšou možnosťou je použitie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) [4]. Špecifické primery použiteľné na detekciu salmonel sú známe [5].

V predkladanej práci sa zaoberáme zavedením detekcie salmonel metódou PCR a určením jej základných parametrov.

RNDr. Mária Zigová, Ing. Alena Štefanovičová, RNDr. Tomáš Kučhta, CSc.,
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava, Dr. Nancy Rijpens,
Rijkszuivelstation, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle, Belgicko.

Materiál a metódy

Použili sme kmene salmonel a príbuzných baktérií zo zbierok mikroorganizmov, izoláty z potravín získané v roku 1994 zo Štátneho veterinárneho ústavu v Bratislave, Štátneho zdravotného ústavu v Bratislave, Slovenskej poľnohospodárskej a potravinárskej inšpekcie v Bratislave a z Okresnej hygienickej stanice v Trnave, a tiež kmene izolované z potravín na našich pracoviskách (tab. 1.). Baktérie sme kultivovali v Živnom bujóne č. 2 alebo na Živnom agare č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany) pri teplote 28 °C (kmene z rodu *Enterobacter*) alebo 37 °C (ostatné kmene). Kultúry baktérií sme riedili v 0,85 % roztoku NaCl. Celkové počty baktérií sme stanovili štandardnou metódou [6].

Pre PCR sme centrifugovali 2 ml kultúry a bunky sme lyzovali v roztoku 0,05 M NaOH a 0,125 % dodecylsulfátu sodného počas 17 min pri 95 °C [7].

100 µl reakčnej zmesi pre PCR obsahovalo 1 µl bunkového lyzátu, 10 mM Tris.HCl pH 9,5, 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 % Tween 20, 0,17 % sérumalbumín, 0,1 % Triton X-100, 200 µM každého dNTP (Pharmacia, Švédsko), 0,5 µM primeru ST11 a 0,5 µM primeru ST15 ([5], Genset, Francúzsko) a 2,5 U

Tabuľka 1. Použité baktérie.

Table 1. The bacteria used.

KMENE ¹	PÔVOD ²
<i>Salmonella enteritidis</i> CCM 4420	Zbierka ³
<i>Salmonella enteritidis</i> , 10 kmeňov ¹	ŠVÚ ⁴
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 4419	Zbierka
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5156	Zbierka
<i>Salmonella typhimurium</i> 105	Dr. Horiuchi, Tokyo
<i>Salmonella adelaide</i> , 2 kmene	ŠVÚ
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 4475	Zbierka
<i>Citrobacter freundii</i> LMG 3246	Zbierka
<i>Citrobacter diversus</i> LMG 5519	Zbierka
<i>Citrobacter</i> sp.	OHS Trnava ⁵
<i>Enterobacter cloacae</i> LMG 2783, 3008, 3014	Zbierka
<i>Enterobacter cloacae</i> E1	Izolát z potravín ⁶
<i>Enterobacter omnigenus</i> LMG 2784	Zbierka
<i>Enterobacter intermedium</i> LMG 2785	Zbierka
<i>Hafnia</i> sp.	SPPI ⁷
<i>Proteus</i> sp.	Izolát z potravín

1 - Strains, 2 - Origin, 3 - Culture collection, 4 - State Veterinary Institute, Bratislava and State Medical Institute, Bratislava, 5 - Regional Hygienic Station, Trnava, 6 - Our isolate from food, 7 - Slovak Agricultural and Food Inspection.

Taq polymeráza (Amersham, Veľká Británia). Reakčné zmesi sme prevrstvili 70 μ l parafrínového oleja a PCR vykonali v termálnom cykléri Techne PHC-3. Teplotný program pozostával z úvodnej denaturácie (95 °C/1 min), 1.-30. cyklu: denaturácia (95 °C/15 s), annealing (57 °C/15 s), polymerizácia (72 °C/30 s), a záverečnej polymerizácie (72 °C/8 min).

Detekciu sme vykonali elektroforézou v 1,2 % agarózovom géli [4] na základe prítomnosti (pozitívny výsledok) alebo neprítomnosti amplifikovaného fragmentu DNA o veľkosti 429 bp (negatívny výsledok).

Výsledky a diskusia

Detekcia salmonel pomocou PCR s primermi ST11 a ST15 bola navrhnutá ako rýchla, selektívna a citlivá alternatíva klasickej kultivačnej metódy [5]. Túto metódu sme modifikovali použitím urýchleného teplotného programu, čo umožnilo vykonať vlastnú polymerázovú reťazovú reakciu za 1,5 h namiesto pôvodných 4 h. Vzorky pre PCR sme získali lýzou buniek iónogénnym detergentom v alkalickom prostredí [7]. Vlastná analýza pripravenej bakteriálnej kultúry nám uvedenou metódou trvala celkove menej ako 6 h.

Aby sme zistili selektivitu metódy, analyzovali sme ňou súbor kmeňov salmonel, obsahujúci zbierkové kmene i kmene čerstvo izolované z potravín v SR, a súbor kmeňov z iných rodov, ktoré dávajú falošne pozitívne výsledky v iných metódach detekcie salmonel [8]. Vzorky jednotlivých kmeňov obsahovali $\geq 10^7$ KTJ/ml. So všetkými použitými kmeňmi salmonel sme získali pozitívne výsledky a naopak, negatívne výsledky so všetkými ostatnými kmeňmi (tab. 2.). Tieto výsledky poukazujú na vysokú selektivitu testovanej metódy.

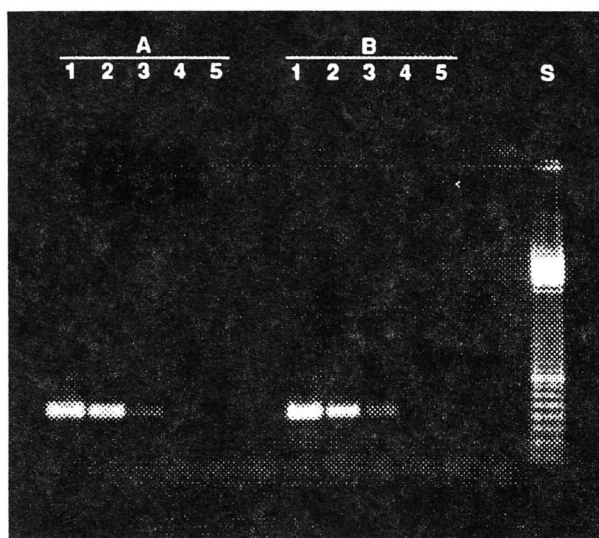
S cieľom zistiť citlivosť metódy, pripravili sme desiatkové riedenia kultúr dvoch reprezentatívnych kmeňov *S. enteritidis* a *S. typhimurium*, v ktorých sme hustotu baktérií súbežne určili platňovou metódou. Pripravené suspenzie baktérií sme vyšetrili pomocou PCR a zistili sme, že pozitívne výsledky možno dosiahnuť pri hustotách $\geq 10^5$ KTJ/ml (obr. 1.).

Získané výsledky potvrdzujú, že prezentovanou metódou je možné rýchlo, špecificky a citlivo detegovať salmonely. Metóda má dobu analýzy kratšiu ako iné doteraz publikované metódy na detekciu mikroorganizmov pomocou polymerázovej reťazovej reakcie, pričom je vysoko selektívna. Zistená citlivosť 10^5 KTJ/ml je nižšia ako v prípade väčšiny publikovaných metód. Zníženie citlivosti sa však prejavuje len pri práci s veľmi zriedenými roztokmi DNA, tak ako je to v uvedenom prípade analýzy čistých kultúr. Pri analýze zmesných kultúr, na ktorú sa metóda bude najviac používať, je citlivosť poriadkovo vyššia (naše nepublikované výsledky) a je v súlade s publikovanými citlivosťami analogických metód [5]. Vzhľadom na jej parametre, môže sa táto metóda stať po optimalizácii postupu od vzorky potraviny po vlastnú PCR jednou z najvhodnejších na rýchlu detekciu salmonel v potravinách.

Tabuľka 2. Výsledky detekcie baktérií.
Table 2. Results of the detection of the bacteria.

BAKTÉRIA ¹	POČET KMEŇOV ²	VÝSLEDOK DETEKCIE ³
<i>Salmonella enteritidis</i>	11	+
<i>Salmonella typhimurium</i>	3	+
<i>Salmonella adelaide</i>	2	+
<i>Citrobacter freundii</i>	2	-
<i>Citrobacter diversus</i>	1	-
<i>Citrobacter</i> sp.	1	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	4	-
<i>Enterobacter omnigenus</i>	1	-
<i>Enterobacter intermedius</i>	1	-
<i>Hafnia</i> sp.	1	-
<i>Proteus</i> sp.	1	-

1 - Bacterium, 2 - Number of strains, 3 - Result of the detection.



Obr. 1. Citlivosť detekcie salmonel.
Fig. 1. Sensitivity of salmonella detection.

A - *S. enteritidis*, B - *S. typhimurium*, 1 - 10^7 KTJ/ml, 2 - 10^6 KTJ/ml, 3 - 10^5 KTJ/ml, 4 - 10^4 KTJ/ml, 5 - 10^3 KTJ/ml, S - zmes štandardov DNA/a mixture of molecular weight standards (n.100 bp).

Literatúra

1. ROSICKÝ, B. - SIXL, W.: Salmonelózy, Scientia Medica, Praha, 1994.
2. STN 56 0088 Dôkaz baktérií rodu *Salmonella*.
3. PISHAWIKAR, M.S. - SINGHAL, R.S. - KULKARNI, P.R.: Rapid non-microbiological methods for detecting microorganisms in foods. Trends Food Sci. Technol., 3, 1992, s.165.
4. ZIGOVÁ, M. - JURÍKOVÁ, K. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A.: Polymerázová refazová reakcia, princíp a využitie na detekciu mikroorganizmov. Bulletin PV, 33, 1994, č. 1-2, s.57.
5. AABO, S. - RASMUSSEN, O.F. - ROSSEN, L. - SORESENSEN, P.D. - OLSEN, J.E.: *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. Mol. Cell. Probes, 7, 1993, s.171.
6. STN 56 0083 Stanovenie celkového počtu mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov platňovou metódou.
7. ROSSEN, L. - HOLMSTROM, K. - OLSEN, J.E. - RASMUSSEN, O.F.: A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. Int. J. Food Microbiol., 14, 1991, s.145.
8. MAJERÍKOVÁ, I. - KUČHTA, T.: Hodnotenie imunochemickej metódy detekcie salmonel s použitím komerčne dostupných systémov. Bulletin PV, 34, 1995, č.3-4, s.141.

Do redakcie došlo 6.10.1995.

Salmonella detection by the polymerase chain reaction

MÁRIA ZIGOVÁ - ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ
- NANCY RIJPENS - TOMÁŠ KUČHTA

SUMMARY. A polymerase chain reaction method was used to detect salmonella, employing primers ST11 and ST15, cell lysis by sodium dodecylsulfate in NaOH solution at 95 °C and detection by agarose gel electrophoresis. From the bacterial culture to the result output the detection took less than 6 h and had a sensitivity of 10⁵ CFU/ml. The method was specific for salmonella, giving positive results with *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* and *S. adelaide*, and negative results with related non-salmonella strains (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. and others).