

Polymerázová reťazová reakcia, princíp a využitie na detekciu mikroorganizmov

MÁRIA ZIGOVÁ - KATARÍNA JURÍKOVÁ - ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ

Súhrn. V predkladanom príspevku je podaný stručný prehľad o podstate, súčasnom stave a možnostiach aplikácie metódy PCR, založenej na molekulárno-genetických poznatkoch v potravinárskej praxi. Uvedené sú i vlastné výsledky a skúsenosti počiatočných prác detekcie koliformných baktérií a *E. coli* amplifikáciou *lacZ* a *lamB* génov použitím metódy PCR, s perspektívou orientácie na potravinársky významné patogénne mikroorganizmy.

Rýchla, citlivá a špecifická analýza prítomnosti indikátorových, ale najmä patogénnych, toxínogénnych a podmienene patogénnych mikroorganizmov má i z hľadiska potravinárskej technológie veľký význam. Takúto analýzu umožňujú hlavne imunologické a genetické metódy, ktorých aplikácia a optimalizácia sa v súčasnosti vo vyspelých krajinách rozvíja rýchlym tempom.

Genetické metódy detekcie používajúce DNA sondy a metódu polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) patria k progresívnym a špecifickým vyšetrovacím metódam z viacerých dôvodov [1, 2].

Nakolko detekujú geneticky zakódované sekvencie, nie je potrebná expresia faktorov virulencie v laboratórnych podmienkach, nie je potrebná izolácia čistej kultúry, v dôsledku čoho sa skracaje čas potrebný na analýzu a súčasne sa môže vyšetriť veľký počet bakteriálnych izolátov alebo vzoriek.

Vzhľadom na to, že tieto metódy umožňujú detekovať genetické faktory virulencie, výrazne môžu prispieť k vytvoreniu podmienok

RNDr. Mária Zigová, RNDr. Katarína Juríková, Ing. Alena Štefanovičová,
Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

pre dobrú technologickú prax, k možnosti pružnej mikrobiologickej kontroly technologického procesu, produkčných kmeňov i finálnych produktov a tým v konečnom dôsledku k ochrane zdravia konzumentov.

Stále významnejšou a dôležitejšou diagnostickou metódou sa stáva polymerázová reťazová reakcia (PCR). Je to metóda, ktorou možno *in vitro*, bez kultivácie buniek a bez klonovania, amplifikovať molekuly DNA, t.j. namnožiť genetický materiál v priebehu niekoľkých hodín. Pomocou tejto techniky je možná identifikácia jednej baktérie alebo vírusovej partikuly, v analyzovanej vzorke, napr. potravinu.

Predpokladom uskutočnenia PCR je informácia o sekvencii báz terminálnych koncov hľadaného úseku nukleovej kyseliny a následné získanie primerov. Primery sú krátke synteticky zostrojené oligonukleotidy o veľkosti 20 - 30 bp, ich sekvencia je dokonale komplementárna k sekvencii báz na 3'-koncoch oboch vlákien DNA. Sú to štartovacie miesta pre DNA-polymerázu, ktorá syntetizuje druhé vlákno iba vtedy, ak má 2-vláknový východiskový bod, ktorý vznikne pripojením sa primeru na úsek 1-vláknovej DNA. Toto pripojenie t.j. hybridizácia primeru nastáva samovoľne za vhodných podmienok. DNA polymeráza dosyntetizuje postupne druhé vlákno (začínajúc od primeru) a to vždy iba jedným smerom od 5'-konca k 3'-koncu.

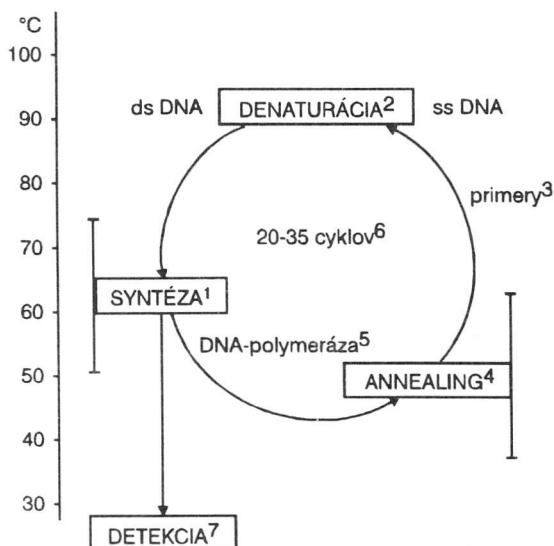
Technológia PCR je založená na 3-stupňovom cyklickom procese [3] (obr.1, 2).

Začína sa denaturáciou templátu dvojvláknovej (ds) DNA účinkom vysokej teploty (93 - 94 °C), pričom vznikne jednovláknová (ss) DNA. Reakčná zmes sa ochladí na teplotu, vhodnú pre nadviazanie primerov k templátovej komplementárnej DNA (annealing). Nakoniec sa teplota reakcie zvýši na optimálnu pre DNA polymerázu, účinkom ktorej dochádza k dosyntetizovaniu druhého vlákna DNA ohraňovaného primermi (syntéza DNA).

Jeden cyklus trvá zvyčajne 3 - 5 minút a opakuje sa 20 - 35 krát. Takto z 1 úseku 2-vláknovej DNA vzniká postupne 2, 4, 8, ... kópií (reťazová reakcia). Pri uvedenom počte cyklov (20 - 35) sa dosiahne 2^{20} - 2^{35} -násobná amplifikácia, t.j. hľadaný gén sa amplifikuje 10^5 - 10^9 násobne. Produkt PCR sa detekuje elektroforeticky v agarózovom géli. Celý postup trvá niekoľko hodín a jeho podstatnú časť je možné automatizovať, použitím komerčne dostupných termálnych cyklérov, ktoré cyklicky menia teplotu podľa naprogramovaného algoritmu.

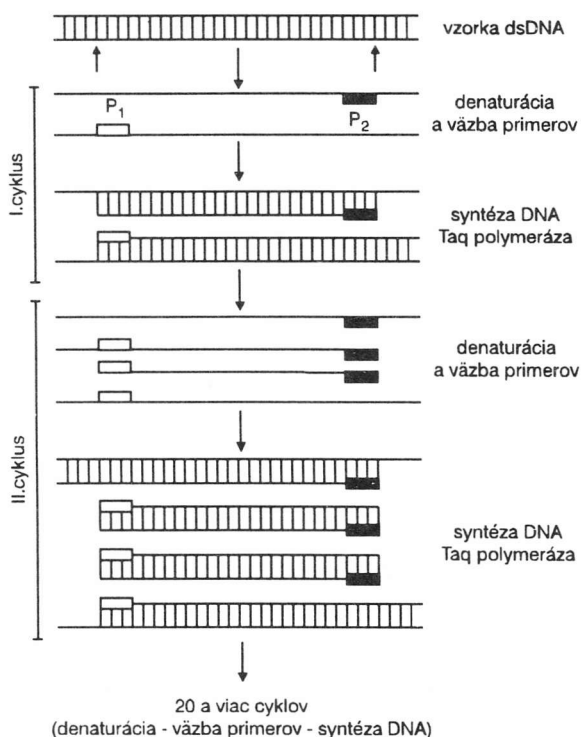
Obr.1. Schéma polymerázovej reťazovej reakcie (PCR).
Fig.1. Scheme of polymerase chain reaction (PCR).

- 1 - Extension, 2 - Denaturation,
3 - Primers, 4 - Annealing,
5 - DNA polymerase,
6 - 20-35 cycles, 7 - Detection.



Obr.2. Princíp metódy (šípkami je na dvojvláknovej vzorke - dsDNA - vymedzený úsek, ktorý sme si zvolili na amplifikovanie, P₁, P₂ - primery).

Fig.2. Principle of method (arrows on a double fibre sample - dsDNA - demonstrate defined section for amplifying, P₁, P₂ primers).



Ako príklad využitia metódy PCR na detekciu niektorých druhov alebo skupín mikroorganizmov významných z hľadiska potravinárskej mikrobiológie možno uviesť nasledovné aplikácie:

Laktózový operón (*lac*) u *Escherichia coli* a koliformných baktérií tvorí niekoľko génov (*lac*/POZYA) a je zodpovedný za schopnosť bunky utilizovať laktózu. Priamo zodpovedné za utilizáciu laktózy sú iba génové produkty *lacZ* (β -galaktozidáza) a *lacY* (laktózopermeáza) [4]. Detekciu koliformných baktérií je preto možné uskutočniť amplifikáciou špecifických sekvencií génu *lacZ* o veľkosti 876 bp, nakoľko aj konvenčné metódy detekcie koliformných baktérií sú založené na aktivite produktu tohto génu [5]. Tí istí autori si zvolili pre detekciu prítomnosti fekálnej *E.coli* amplifikáciu časti génu kódujúceho transportný proteín maltózy, *mal B*, ktorý obsahuje úsek označený ako *lamB*, kódujúci povrchový proteín rozlišovaný bakteriofágom špecifickým pre *E.coli*. Dosiahla sa vysoká špecifita a citlivosť reakcie, podarilo sa detekovať 1 - 10 fg genomickej DNA a 1 - 5 buniek *E.coli* v 100 ml vody.

Významný prínos predstavuje metóda PCR aj pre diagnostiku enterotoxigénnych kmeňov *E.coli* (ETEC) produkujúcich termolabilný toxín, ktorého gén (*LT*) je lokalizovaný na plazmide virulencie. Po 30 cykloch amplifikácie s použitím termostabilnej DNA-polymerázy z mikroorganizmu *Thermus aquaticus* bolo možné detekovať jednu baktériu [6].

Cytotoxická *E.coli* obsahujúca gény zodpovedné za tvorbu toxínu podobného štruktúrou toxínu, ktorý produkuje *Shigella* (Shiga-like toxín, SLT I a SLT II) sa taktiež detekovala metódou PCR, pričom sa použili 3 primery v tzv. "nested PCR". Amplifikované fragmenty sa následne separovali magneticky v testovacom systéme, ktorí autori označili ako DIANA (Detection of Immobilized Amplified Nucleic Acid) [7].

Diferenciácia patogénnych kmeňov *Yersinia enterocolitica* sa uskutočnila na základe detekcie génu kódujúceho termostabilný enterotoxín (*yst*), ktorý je lokalizovaný na chromozóme. Uvedený metodický prístup predstavuje výhodu oproti sondám pripraveným na základe plazmidom determinovaných vlastností virulencie, nakoľko počas izolácie, pri subkultivácii a pod. dochádza často k strate plazmidu.

Sonda *yst* označená digoxigenínom-dUTP a pripravená metódou PCR sa použila v hybridizácii Southern a úspešne diferencovala patogénne kmene *Y.enterocolitica* v čistej aj zmiešanej kultúre [8].

Patogenita kmeňov listérií súvisí o.i. najmä s produkciou hemolytického exoproteínu listeriolyzínu, ktorý je kódovaný génom *lysA*, resp. *hlyA*. Metódou PCR sa amplifikovali dva špecifické fragmenty DNA hemolyzínových génov, pomocou ktorých sa selektívne diagnostikovala *Listéria monocytogenes* v mlieku. Detekčný limit bol 10 baktérií v 10 ml mlieka [9, 10].

Cieľom predloženej práce je podať stručnú informáciu o princípe polymerázovej reťazovej reakcii a o niektorých možnostiach jej uplatnenia v oblasti potravinárskej praxe, ako aj experimentálne overiť a rozpracovať metódu PCR v aplikácii na detekciu koliformných baktérií a *E. coli* amplifikáciou *lacZ* a *lamB* génov v enzýmových prípravkoch mikrobiálneho pôvodu v porovnaní so štandardnými kultivačnými postupmi.

Materiál a metódy

V práci sa použil kmeň *E. coli* 208 vyrastený v kvapalnom LB médiu za 20 hod pri 37 °C. Ako pozitívna kontrola sa použil plazmid pUZL obsahujúci celý laktózový operón, negatívna kontrola neobsahovala templátovú DNA.

Prítomnosť *E. coli* a koliformných baktérií sa vyšetrila v 20-tich potravinárskych enzýmových prípravkoch (tab.1.).

Použité primery na detekciu:

a) koliformných baktérií [5]

ZL - 1675 : 5'-ATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCC-3'

ZR - 2548 : 5'-CACCATGCCGTGGGTTTCAATATT-3'

amplifikoval sa úsek *lacZ* génu o veľkosti 876 bp

b) *E.coli* [5]

BL - 4899 : 5'-GGATATTTCTGGTCCTGGTGCCGG-3'

BR - 5452 : 5'-ACTTGGTGCCGTTGTCGTTATCCC-3'

amplifikoval sa úsek *lamB* génu o veľkosti 554 bp

Syntéza oligonukleotidových primerov sa uskutočnila pomocou DNA syntetizátora u fy Genexpress, Bratislava.

Tabuľka 1. Zoznam enzýmových prípravkov použitých v práci.
Table 1. List of enzyme preparations used in work.

ENZÝMOVÝ PRÍPRAVOK ¹	PÔVOD ²	VÝROBCA ³
Promozyme 200 L	<i>Bacillus acidopullulyticus</i>	Novo, Nordish
Pulluzyme 750 L	<i>Klebsiella planticola</i>	Rhône-Poulenc
Catalase L 43	<i>Aspergillus niger</i>	Rhône-Poulenc
Lipozyme 10000 L	<i>Mucor michei</i>	Novo, Nordish
Celluclast 1,5 L	<i>Trichoderma reesei</i>	Novo Ind., Dánsko
Ceremix	<i>Bacillus subtilis</i>	Novo Ind., Dánsko
Optidex L - 200	<i>Aspergillus niger</i>	MKC, Nemecko
Glucose Oxidase P 1500	<i>Aspergillus niger</i>	MKC, Nemecko
Phylacell	<i>Helmintosporium</i>	Phylaxia, Maďarsko
Celuláza	<i>Trichoderma reesei</i>	VÚPP, Praha
Pectinex Ultra SP-L	<i>Aspergillus niger</i>	Novo Ind., Dánsko
Fungamyl 800 L	<i>Aspergillus oryzae</i>	Novo Ind., Dánsko
α -amyláza potravinárska	<i>Bacillus subtilis</i>	Slov.škrobárne, D.Krupá
Proteináza neutrálna technická	<i>Bacillus subtilis</i>	VÚ SŠL, VÚ LIKO
Dextranase 50 L	<i>Penicillium lilacinum</i>	Novo Nordisk
Lactase	<i>Aspergillus oryzae</i>	MKC, Nemecko
Maxazyme	neuvedený	Gist-brocades
Invertin	kvasinky	Merck, Nemecko
AMG 300 L	<i>Aspergillus niger</i>	Novo Ind., Dánsko
Brew-N-zyme B G5, β -glukanáza	fungálny	Jan Dekker, Holandsko

1 - Enzyme preparation, 2 - Origin, 3 - Producer.

Príprava plazmidovej DĽA (pDNA) pre PCR [11]

K sedimentu buniek získaných centrifugáciou (7000 otáčok 37 °C/20 h) sa pridalo 150 ml lyzačného roztoku: Tris-Cl (200 mmol.l⁻¹, pH 8,5), NaCl (250 mmol.l⁻¹), kyselina etyléndiaminotetraoctová (EDTA, 25 mmol.l⁻¹), dodecylsulfát sodný (SDS, 0,05 g.l⁻¹), lyzozým (4 mg.ml⁻¹) a nechal sa pôsobiť pri laboratórnej teplote 30 min. Zmes sa precipitovala 150 μ l octanu sodného (3 mol.l⁻¹, pH 5,2), 20 minút pri -20 °C. Po centrifugácii (12 000 g, 10 min) sa k supernatantu pridal

rovnaký objem izopropylalkoholu a inkuboval sa pri laboratórnej teplote 10 minút. Centrifugáciou (12 000 g, 15 min) získaný sediment precipitovanej pDNA sa premyl čistým alkoholom, krátko sa vysušil vo vákuu a pDNA sa resuspendovala v 10 μ l TE pufru (10 mmol.l⁻¹ Tris HCl, pH 8, 1 mmol.l⁻¹ EDTA).

Pri analýze enzýmových preparátov sa pri extrakcii pDNA vychádzalo z navážky 1 g resp. 1 ml enzýmu v 9 ml fyziologického roztoku. Po 15 min homogenizácii vzoriek sa 1,5 ml enzýmového roztoku ďalej spracovalo podľa vyššie uvedenej metódy izolácie pDNA.

PCR amplifikácia [5]

Celkový objem 100 μ l PCR reakčnej zmesi obsahoval:

10 μ l 10x koncentrovaný PCR tlm. roztok (pH 9), 2 μ l dNTP zmesi (výsledná koncentrácia 200 μ mol.l⁻¹ každého dNTP) (Pharmacia), 1 μ l každého primeru (výsledná koncentrácia 50 pmol.l⁻¹), 2 μ l Taq polyméraz (2 U. μ l⁻¹) (Pharmacia), ktorá sa pridala po nultom cykle, templátovú DNA vzorku a požadovaný celkový objem sa doplnil redestilovanou vodou. Reakčná zmes sa prevrstvila 70 μ l parafrínového oleja. Amplifikácia prebehla v DNA termálnom cykléri PHC-3 fy Techne podľa vopred overeného algoritmu:

0.-tý cyklus	94 °C/8 min, 72 °C/1 min,
1.- 30.-tý cyklus	94 °C/1 min, 50 °C/1 min, 72 °C/1 min,
31.-tý cyklus	72 °C/5 min

Detekcia amplifikovanej DNA

Po ukončení polymerázovej reťazovej reakcie sa amplifikovaná DNA môže uskladniť (pri 4 °C, resp. pri -20 °C po dobu 1 - 3 mesiacov), alebo použiť na ďalšiu analýzu (napr. restrikciu endonukleázami po odstránení parafrínového oleja z reakčnej zmesi), prípadne na detekciu amplifikovanej DNA. Detekcia sa uskutočnila elektroforeticky v agarózovom géli (agaróza, SERVA, 1,5 g.l⁻¹ 100 m.l⁻¹ TAE tlmivom roztoku obsahujúcom etídium bromid ako interkalačné činidlo) [14]. Veľkosť amplifikovaného úseku DNA sa určila porovnaním s markerom molekulovej hmotnosti (100-Base-Pair Ladder, Pharmacia). Prítomnosť DNA v géli sa vizualizovala pomocou transiluminátora v UV svetle.

Mikrobiologická analýza enzýmových prípravkov

Mikrobiologická analýza enzýmových prípravkov sa uskutočnila štandardnými kultivačnými postupmi podľa platných ČSN [15, 16, 17].

Výsledky a diskusia

Citlivosť metódy PCR

Z inokula kmeňa *Escherichia coli* č.208 vyrasteneho za 20 hodín pri 37 °C v LB kvapalnej pôde sa pripravil rad desaťnásobných riedení vo fyziologickom roztoku a v každom z nich sa kultivačne stanovil počet buniek. Súčasne sa centrifugáciou z 1,5 ml každého riedenia získali bunky, z ktorých sa izolovala ich plazmidová DNA. Táto sa následne amplifikovala v PCR za podmienok uvedených v časti Materiál a metódy. Analýzou elektroforetogramov a porovnaním s výsledkami kultivácie sa zistilo, že metódou PCR sa detekovala prítomnosť *lacZ* génu ešte i pri 10^{-9} riedení inokula. Intenzita pásov DNA po PCR amplifikácii v agarózovom géli klesala v závislosti od počtu buniek, z ktorých bola izolovaná (v rozpätí od $4,2 \cdot 10^7$ po $4,2 \cdot 10^1$ KTJ.g⁻¹) (tab. 2.). Dosiahnutý výsledok dokumentuje citlivosť metódy PCR, ktorá však vo veľkej miere závisí na podmienkach, pri ktorých sa PCR uskutočňuje. Podľa literárnych údajov zvýšenie teploty annealingu primerov na 70 °C umožnilo amplifikáciu a detekciu *lacZ* génu z viac ako 100 fg genomickej DNA *Escherichia coli* (1 ag cieľovej sekvencie). Znížením teploty annealingu na 40 °C bola možná detekcia 1 - 10 fg DNA *Escherichia coli* [5].

V našej práci sme sa stretli s problémami súvisiacimi so získaním cieľových sekvencií slúžiacich ako templát v PCR. Uskutočnili sa viaceré experimenty, kedy sa bunky lyzovali varom pri 100 °C alebo sa použili rôzne modifikácie izolácie DNA [12], až po metódu, ktorá je uvedená v časti Materiál a metódy [11] a ktorou sa dosiahli pozitívne výsledky analýz.

Detekcia koliformných baktérií a Escherichia coli v enzýmových prípravkoch amplifikáciou génov lacZ a lamB

V ďalšej časti práce sa uskutočnila mikrobiologická analýza obsahu koliformných baktérií a prítomnosti *Escherichia coli* v 20-tich vzorkách enzýmových prípravkov metódou PCR. Zistilo sa, že amplifikáciou *lacZ* génu a za podmienok PCR, ktoré sa uviedli v časti Materiál a metódy,

Tabuľka 2. Porovnanie citlivosti detekcie koliformných baktérií štandardnou kultivačnou metódou a dôkazom prítomnosti *lacZ* génu metódou PCR.

Table 2. Comparison of sensitiveness of coliform bacteria detection by standard cultivating method and by demonstration of gene *lacZ* presence with PCR method.

INOKULUM ¹ rast 24 h, 37 °C, riedenie	KULTIVAČNÁ METÓDA ² počet buniek [KTJ.g ⁻¹]	METÓDA PCR ³ <i>lacZ</i> gén [+/-]
10 ⁻¹	4,2 . 10 ⁷	+++
10 ⁻²	4,2 . 10 ⁶	+++
10 ⁻³	4,2 . 10 ⁵	+++
10 ⁻⁴	4,2 . 10 ⁴	+++
10 ⁻⁵	4,2 . 10 ³	+
10 ⁻⁶	4,2 . 10 ²	+
10 ⁻⁷	4,2 . 10 ¹	+
10 ⁻⁸	0	+
10 ⁻⁹	0	+
10 ⁻¹⁰	0	-

Pozn.: + vyjadruje prítomnosť a intenzitu pásu DNA v agarózovom géli, - vyjadruje neprítomnosť DNA v agarózovom géli.

Počet buniek (KTJ . g⁻¹) *Escherichia coli* sa stanovil kultiváciou na MacConkeyho agare a veľkosť amplifikovaného úseku *lacZ* sa stanovila porovnaním s veľkosťou pásov DNA markera molekuly hmotnosti (100-Base-Pair Ladder).

1 - Inoculum, growth 24 hours, 37°C, dilution, 2 - Cultivating method, number of cells KTJ, 3 - PCR method, *lacZ* gene, + presence and intensity of DNA band in agarose gel, - absence of DNA in agarose gel.

Number of cells (KTJ.g⁻¹) *Escherichia coli* was determined by cultivation on MacConkey agar and size of amplified section of *lacZ* was determined by comparison with the size of DNA marker bands.

12 analyzovaných enzýmových prípravkov obsahovalo koliformné baktérie, resp. baktérie obsahujúce *lacZ* gén (tab.3.).

Vzhľadom na to, že štandardnou kultivačnou metódou sa zistila prítomnosť koliformných baktérií len vo dvoch vzorkách, na základe získaných výsledkov je možné poukázať na vyššiu citlivosť metódy PCR, ktorou sa detekujú aj prípadné fyziologicky oslabené bunky, ktoré sa kultivačne nedajú zistiť. Avšak enzýmové prípravky môžu obsahovať

Tabuľka 3. Analýza prítomnosti *Escherichia coli* a koliformných baktérií štandardnými kultivačnými metódami a metódou PCR v enzýmových prípravkoch.
Table 3. *Escherichia coli* and coliform bacteria presence analysis by standard cultivating method and PCR method in enzyme preparations.

ENZÝMOVÝ PRÍPRAVOK ¹	Kultivačná metóda ²	Metóda PCR ⁴	
	koliformné baktérie ³ [KTJ.g ⁻¹]	<i>Escherichia coli</i> ⁵ (prítomnosť <i>lamB</i>)	koliformné baktérie ⁶ (prítomnosť <i>lacZ</i>)
Promozyme	0	-	+
Pulluzyme 750 L	0	-	+
Catalase	0	-	+
Lipozyme	0	-	+
Celluclast	0	-	-
Ceremix	0	-	+
Optidex L 200	0	-	-
Glucose-oxidase	0	-	+
Phylacell	0	*	*
Celuláza VÚPP	0	-	-
Pectinex Ultra	0	-	+
Fungamyl	0	-	+
α-amyláza	0	+	+
Neutrálna proteínáza	0	-	-
Dextranase 50 L	1,5 · 10 ¹	-	+
Lactase	0	-	-
Maxazyme	2,0 · 10 ¹	-	+
Invertin	0	-	+
AMG 300 L	0	-	-
Brew-N-zyme BG 5	0	-	-

Pozn.: + detekcia prítomnosti mikroorganizmov, - detekcia neprítomnosti mikroorganizmov, * zhydrolyzovaná vzorka.

1 - Enzyme preparation, 2 - Cultivation method, 3 - Coliform bacteria, 4 - PCR method, 5 - *Escherichia coli* (presence of *lamB*), 6 - Coliform bacteria (presence of *lacZ*), + microorganisms presence detection, - microorganisms absence detection, * hydrolysed sample.

koliformné baktérie v maximálnom množstve $3 \cdot 10^1$ KTJ.g⁻¹ [13]. Nakoľko metóda PCR v súčasnom štádiu rozpracovanosti neposkytuje postačujúcu kvantitatívnu analýzu, preto jej aplikácia je významná predovšetkým u takých požívatín, v ktorých sa koliformné baktérie nesmú vyskytovať.

Prítomnosť *Escherichia coli* amplifikáciou *lamB* génu sa zistila len u 1 vzorky enzýmového prípravku α -amyláza (tab.3.). Aj v tomto prípade mohlo ísť o fyziologicky oslabené alebo vplyvom technologického procesu poškodené bunky, ktoré sa kultivačnou metódou nedetekovali, ale ich genetický materiál bol vo vzorke prítomný.

Podľa odporúčaní FAO/WHO [13], enzýmové prípravky nesmú obsahovať bunky *Escherichia coli*. Túto požiadavku spĺňa 18 vzoriek z analyzovaného súboru 20-tich enzýmových prípravkov.

Záver

Práca sa zamerala na overenie a zavedenie metódy polymerázovej reťazovej reakcie. Metóda umožňuje odstránenie pracných a časovo náročných kultivačných postupov, mikroorganizmus sa neidentifikuje na základe jeho fyziologických prejavov, ale priamou analýzou jeho genetického materiálu v priebehu 24 až 48 hodín. Jedným z mála nedostatkov je fakt, že metódu PCR doposiaľ nemožno spoľahlivo využiť na kvantitatívne analýzy, čo však z hľadiska rýchleho rozvoja poznatkov v tejto oblasti je iba otázkou času. V potravinárskej praxi to znamená, že pomocou PCR je výhodné zatiaľ detekovať len tie skupiny mikroorganizmov, ktoré nesmú byť v analyzovaných vzorkách podľa ČSN prítomné.

Získané výsledky, praktické skúsenosti a teoretické vedomosti zo štúdia literatúry nám dovoľujú odporučiť túto metódu, pri dodržiavaní všetkých protikontaminačných opatrení, do laboratórnej mikrobiologickej praxe pre jej mimoriadnu citlivosť a špecifickosť, rýchlosť, jednoduchosť a možnosť analýzy veľkého množstva vzoriek naraz.

Literatúra

1. WOLCOTT, M.J.: DNA-Based Rapid Methods for the Detection of Foodborne Pathogens. J.of Food Protection, 54, 5, 1991, s. 387.

2. STEFFAN, R.J. - ATLAS, R.M.: Polymerase chain reaction: Application in Environmental Microbiology. Annu. Rev. Microbiol. 45, 1991, s.137.
3. VILČEK, Š.: PCR - metóda in vitro amplifikácie DNA. Biologické listy 57,1, 1992, s.28.
4. SILHAVY, T.J. - BERMAN, M.L. - ENQIST, L.W.: Experiments with gene fusions. Cold Spring Harbor Labor. 1984, s.266.
5. BEJ, A.K. - STEFFAN, R.J. - CESARE, J.D. - HAFF, L. - ATLAS, R.M.: Detection of Coliform Bacteria in Water by Polymerase Chain Reaction and Gene Probes. Appl. Environm. Microbiol., 56, 2, 1990, s.307.
6. OLIVER, M.D.: Detection of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Polymerase Chain Reaction Amplification with a Thermostable DNA Polymerase. J.Clin.Microbiol., 27, 2, 1989, s. 261.
7. OLSVIK, O. - RIMSTAD, E. - HORNES, E. - STROCKBINE, N. - WATESON, Y. - LUND, A. - WACHSMUTH, K.: A nested PCR followed by magnetic separation of Amplified fragments for detection of *Escherichia coli* Shiga like toxin genes. Moll.Cell.Probes, 5, 1991, s.429.
8. IBRAHIM, A. - LIESACK, W. - STACKEBRANDT, E.: Differentiation between pathogenic and nonpathogenic *Yersinia enterocolitica* strains by colony hybridization with a PCR-mediated digoxigenin-dUTP-labeled probe. Mol.Cell. Probes, 6, 1992, s.163.
9. FURRER, B. - CONDRIAN, U. - HOLFELEIN, CH. - LUETHY, J.: Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. J.Appl.Bacteriol., 70, 1991, s.372.
10. STARBRUCK, M.A.B. - HILL, P.J. - STEWARD, G.S.A.B.: Ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the PCR. Lett.Appl.Microbiol., 15, 1992, s.248.
11. CENIS, J.L.: Rapid extraction of fungal DNA for PCR amplification. Nucl. Acids Res., 20, 9, 1992, s.2380.
12. VENKATAMARAN, S. - BARKER, R.H.: A simple method for diagnosing *M.tuberculosis* infection in clinical samples using PCR, Molecular and Cellular Probes, 5, 1991, 385-395.
13. FAO/WHO: Food additives data system, FAO Food and Nutrition Paper, 30, 1, Rome 1975.
14. MANIATIS, T. - FRITSCH, E.F. - SAMBROOL, J.: Molecular cloning. A Laboratory manual, New York, 1982, s.545.
15. ČSN 56 0081 Potravinárske výrobky. Príprava vzoriek k mikrobiologickému skúšanju.
16. ČSN 56 0082 Potravinárske výrobky. Zásady kultivácie mikroorganizmov a spôsob zpracovania výsledkov pri mikrobiologickom skúšaní.
17. ČSN 56 0085 Potravinárske výrobky. Stanovenie počtu koliformných baktérií platňovou metódou.

Do redakcie došlo 21.1.1994.

Polymerase chain reaction (PCR), its principle and usage for a detection of microorganisms

Summary

Submitted contribution gives a brief overview of the essence, current status and possibilities for applications of PCR method based on molecular-genetic knowledge so far established in food practice. Also a presentation of the results and experience gathered from the initial works being focused on a detection of coliform bacteria and *E. coli*, with the implication of *lacZ* and *lamB* gens by using PCR method and prospects of orientation on food-significant pathogenic microorganisms is given.