

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Tadeja KOČMUR

**OPTIMIZACIJA METODE mPCR ZA SOČASNO DOLOČANJE
BAKTERIJ RODU *Salmonella* IN VRSTE *Listeria monocytogenes***

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**OPTIMIZATION OF mPCR FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF
Salmonella spp. AND *Listeria monocytogenes***

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Delo je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Kocmur Tadeja

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.67.083:577.2.083(043)=163.6
KG mikrobiološke metode/patogene bakterije/sočasno določanje/*Salmonella/Listeria monocytogenes*/multipli PCR/zaporedni PCR/optimizacija mPCR/obogatitvena gojišča/gojišče UPB/občutljivost mPCR
AV KOCMUR, Tadeja
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2011
IN OPTIMIZACIJA METODE mPCR ZA SOČASNO DOLOČANJE BAKTERIJ RODU *Salmonella* IN VRSTE *Listeria monocytogenes*
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP IX, 62 str., 11 pregl., 15 sl., 69 vir.
IJ sl
JI sl/en
- AI Bakterije rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* so za človeka patogene bakterije. Klasične metode določanja salmonel in listerij v živilih so dolgotrajne, saj je za rezultate potrebnih 5–10 dni. V zadnjih letih se vse bolj uveljavljajo metode na osnovi verižne reakcije s polimerazo (PCR), saj so hitrejšje, bolj specifične in občutljive kot klasične metode določanja. Namen našega dela je bil postavitve protokola multiple verižne reakcije s polimerazo (mPCR) za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. mPCR omogoča sočasno pomnoževanje več kot ene tarčne sekvence DNA v eni sami encimski reakciji. Pri uporabi PCR za določanje patogenih bakterij v živilih se pojavlja veliko problemov, zato se ta metoda pogosto vključi v postopek določanja po obogatitvi živila. Kot obogatitveno gojišče smo uporabili UPB (univerzalno obogatitveno gojišče), ki omogoča sočasno rast bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. Bakterije rodu *Salmonella* so se v mešani kulturi z bakterijami vrste *L. monocytogenes* v UPB namnožile vsaj do koncentracije 10^7 cfu/ml in bakterije vrste *L. monocytogenes* so se v mešani kulturi z bakterijami rodu *Salmonella* namnožile vsaj do koncentracije 10^4 cfu/ml. Sočasna rast obeh omenjenih skupin bakterij v gojišču UPB (24 h pri $35\text{ }^{\circ}\text{C}$) je tako primerna za njuno kasnejše določanje z PCR. Za encimsko reakcijo smo uporabili par specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* (ST11/ST15) in par specifičnih oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *Listeria monocytogenes* (LM1/LM2) v eni sami reakciji ter reakcijo optimizirali. Občutljivost mPCR reakcije za bakterije rodu *Salmonella* je bila 10^5 cfu/ml ne glede na koncentracijo bakterij *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes* ne glede na koncentracijo bakterij rodu *Salmonella*. Z optimiziranim protokolom za mPCR smo tako vedno dobili pozitiven rezultat za bakterije rodu *Salmonella* in negativen rezultat za bakterije vrste *L. monocytogenes* v tistih koncentracijah, do katerih omenjeni skupini bakterij sočasno zrastle v UPB. Z uvedbo nPCR (zaporednega PCR) smo dobili pozitivne rezultate tudi za bakterije vrste *L. monocytogenes*. nPCR je sledil predhodno izvedenemu mPCR. Tako smo dosegli glavni cilj naloge – to je postavitve protokola, ki bi ga lahko uporabili za sočasno določitev bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilu.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 579.67.083:577.2.083(043)=163.6
CX microbiological methods/pathogens/simultaneous detection/*Salmonella*/*Listeria monocytogenes*/multiplex PCR/nested PCR/optimization of mPCR/enrichment media/UPB/sensitivity of mPCR
AU KOČMUR, Tadeja
AA JERŠEK, Barbara (supervisor)/SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and Technology
PY 2011
TI OPTIMIZATION OF mPCR FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF *Salmonella* spp. AND *Listeria monocytogenes*
DT Graduation Thesis (University studies)
NO IX, 62 p., 11 tab, 15 fig., 69 ref.
LA sl
AL sl/en
- AB *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* strains are human pathogens. Classical detection methods for these pathogens in foods are time-consuming and require several days (5–10) before results are obtained. In recent years PCR-based methods have been reported as a rapid, specific and sensitive alternative to classical detection methods. The purpose of our work was to develop a multiplex polymerase chain reaction (mPCR) for simultaneous detection of *Salmonella* spp. and *L. monocytogenes*. mPCR allows the simultaneous amplification of more than one target sequence in a single enzyme reaction. Since there are several problems, when using PCR method to detect foodborne pathogens, enrichment of food sample is often used before PCR detection. As an enrichment medium we used UPB (Universal preenrichment broth), which allows simultaneous growth of *Salmonella* and *L. monocytogenes*. *Salmonella* in mixed culture with *L. monocytogenes* in UPB multiplied to at least 10^7 cfu/ml and *L. monocytogenes* in mixed culture with *Salmonella*, multiplied to at least 10^4 cfu/ml. The simultaneous growth of both pathogens in UPB (24 h at 35 °C) was appropriate for their subsequent PCR detection. Specific primer pairs for *Salmonella* (ST11/ST15) and *L. monocytogenes* (LM1/LM2) were used in one amplification reaction and PCR was optimized. The detection limit of mPCR was 10^5 cfu/ml for *Salmonella* irrespective to *L. monocytogenes* concentration and 10^6 cfu/ml for *L. monocytogenes* irrespective to *Salmonella* concentration. With optimized protocol of mPCR we always got a positive result for *Salmonella* and a negative result for *L. monocytogenes* by concentrations achieved with simultaneous growth of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in UPB. Positive results for *L. monocytogenes* were obtained by using nPCR (nested PCR) after mPCR. Thus we have achieved the main goal of our work – this is to set the protocol, which could be used for simultaneous detection of bacteria *Salmonella* and *L. monocytogenes* in food.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO SLIK.....	VIII
KAZALO PREGLEDNIC	IX
OKRAJŠAVE.....	X
1 UVOD.....	1
1.1 CILJI NALOGE.....	2
1.2 DELOVNA HIPOTEZA.....	3
2 PREGLED OBJAV.....	4
2.1 LASTNOSTI BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> in VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	4
2.1.1 Splošne lastnosti.....	4
2.1.2 Razširjenost in patogenost.....	5
2.1.3 Določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> s klasičnimi mikrobiološkimi metodami.....	7
2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO.....	8
2.2.1 Princip PCR.....	8
2.2.2 Uporaba PCR v živilski mikrobiologiji.....	9
2.2.3 Multipli PCR.....	10
2.2.4 Zaporedni PCR.....	10
2.3 SOČASNO DOLOČANJE BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> in VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i> z mPCR.....	11
2.3.1 Univerzalno obogatitveno gojišče (UPB).....	11
2.3.2 Imunomagnetno koncentriranje celic.....	12
2.3.3 Optimizacija mPCR.....	13
2.3.3.1 Temperaturni program.....	14
2.3.3.2 Koncentracija MgCl ₂	15
2.3.3.3 Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov.....	15
2.3.3.4 Število ciklov.....	16
2.3.4 Sočasno določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> z mPCR.....	16
3 MATERIAL IN METODE.....	18

3.1 MATERIAL.....	18
3.1.1 Bakterijski sevi.....	18
3.1.2 Mikrobiološka gojišča.....	18
3.1.3 Reagenti	18
3.1.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic	18
3.1.3.2 Reagenti za mPCR.....	18
3.1.3.3 Reagenti za imunomagnetno koncentriranje.....	19
3.1.3.4 Reagenti za gelsko elektroforezo	19
3.1.3.5 Druge kemikalije.....	20
3.1.4 Laboratorijska oprema	20
3.2 METODE.....	21
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela	21
3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur	24
3.2.2.1 Namnožitev bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	24
3.2.2.2 Namnožitev bakterij seva <i>S. Enteritidis</i>	25
3.2.3 Določitev števila bakterij.....	25
3.2.4 Priprava pozitivnih kontrol za PCR	25
3.2.4.1 Priprava pozitivne kontrole za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i>	25
3.2.4.2 Priprava pozitivne kontrole za bakterije seva <i>S. Enteritidis</i>	26
3.2.4.3 Priprava skupne pozitivne kontrole bakterij <i>L. monocytogenes</i> in <i>S.</i> <i>Enteritidis</i>	26
3.2.5 Sočasna priprava bakterijske DNA za PCR.....	26
3.2.6 Priprava reakcijske mešanice za PCR.....	26
3.2.7 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo	28
3.2.8 Imunomagnetno koncentriranje.....	29
3.2.8.1 Imunomagnetno koncentriranje bakterij po postopku A (Dynal, 2003).....	29
3.2.8.2 Imunomagnetno koncentriranje bakterij po postopku B (Hsih in Tsen, 2001)	29
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	30
4.1 RAST BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> in VRSTE <i>Listeria monocytogenes</i> V GOJIŠČU UPB	30
4.2 IZBIRA RAZMER SOČASNEGA POMNOŽEVANJA SPECIFIČNEGA DELA DNA BAKTERIJ RODU <i>Salmonella</i> in VRSTE <i>L. monocytogenes</i>	32
4.2.1 Izbira oligonukleotidnih začetnikov.....	32
4.2.2 Postavitev protokola mPCR.....	33
4.3 OBČUTLJIVOST mPCR PO PROTOKOLIH SALLIS1 IN SALLIS2	35
4.3.1 Občutljivost mPCR za določanje čistih kultur bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i>	35
4.3.2 Občutljivost mPCR za sočasno določanje mešanih kultur bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i>	36
4.4. OPTIMIZACIJA PROTOKOLA mPCR SALLIS2	39
4.4.1 Temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov.....	39
4.4.2 Koncentracija MgCl ₂ v reakcijski mešanici za mPCR.....	40
4.4.3 Število ciklov mPCR in čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov.....	42

4.4.4 Razredčevanje celičnega lizata	42
4.4.5 Imunomagnetno koncentriranje.....	43
4.4.6 Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov.....	45
4.4.7 Sestava reakcijske PCR-mešanice in časovno-temperaturni režim pri optimiziranem protokolu SALLIS2b	47
4.5 ZAPOREDNI PCR	48
5 SKLEPI.....	53
6 POVZETEK	54
7 VIRI.....	56

KAZALO SLIK

Slika 1: Princip PCR (Vierstraete, 1999).....	8
Slika 2: Shema poteka eksperimentov	21
Slika 3: Shema glavnih stopenj proučevanja rasti bakterij <i>L. monocytogenes</i> in <i>S. Enteritidis</i> v obogatitvenem gojišču UPB.....	22
Slika 4: Shema glavnih stopenj optimizacije mPCR	23
Slika 5: Shema glavnih stopenj zaporednega PCR (nPCR).....	24
Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) s čistimi kulturami bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i>	35
Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) pri mešanih kulturah bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> s koncentracijami 10^7 in 10^6 cfu/ml	36
Slika 8: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) pri mešanih kulturah bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> s koncentracijami 10^5 in 10^4 cfu/ml	37
Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR s programom SALLIS2a ($T_a=57$ °C) (A.) in z programom SALLIS2b ($T_a=59$ °C) (B.).....	40
Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR s programom SALLIS2b pri koncentraciji $MgCl_2$ 1,5 mM (A.), 1,7 mM (B.), 2,0 mM (C.) in 2,5 mM (D.)	41
Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR po razredčevanju lizatov.....	43
Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR po imunomagnetnem koncentriranju bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> in bakterij seva <i>S. Enteritidis</i>	44
Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR pri različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2 v 50 μ l reakcijski mešanici za mPCR	47
Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z nPCR po programu SALLIS2b in programu LISTER1.....	49
Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov dobljenih z mPCR (A.) in nPCR (B.) za sočasno določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> in rodu <i>Salmonella</i>	50

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Laboratorijska oprema	20
Preglednica 2: Sestava reakcijskih mešanic za mPCR	27
Preglednica 3: Sestava reakcijskih mešanic za nPCR.....	28
Preglednica 4: Rast čistih in mešanih kultur bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> in seva <i>S. Enteritidis</i> v.....	30
Preglednica 5: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM	33
Preglednica 6: Sestava reakcijskih mešanic in časovno-temperaturna režima PCR za določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> (Aabo in sod., 1993) in vrste <i>L. monocytogenes</i> (Border in sod., 1990)	33
Preglednica 7: Sestava reakcijskih mešanic za mPCR in časovno-temperaturna režima pri protokolih SALLIS1 in SALLIS2.....	34
Preglednica 8: Primerjava občutljivosti sočasnega določanja bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> z mPCR po protokolih SALLIS1 in SALLIS2	38
Preglednica 9: Primerjava časovno-temperaturnih režimov v programih SALLIS2, SALLIS2a in SALLIS2b	40
Preglednica 10: Vpliv koncentracij oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2 na učinkovitost pomnoževanja specifičnih delov DNA bakterij rodu <i>Salmonella</i> in bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	46
Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za mPCR in časovno-temperaturni režim pri optimiziranem protokolu SALLIS2b	48

OKRAJŠAVE

Okrajšava	Pomen
A	adenin
ALOA	gojišče Aloa (angl. Agar Listeria selon Ottaviani & Agosti)
BHI	gojišče BHI (angl. Brain Heart Infusion broth)
bp	bazni par
BPW	puferirana peptonska voda (angl. Buffered Peptone Water)
C	citozin
cfu	kolonijska enota (angl. Colony forming unit)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDTA	etilendiamino tetraocetna kislina
ELISA	(angl. Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)
EtBr	etidijev bromid
F	gojišče Fraser (angl. Fraser)
G	gvanin
HF	gojišče Half Fraser (angl. Half Fraser)
H ₂ O _{PCR}	sterilna, deionizirana, DNA prosta voda
H ₂ O _{KEM}	bi-destilirana, sterilna voda
IMS	imunomagnetno ločevanje (angl. immunomagnetic separation)
LM1/LM2	oligonukleotidna začetnika za določanje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>
MKTTn	(angl. Mueller-Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin broth)
mPCR	multipli PCR (angl. multiplex PCR)
nPCR	zaporedni PCR (angl. nested PCR)
NA	hranljivi agar (angl. Nutrition Agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. polymerase chain reaction)
RVS	gojišče Rappaport (angl. Rappaport and Vassiliadis broth)
SDS	natrijev dodecil sulfat
ST11/ST15	oligonukleotidna začetnika za določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i>
T	timin
TAE	elektroforetski pufer (angl. Tris Acetate EDTA)
TSYEA	gojišče triptični soja agar s kvasnim ekstraktom (angl. Tryptic soy Yeast Extract Agar)
U	enota (angl. unit)
UPB	univerzalno obogatitveno gojišče (angl. Universal Preenrichment Broth)
XLD	gojišče ksiloza lizin deoksiholatni agar (angl. Xylose Lysine Deoxycholate agar)

1 UVOD

Salmoneloza in listerioza sta bolezni, ki sta najpogosteje povezani z zaužitjem živil kontaminiranih z bakterijami rodu *Salmonella* oziroma vrste *Listeria monocytogenes*. Zato je pravočasno odkritje patogenih bakterij v živilih izjemnega pomena za zdravstveno varstvo potrošnikov.

Živila v katerih so bakterije vrste *L. monocytogenes* najpogosteje prisotne so mleko, mehki siri, sladolei, pred-pripravljena in ohlajena živila, surovo meso, perutnina, ribe (Jeršek, 2006). Bakterije vrste *L. monocytogenes* so na okoljske dejavnike zelo odporne, saj v živilih lahko preživijo niz tehnoloških operacij kot so sušenje, zamrzovanje, soljenje in razsoljevanje (Adamič in sod., 2003). Živila so tako ugodno okolje za njihov razvoj, saj lahko rastejo pri temperaturah hladilnika, nizkem pH in relativno visoki koncentraciji soli (Gandhi in Chikindas, 2007; Yang in sod., 2007).

Kljub temu, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* pogosto pojavljajo v različnih živilih, je incidenca humane listerioze na srečo nizka. Listerioza je bolezen, ki ogroža predvsem rizične skupine ljudi, kamor prištevamo nosečnice, dojenčke, starejše in ljudi z oslabelem imunskim sistemom. Kljub nizki incidenci pa je smrtnost najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano in se giblje med 20-50 % (Program monitoringa..., 2010).

Salmoneloza sodi med najpogosteje prijavljene okužbe s hrano tako v svetu kot tudi pri nas. V Sloveniji je salmoneloza že nekaj let med desetimi najpogosteje prijavljenimi nalezljivimi boleznimi in najpogostejši bakterijski povzročitelj gastroenterokolitisa (Epidemiološko..., 2010). Leta 2003 so prijave dosegle vrh, ko je incidenca znašala 201/100.000 prebivalcev. S tem se je Slovenija uvrstila med države z najvišjo incidenco salmoneloze v Evropi. Večina ljudi preboli salmonelozo brez zapletov v nekaj dneh. Potek bolezni je odvisen od imunske odpornosti gostitelja in količine zaužitih salmonel. Umrljivost je običajno nizka (manj kot 1 %) (Milohnoja, 2003).

Bakterije rodu *Salmonella* so v naravi zelo razširjene, posebno kot črevesni paraziti različnih sesalcev, ptic in človeka. Najpogosteje so prisotne v živilih kot so: perutnina, jajca, svinjina, živila, ki vsebujejo jajca, nepasterizirano mleko, mleko v prahu (Wray, 2003).

Bakterije vrste *L. monocytogenes*, kot tudi bakterije rodu *Salmonella*, po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (2000), v živilih ne smejo biti prisotne, zato je zelo pomembna njihova hitra in zanesljiva detekcija.

Klasične mikrobiološke metode izolacije in identifikacije vključujejo bolj ali manj selektivno primarno obogatitev, sekundarno selektivno obogatitev, izolacijo ter identifikacijo z morfološki in biokemijski testi ter serološko tipizacijo. Kljub temu, da omogočajo dobro specifičnost in občutljivost, so delovno in materialno zahtevne ter zelo dolgotrajne. Rezultati so znani šele v 7–10 dneh (Jofre in sod., 2005), kar je za

zagotavljanje mikrobiološko ustreznih živil lahko že prepozno. Poleg tega se fenotipske lastnosti, preko katerih se identificira določena bakterija, včasih ne izrazijo oziroma je njihova interpretacija težavna. Zato je identifikacija mikroorganizmov, ki temelji izključno na njihovih fizioloških in biokemijskih lastnostih lahko dvoumna (Malorny in sod., 2003; Settani in Corsetti, 2007). Samo pravočasna in natančna detekcija patogenih mikroorganizmov v živilih lahko prepreči širitev bolezni, ki so posledica uživanja kontaminiranih živil. Zato je trend raziskav v razvoju čim hitrejših detekcijskih metod, ki bi bile enako občutljive in specifične kot klasične mikrobiološke metode (Lazcka in sod., 2007).

Med alternativnimi metodami določanja bakterij v živilski mikrobiologiji se zaradi svoje hitrosti, dobre specifičnosti in občutljivosti, možnosti avtomatizacije, možnosti določanja mikroorganizmov z netipičnimi fenotipskimi lastnostmi, čedalje pogosteje uporablja verižna reakcija s polimerazo (PCR). PCR je priročna metoda v molekularni biologiji, ki omogoča pomnožitev specifičnih delov tarčne DNA, v razmerah *in vitro*, s pomočjo termostabilnega encima DNA-polimeraza. Zanesljivost metod, ki vključujejo PCR, je v veliki meri odvisna od števila iskanih bakterij in od vrste preiskovanega živila, saj mnoge sestavine živila lahko zavirajo encimsko reakcijo. Zato se pogosto pred samo reakcijo PCR uporablja obogatitev živila v različnih obogatitvenih gojiščih.

V našem eksperimentalnem delu smo uporabili multiplo verižno reakcijo s polimerazo (mPCR) za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes*. mPCR omogoča sočasno pomnoževanje več kot ene tarčne sekvence DNA, znotraj ene same PCR (Jofre in sod., 2005). S sočasn timer pomnoževanjem obeh tarčnih sekvenc v eni sami reakciji prihranimo veliko časa, dela, reagentov in zmanjšamo število potrebnih reakcij v primerjavi s posamičnim pomnoževanjem omenjenih tarčnih sekvenc DNA.

1.1 CILJI NALOGE

Namen našega dela je bil postavitve protokola multiple verižne reakcije s polimerazo (mPCR) za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. V ta namen smo postavili naslednje cilje:

- poiskati obogatitveno gojišče, v katerem bi se obe skupini bakterij sočasno namnožile do zadostne koncentracije za določitev z mPCR,
- izbrati takšne razmere sočasn timer pomnoževanja DNA, ki bodo dovoljevale sočasno pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij rodu *Salmonella* in hkrati
- pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij vrste *L. monocytogenes*,
- optimizirati protokol mPCR tako, da bomo lahko z njim sočasno določili obe skupini bakterij v tistih koncentracijah, do katerih sočasno zrasteta v obogatitvenem gojišču,
- skrajšati in poenostaviti postopek določanja omenjenih bakterij, v primerjavi z klasičnimi metodami določanja.

1.2 DELOVNA HIPOTEZA

Predvidevamo, da bomo z dvema paroma specifičnih oligonukleotidnih začetnikov ob ustrezni izbiri razmer pomnoževanja z mPCR lahko sočasno določili bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v modelni raztopini v tistih koncentracijah, do katerih omenjeni skupini bakterij sočasno zrasteta v izbranem obogatitvenem gojišču.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI BAKTERIJ RODU *Salmonella* in VRSTE *L. monocytogenes*

2.1.1 Splošne lastnosti

Bakterije rodu *Salmonella* spadajo v družino Enterobacteriaceae. Rod *Salmonella*, ki je dobil ime leta 1885 po patologu Salmonu, danes delimo na dve vrsti: *S. bongori* in *S. enterica* (Garrity in sod., 2004; Yan in sod., 2003, Wray, 2003). Vrsta *S. bongori* obsega 21 sevov, katerih primarni izvor so hladnokrvne živali in okolje, le redko sesalci (Yan in sod., 2003). Vrsta *S. enterica* se deli v šest podvrst (Yan in sod., 2003; Garrity in sod., 2004):

- *Salmonella enterica* podvrsta *enterica*
- *Salmonella enterica* podvrsta *salamae*
- *Salmonella enterica* podvrsta *arizonae*
- *Salmonella enterica* podvrsta *diarizonae*
- *Salmonella enterica* podvrsta *houtenae*
- *Salmonella enterica* podvrsta *indica*

Klasifikacija bakterij rodu *Salmonella* se je razvila na osnovi sistema, ki temelji na serološki identifikaciji somatskega (O), flagelarnega (H) in kapsularnega (Vi) antigena. Na podlagi takšne identifikacije je dandanes poznanih že okoli 2500 sevov rodu *Salmonella* (Wray, 2003). Preko 99 % salmonel spada v vrsto *Salmonella enterica*, blizu 60 % sevov te vrste spada v podvrsto *enterica* (Garrity in sod., 2004; Yan in sod., 2003).

Vendar večina sevov bakterij rodu *Salmonella* ni dobila imena po antigenu, ampak po boleznih, ki jih povzročajo pri ljudeh in živalih (npr. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*), oziroma po geografski lokaciji, kjer je bil sev prvič izoliran (npr. *S. Dublin*) (Yan in sod., 2003).

Primarno življenjsko okolje salmonel je prebavni trakt ljudi in živali. Salmonele so gramnegativne, katalaza-pozitivne in fakultativno anaerobne palčke. Kot edini vir ogljika izkoriščajo citrat iz triptofana, ne tvorijo pa indola. Nitrite reducirajo v nitrat. Glukozo navadno razgrajujejo brez oblikovanja plina, laktoze ne cepijo. Optimalna temperatura za rast je 37 °C, razmnožujejo se pri temperaturah med 7 in 47 °C. Temperatura nad 65 °C jih hitro uniči. Razmnožujejo se pri pH od 4,5 do 9, pri čemer minimalno vrednost pH, ki še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline (Adamič in sod., 2003).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so prvič izolirali že leta 1926 in mnogo let po odkritju je bila to edina vrsta rodu *Listeria*. Danes se v rod *Listeria* uvršča 6 vrst (Garrity in sod., 2004; Rocourt in Buchrieser, 2007):

- *Listeria monocytogenes*
- *Listeria ivanovii*
- *Listeria innocua*
- *Listeria seeligeri*

- *Listeria welshimeri*
- *Listeria grayi*

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so grampozitivne, kokoidne do paličaste oblike, gibljive, sicer nesporogene, a relativno zelo odporne proti različnim dejavnikom okolja. Razmnožujejo se v širokem temperaturnem območju od 1 do 45 °C in pri vrednosti pH od 4,4 do 9,6 (Rocourt in Buchrieser, 2007; Adamič in sod., 2003). Sposobne so rasti v mediju, ki vsebuje 10 % NaCl, preživijo pa tudi višje koncentracije (Sauders in Wiedmann, 2007). Zato jih razmeroma pogosto izoliramo v okolju. Izmed vseh nesporogenih bakterij so najbolj odporne proti različnim vplivom okolja. Listerije uniči šele temperatura 80 °C, preživijo sušenje, zamrzovanje, soljenje, pri 22 °C pa se hitro razmnožujejo (Milohnoja, 2003). Omenjene bakterije so aerobne do mikroaerofilne, katalaza-pozitivne in citokromoksidaza-negativne. Za bakterije vrste *L. monocytogenes*, ki so patogene za človeka je značilno, da tvorijo β -hemolizo na krvnem agarju, izkoriščajo ramnozo in ne ksiloze, ter imajo pozitiven test CAMP (Adamič in sod., 2003). Rast bakterij je ustavljena ali močno inhibirana v anaerobnih razmerah in pri pH, manjših od 5,6 (Jeršek, 2006).

2.1.2 Razširjenost in patogenost

Salmonele so v naravi zelo razširjene. Primarni izvor salmonel je prebavni trakt ljudi in živali (domačih živali, plazilcev, ptic in občasno insektov). Včasih so prisotne tudi v drugih delih telesa. Organizem jih izloči preko blata, od tu pa lahko preko različnih prenašalcev pridejo v vodo in živila (Jeršek, 2006). Bakterije rodu *Salmonella* so sposobne preživeti v naravnem okolju zunaj gostitelja različne okoljske dejavnike kot so sončna svetloba, pomanjkanje hranil, nihanje temperature. Tako lahko preživijo v blatu živali tudi do 12 tednov (Wray, 2003).

Bakterije rodu *Salmonella* so najpogosteje prisotne v živilih kot so: perutnina, jajca, svinjina in živila, ki vsebujejo jajca, nepasterizirano mleko, mleko v prahu. Pogosto je vzrok za okužbo preko živil tudi časovni zamik med pripravo živila in njegovo porabo, saj se število celic v tem času hitro poveča (Wray, 2003).

Mikrobiološke raziskave na belgijskem tržišču so pokazale, da je 38,5 % trupov perutnine okuženih z bakterijami rodu *Salmonella* (Uytendaele in sod., 1999). Podobne rezultate so dobili tudi Yildirim in sod. (2011), ki so v svoji študiji raziskovali pogostnost kontaminacije trupov perutnine na turškem tržišču.

Bakterije rodu *Salmonella*, še posebno serotipov *S. Enteritidis* in *S. Typhimurium*, so pogost vzrok za salmonelozo. Značilni znaki salmoneloze so diareja, bruhanje, vročina, slabost in abdominalne bolečine, ki se najpogosteje pojavijo po 12–36 urah in trajajo 2–5 dni. Intenzivnost bolezni je odvisna od imunske odpornosti gostitelja in količine zaužitih salmonel. Umrljivost je običajno nizka (manj kot 1 %). Infektivna doza, ki povzroča obolenje, se giblje med 10 in 10⁶ celic in je odvisna od odpornosti okužene osebe, vrste živila, vrste salmonel in želodčne vsebine (Milohnoja, 2003).

Salmoneloza sodi med najpogosteje prijavljene okužbe s hrano, tako v svetu kot tudi pri nas. V Sloveniji je salmoneloza že nekaj let med desetimi najpogosteje prijavljenimi nalezljivimi boleznimi in najpogostejši bakterijski povzročitelj gastroenterokolitisov. Visoko število prijav je bilo predvsem v obdobju 2002–2004. Leta 2003 so prijave dosegle vrh, ko je incidenca znašala 201/100.000 prebivalcev. S tem se je Slovenija uvrstila med države z najvišjo incidenco salmoneloze v Evropi. Podobno kot v večini držav Evropske unije je incidenca salmoneloz po letu 2003 začela padati. 5-letna povprečna incidenca (obdobje 2005–2009) je znašala 60,58. (Epidemiološko..., 2010; Program monitoringa..., 2010). V ZDA povzročijo bakterije rodu *Salmonella* od 800.000 do 4 milijone okužb ter 500 smrtnih primerov vsako leto (Helmick in sod., 1994).

Bakterije vrste *L. monocytogenes* so v naravi zelo razširjene, najdemo jih v razpadajoči vegetaciji, zemlji, živalskem blatu, odpadnih vodah. Približno 5–10 % ljudi ima bakterije *L. monocytogenes* v prebavnem traktu (Jeršek, 2006).

Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v mnogih živilih je predvsem posledica navzkrižne kontaminacije končnih izdelkov. Živila so ugodno okolje za njihov razvoj, saj lahko rastejo pri temperaturah hladilnika, nizkem pH in relativno visoki koncentraciji soli (Gandhi in Chikindas, 2007; Yang in sod., 2007). Najpogosteje so bakterije vrste *L. monocytogenes* prisotne v mleku, mehkih sirih, sladoledu, pred-pripravljenih in ohlajenih živilih, surovem mesu, perutnini, ribah (Jeršek, 2006).

Zdravstveni inšpektorat republike Slovenije poroča, da je bilo v letih 2004–2006 povprečno 5 % vzorcev različnih živil kontaminiranih z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Vzorčili so skupine živil, pri katerih se bakterije vrste *L. monocytogenes* pogosto pojavljajo zaradi neustreznega izvajanja proizvodne oziroma higienske prakse. Raziskave so pokazale, da so bile v 40 % vzorcev mletega mesa potrjene bakterije vrste *L. monocytogenes*. V letu 2007 so bile bakterije vrste *L. monocytogenes* najpogosteje prisotne v delikatesnih mesnih izdelkih (tatarski biftek, mesni karpačo; 20 % vzorcev) in v delikatesnih živilih z dolgim rokom uporabe (mesna tlačanka; 14 % vzorcev). Veterinarska uprava republike Slovenije je leta 2007 v okviru uradnega nadzora mesnic potrdila bakterije vrste *L. monocytogenes* v 6 od 78 vzorcih različnih mesnih pripravkov oziroma mesnih izdelkov (Program monitoringa zoonoz..., 2010).

Kljub temu, da se bakterije vrste *L. monocytogenes* pogosto pojavljajo v različnih živilih, je incidenca humane listerioze nizka. Listerioza, ki se lahko pojavi v različnih oblikah, je oportunistična infekcija, ki prizadene predvsem ljudi z oslabeлим imunskim sistemom, starejše od 65 let, nosečnice, nerojene otroke in dojenčke (Gandhi in Chikindas, 2007; Jeršek, 2006). Inkubacijska doba pred nastopom bolezni je lahko dolga do 10 tednov, kar močno oteži določanje bakterij in iskanje povezav z potencialno kontaminirano hrano. Listerioza se najpogosteje kaže kot meningitis, sepsa, kot infekcija centralnega živčnega sistema. Simptomi listerioze so pogosto vročina, bolečine v mišicah in gastrointestinalni simptomi, kot sta slabost in diareja. Pri nosečnicah lahko listerioza povzroči prezgodnji porod, splav ali številne zdravstvene težave pri novorojenčku (Gandhi in Chikindas, 2007; Churchill, 2006). Kljub temu, da je incidenca listerioze nizka, je smrtnost najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano in se giblje med 20–50 % (Program monitoringa..., 2010; Adamič in sod., 2003; Jeršek, 2006).

Minimalna koncentracija celic bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki jih moramo zaužiti, da pride do okužbe, ni znana (Churchill, 2006). Kljub temu, da naj bi bila minimalna infektivna doza višja od 100 živih celic, je večina držav sprejela zakonodajo, ki navaja, da bakterije vrste *L. monocytogenes* v živilih ne smejo biti prisotne (Yang in sod., 2007).

2.1.3 Določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* s klasičnimi mikrobiološkimi metodami

Klasične metode za določanje bakterij rodov *Salmonella* in *Listeria* temeljijo na obogatitvi vzorca v neselektivnih in selektivnih gojiščih (pred-obogatitev in obogatitev), izolaciji bakterij na trdih selektivnih gojiščih ter njihovi serološki in biokemijski potrditvi (Olsen, 2000; Li in sod., 2000).

Pri določanju bakterij rodu *Salmonella* po standardu SIST EN ISO 6579: 2003/AC: 2004 (2004) je potrebna primarna obogatitev v gojišču BPW, ker lahko živilo vsebuje nizko število bakterij rodu *Salmonella*, v primerjavi z ostalimi bakterijami v živilu. Gojišče BPW ne vsebuje selektivnih dodatkov, zato omogoča rast in razmnoževanje tudi poškodovanim celicam rodu *Salmonella*. Kot sekundarni obogatitveni gojišči sta predpisani gojišči RVS in MKTTn. Za izolacijo salmonel je predpisano trdo gojišče XLD, drugo selektivno gojišče je prepuščeno izbiri. Za potrditev bakterij rodu *Salmonella* se vzame 5, za salmonele značilnih kolonij in se jih precepi na gojišče NA. Če po 24 urni inkubaciji zrastejo 1–2 mm velike, okrogle kolonije beže barve, se naredijo naslednji biokemijski testi: trojni sladkor, gojišče z ureo, gojišče za dekarboksilacijo L-lizina, določanje β -galaktozidaze, reakcija Voges-Proskauer in tvorba indola. Sledi serološka tipizacija, pri čemer se določa prisotnost *Salmonella* O-, Vi- in H-antigenov, pri vzorcih, kjer biokemijski testi niso ovrgli možnosti, da preiskovana bakterijska kultura spada v rod *Salmonella*.

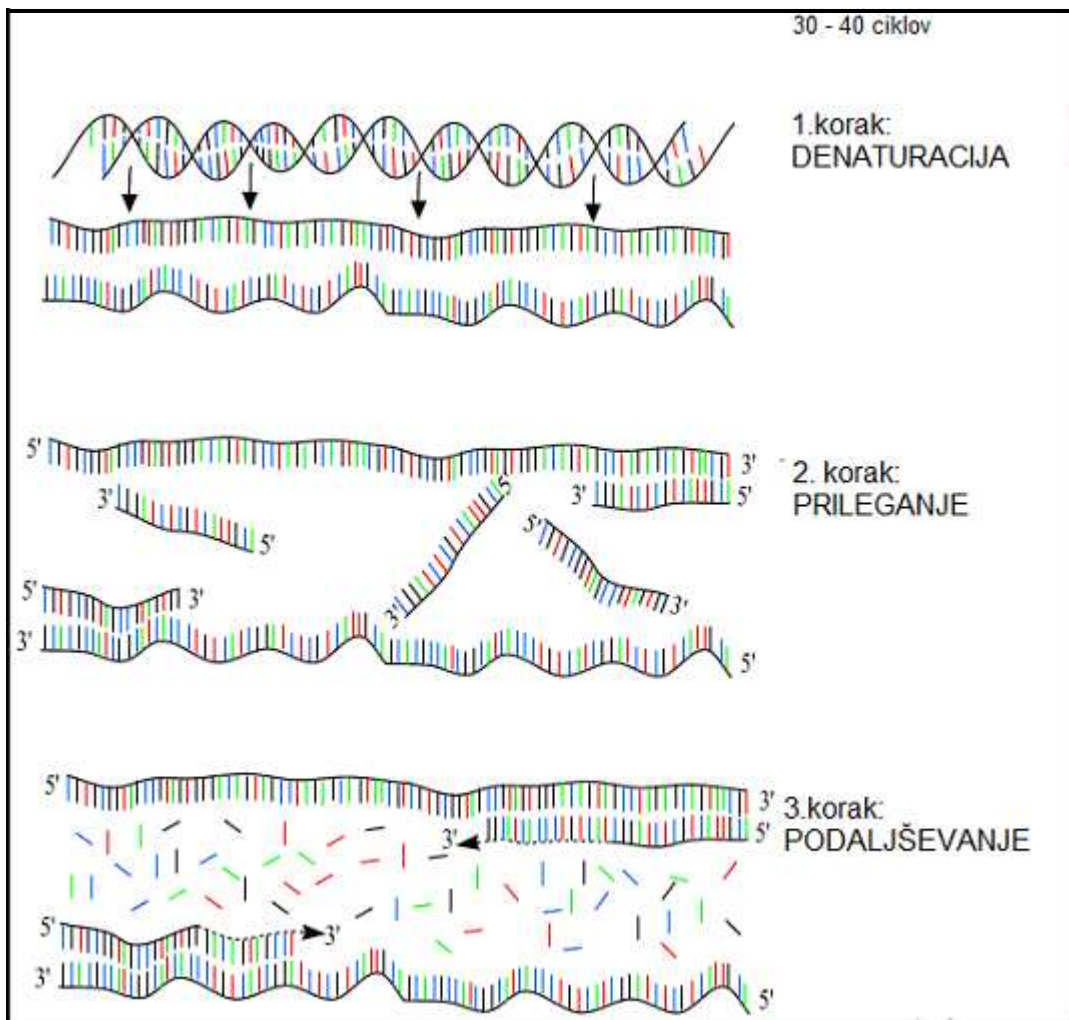
Pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* po standardu SIST EN ISO 11290-1:1997/A1:2005 (2005) je potrebna primarna obogatitev v obogatitvenim gojiščem Half Fraser, ker živilo lahko vsebuje nizko število bakterij vrste *L. monocytogenes* in visoko skupno število bakterij. Gojišče Half Fraser vsebuje polovično koncentracijo selektivnih sestavin in tako omogoča rast in razmnoževanje tudi poškodovanim celicam. Sledi sekundarna obogatitev v gojišču Fraser. Za izolacijo listerij je predpisano selektivno trdo gojišče ALOA, drugo selektivno gojišče je prepuščeno izbiri. Za potrditev bakterij rodu *Listeria* se vzame z vsake plošče po 5, za listerije značilnih kolonij in se jih precepi na gojišče TSYEA. Če po 24 urni inkubaciji zrastejo 1–2 mm velike, konveksne, prosojne kolonije, se za njihovo potrditev naredijo naslednji testi: test na katalazo, barvanje po Gramu in test gibljivosti. Za potrditev bakterij vrste *L. monocytogenes* se naredijo še naslednji testi: hemoliza, izkoriščanje ogljikovih hidratov in test CAMP.

2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

2.2.1 Princip PCR

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je priročna metoda v molekularni biologiji, ki omogoča pomnožitev specifičnih delov tarčne DNA, v razmerah *in vitro*, s pomočjo termostabilnega encima DNA-polimeraza (Jeršek, 2009; Li in sod., 2000). Pomnožitev poteka v posebnem termostatu, ki omogoča zvezno spreminjanje temperature v posameznem ciklu. Vsak cikel je razdeljen v tri glavne faze (slika 1) (Jeršek, 2009; Broll, 2010):

- denaturacija dvoverižne tarčne DNA tako, da dobimo enoverižno molekulo,
- prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno mesto tarčne DNA,
- podaljševanje molekule DNA s termostabilnim encimom DNA-polimeraza.



Slika 1: Princip PCR (Vierstraete, 1999)

Za pomnoževanje specifičnega dela DNA je potrebna reakcijska mešanica, ki poleg tarčne DNA vsebuje encim DNA-polimerazo, specifična oligonukleotidna začetnika, deoksinukleotidtrifosfate vseh štirih baz (dNTP) v enakih koncentracijah, reakcijski pufer, Mg^{2+} (Broll, 2010; Jeršek, 2009).

V vsakem ciklu se število kopij podvoji. Pomnožke enostavno dokažemo z agarozno ali akrilamidno gelsko elektroforezo in velikost pomnožkov primerjamo z fragmenti molekularnega označevalca z znanimi velikostmi. Velikost pomnožka je določena z razdaljo med obema oligonukleotidnima začetnikoma (Olsen, 2000; Jeršek, 2009).

Vsak potek PCR moramo glede na namen in izvedbo optimizirati, kar pomeni določiti optimalno sestavo reakcijske mešanice, določiti temperaturno-časovni režim, določiti optimalno število ponovitev ciklusa (Jeršek, 2009).

2.2.2 Uporaba PCR v živilski mikrobiologiji

Zaradi tveganj povezanih s patogenimi bakterijami, ki so prisotne v živilih in njihovem okolju, je trend raziskav v razvoju čim hitrejših detekcijskih metod, ki bi bile enako občutljive in bi imele enako specifičnost kot klasične mikrobiološke metode (Brehm-Stecher in Johnson, 2007). Klasične mikrobiološke metode izolacije in identifikacije vključujejo bolj ali manj selektivno primarno obogatitev, sekundarno selektivno obogatitev, izolacijo ter identifikacijo z morfološkimi in biokemijski testi. Metode so delovno in materialno zahtevne, rezultati so znani po 7–10 dneh (Jofre, 2005; Malorny in sod., 2003).

Med alternativnimi metodami določanja bakterij v živilski mikrobiologiji se zaradi svoje hitrosti, dobre specifičnosti in občutljivosti, možnosti avtomatizacije, možnosti določanja mikroorganizmov z netipičnimi fenotipskimi lastnostmi, čedalje pogosteje uporablja PCR (Olsen, 2000; Brehm-Stecher in Johnson, 2007; Malorny in sod., 2003).

Glavni problemi, ki spremljajo PCR, so visoka občutljivost na kontaminacijo, inhibicija encimske reakcije z mnogimi sestavinami živila, s sestavinami gojišč ali s sestavinami uporabljenimi za ekstrakcijo DNA in relativno visok prag občutljivost (10^3 cfu/ml), glede na majhen volumen reakcijskega vzorca. Patogeni mikroorganizmu pa so običajno v živilu prisotni v nižjem številu (Olsen, 2000). Poseben problem PCR je nezmožnost ločevanja med živimi in mrtvimi celicami. Namreč toplotno obdelana živila lahko vsebujejo mrtve ali poškodovane celice, ki se ne morejo razmnoževati in tako nimajo vpliva na varnost živila, vseeno pa lahko dajo pri PCR pozitiven rezultat. (Brehm-Stecher in Johnson, 2007; Olsen, 2000; Lazcka in sod., 2007). Direktno določanje mikroorganizmov s PCR v živilih je zato precej težavno.

Tako večina metod, ki temeljijo na PCR, vključuje predhodno obogatitev vzorca v obogatitvenih gojiščih in različne metode separacije in koncentracije vzorca, kot so razredčevanje, centrifugiranje, filtracija in imunomagnetno koncentriranje. S temi koraki lahko tarčne mikroorganizme učinkovito ločimo od potencialnih inhibitorjev PCR in

kompetativne mikroflоре v živilih, ter jih koncentriramo v majhen volumen (Kuchta, 2006b; Olsen, 2000; Brehm-Stecher in Johnson, 2007).

2.2.3 Multipli PCR

Multipli PCR (mPCR) omogoča sočasno pomnoževanje več kot ene tarčne sekvence DNA znotraj ene same PCR (Jofre in sod., 2005; Lazcka in sod., 2007; Hsih in Tsen, 2001; Settanni in Corsetti, 2007). Na ta način lahko prihranimo veliko časa, dela in reagentov. Vendar je postavitvev protokola mPCR zahteven proces, saj pogosto prihaja do tekmovanja parov oligonukleotidnih začetnikov za reagente in na splošno do interakcij med posameznimi reakcijami. Zaradi tega prihaja do lažno negativnih rezultatov, še posebej kadar je koncentracija tarčnih DNA različna (Kuchta, 2006a).

Od njegove predstavitve leta 1988 se metoda uporablja na mnogih področjih preiskovanja DNA, kot so analize delecij, analize mutacij, analize polimorfizmov, detekcije patogenih mikroorganizmov (Broll, 2010).

Poskus uporabe več kot treh parov oligonukleotidnih začetnikov v eni sami PCR, se pogosto izkaže za neuspešen, ker se občutljivost določitve ene tarčne DNA občutno zmanjša (Broll, 2010). Zato se v praksi svetuje uporaba samo dveh parov oligonukleotidnih začetnikov v eni sami reakciji (ang. duplex PCR) (Kuchta, 2006a).

Pri sočasnem določanju bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR se lahko zgodi, da kadar je razlika v koncentracijah omenjenih skupin bakterij večja od 10^2 cfu/ml, dobimo za bakterije prisotne v manjšini negativen rezultat. Različni avtorji navajajo, da prihaja v mPCR do nekakšnega tekmovanja med oligonukleotidnimi začetniki za sestavine PCR-mešanice, kar lahko vpliva na sam potek reakcije (Hsih in Tsen, 2001). Prav nasprotno pa je mPCR izredno preprosta in zanesljiva metoda za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*, kadar omenjeni bakteriji določamo direktno iz kolonij in je uporaba mPCR lahko alternativa biokemični potrditvi bakterij (Jofre in sod., 2005).

2.2.4 Zaporedni PCR

Čeprav teoretično za doseganje pozitivnega signala pri PCR zadostuje že ena sama tarčna molekula DNA, v praksi to ponavadi ne drži. Pogosto se zgodi, da pri vzorcih, ki vsebujejo zelo nizko koncentracijo tarčne DNA, kljub številnim ukrepom ne moremo dobiti pozitivnega rezultata. Ena od možnosti za odpravo tega problema je zaporedni PCR (ang. nested PCR; nPCR).

Pri zaporednem PCR gre za kombinacijo dveh PCR, ki si sledita ena za drugo. Kot tarčno DNA se v drugi PCR (zaporednem PCR) vzame pomnožke iz prve PCR reakcije (Broll, 2010).

Uporaba nPCR lahko izboljša občutljivost PCR (Levin, 2003). Herman in sod. (1995) navajajo, da se je občutljivost PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v surovem mleku občutno izboljšala z uporabo nPCR. S prvo reakcijo so lahko določili do 10^4 bakterij vrste *L. monocytogenes* v 25 ml mleka, po nPCR pa so lahko določili 5–10 bakterij v 25 ml mleka.

Zaporedni PCR se pogosto uporablja za povečanje specifičnosti PCR metode. V tem primeru se s pomočjo prvega para oligonukleotidnih začetnikov pomnoži specifični fragment tarčne molekule DNA, z drugim parom pa nato pomnožimo interno sekvenco pomnožkov iz prve reakcije (Olsen, 2000; Levin, 2003).

2.3 SOČASNO DOLOČANJE BAKTERIJ RODU *Salmonella* in VRSTE *Listeria monocytogenes* z mPCR

2.3.1 Univerzalno obogatitveno gojišče (UPB)

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili (2000) med drugim predpisuje, da je živilo zdravstveno ustrezno, če ne vsebuje mikroorganizmov in parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi. To pomeni, da bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih ne smejo biti prisotne. Ker je prag občutljivosti PCR metode okoli 10^3 cfu/ml, patogeni organizmi pa so v živilu lahko prisotni v nižjem številu, večina metod vključuje pred PCR obogatitev vzorca v obogatitvenih gojiščih. S tem korakom se lahko izognemo tudi lažno pozitivnim rezultatom, ki so posledica prisotnosti mrtvih celic v vzorcu (Kuchta, 2006b; Olsen, 2000).

Pri razvoju metode sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* je bilo tako potrebno najprej poiskati gojišče v katerem bi se omenjeni skupini bakterij lahko sočasno namnožile do zadostne koncentracije za določitev z PCR (Bhaduri in Cottrell, 2001). Poleg tega je moralo gojišče omogočati rast in razmnoževanje tudi poškodovanim celicam, ki so v živilih pogosto prisotne zaradi raznih tehnoloških postopkov, kot so zmrzovanje, dehidracija, izpostavljenost visokim temperaturam. Večina selektivnih gojišč vsebuje različne selektivne sestavine, ki zavirajo rast čim večjega števila organizmov, ki so lahko prisotni v živilih, ne motijo pa rasti tarčnega organizma. Vendar pogosto zavirajo ali upočasnijo rast tudi poškodovanim celicam (Zhao in Doyle, 2001).

Kot obogatitveno gojišče za sočasno rast omenjenih skupin bakterij lahko uporabimo gojišče UPB, ki sta ga leta 1992 razvila Bailey in Cox (Zhao in Doyle, 2001; Bhaduri in Cottrell, 2001; Hsieh in Tsen, 2001; Bhagwat, 2003; Paternoster, 2009).

Univerzalno obogatitveno gojišče (UPB) ima veliko pufersko kapaciteto in nizko vsebnost ogljikovih hidratov, s čimer je preprečen padec vrednosti pH, ki bi ga lahko povzročili kisli metabolni produkti različnih mikroorganizmov, ki so naravno prisotni v živilih. Prav tako omogoča rast poškodovanim organizmom (Bailey in Cox, 1992; Bhaduri in Cottrell, 2001).

Bakterije rodu *Salmonella* in bakterije rodu *Listeria* se kot čisti kulturi v gojišču UPB po 24-urni inkubaciji pri 35 °C namnožijo do koncentracije 10⁹ cfu/ml. Bakterije rodu *Salmonella* se v enakovredni mešani kulturi z bakterijami rodu *Listeria* v gojišču UPB prav tako namnožijo do koncentracije 10⁹ cfu/ml, medtem ko se bakterije rodu *Listeria* v enakovredni mešani kulturi z bakterijami rodu *Salmonella* namnožijo do koncentracije 10⁶ cfu/ml (24-urna inkubacija v gojišču UPB pri 35 °C). Bakterije rodu *Listeria* tako nimajo vpliva na rast bakterij rodu *Salmonella*, na drugi strani pa je rast bakterij rodu *Listeria* v prisotnosti rodu *Salmonella* zmanjšana za 10³ cfu/ml (Bailey in Cox, 1992).

Gojišče UPB omogoča rast tudi bakterijam, ki so bile pred inkubacijo v gojišču UPB izpostavljene temperaturnim šokom. V tem primeru se obe omenjeni skupini bakterij po 24-urni inkubaciji v gojišču UPB namnožita vsaj do koncentracije 10⁵ cfu/ml (Bailey in Cox, 1992). Podobne rezultate je dala tudi študija, ki sta jo opravila Zhao in Doyle (2001), v kateri sta vrednotila rast bakterij v gojišču UPB, ki so bile predhodno izpostavljene temperaturnim šokom. Rezultati študije so pokazali, da se po samo 6-urni inkubaciji v gojišču UPB, omenjeni skupini bakterij ne namnožita do zadostne koncentracije, potrebne za določanje z PCR.

Obogatitveno gojišče UPB tudi nima inhibitornega učinka na samo PCR (Bhaduri in Cottrell, 2001; Paternoster, 2009).

2.3.2 Imunomagnetno koncentriranje celic

Številni avtorji poročajo o nezmožnosti določanja bakterij z PCR direktno iz živil, kar je najbrž posledica prisotnosti različnih inhibitornih sestavin v živilih (Hudson in sod., 2001; Yang in sod., 2007). Imunomagnetno koncentriranje bakterij (IMS) je učinkovita metoda za koncentriranje tarčnih organizmov in njihovo separacijo od potencialnih inhibitorjev PCR, ki so lahko prisotni v živilih (Hsieh in Tsen; 2001, Rijpens in sod., 1999).

Kroglice za imunomagnetno koncentriranje bakterij so magnetne kroglice, ki imajo na površini s kovalentnimi vezmi vezana specifična protitelesa za določen rod oziroma vrsto bakterij. Kroglice dodamo preiskovanemu vzorcu, da se bakterije vežejo v kompleks z specifičnimi protitelesi. Kompleks kroglic in bakterij nato ločimo od vzorca z uporabo magnetnega stojala (Dynal, 2003). Dobra lastnost imunomagnetnega ločevanja je, da se pri vezavi bakterij s protitelesi v kompleks ohrani možnost kultivacije in izolacije (Lynch in sod., 2004).

Imunomagnetno koncentriranje se lahko uporabi v kombinaciji s hitrimi metodami določanja mikroorganizmov kot sta ELISA in PCR (Lynch in sod., 2004).

Rijpens in sod. (1999) navajajo imunomagnetno koncentriranje kot uspešen nadomestek časovno zamudni selektivni obogatitvi. Z imunomagnetnim koncentriranjem lahko ločimo tarčne bakterije iz primarnega obogatitvenega gojišča in se tako izognemo sekundarni obogatitvi, kar zelo skrajša postopek samega določanja.

Različni avtorji navajajo, da se z uporabo imunomagnetnega koncentriranja bakterijskih celic pred PCR poveča občutljivost metode (Hsih in Tsen, 2001; Li in sod, 2000). Hsih in Tsen (2001) sta razvila metodo za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. Z uporabo imunomagnetnega koncentriranja bakterij pred mPCR sta rešila problem lažno negativnih rezultatov, ki se pogosto pojavi kadar je razlika v koncentracijah omenjenih bakterij večja od 10^2 celic. Z tako postavljenim protokolom sta lahko sočasno določila obe bakteriji, tudi kadar se je njuna začetna koncentracija razlikovala za 10^5 celic.

Ob pravilni pripravi vzorca izbranega živila je imunomagnetno koncentriranje primerno tudi za direktno izolacijo bakterij iz živila. Hudson in sod. (2001) so razvili PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, pri kateri so za izolacijo in koncentracijo teh bakterij direktno iz vzorca šunke, uporabili imunomagnetno koncentriranje. S tem so skrajšali čas detekcije na 24 ur. Yang in sod. (2007) so razvili PCR metodo v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku. Za izolacijo bakterij vrste *L. monocytogenes* direktno iz vzorca mleka so uporabili imunomagnetno koncentriranje in se s tem izognili časovno zamudnim obogatitvam ter potencialnim inhibitorjem v mleku.

2.3.3 Optimizacija mPCR

Prvi korak pri oblikovanju mPCR je izbira parov oligonukleotidnih začetnikov, ki jih med seboj lahko kombiniramo. Sledi postavitvev protokola reakcije mPCR, ki dovoljuje optimalno pomnoževanje vseh zelenih delov DNA, kot če bi jih pomnoževali posamično v posameznih reakcijah PCR (Henegariu in sod., 1997). To dosežemo z optimizacijo PCR-protokola.

Najpomembnejši parametri optimizacije PCR-protokola so izbira:

- temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov
- koncentracije $MgCl_2$
- koncentracije oligonukleotidnih začetnikov
- koncentracije encima
- koncentracije dNTP

Glede na njihovo medsebojno odvisnost je pomembno tudi, kateri od parametrov je optimiziran prvi (Persing, 1993).

2.3.3.1 Temperaturni program

Vzrok za slabo učinkovitost PCR je pogosto nepopolna denaturacija DNA. Značilne razmere denaturacije so 30 s pri 95 °C oziroma 15 s pri 97 °C (Innis in Gelfand, 1990). Da bi dosegli popolno denaturacijo na začetku PCR, se temperaturni program začne z začetno denaturacijo, ki traja 1–15 min pri 94–95 °C. Temu sledi 30–40 ciklov, ki se začnejo z 15–60 s trajajočo denaturacijo pri 94–95 °C (Kuchta, 2006a). Predolgo trajajoča denaturacija pri visoki temperaturi lahko povzroči izgubo aktivnosti encima DNA-polimeraze (Innis in Gelfand, 1990).

Eden od pomembnejših parametrov optimizacije PCR je temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov je odvisna predvsem od njihove dolžine in sekvenc. Na voljo so različne formule za izračun teoretične temperature tališča (T_m). Najpogosteje uporabljena formula, ki temelji na vsebnosti gvanina in citozina, da zadovoljiv približek dejanske T_m , ko gre za kratke oligonukleotidne začetnike (do dolžine 20 baz). Optimalno temperaturo prileganja določimo empirično in sicer je 5–10 °C nižja od teoretično izračunane (Broll, 2010).

$$T_m = 2(A+T) + 4(G+C) \quad \dots(1)$$

Legenda: T_m – temperatura tališča, A – Adenin, T – Timin, G – Gvanin, C – Citozin

Priporočljivo je izbrati oligonukleotidne začetnike z optimalno temperaturo prileganja v temperaturnem območju od 55 °C do 65 °C (Persing, 1993; Innis in Gelfand, 1990). Nižja temperatura prileganja lahko vodi do nižje specifičnosti in posledično tudi do nižje občutljivosti PCR. Prihaja namreč do tekmovanja za komponente PCR-mešanice med nespecifičnimi in specifičnimi PCR-produkti (Persing 1993). Višja temperatura prileganja pa zagotavlja večjo specifičnost PCR (Innis in Gelfand, 1990; Broll 2010).

Prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri tipični koncentraciji 200 μM je končano v nekaj sekundah. Kljub temu je priporočen čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov od 30 s do 1 min (Grunenwald, 2003).

Pri izbiri oligonukleotidnih začetnikov za multipli PCR (mPCR) je pomembno, da imajo vsi oligonukleotidni začetniki podobne temperature tališča in niso med seboj komplementarni (Grunenwald, 2003).

Čas podaljševanja oligonukleotidnih začetnikov z DNA-polimerazo je odvisen od dolžine in koncentracije tarčne sekvence. Optimalna temperatura podaljševanja je 72 °C (Innis in Gelfand, 1990). Prekratek čas podaljševanja onemogoči DNA-polimerazi, da bi dokončala polimerizacijo, medtem ko dolgo podaljševanje lahko vodi do nastanka nespecifičnih produktov. Optimalen čas podaljševanja je tako 0,5–1 min na 1 kb pomnožka (Broll, 2010). Temperaturni program PCR se ponavadi konča z končnim podaljševanjem, ki traja nekaj minut, da lahko pride do podaljšanja vseh pomnožkov. To omogoči večjo homogenost produkta PCR (Kuchta, 2006a).

2.3.3.2 Koncentracija MgCl₂

Encim DNA-polimeraza potrebuje za svojo aktivnost proste ione Mg²⁺. Zato je optimalna koncentracija MgCl₂ ključnega pomena za uspešno pomnoževanje. Koncentracija ionov Mg²⁺ pri konvencionalnem PCR je največkrat 1,5 mM, pri PCR v realnem času pa 2,5–5 mM (Kuchta, 2006a). Na splošno velja, da je koncentracija MgCl₂ pri mPCR višja kot pri PCR (Settanni in Corsetti, 2007).

Na koncentracijo prostih ionov Mg²⁺ v reakcijski mešanici lahko vpliva tudi koncentracija tarčne DNA, koncentracija dNTP in prisotnost različnih proteinov (Broll, 2010). Prenizka koncentracija ionov Mg²⁺ lahko povzroči slabo encimsko aktivnost in posledično poslabšanje občutljivosti. Na drugi strani pa previsoka koncentracija ionov Mg²⁺ poslabša encimsko natančnost, kar lahko vodi do poslabšanja specifičnosti same reakcije (Broll, 2010; Persing, 1993). Zato je za vsako PCR potrebno empirično določiti optimalno koncentracijo MgCl₂.

Optimizacijo koncentracije MgCl₂ ponavadi izvedemo tako, da povišujemo koncentracijo MgCl₂ za 0,5 mM oziroma za 1 mM, v intervalu 1–4 mM. Za optimalno koncentracijo izberemo tisto, pri kateri je učinkovitost PCR reakcije najboljša, ob minimalni količini nespecifičnih produktov (Broll, 2010).

Optimalna koncentracija MgCl₂ se lahko spremeni, če uporabimo DNA-polimerazo drugega proizvajalca (Broll, 2010).

Persing (1993) v svoji študiji svetuje, da se raztopina MgCl₂, namesto v zamrzovalniku hrani v hladilniku. Nenehno zamrzovanje in taljenje MgCl₂ lahko vodi do nastanka nehomogene raztopine, kar je velikokrat krivec za neuspešno PCR. Zato je pomembno, da se raztopina pred uporabo dobro premeša (Broll, 2010).

2.3.3.3 Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov

Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov ima velik vpliv na učinkovitost PCR. Običajna koncentracija oligonukleotidnega začetnika je 0,2 mM. Z zviševanjem koncentracije lahko povečamo sam izkoristek reakcije. Smiselno je povečanje do 2 mM, ker se pri višjih koncentracijah izkoristek ponavadi spet zmanjša (Broll, 2010). Uporaba previsoke ali prenizke koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ponavadi vodi do zmanjšanja občutljivosti PCR in posledično do lažno negativnih rezultatov (Gunson in sod., 2003; Grunenwald, 2003). Previsoka koncentracija oligonukleotidnih začetnikov lahko povzroči nespecifično prileganje in nastanek oligonukleotidnih-dimerjev, medtem ko prenizka koncentracija lahko ogrozi učinkovitost PCR reakcije (Grunenwald, 2003).

Gunson in sod. (2003) so razvili preprosto metodo »šahovnice« za določitev optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov v mPCR. Vsak par oligonukleotidnih

začetnikov so pripravili v koncentracijah 100, 50, 25, 12,5 in 6,25 pmol/ μ l. Preizkusili so 25 različnih reakcijskih mešanic za mPCR, katerim so dodali od 100 do 6,25 pmol/ μ l prvega para oligonukleotidnih začetnikov in od 100 do 6,25 pmol/ μ l drugega para oligonukleotidnih začetnikov. Optimalno razmerje med obema paroma oligonukleotidnih začetnikov je bilo tisto, pri katerem sta bila oba specifična pomnožka in pri katerem ni bilo nespecifičnih pomnožkov.

2.3.3.4 Število ciklov

Priporočljivo število ciklov v PCR je 35–40. Povečanje števila ciklov lahko izboljša občutljivost same reakcije, vendar lahko ogrozi samo specifičnost. Zato se za rutinsko analizo priporoča uporaba PCR-protokola z nižjim številom ciklov, ki ima sicer lahko nižjo občutljivost in se za boljšo občutljivost raje poskuša optimizirati pripravo vzorca (Kuchta, 2006a).

Kadar je za pozitivno PCR potrebnih veliko število ciklov (več kot 40) ponavadi pomeni, da gre za kontaminacijo oziroma za slabo izbiro oligonukleotidnih začetnikov (Broll, 2010).

Po določenem številu ciklov se učinkovitost PCR vidno zmanjša in koncentracija PCR produktov ne narašča več eksponentno. To se ponavadi zgodi, ko koncentracija PCR produktov doseže 0,3–1 pmol. Vzroki za pojav plato-učinka (ang. plateau effect) so lahko različni; lahko prihaja do zmanjšanja količine oligonukleotidnih začetnikov, zmanjšanja količine nepoškodovane DNA-polimeraze... (Broll, 2010; Innis in Gelfand, 1990).

2.3.4 Sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR

V zadnjem času je bilo razvitih več metod mPCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v različnih živilih, v kombinaciji z različnimi obogatitvenimi gojišči, različnimi tarčnimi sekvencami in oligonukleotidnimi začetniki.

Hsieh in Tsen (2001) sta razvila metodo za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. Občutljivost mPCR brez predhodne obogatitve je bila 10^3 – 10^4 cfu/ml, kadar je bila koncentracija omenjenih bakterij enaka. Ko je bila koncentracija obeh skupin bakterij sicer nad mejo občutljivosti, vendar se je razlikovala za več kot 10^2 cfu/ml, pa je bil rezultat za bakterije v manjšini pogosto negativen. Za izboljšanje občutljivosti PCR sta uvedla predhodno 24-urno obogatitev v gojišču UPB (angl. Universal preenrichment broth) in ugotovila, da se koncentracija omenjenih bakterij po obogatitvi v gojišču UPB razlikuje za več kot 10^3 cfu/ml. Zato sta pred postopkom mPCR uvedla imunomagnetno koncentriranje. Na ta način sta lahko določila obe omenjeni skupini bakterij tudi kadar je bila razlika v njuni začetni koncentraciji 10^5 cfu/ml.

Jofre in sod. (2005) so določali bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR v kuhanem pršutu. Za določanje bakterij rodu *Salmonella* so uporabili oligonukleotidna začetnika 139 in 141, ki pomnožita 284 bp dolg pomnožek, za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* pa oligonukleotidna začetnika Lip1 in Lip 3, ki pomnožita 215 bp dolg pomnožek. Občutljivost mPCR je bila 10^5 cfu/ml, ko je bila koncentracija obeh skupin bakterij enaka. Protokol mPCR je omogočal tudi pozitivno detekcijo obeh skupin bakterij, kadar je bila razlika v njuni koncentraciji večja od 10^3 cfu/ml. Za uspešno detekcijo omenjenih bakterij v kuhanem pršutu so pred mPCR izvedli ločeno, 48-urno obogatitev gojišču BPW in HF in tako sočasno določili obe skupini bakterij v kuhanem pršutu do koncentracije 1 cfu/25 g. Predhodni rezultati v študiji so pokazali, da sočasna obogatitev omenjenih bakterij v BPW vodi do prevlade bakterij rodu *Salmonella* nad bakterij vrste *L. monocytogenes* in posledično njeno neuspešno detekcijo z mPCR.

Bhagwat (2003) je z mPCR v realnem času sočasno določil bakterije vrst *L. monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium in *E. coli* v umetno kontaminiranih vzorcih zelenjave (zeleno zelje, cvetača, koriander, mešana solata). Zelenjavo so oprali z umetno kontaminirano vodo, ki je vsebovala 1–1000 cfu/ml zgoraj omenjenih skupin bakterij. Vzorce so pred PCR sočasno obogatili v UPB. Občutljivost metode je bila za bakterije seva *S. Typhimurium* in vrste *E. coli* 1–10 cfu/ml in za bakterije vrste *L. monocytogenes* 1000 cfu/ml. Celoten postopek je trajal 30 ur.

Kim in sod. (2006) so z mPCR v pšeničnem zrnju določali bakterije vrste *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* po 24-urni sočasni obogatitvi v gojišču BPW. Občutljivost metode je bila 56 cfu/ml za bakterije vrste *E. coli*, 1800 cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes* in 54 cfu/ml za bakterije *S. Typhimurium*. Občutljivost za bakterije vrste *L. monocytogenes* se je izboljšala na 62 cfu/ml, kadar so v PCR uporabili samo oligonukleotidne začetnike specifične za te bakterije. Ugotovili so tudi, da se občutljivost metode za vse tri skupine bakterij močno poslabša, kadar ni predhodne obogatitve v gojišču BPW.

Germini in sod. (2009) so razvili mPCR metodo, za sočasno določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* v umetno kontaminiranem jajcu, ki je bil predhodno pasteriziran. Občutljivost mPCR metode je bila 10 cfu/ml za čiste kulture in 10^6 cfu/ml za mešane kulture. Za uspešno detekcijo v jajcu so pred mPCR izvedli sočasno, 15-urno obogatitev v gojišču TSB (angl. Tryptic soy broth) in na ta način uspešno določili vse tri omenjene bakterije do koncentracije 10 cfu/25 g vzorca.

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterijski sevi

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednje bakterijske seve zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete:

- *Listeria monocytogenes* ŽM 52
- *Listeria monocytogenes* ŽM 54
- *Salmonella* Enteritidis ŽM 2

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednja gojišča, ki smo jih pripravili po navodilih proizvajalcev:

- Gojišče UPB (angl. Universal Preenrichment Broth, Difco, Becton Dickinson Mikrobiology Systems, 223510, ZDA)
- Gojišče OXFORD (Merck, 1.07004.0500, Nemčija)
- Gojišče PALCAM (Merck, 1.11755.0500, Nemčija)
- Gojišče ALOA (angl. Agar *Listeria* selon Ottaviani & Agosti, Biolife, 4016052, Italija)
- Gojišče XLD (angl. Xylose Lysine Deoxycholate agar, Biolife, 402206, Italija)
- Gojišče NA (angl. Nutrient Agar, Oxoid, CM3, Anglija)
- Gojišče TSA (angl. Tryptone Soya Agar, Oxoid, CM 0131, Anglija)
- Gojišče BHI (angl. Brain Heart Infusion, Biolife, 401230, Italija)
- Gojišče TSYEA (angl. Tryptone Soya Yeast Extract Agar, Fluka 22091, Nemčija)

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic

- 0,125 % raztopina SDS (natrijev dodecil sulfat, Promega, V 6551, ZDA)
- 0,05 M raztopina NaOH (natrijev hidroksid, Sigma-Aldrich, S 8045, ZDA)

3.1.3.2 Reagenti za mPCR

- Pufer PCR 10x (100 mM Tris-HCl (pH = 9), 500 mM KCl, Triton X-100: 1 %)

- (Promega, 338, ZDA)
- 2 mM mešanica deoksinukleotid trifosfatov – dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (Promega, 303, ZDA)
- 25 mM MgCl₂ (magnezijev klorid) (Promega, A351B, ZDA)
- Taq DNA-polimeraza (5U/μl) (Promega, M1661, ZDA)
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *Listeria monocytogenes* LM1/LM2 (Border in sod., 1990):
LM1 (5'-CCT AAG ACG CCA ATC GAA-3'): 100 pmol/μl
LM2 (5'-AAG CGC TTG CAA CTG CTC-3'): 100 pmol/μl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993):
ST11 (5'-AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGCA-3'): 100 pmol/μl
ST15 (5'-GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG-3'): 100 pmol/μl
- Tween 20 (Merck, 1.09280.0100, Nemčija)
- Voda_{PCR} (Eppendorf, 0032 006.159, Nemčija)

3.1.3.3 Reagenti za imunomagnetno koncentriranje

- Kroglice za imunomagnetno koncentriranje salmonel (Dynabeads anti-Salmonella) (Dyna, 710.01, Norveška)
- Kroglice za imunomagnetno koncentriranje listerij (Dynabeads anti-Listeria) (Dyna, 710.05, Norveška)
- Pufer PBS-Tween
0,15 M natrijev klorid (NaCl)
0,01 M natrijev fosfat pufer (Na₂HPO₄, pH = 7,4)
0,05 % Tween 20

3.1.3.4 Reagenti za gelsko elektroforezo

- Pufer TAE 10x (pH = 8,1)
0,4 M raztopina Tris baze (Promega, H5131, ZDA)
0,2 M raztopina očetne kisline (Merck, 1.0063.1000, Nemčija)
0,02 M raztopina Na₂-EDTA (Sigma-Aldrich, E 5134, ZDA)
- Agarozni gel
1,5 % Agaroz (FMC Bioproducts, 50014, ZDA)
Pufer TAE 0,5x
- Molekularni označevalci dolžin pomnožkov DNA – 100 bp (100 bp DNA Ladder, GibcoBRL, 156238-019, ZDA)
- Raztopina barvil za nanos pomnožkov na gel (0,21 % raztopina barvila bromfenol modro, 0,21 % raztopina barvila ksilen cianol FF, 0,2 M EDTA (pH=8,)), 50 % glicerol) (Eppendorf, 0032 006.850, Nemčija)
- Raztopina etidijevega bromida (10 mg/ml) (Sigma-Aldrich, ZDA)

3.1.3.5 Druge kemikalije

10 % raztopina natrijevega hipoklorita (NaOCl) (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)

96 % raztopina etanola (Merck, 1.00971.6025, Nemčija)

3.1.4 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali laboratorijsko opremo, ki je navedena v preglednici 1.

Preglednica 1: Laboratorijska oprema

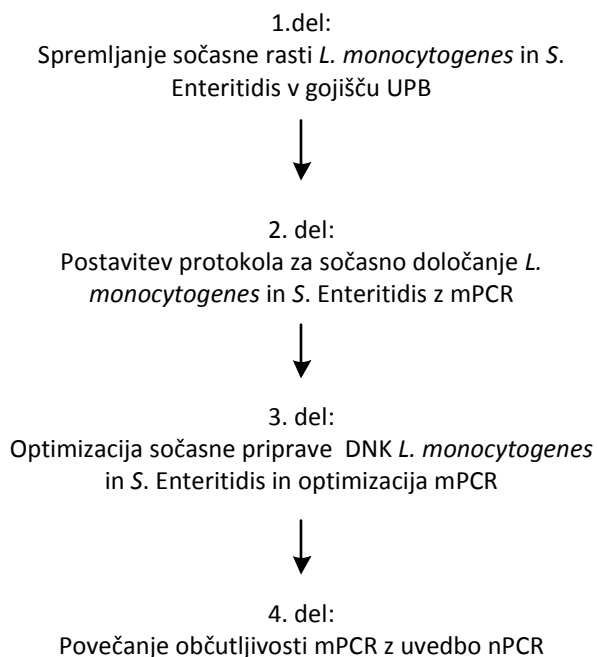
APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Aparat PCR	Gene Amp DNA Thermal Cycler 2400	Perkin Elmer, ZDA
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Avtomatske pipete in nastavki	P10, P100, P1000	Gilson, Francija
Centrifuga	Mini Spin	Eppendorf, Nemčija
Hladilnik	/	Gorenje, Slovenija
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Komora za PCR	Lamin Air	Holten
Elektroforeza	MUPID-2	Cosmo Bio.,Ltd, Japonska
Sistem za dokumentiranje gelov	Gel doc 20H00 S.N.653/1281	BioRad, ZDA
Stresalnik	Vibromix 314 EVT Vibromix EV 202	Tehtnica, Slovenija Tehtnica, Slovenija
Tehtnica	PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
Vodna kopel	serija 11757	Sutjeska, Jugoslavija
Vrtinčno mešalo	Vibromix 104EV	Tehtnica, Slovenija
Zaščitna mikrobiološka komora	PIO SMBC 122AV	Iskra, Slovenija
Zamrzovalnik (-20 °C)	/	LTH, Slovenija

Poleg opreme, ki je navedena v preglednici 1, smo uporabljali še splošno laboratorijsko opremo: gorilnike, epruvete, erlenmajerice, merilne valje, Eppendorfove epruvete (0,2 ml, 1,5 ml, 2 ml), nastavke za pipete, petrijevke, cepilne zanke, stojala.

3.2 METODE

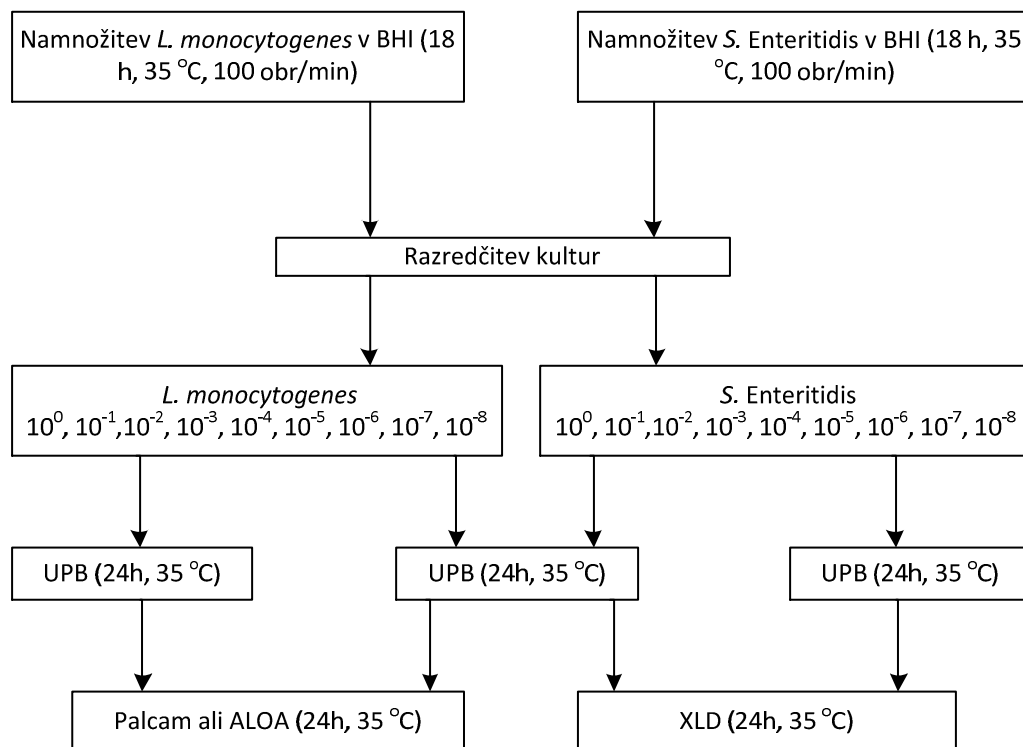
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Naš eksperimentalni del je potekal v štirih zaporednih delih, ki so si sledili kot je shematsko prikazano na sliki 2, da bi dosegli sočasno določitev bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij rodu *Salmonella* z mPCR.



Slika 2: Shema poteka eksperimentov

V prvem delu smo proučevali rast bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* v obogatitvenem gojišču UPB. Želeli smo preveriti, ali to gojišče omogoča namnožitev obeh skupin bakterij do zadostne koncentracije za določitev z mPCR (slika 3).



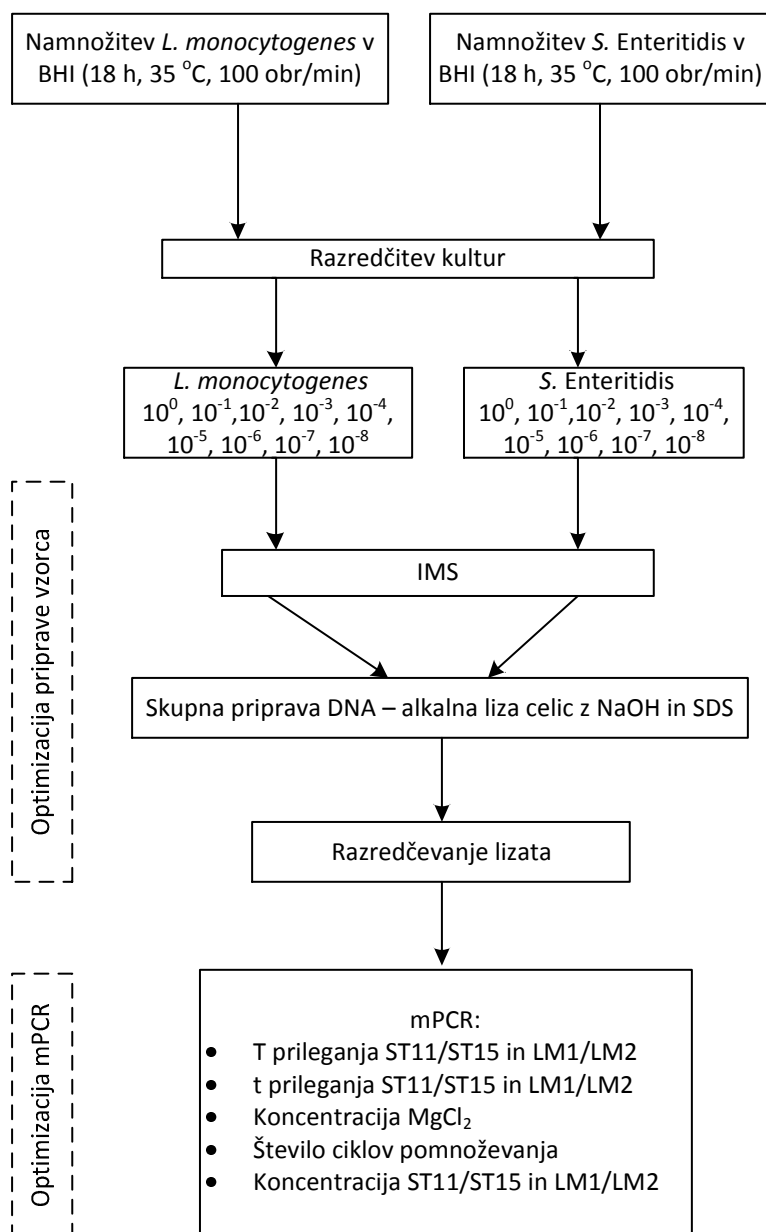
Slika 3: Shema glavnih stopenj proučevanja rasti bakterij *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis* v obogatitvenem gojišču UPB

Legenda:

BHI – gojišče BHI, **UPB** – obogatitveno gojišče UPB, **XLD** – gojišče XLD za kvantitativno določanje bakterij rodu *S. Enteritidis*, **PALCAM** – gojišče PALCAM za kvantitativno določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, **ALOA** – gojišče ALOA za kvantitativno določanje bakterij *L. monocytogenes*

V drugem delu smo postavili protokol mPCR (SALLIS2), ki z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15 in LM1/LM2 dovoljuje sočasno pomnoževanje DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij rodu *Salmonella*. Določili smo občutljivost mPCR po protokolu SALLIS2 in jo primerjali z občutljivostjo mPCR po protokolu SALLIS1, ki smo ga povzeli po Li in sod. (2000).

Občutljivost mPCR po protokolu SALLIS2 je bila boljša, zato smo v tretjem delu protokol SALLIS2 optimizirali. Želeli smo razviti protokol, ki bi dovoljeval sočasno pomnoževanje obeh skupin bakterij z mPCR v modelni raztopini, v koncentracijah do katerih omenjeni bakteriji sočasno zrastle v gojišču UPB. Zato smo skušali izboljšati samo pripravo vzorca za mPCR (z imunomagnetnim koncentriranjem, razredčevanjem vzorca celičnega lizata) in izbrati ustrezne razmere pomnoževanja z mPCR (določanje optimalne temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov, določanje koncentracije $MgCl_2$). Shema glavnih stopenj optimizacije mPCR je predstavljena na sliki 4.



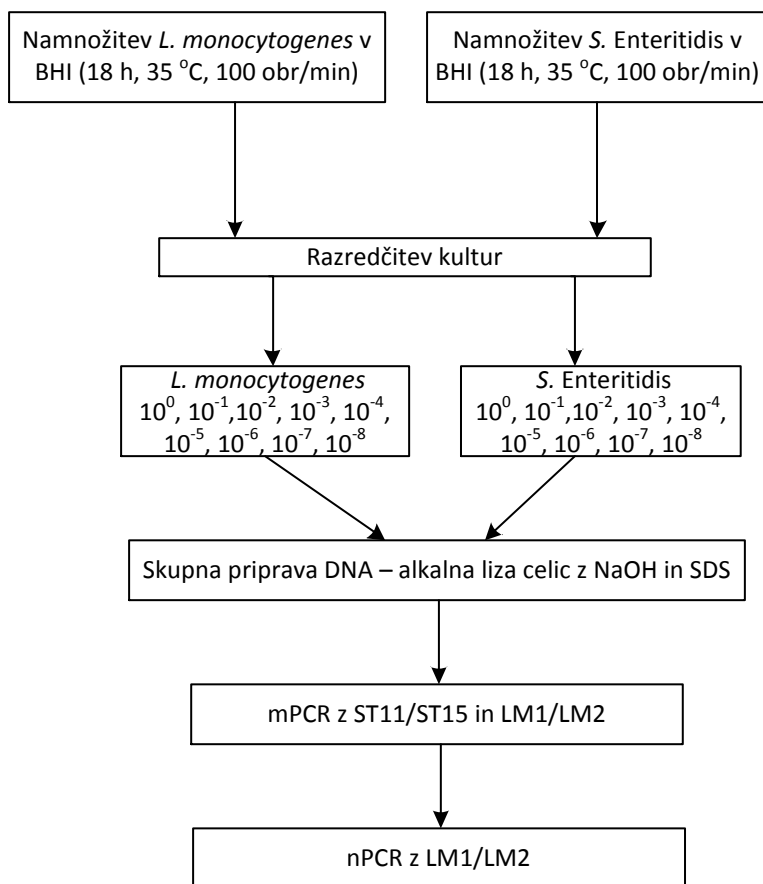
Slika 4: Shema glavnih stopenj optimizacije mPCR

Legenda:

BHI – gojišče BHI, **IMS** – imunomagnetno koncentriranje, **mPCR** – multipli PCR, **ST11/ST15** – specifična oligonukleotidna za bakterije rodu *Salmonella*, **LM1/LM2** – specifična oligonukleotidna začetnika za bakterije vrste *L. monocytogenes*

V četrtem delu smo v sočasno določanje obeh skupin bakterij z mPCR vključili še zaporedni PCR (nPCR). Predhodni rezultati naših eksperimentov so namreč pokazali, da kadar je razlika med koncentracijami omenjenih bakterij takšna, kot jo dobimo pri njuni sočasni rasti v gojišču UPB, dobimo za bakterije *L. monocytogenes* pogosto lažno negativen rezultat. Zato smo po končanem mPCR izvedli še nPCR. Namen nPCR je bila predvsem določitev bakterij vrste *L. monocytogenes* in zato je mešanica za zaporedni

PCR vsebovala samo oligonukleotidne začetnike LM1/LM2. Shema glavnih stopenj nPCR je predstavljena na sliki 5.



Slika 5: Shema glavnih stopenj zaporednega PCR (nPCR)

Legenda:

BHI – gojišče BHI, **mPCR** – multipli PCR, **nPCR** – zaporedni PCR, ST11/ST15 – specifična oligonukleotidna začetnika za bakterije rodu *Salmonella*, **LM1/LM2** – specifična oligonukleotidna začetnika za bakterije vrste *L. monocytogenes*

3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur

3.2.2.1 Namnožitev bakterij vrste *L. monocytogenes*

Kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* smo vsak teden znova precepili na gojišče TSYEA, jo inkubirali 24 ur pri 37 °C in hranili v hladilniku. Kolonije z gojišča TSYEA smo uporabljali za pripravo 18-urne kulture *L. monocytogenes*.

Kolonijo *L. monocytogenes* smo suspendirali v 4 ml neselektivnega gojišča BHI in vsebino premešali na namiznem mešalu. Suspenzijo smo nato 18 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri 35 °C.

3.2.2.2 Namnožitev bakterij seva *S. Enteritidis*

Kulturo bakterij seva *S. Enteritidis* smo vsak teden znova precepili na ploščo NA, jo inkubirali 24 ur pri 37 °C in hranili v hladilniku. Kolonije z gojišča NA smo uporabljali za pripravo 18-urne kulture *S. Enteritidis*.

Kolonijo *S. Enteritidis* smo suspendirali v 4 ml neselektivnega gojišča BHI in vsebino premešali na namiznem mešalu. Suspenzijo smo nato 18 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri 35 °C.

3.2.3 Določitev števila bakterij

Vsaki 18-urni kulturi bakterij seva *S. Enteritidis* oziroma vrste *L. monocytogenes* smo določili število po postopku opisanem v standardu SIST EN ISO 4833 (2003). Vsako kulturo smo po 18-urni inkubaciji v BHI pri 35 °C, 10-kratno redčili s fiziološko raztopino, razredčitve nacepili na trda gojišča in 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo prešteli kolonije in izračunali koncentracijo bakterij v BHI. Za določitev števila bakterij seva *S. Enteritidis* smo uporabljali gojišče XLD. Za določitev števila bakterij *L. monocytogenes* pa smo uporabljali gojišča PALCAM, OXFORD ali ALOA.

3.2.4 Priprava pozitivnih kontrol za PCR

Pozitivne kontrolne vzorce za PCR smo pripravili za bakterije vrste *L. monocytogenes*, za bakterije seva *S. Enteritidis* (Medeiros in Farber, 2001) in kot skupno pozitivno kontrolo za mešanico omenjenih bakterij.

3.2.4.1 Priprava pozitivne kontrole za bakterije vrste *L. monocytogenes*

- 1 ml dobro premešane 18-urne kulture *L. monocytogenes* v BHI smo odpipetirali v Eppendorfove epruvete (1,5 ml) in centrifugirali 3 min pri 14.000 x g
- odstranili smo supernatant in peletu dodali 1 ml sterilne 0,9 % raztopine NaCl, premešali in ponovno centrifugirali pri 14.000 x g
- pelet smo raztopili v 50 µl 0,9 % raztopine NaCl in dodali 450 µl sterilne deionizirane vode
- dobro premešano suspenzijo celic smo razdelili v sterilne epruvete po 50 µl in shranili pri -20 °C.

Vzorec tako pripravljene kulture je služil kot pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes* za PCR.

3.2.4.2 Priprava pozitivne kontrole za bakterije seva *S. Enteritidis*

Pozitivno kontrolo smo pripravili po enakem postopku kot je opisan v poglavju 3.2.4.1. Vzorec tako pripravljene kulture je služil za pozitivno kontrolo za *S. Enteritidis* za PCR.

3.2.4.3 Priprava skupne pozitivne kontrole bakterij *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis*

- 1 ml dobro premešane 18-urne kulture bakterij seva *S. Enteritidis* v BHI in 1 ml 18-urne kulture vrste *L. monocytogenes* v BHI smo odpipetirali v Eppendorfove epruvete (1,5 ml) in centrifugirali 3 min pri 14.000 x g
- Odstranili smo supernatant in nadaljevali s postopkom kot je opisan v poglavju 3.2.4.1.

Vzorec tako pripravljenih kultur je služil za skupno pozitivno kontrolo za bakterije seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* za PCR.

3.2.5 Sočasna priprava bakterijske DNA za PCR

Za sočasno pripravo DNA bakterij *S. Enteritidis* in *L. monocytogenes* smo uporabili alkalno lizo celic, ker je dala najboljše rezultate, kadar je vzorec vseboval samo eno od omenjenih bakterij (Trkov in Jeršek, 2001; Klančnik in sod., 2003). Postopek:

- 1 ml 18-urne bakterijske kulture *S. Enteritidis* (ali njene serijske razredčitve) smo dodali 1ml 18-urne bakterijske kulture *L. monocytogenes* (ali njene serijske razredčitve) in vzorec centrifugirali 5 min pri 13000 obratov/min
- odstranili smo supernatant in celicam dodali 100 µl mešanice 0,05 M NaOH in 0,125 % SDS v razmerju 1:1
- vzorce smo segrevali 15 min v vodni kopeli 94 °C in jih ohladili na ledu

3.2.6 Priprava reakcijske mešanice za PCR

Za vsak PCR smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice. V 0,2 ml Eppendorfovo mikrocentrifugirko smo dali 45 µl reakcijske mešanice in 5 µl lizata. Celotni volumen reakcijske mešanice z dodanim lizatom je za en vzorec tako vedno znašal 50 µl. V vsak PCR smo vključili tudi negativno in pozitivno kontrolo. Negativna kontrola je namesto lizata bakterij v reakcijski mešanici vsebovala H₂O_{PCR}. Pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes* je v reakcijski mešanici vsebovala lizat čiste kulture teh bakterij. Pozitivna kontrola za bakterije seva *S. Enteritidis* je v reakcijski mešanici vsebovala lizat čiste kulture omenjenih bakterij.

Sestava reakcijske mešanice za PCR je bila odvisna od tega, ali smo izvedli mPCR reakcijo po protokolu SALLIS1, SALLIS2, optimiziranem protokolu SALLIS2b oziroma če smo izvedli zaporedni PCR (nPCR). Sestave reakcijskih mešanic za PCR pri različnih protokolih so predstavljene v preglednicah 2 in 3.

Za encimsko reakcijo smo uporabili par oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 specifičnih za bakterije vrste *L. monocytogenes* in par oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 specifičnih za bakterije rodu *Salmonella*. Pri zaporednem PCR smo v reakcijski mešanici za PCR uporabili samo par oligonukleotidnih začetnikov specifičnih za bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Preglednica 2: Sestava reakcijskih mešanic za mPCR

PCR-mešanica	SALLIS1	SALLIS2	SALLIS2b po optimizaciji
Pufer PCR 10x	10 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %	10 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %	10 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %
MgCl ₂	1,7 mM	1,5 mM	2,0 mM
dNTP	200 μM	200 μM	200 μM
LM1	0,5 μM	1 μM	2 μM
LM2	0,5 μM	1 μM	2 μM
ST11	0,2 μM	1 μM	0,06 μM
ST15	0,2 μM	1 μM	0,06 μM
Polimeraza	1,25 U	1,25 U	1,25 U
Tween 20	0,2 %	0,2 %	0,2 %
V _{končni}	50 μl	50 μl	50 μl
V _{DNA}	5 μl	5 μl	5 μl
Časovno-temperaturni režim mPCR			
Začetna denaturacija	94 °C, 5 min (1 cikel)	95 °C, 1 min (1 cikel)	95 °C, 1 min (1 cikel)
Denaturacija	92 °C, 30 s	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s
Prileganje	59 °C, 80 s	55 °C, 15 s	59 °C, 15 s
Podaljševanje	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Število ciklov	35 ciklov	30 ciklov	30 ciklov
Končno podaljševanje	72 °C, 5 min (1 cikel)	72 °C, 8 min	72 °C, 8 min
Ohladitev	4 °C	4 °C	4 °C

Legenda:

V_{DNA}: volumen lizata bakterijskih celic

V_{končni}: volumen reakcijske mešanice po dodatku lizata bakterijskih celic

Preglednica 3: Sestava reakcijskih mešanic za nPCR

PCR-mešanica	SALLIS2b	LISTER 1
Pufer PCR 10x	10 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %	10 mM Tris-HCl (pH=9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %
MgCl ₂	2,0 mM	1,5 mM
dNTP	200 μM	200 μM
LM1	1 μM	1 μM
LM2	1 μM	1 μM
Polimeraza	1,25 U	1,25 U
Tween 20	0,2 %	0,2 %
V _{končni}	50 μl	50 μl
V _{DNA}	5 μl	5 μl
Časovno-temperaturni režim za PCR		
Začetna denaturacija	95 °C, 1 min (1 cikel)	95 °C, 1 min(1 cikel)
Denaturacija	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s
Prileganje	59 °C, 15 s	50 °C, 15 s
Podaljševanje	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Število ciklov	30 ciklov	25 ciklov
Končno podaljševanje	72 °C, 8 min	72 °C, 8 min
Ohladitev	4 °C	4 °C

Legenda:

V_{DNA}:volumen pomnožkov, ki smo jih dobili v predhodno izvedenem mPCR

V_{končni}:volumen reakcijske mešanice, po dodatku predhodno dobljenih pomnožkov

3.2.7 Dokazovanje pomnožkov z gelsko elektroforezo

Po končanem pomnoževanju smo preverili uspešnost reakcij z ločevanjem pomnožkov na agaroznem gelu. Pomnožke smo dokazovali na 1,5 % agaroznem gelu v pufru TAE 0,5 x (Karcher, 1995). 1,5 % agarozni gel smo pripravili tako, da smo v določenem volumnu pufru TAE 0,5 x raztopili potrebno količino agaroze. Agarozno raztopino smo v mikrovalovni pečici segrevali tako dolgo, da je postala bistra. Zmes smo ohladili na približno 60 °C, jo vlili v modelček in pustili strjevati 30 min. Tako pripravljen gel smo prenesli v aparat za elektroforezo.

Na agarozni gel smo nanесли 8 μl pomnožkov, katerim smo predhodno dodali 2 μl barvila za nanos pomnožkov. Na gel smo vedno nanесли tudi molekularni označevalec pomnožkov DNA (100 bp DNA Ladder). Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V. Po končani elektroforezi smo gel 15 min barvali v etidijevem bromidu (EtBr), ga nato opazovali pod UV svetlobo in ga računalniško dokumentirali.

Reakcija je bila uspešna – to pomeni PCR je bila pozitivna, ko smo dobili pomnožek prave dolžine (kot je bil pomnožek pozitivne kontrole), dovolj močne intenzitete in ko pri negativni kontroli ni bilo pomnožka. Velikost pomnožkov smo odčitali glede na velikost

fragmentov molekularnega označevalca. Velikost pomnožka 701 bp je pomenila prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* in velikost pomnožka 429 bp prisotnost bakterij seva *S. Enteritidis*.

3.2.8 Imunomagnetno koncentriranje

Kroglice za imunomagnetno koncentriranje listerij oziroma salmonel so magnetne kroglice iz polistirena, na katere so z kovalentnimi vezmi vezana protitelesa specifična za listerije oziroma salmonelle. Sočasno imunomagnetno koncentriranje bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* smo izvedli po dveh postopkih.

3.2.8.1 Imunomagnetno koncentriranje bakterij po postopku A (Dynal, 2003)

- V 1,5 ml-epreveto smo odpipetirali 10 μ l suspenzije magnetnih kroglic za koncentriranje listerij in 10 μ l suspenzije magnetnih kroglic za koncentriranje salmonel.
- V epruveto smo dodali po 1 ml mešane kulture bakterij (18-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* in 18-urne kulture bakterij seva *S. Enteritidis*) in 20 min inkubirali na stresalniku pri 100 obr/min.
- Epruvete smo nato za 3 minute postavili v magnetno stojalo in jih občasno rahlo premešali. Nato smo iz epruвет odstranili supernatant in jih preložili v drugo stojalo.
- V epruveto smo dodali 1 ml pufra PBS-Tween in ponovili postopek koncentriranja z magnetnim stojalom.
- Magnetne kroglice smo še dvakrat sprali z dodatkom sterilne vode in ponavljali postopek koncentriranja kroglic z magnetnim stojalom.
- Po spiranju smo odpipetirali supernatant in dodali 20 μ l sterilne vode.
- Tako pripravljen vzorec smo uporabili za pripravo bakterijske DNA z alkalno lizo.

3.2.8.2 Imunomagnetno koncentriranje bakterij po postopku B (Hsieh in Tsen, 2001)

- V 1,5 ml-epreveto smo odpipetirali 10 μ l suspenzije magnetnih kroglic za koncentriranje listerij in 10 μ l suspenzije magnetnih kroglic za koncentriranje salmonel.
- V epruveto smo dodali po 100 μ l mešane kulture bakterij (18-urne kulture bakterij vrste *L. monocytogenes* in 18-urne kulture bakterij seva *S. Enteritidis*) in 900 μ l fiziološke raztopine ter jih 20 min inkubirali na stresalniku pri 100 obr/min.
- Nadaljevanje je bilo enako kot pri postopku A, ki je opisan v poglavju 3.2.8.1

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1 RAST BAKTERIJ RODU *Salmonella* in VRSTE *Listeria monocytogenes* V GOJIŠČU UPB

V prvem delu smo proučevali rast bakterij vrste *L. monocytogenes* in rodu *Salmonella* v gojišču UPB. Želeli smo preveriti, ali gojišče UPB omogoča sočasno namnožitev omenjenih bakterij do zadostne koncentracije za določitev z mPCR. V gojišče UPB smo tako dodali različne koncentracije bakterij vrste *L. monocytogenes* in/ali rodu *Salmonella* ter jih 24 ur inkubirali pri 35 °C.

Preglednica 4: Rast čistih in mešanih kultur bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* v gojišču UPB

Vzorec	N ₀ (cfu/ml)		N _{24h} (cfu/ml)	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. Enteritidis</i>
1	1,8 x 10 ²	0	6,9 x 10 ⁷	0
2	4,1 x 10 ³	0	1,0 x 10 ⁷	0
3	1,2 x 10 ⁴	0	2,3 x 10 ⁸	0
4	4,1 x 10 ⁴	0	1,1 x 10 ⁷	0
5	0	3,35 x 10 ⁴	0	5,9 x 10 ⁸
6	0	3,35 x 10 ⁴	0	4,1 x 10 ⁸
7	0	2,07 x 10 ¹	0	5,2 x 10 ⁷
8	1,5 x 10 ²	3,1 x 10 ²	5,0 x 10 ⁵	1,4 x 10 ⁸
9	1,5 x 10 ²	3,1 x 10 ³	4,2 x 10 ⁶	1,4 x 10 ⁸
10	1,5 x 10 ²	3,1 x 10 ⁴	8,0 x 10 ⁵	9,8 x 10 ⁷
11	1,8 x 10 ³	1,6 x 10 ¹	1,1 x 10 ⁴	2,3 x 10 ⁷
12	6,6 x 10 ³	2,07 x 10 ³	3,0 x 10 ⁴	4,9 x 10 ⁷
13	1,5 x 10 ³	3,1 x 10 ³	2,0 x 10 ⁶	1,6 x 10 ⁸
14	6,6 x 10 ⁴	2,07 x 10	6,0 x 10 ⁶	7,1 x 10 ⁷
15	1,2 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	7,9 x 10 ⁶	3,4 x 10 ⁷
16	1,2 x 10 ⁴	3,4 x 10 ⁴	6,9 x 10 ⁶	5,9 x 10 ⁷

Legenda:

N₀: začetno število bakterij

N_{24h}: število bakterij po 24-urni inkubaciji v gojišču UPB

Rezultati preučevanja rasti bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v obogatitvenem gojišču UPB so zbrani v preglednici 4. Bakterije rodu *Salmonella* se v gojišču UPB namnožijo najmanj do koncentracije 10⁷ cfu/ml, ne glede na prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Bakterije vrste *L. monocytogenes* se kot čista kultura namnožijo do najmanj 10⁷ cfu/ml, v mešani kulturi z bakterijami rodu *Salmonella* pa najmanj do 10⁴ cfu/ml.

Iz rezultatov je razvidno, da bakterije vrste *L. monocytogenes* v gojišču UPB rastejo počasneje kot bakterije rodu *Salmonella*, vendar se obe skupini bakterij po 24-urni inkubaciji v gojišču UPB namnožita najmanj do koncentracije 10^4 cfu/ml.

Ker je občutljivost metode PCR običajno 10^3 cfu/ml, patogeni mikroorganizmi pa so lahko v živilih prisotni v nižjem številu je obogatitev vzorca v obogatitvenih gojiščih pred samo PCR reakcijo nujna (Kuchta, 2006b). Rezultati eksperimentalnega dela so pokazali, da se bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* po sočasni inkubaciji v UPB namnožita najmanj do koncentracije 10^4 cfu/ml, kar je nad mejo običajne občutljivosti PCR. Gojišče UPB se je tako izkazalo kot učinkovito gojišče za sočasno obogatitev omenjenih skupin bakterij do koncentracij potrebnih za določitev z mPCR. Sočasna obogatitvena kultivacija predstavlja enostavnejši in cenejši način dela, v primerjavi z dosedanjimi postopki detekcije omenjenih bakterij. Običajno se namreč za določanje obeh skupin bakterij uporablja ločena obogatitev – obogatitev posamezne skupine bakterij v najprimernejšem obogatitvenem gojišču.

Študiji, ki so ju opravili Hsieh in Tsen (2001) ter Bailey in Cox (1992) sta dali podobne rezultate. Bakterije rodu *Salmonella* se v enakovredni mešanici z bakterijami vrste *Listeria monocytogenes* namnožijo do koncentracije 10^9 cfu/ml, medtem ko se bakterije vrste *Listeria monocytogenes* v enakovredni mešanici z bakterijami rodu *Salmonella* namnožijo do koncentracije 10^6 cfu/ml. Rast listerij je v prisotnosti salmonel inhibirana za 10^3 cfu/ml, kar je najbrž posledica tekmovanja v rasti. Zhao in Doyle (2001) sta vrednotila rast bakterij *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* in *Listeria monocytogenes* v UPB. Bakterije so bile predhodno izpostavljene temperaturnim šokom. Študija je pokazala, da se po samo 6-urni inkubaciji v gojišču UPB, omenjeni skupini bakterij ne namnožita do zadostne koncentracije za določitev z PCR, ampak to zagotavlja šele 24-urna inkubacija v UPB. Vzrok je najbrž v tem, da bakterije prve štiri ure potrebujejo za okrevanje po temperaturnem šoku in šele potem začno pospešeno rasti.

Bhagwat in sod. (2003) navajajo uporabo UPB gojišča za sočasno obogatitev bakterij *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* v umetno kontaminiranih vzorcih zelenjave. Po sočasni inkubaciji v gojišču UPB so lahko z PCR v realnem času določili bakterije vrste *L. monocytogenes* do koncentracij 10^2 – 10^3 cfu/ml in *S. Typhimurium* 1–10 cfu/ml.

Paternoster (2009) je določala bakterije *S. Enteritidis* in *L. monocytogenes* s PCR v realnem času v kravjem mleku. Zaradi slabih rezultatov pomnoževanja bakterijske DNA neposredno iz vzorcev mleka, je izvedla predhodno obogatitev v gojišču UPB in tako določila obe skupini bakterij do koncentracije 10 cfu/ml. Študija je pokazala, da naravna mikroflora prisotna v mleku ni imela inhibitornega učinka na rast bakterij v gojišču in sam potek encimske reakcije. Rezultati so pokazali, da samo gojišče UPB nima vpliva na učinkovitost encimske reakcije, kar so potrdili tudi številni drugi avtorji (Bhagwat, 2003; Bhaduri in Cottrell, 2001).

4.2 IZBIRA RAZMER SOČASNEGA POMNOŽEVANJA SPECIFIČNEGA DELA DNA BAKTERIJ RODU *Salmonella* in VRSTE *L. monocytogenes*

Namen našega dela je bil razviti postopek mPCR za sočasno določitev bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*. Pravilna izbira oligonukleotidnih začetnikov je ključni element pri izvedbi mPCR. Pri oblikovanju postopka mPCR je bilo potrebno izbrati takšne oligonukleotidne začetnike, ki jih med seboj lahko kombiniramo. Sledila je postavitev protokola mPCR, ki je dovoljeval optimalno pomnoževanje obeh zelenih delov DNA, kot če bi jih pomnoževali posamično.

4.2.1 Izbira oligonukleotidnih začetnikov

Priporočena dolžina oligonukleotidnih začetnikov za PCR je 18–28 bp, vsebnost gvanina in citozina 50–60 %, imeli naj bi podobne temperature tališča. Temperaturo tališča (T_m) smo izračunali po formuli $T_m = 2(A + T) + 4(G + C)$. Teoretična temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov je 5 °C pod temperaturo tališča. Oligonukleotidna začetnika tudi ne smeta biti komplementarna na 3'-koncu, da preprečimo tvorbo dimerov (Innis in Gelfand, 1990). Razlika v velikosti dobljenih dveh specifičnih pomnožkov mora biti dovolj velika, da sta oba pomnožka ločena in lepo vidna na agaroznem gelu.

Za pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* smo izbrali oligonukleotidna začetnika LM1 in LM2, ki pomnožita 701 bp dolg del DNA, specifičen za bakterije vrste *L. monocytogenes* (Border in sod., 1990). LM1/LM2 sta bila izbrana iz sekvenčnih podatkov za gen *hly A*, ki določa za bakterije vrste *L. monocytogenes* specifičen listeriolizin O. Številni avtorji so potrdili dobro občutljivost in specifičnost omenjenih oligonukleotidnih začetnikov (Lawrence in Gilmour, 1994; Herman, 1997; Karpiškova in sod., 2000; Aznar in Alarcon, 2002; Rijpens in Herman, 2004; Lenček, 2005; Conter in sod., 2009).

Za pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij rodu *Salmonella* smo izbrali oligonukleotidna začetnika ST11 in ST15, ki so ju razvili Aabo in sodelavci (1993) in pomnožita 429 bp dolg del DNA specifičen za bakterije rodu *Salmonella*. Avtorji so določili optimalno temperaturo prileganja in ugotovili, da metoda dopušča široko variiranje temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov brez izgube specifičnosti. ST11 in ST15 sta bila izbrana iz 2.3 kb fragmenta DNA - JE0402-1. Dobro specifičnost navedenih oligonukleotidnih začetnikov so potrdili številni raziskovalci, zato smo jih uporabili tudi v naši študiji (Soumet in sod., 1994; Rijpens in sod., 1999; Trkov in sod., 1999; Piknova in sod., 2002; Lenček, 2005; Paternoster, 2009; Yildirim in sod., 2011; Pui in sod., 2011).

Glavne lastnosti izbranih oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 in ST11/ST15 so prikazane v preglednici 5.

Preglednica 5: Lastnosti oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2

Oznaka	Specifičnost	Sekvenca (5'→3')	CG (%)	T _m (°C)	Velikost pomnožka (bp)
ST11	<i>Salmonella</i>	AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGCA	48	74	429
ST15		GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG	54,2	74	
LM1	<i>L. monocytogenes</i>	CCT AAG ACG CCA ATC GAA	50	54	701
LM2		AAG CGC TTG CAA CTG CTC	55,5	56	

Legenda:

CG.....gvanin in citozin

T_m.....temperatura tališča

4.2.2 Postavitev protokola mPCR

V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo postavili protokol mPCR, ki z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15 in LM1/LM2 dovoljuje sočasno pomnoževanje DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* in rodu *Salmonella*.

Preglednica 6: Sestava reakcijskih mešanic in časovno-temperaturna režima PCR za določanje bakterij rodu *Salmonella* (Aabo in sod., 1993) in vrste *L. monocytogenes* (Border in sod., 1990)

PCR-mešanica	Aabo in sod. (1993)	Border in sod. (1990)
Tris-HCL(pH 8,3)	10 mM	10 mM
KCL	50 mM	50 mM
MgCL ₂	2,5 mM	1,5 mM
dNTP	200 μM	200 μM
ST11	1 μM	/
ST15	1 μM	/
LM1	/	3 μl (0,1mg /ml)
LM2	/	3 μl (0,1mg /ml)
Polimeraza	2,5 U	2,5 U
Tween 20	0,5 %	/
Gelatina	0,02 %	0,01 %
V _{končen}	100 μl	50 μl
V _{DNA}	5 μl	5 μl
Časovno-temperaturni režim za PCR		
Začetna denaturacija	/	95 °C, 4 min
Denaturacija	94 °C, 60 s	95 °C, 1min
Prileganje	57 °C, 60 s	50 °C, 2s
Podaljševanje	72 °C, 120 s	72 °C, 1min
Število ciklov	30 ciklov	29 ciklov
Končno podaljševanje	72 °C, 10 min (1c)	72 °C, 8 min
Ohladitev	4 °C	4 °C

Legenda:

V_{DNA}: volumen lizata bakterijskih celic

V_{končni}: volumen reakcijske mešanice po dodatku lizata bakterijskih celic

Za izhodišče smo izbrali protokol, ki so ga razvili Aabo in sod. (1993) za določanje bakterij rodu *Salmonella* z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 in protokol, ki so ga razvili Border in sod. (1990) za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2. Sestava reakcijskih mešanic za PCR ter temperaturno-časovna režima omenjenih protokolov sta predstavljena v preglednici 6. Prvi protokol SALLIS1 smo povzeli po Li in sod. (2000) in ga delno modificirali. Drugi protokol SALLIS2 smo izbrali sami glede na optimalne koncentracije kemikalij, ki se uporabljajo pri PCR, če mešanica vsebuje le en par oligonukleotidnih začetnikov.

Glede na koncentracije kemikalij za PCR, ki so jih v svojih metodah uporabili Aabo in sod. (1993) ter Border in sod. (1990) smo sestavili protokol mPCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* in ga poimenovali SALLIS2. Sestava reakcijskih mešanic in časovno-temperaturna režima metode SALLIS1 in metode SALLIS2 sta podani v preglednici 7.

Preglednica 7: Sestava reakcijskih mešanic za mPCR in časovno-temperaturna režima pri protokolih SALLIS1 in SALLIS2

PCR-mešanica	SALLIS1	SALLIS2
Pufer PCR 10x	10 mM Tris-HCl (pH = 9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %	10 mM Tris-HCl (pH = 9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %
MgCl ₂	1,7 mM	1,5 mM
dNTP	200 μM	200 μM
LM1	0,5 μM	1 μM
LM2	0,5 μM	1 μM
ST11	0,2 μM	1 μM
ST15	0,2 μM	1 μM
Polimeraza	1,25 U	1,25 U
Tween 20	0,2 %	0,2 %
V _{končni}	50 μl	50 μl
V _{DNA}	5 μl	5 μl
Časovno temperaturni režim za PCR		
Začetna denaturacija	94 °C, 5min (1 cikel)	95 °C, 1min (1 cikel)
Denaturacija	92 °C, 30 s	95 °C, 15 s
Prileganje	59 °C, 80 s	55 °C, 15 s
Podaljševanje	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s
Število ciklov	35 ciklov	30 ciklov
Končno podaljševanje	72 °C, 5 min (1 cikel)	72 °C, 8 min
Ohladitev	4 °C	4 °C

Legenda:

V_{DNA}: volumen lizata bakterijskih celic

V_{končni}: volumen reakcijske mešanice po dodatku lizata bakterijskih celic

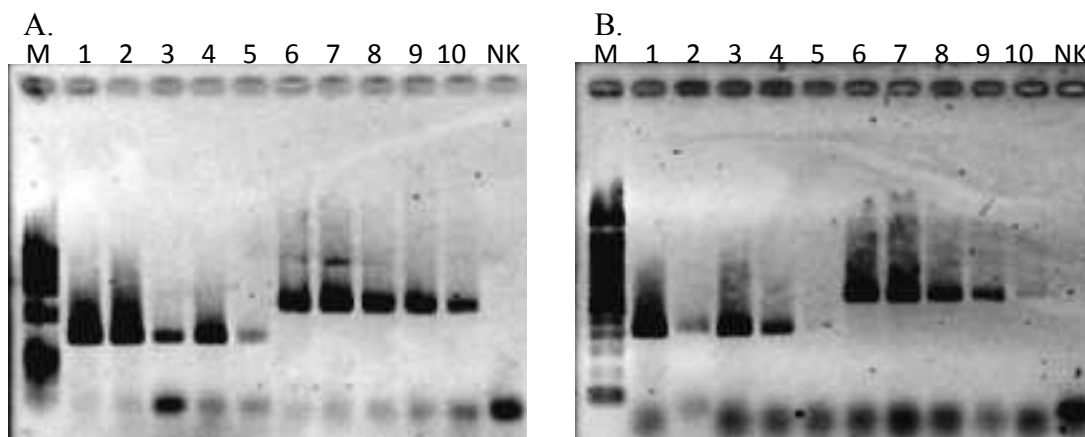
4.3 OBČUTLJIVOST mPCR PO PROTOKOLIH SALLIS1 IN SALLIS2

V drugem delu smo primerjali občutljivost mPCR, ki smo ga povzeli po Li in sod. (2000) (SALLIS1), z rezultati mPCR v katerem smo spremenili koncentracije $MgCl_2$, oligonukleotidnih začetnikov ter samo shemo pomnoževanja (protokol SALLIS2).

Občutljivost mPCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* smo določili z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15, specifičnima za rod *Salmonella* in oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2, specifičnima za vrsto *L. monocytogenes*. Pomnožke smo dokazali z gelsko elektroforezo in barvanjem z EtBr. Na slikah agaroznih gelov je tako 701 bp velik pomnožek značilen za bakterije vrste *L. monocytogenes* in 429 bp velik pomnožek značilen za bakterije rodu *Salmonella*.

4.3.1 Občutljivost mPCR za določanje čistih kultur bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*

Občutljivost mPCR za določanje čistih kultur bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* po dokazovanju pomnožkov z gelsko elektroforezo, je bila nekoliko boljša po protokolu SALLIS1 (Slika 6 (A.)). S protokolom SALLIS1 smo lahko določili čisti kulturi obeh bakterij do koncentracije 10^3 cfu/ml, medtem ko smo ju z protokolom SALLIS2 lahko določili do koncentracije 10^4 cfu/ml. Rezultati so prikazani na sliki 6.



Slika 6: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) s čistimi kulturami bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes*

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: $1,8 \times 10^7$ cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*

2: $1,8 \times 10^6$ cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*

3: $1,8 \times 10^5$ cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*

4: $1,8 \times 10^4$ cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*

5: $1,8 \times 10^3$ cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*

6: $1,7 \times 10^7$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*

7: $1,7 \times 10^6$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*

8: $1,7 \times 10^5$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*

9: $1,7 \times 10^4$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*

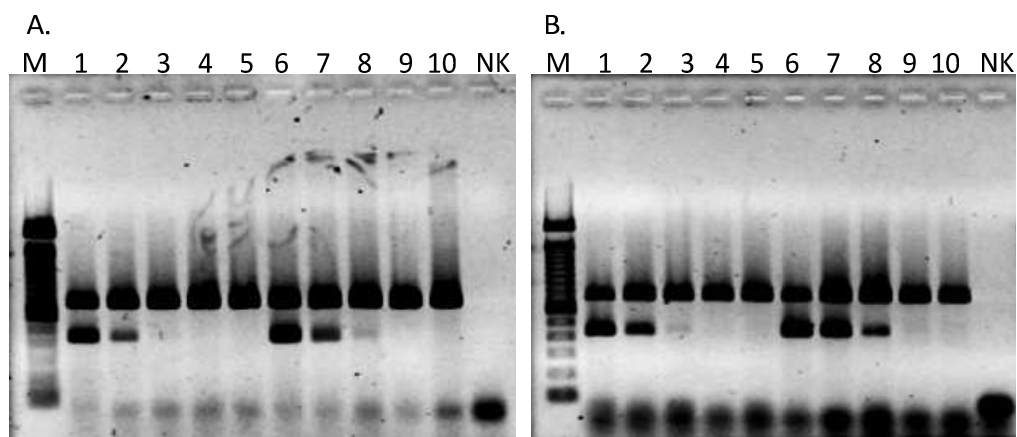
10: $1,7 \times 10^3$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola

4.3.2 Občutljivost mPCR za sočasno določanje mešanih kultur bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*

V nadaljevanju smo primerjali občutljivost sočasnega določanja obeh skupin bakterij v mešanih kulturah z mPCR po protokolu SALLIS1 z občutljivostjo mPCR v mešanih kulturah po protokolu SALLIS2.

Vzorci smo pripravili tako, da smo različnim koncentracijam bakterij seva *S. Enteritidis* dodali različne koncentracije bakterij vrste *L. monocytogenes* in izvedli alkalno lizo. Reakcijski mešanici za oba mPCR sta vsebovali oligonukleotidna začetnika specifična za rod *Salmonella* (ST11/ST15) in oligonukleotidna začetnika specifična za vrsto *L. monocytogenes* (LM1/LM2). Po alkalni lizi vzorcev smo izvedli mPCR po obeh protokolih. Vzorci z oznako NK so bili negativne kontrole, ki so namesto obeh tarčnih DNA vsebovali vodo (H_2O_{PCR}). Rezultati sočasnega določanja obeh bakterij so bili vedno pozitivni, kadar smo dobili na agaroznem gelu na eni progi dva specifična pomnožka: 701 bp velik pomnožek značilen za bakterije vrste *L. monocytogenes* in 429 bp velik pomnožek značilen za bakterije rodu *Salmonella*. Rezultati sočasnega določanja obeh skupin bakterij z mPCR v mešanih kulturah so prikazani na slikah 7 in 8.



Slika 7: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) pri mešanih kulturah bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* s koncentracijami 10^7 in 10^6 cfu/ml

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

3: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^4 cfu/ml *S. Enteritidis*

5: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^3 cfu/ml *S. Enteritidis*

6: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

7: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

8: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

9: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^4 cfu/ml *S. Enteritidis*

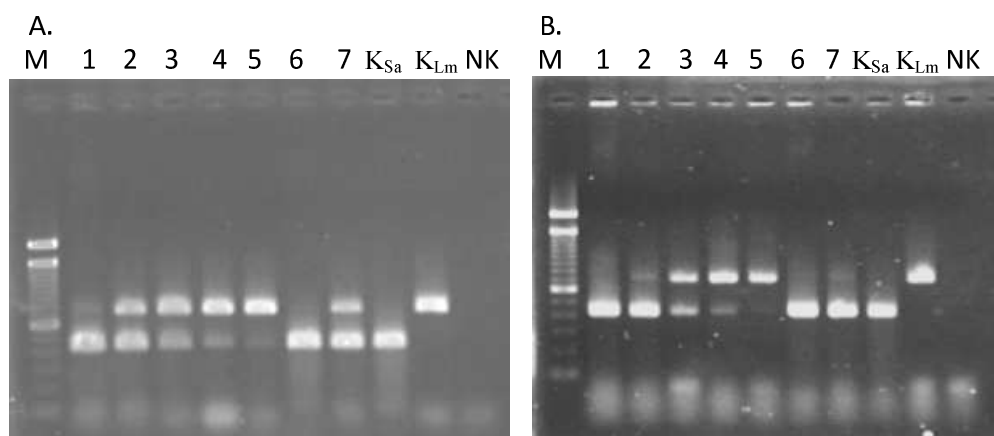
10: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^3 cfu/ml *S. Enteritidis*

NK: negativna kontrola

Na sliki 7 vidimo, da ko je vzorec vseboval 10^7 cfu/ml oziroma 10^6 cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes* in različno koncentracijo bakterij seva *S. Enteritidis*, smo bakterije vrste *L. monocytogenes* lahko določili z obema preizkušenima protokoloma. Bakterije

seva *S. Enteritidis* pa smo lahko z protokolom SALLIS1 določili do koncentracije 10^6 cfu/ml, z protokolom SALLIS2 pa do koncentracije 10^5 cfu/ml.

Na sliki 8 so prikazani rezultati določanja obeh skupin bakterij z mPCR, ko so vzorci vsebovali 10^5 cfu/ml oziroma 10^4 cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes* in različno koncentracijo bakterij seva *S. Enteritidis*. Z obema preizkušenima protokoloma smo lahko določili bakterije vrste *L. monocytogenes*, razen ko je bila razlika v koncentracijah obeh skupin bakterij 2 ali več logaritmskih stopenj (vzorca 1 in 6 na sliki 8) smo dobili negativen rezultat. Bakterije seva *S. Enteritidis* smo z obema protokoloma lahko določili do koncentracije 10^4 cfu/ml.



Slika 8: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR po protokolih SALLIS1 (A.) in SALLIS2 (B.) pri mešanih kulturah bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* s koncentracijami 10^5 in 10^4 cfu/ml

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

3: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^4 cfu/ml *S. Enteritidis*

5: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^3 cfu/ml *S. Enteritidis*

6: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

7: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

K_{Sa}: pozitivna kontrola za bakterije rodu *Salmonella*

K_{Lm}: pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola

V preglednici 8 so zbrani vsi rezultati sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v mešani kulturi z mPCR. Občutljivost sočasnega določanja obeh skupin bakterij v mešani kulturi po protokolu SALLIS1 je bila za bakterije rodu *Salmonella* 10^6 cfu/ml, ne glede na koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes*, in 10^6 cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes*, ne glede na koncentracijo bakterij rodu *Salmonella*.

Občutljivost sočasnega določanja obeh bakterij v mešani kulturi po protokolu SALLIS2 je bila za bakterije rodu *Salmonella* 10^5 cfu/ml, ne glede na koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes*, in 10^6 cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes*, ne glede na koncentracijo bakterij rodu *Salmonella*.

Iz rezultatov je razvidno, da smo pri vzorcih, kjer je bila razlika v koncentracijah omenjenih bakterij 2 ali več logaritamskih stopenj, včasih dobili lažno negativen rezultat. Pri mešanih kulturah, kjer je bila razlika v koncentracijah 2 ali več logaritamskih stopenj, smo z protokolom SALLIS2 dobili boljšo občutljivost (npr. slika 7, progri 8: vzorec z 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis* in 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes*).

Preglednica 8: Primerjava občutljivosti sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR po protokolih SALLIS1 in SALLIS2

SALLIS 1		<i>S. Enteritidis</i> (cfu/ml)				
		10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
<i>L. monocytogenes</i> (cfu/ml)	10^7	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -
	10^6	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -
	10^5	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -
	10^4	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -
	10^3	Lm: - Sa: +	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: - Sa: -
SALLIS 2		<i>S. Enteritidis</i> (cfu/ml)				
		10^7	10^6	10^5	10^4	10^3
<i>L. monocytogenes</i> (cfu/ml)	10^7	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -
	10^6	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -	Lm: + Sa: -
	10^5	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: -
	10^4	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +
	10^3	Lm: - Sa: +	Lm: - Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: + Sa: +	Lm: - Sa: -

Legenda:

Lm.....bakterije vrste *L. monocytogenes*

Sa..... bakterije seva *S. Enteritidis*

+specifičen pomnožek

-.....ni specifičnega pomnožka

Občutljivost mPCR za sočasno določanje obeh bakterij v mešani kulturi je bila nekoliko boljša po protokolu SALLIS2. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju za sočasno pomnoževanje specifičnih delov DNA omenjenih bakterij z mPCR uporabili protokol SALLIS2 in postopek optimizirali.

Rezultati sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR so pokazali omejitve postopka. Kadar je bila razlika v koncentracijah obeh bakterij, sicer nad mejo občutljivosti vendar večja ali enaka 10^2 cfu/ml, smo lahko za bakterije, ki so bile prisotne v manjšini, dobili negativen rezultat. Občutljivost metode za čiste kulture je bila 10^3 – 10^4 cfu/ml, občutljivost metode – ko gre za mešane kulture omenjenih bakterij, pa se je poslabšala. Tudi številni drugi avtorji so v svojih študijah prišli do zaključka, da je občutljivost metode mPCR za mešane kulture nižja v primerjavi z čistimi kulturami (Hsieh in Tsen, 2001; Germini in sod., 2009; Kim in sod., 2006). Najverjetneje prihaja do nekakšnega tekmovanja med oligonukleotidnimi začetniki za sestavine PCR-mešanice in na splošno do interakcij med obema reakcijama pomnoževanja.

Občutljivost našega mPCR-protokola je primerljiva z podatki iz različnih študij. Hsieh in Tsen (2001) navajata uspešno določitev bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* kadar je bila razlika med koncentracijama bakterijskih kultur manjša ali enaka 10^2 cfu/ml, ob predpostavki da koncentracija posamezne kulture bakterij ni bila manjša od praga občutljivosti metode (občutljivost metode za čiste kulture je bila 10^4 cfu/ml). Jofre in sod. (2005) so razvili protokol, ki je omogočal uspešno določitev obeh omenjenih skupin bakterij tudi kadar se je njuna koncentracija razlikovala za 3 log enote, vendar je bil prag občutljivosti metode slabši. Ko sta bili v vzorcu prisotni obe skupini bakterij v enakih koncentracijah so jih lahko sočasno določili do koncentracije 10^5 cfu/ml. Germini in sod. (2009) so razvili mPCR-protokol, za sočasno določanje bakterij *S. enterica*, *L. monocytogenes* in *E. coli* 0157:H7, ki je omogočal detekcijo vseh treh bakterij celo do koncentracije 10 cfu/ml, ko je šlo za čiste kulture bakterij. Občutljivost za mešane kulture omenjenih bakterij pa je bila občutno slabša in je znašala 10^6 cfu/ml.

4.4. OPTIMIZACIJA PROTOKOLA mPCR SALLIS2

Optimizacija mPCR je ključ do boljše občutljivosti, specifičnosti in ponovljivosti. Optimalne razmere za sočasno pomnoževanje obeh tarčnih DNA smo določili eksperimentalno.

Predhodni rezultati (preglednica 8) sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* so pokazali, da je občutljivost mPCR v mešanih kulturah omenjenih bakterij boljša po protokolu SALLIS2. Zato smo se odločili, da bomo skušali optimizirati mPCR po protokolu SALLIS2 tako, da bomo lahko z njim sočasno določili obe skupini bakteriji v modelni raztopini, v koncentracijah do katerih omenjeni bakteriji zrasteta v obogatitvenem gojišču UPB.

4.4.1 Temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov

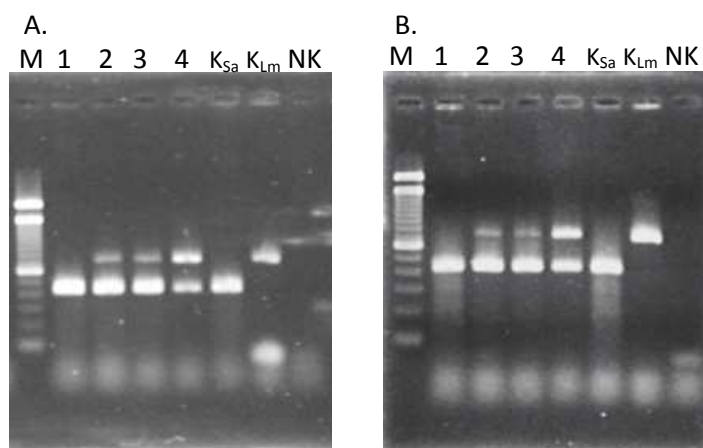
Prvi korak pri optimizaciji mPCR je bila izbira optimalne temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Za vzorce z oznakami 1, 2, 3, 4 (slika 9) smo pripravili reakcijsko mešanico za PCR po protokolu SALLIS2. Nato smo izvedli pomnoževanje s

programom SALLIS2, SALLIS2a in SALLIS2b. Razlika med posameznim programom je bila v temperaturi prileganja oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 9).

Preglednica 9: Primerjava časovno-temperaturnih režimov v programih SALLIS2, SALLIS2a in SALLIS2b

Stopnja reakcije	Program		
	SALLIS2	SALLIS2a	SALLIS2b
Denaturacija	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s	95 °C, 15 s
Prileganje	55 °C, 15 s	57 °C, 15 s	59 °C, 15 s
Podaljševanje	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s	72 °C, 30 s

Z zviševanjem temperature prileganja oligonukleotidnih začetnikov v mPCR iz 55 °C (SALLIS2), na 57 °C (SALLIS2a) oziroma na 59 °C (SALLIS2b) smo dobili enako intenzivne pomnožke (slika 9). Teoretična izračunana optimalna temperatura prileganja za oligonukleotidne začetnike ST11/ST15 in LM1/LM2 je 59,5 °C. Ker višja temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov zmanjša verjetnost za pomnoževanje nespecifičnih delov DNA smo se odločili, da bomo v nadaljevanju uporabljali temperaturo prileganja 59 °C (SALLIS2b).



Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR s programom SALLIS2a ($T_a=57$ °C) (A.) in s programom SALLIS2b ($T_a=59$ °C) (B.)

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)
1: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*
2: 10^5 cfu /ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu /ml *S. Enteritidis*
3: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*
4: 10^4 cfu/ ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu /ml *S. Enteritidis*

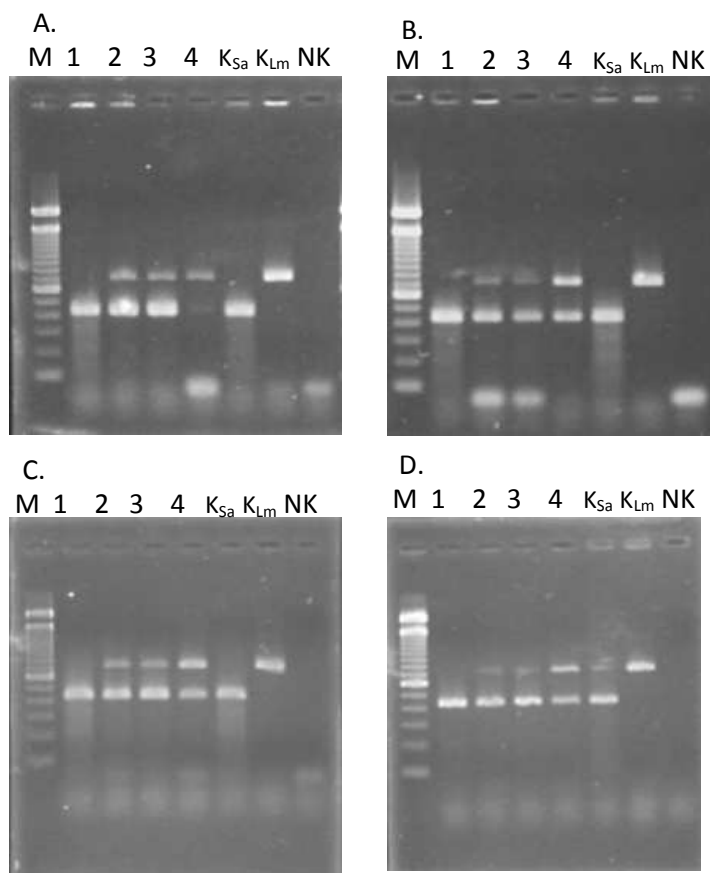
K_{Sa} : pozitivna kontrola za bakterije rodu *Salmonella*
 K_{Lm} : pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes*
NK: negativna kontrola
 T_a : temperatura prileganja oligonukleotidnih začetnikov

4.4.2 Koncentracija $MgCl_2$ v reakcijski mešanici za mPCR

Naslednji korak pri optimizaciji mPCR je bila izbira optimalne koncentracije $MgCl_2$ v reakcijski mešanici za mPCR. V mešanici za mPCR SALLIS2 smo zviševali koncentracijo $MgCl_2$ iz 1,5 mM na 1,7 mM, 2,0 mM oziroma 2,5 mM.

Za vzorce 1, 2, 3 in 4 (slika 10) smo tako pripravili 4 različne reakcijske mešanice, ki so se razlikovale po koncentraciji $MgCl_2$. Po alkalni lizi smo vzorce vstavili v aparaturo za PCR, kjer smo predhodno nastavili program SALLIS2b.

Iz rezultatov na sliki 10 je razvidno, da je pri nižji koncentraciji magnezijevih ionov slabša učinkovitost encimskega pomnoževanja DNA, medtem ko se pri višjih koncentracijah zmanjša natančnost prileganja oligonukleotidnih začetnikov. Zato smo za optimalno koncentracijo magnezijevih ionov izbrali 2,0 mM $MgCl_2$. Na splošno velja, da je koncentracija $MgCl_2$ v mPCR višja v primerjavi z običajnim PCR (Settani in Corsetti, 2007).



Slika 10: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR s programom SALLIS2b pri koncentraciji $MgCl_2$ 1,5 mM (A.), 1,7 mM (B.), 2,0 mM (C.) in 2,5 mM (D.)

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^5 cfu /ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu /ml *S. Enteritidis*

3: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^4 cfu/ ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

K_{Sa}: pozitivna kontrola za bakterije rodu *Salmonella*

K_{Lm}: pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola

4.4.3 Število ciklov mPCR in čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov

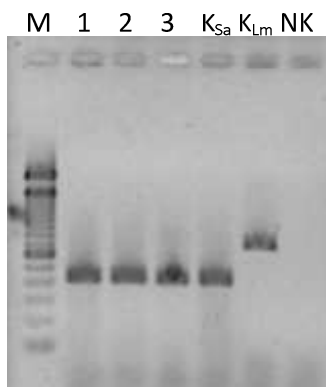
V nadaljevanju eksperimentalnega dela smo skušali izboljšati občutljivost mPCR z povečanjem števila ciklov v mPCR. Tako smo programu SALLIS2b povečali število ciklov iz 30 na 35 in upali, da bomo s tem postopkom povečali količino zelenega produkta. Rezultati naših predvidevanj niso potrdili, zato smo v nadaljevanju za sočasno določanje omenjenih bakterij uporabljali program SALLIS2b, ki je imel 30 ciklov.

Občutljivost mPCR smo poizkušali izboljšati tudi z podaljševanjem časa prileganja oligonukleotidnih začetnikov in sicer smo v programu SALLIS2b podaljšali čas prileganja oligonukleotidnih začetnikov pri 59 °C iz začetnih 15 s na 25 s. Rezultati so pokazali, da je občutljivost mPCR ostala enaka, zato smo v nadaljevanju uporabljali protokol SALLIS2b.

Povečanje števil ciklov v našem eksperimentalnem delu ni imelo zelenega učinka. Rijpens in sod. (1999) so v svoji študiji opazili, da povečanje števil ciklov iz 30 na 33, prinese izboljšanje občutljivosti PCR reakcije za določanje bakterij rodu *Salmonella* iz obogatitvenega gojišča. Vendar za rutinsko uporabo protokol, ki ima 35–40 ciklov odsvetujejo, ker to lahko ogrozi samo specifičnost reakcije. Tudi Kuchta (2006a) za rutinsko analizo priporoča uporabo PCR-protokola z nižjim številom ciklov, ki ima sicer lahko nižjo občutljivost in za boljšo občutljivost reakcije svetuje optimizacijo priprave vzorca.

4.4.4 Razredčevanje celičnega lizata

V nadaljevanju smo želeli preveriti vpliv bakterijskega lizata na učinkovitost encimske reakcije. Znano je namreč, da imata predvsem NaOH in SDS, ki smo ju uporabljali za alkalno lizo, lahko inhibitorni učinek na encimsko reakcijo. Po končani alkalni lizi vzorcev smo zato lizate 10-krat oziroma 100-krat razredčili z sterilno destilirano vodo (H_2O_{KEM}) in izvedli mPCR. Vzorec z oznako NK je namesto tarčnih DNA vseboval vodo (H_2O_{PCR}). Rezultati so prikazani na sliki 11.



Slika 11: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR po razredčevanju lizatov

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis* in 10^5 cfu/ml vrste *L. monocytogenes*

2: 10-krat razredčen lizat vzorca 1

3: 100-krat razredčen lizat vzorca 1

K_{Sa}: pozitivna kontrola za bakterije rodu *Salmonella*

K_{Lm}: pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola (vzorec vsebuje H₂O_{PCR})

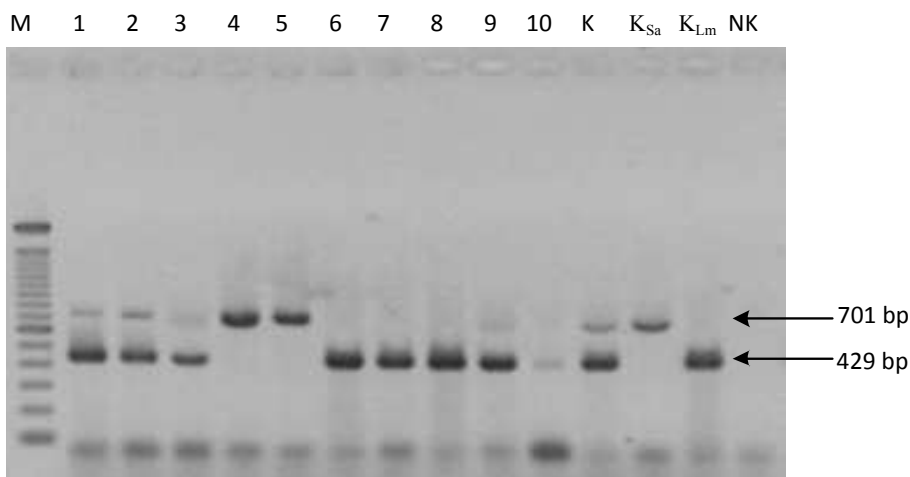
Predvidevali smo, da bomo z zmanjšanjem količine NaOH, SDS in drugih celičnih komponent v vzorcu, ki bi lahko zavirale delovanje DNA-polimeraze, izboljšali učinkovitost encimske reakcije. Rezultati naših predvidevanj niso potrdili. Na sliki 11 vidimo, da za bakterije, ki so prisotne v manjšini (*L. monocytogenes*) dobimo v vseh treh primerih negativen rezultat. Za bakterije, ki so prisotne v večini (*S. Enteritidis*) smo dobili enako intenzivne pomnožke, ne glede na predhodno razredčitev celičnega lizata.

Rossen in sod. (1991) so preučevali vpliv NaOH in SDS na učinkovitost PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*. Rezultati so pokazali, da NaOH do koncentracije 4 mM nima inhibitornega učinka na PCR, medtem ko dodatek samo 0,01 % SDS močno zmanjša učinkovitost. Zato je potrebno, da PCR-mešanici dodamo pravilno koncentracijo Tween 20, ki zmanjša inhibitorni učinek SDS. Dodatek Tween 20 vzorcem, ki niso vsebovali SDS je razkril, da ima tudi sam Tween 20 inhibitorni učinek na PCR. Zato je za uspešno PCR reakcijo potrebno dodati pravilno razmerje SDS in Tween 20.

4.4.5 Imunomagnetno koncentriranje

Rezultati optimizacije sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* so pokazali omejitev postopka. Kadar je bila razlika v koncentracijah obeh bakterij večja ali enaka 10^2 cfu/ml, smo lahko za bakterije, ki so bile prisotne v manjšini, dobili negativen rezultat. Zato smo se odločili za koncentriranje vzorca z uporabo imunomagnetnih kroglic. Vzorce smo pripravili na dva načina in jim dodali enako količino kroglic za imunomagnetno koncentriranje listerij oziroma salmonel. Po

imunomagnetnem koncentriranju bakterij in sledeči alkalni lizi, smo izvedli mPCR (slika 12).



Slika 12: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR po imunomagnetnem koncentriranju bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij seva *S. Enteritidis*

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

3: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^8 cfu/ml *L. monocytogenes*

5: 10^7 cfu/ml *L. monocytogenes*

6: 10^8 cfu/ml *S. Enteritidis*

7: 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

8: 10^6 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

9: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

10: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^4 cfu/ml *S. Enteritidis*

K: pozitivna kontrola za *Salmonella* in *L. monocytogenes*

K_{Sa}: pozitivna kontrola za bakterije rodu *Salmonella*

K_{Lm}: pozitivna kontrola za bakterije vrste *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola

Uporaba imunomagnetnih kroglic za koncentriranje listerij oziroma salmonel je občutljivost mPCR še poslabšala. Preizkus smo naredili na vzorcih, pri katerih smo brez uporabe imunomagnetnih kroglic lahko sočasno z mPCR določili obe skupini bakterij. Kot je razvidno iz slike 4.7, smo po imunomagnetnem koncentriranju in sledečem mPCR, dobili pozitiven rezultat za obe skupini bakterij, kadar so bile v vzorcu čiste kulture bakterij (vzorci 4, 5, 6, 7). Ko pa sta bili v vzorcu prisotni obe skupini bakterij, se je občutljivost predvsem za bakterije vrste *L. monocytogenes* zelo poslabšala.

Rezultati so pokazali, da bakterij vrste *L. monocytogenes* nismo mogli določiti z mPCR kadar smo vzorec predhodno razredčili z fiziološko raztopino in uporabili imunomagnetne kroglice (imunomagnetno koncentriranje po postopku B). Imunomagnetno koncentriranje po postopku B smo uporabili pri vzorcih 8, 9, 10 (slika 12). Kljub visoki koncentraciji bakterij vrste *L. monocytogenes* (10^6 cfu/ml) je bil rezultat po imunomagnetnem koncentriranju in sledečem mPCR za bakterije vrste *L. monocytogenes* negativen. Rezultati za bakterije seva *S. Enteritidis* so bili v vseh primerih pozitivni. Zaradi dvoma o sami specifičnosti vezave na imunomagnetne kroglice v nadaljevanju imunomagnetnega koncentriranja nismo več uporabljali.

V našem eksperimentalnem delu je tako uporaba imunomagnetnih kroglic občutljivost mPCR še poslabšala, kar je bilo popolnoma v nasprotju z pričakovani in podatki iz literature. Hsieh in Tsen (2001) namreč navajata, da sta z uporabo IMS po 24-urni inkubaciji v UPB lahko določila bakterije *L. monocytogenes* in *S. Typhimurium* tudi, ko je bila njuna začetna koncentracija v UPB različna za 10^5 cfu/ml. Za koncentriranje obeh skupin bakterij sta tako kot mi uporabila enako količino magnetnih kroglic za koncentriranje salmonel (Dynabeads anti-Salmonella) in magnetnih kroglic za koncentriranje listerij (Dynabeads anti-Listeria). Lynch in sod. (2004) poročajo, da se z uporabo enakih magnetnih kroglic za koncentriranje bakterij rodu *Salmonella* za 15,5 % izboljša občutljivost metode, v primerjavi s konvencionalnimi tehnikami določanja. Tudi Rijpens in sod. (1999) navajajo imunomagnetno koncentriranje kot uspešen nadomestek časovno zamudni sekundarni selektivni obogatitvi pri določanje bakterij rodu *Salmonella* z PCR. PCR so izvedli po 16-urni obogatitvi v BPW, ki ji je sledilo imunomagnetno koncentriranje. S tako postavljenim protokolom so v 20-urah določili bakterije rodu *Salmonella* v sladoledu, pasteriziranem jajčnem rumenjaku, mleku v prahu in sirih, ki so bili narejeni iz pasteriziranega mleka.

Vzrokov za slabe rezultate imunomagnetnega koncentriranja je lahko več. Lahko smo uporabili premajhno količino imunomagnetnih kroglic, saj smo uporabili polovično količino obeh vrst imunomagnetnih kroglic glede na navodila proizvajalca (Dynal, 2003). Zaradi slabih rezultatov smo podvomili tudi v specifičnost imunomagnetnih kroglic, posebno kroglic za imunomagnetno koncentriranje listerij. Rijpens in sod. (1999) so v svoji študiji prišli do zaključka, da magnetne kroglice do neke mere same po sebi privlačijo vse bakterije. Zato ne privlačijo samo bakterij, katerih protitelesa so vezane na njih ampak v določeni meri tudi ostale bakterije. Ugotovili so, da je afiniteta salmonel do imunomagnetnih kroglic za koncentriranje listerij in pa magnetnih kroglic brez specifičnih protiteles za salmonele, samo 10-krat nižja kot je njihova afiniteta do imunomagnetnih kroglic za koncentriranje salmonel. Tako smo najbrž z uporabo enakih količin obeh vrst imunomagnetnih kroglic nehote favorizirali bakterije vrste *S. Enteritidis*. Slab izkoristek imunomagnetnih kroglic za koncentriranje listerij so opazili tudi Hudson in sod. (2001), ko so razvili PCR metodo za določanje bakterij *L. monocytogenes* v šunki. IMS so uporabili za izolacijo in koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* direktno iz vzorcev šunke in se na ta način izognili časovno zamudnim obogatitvam in hkrati potencialnim inhibitorjem v šunki. Z imunomagnetnim koncentriranjem so skrajšali čas detekcije na 24 h, vendar je bil metoda limitirana s strani občutljivosti. Rezultati so pokazali, da je izkoristek imunomagnetnega koncentriranja samo 20 % (glede na dodane celice). Študija je pokazala, da spiranje magnetnih kroglic z namenom odstranitve potencialnih inhibitorjev v živilu, močno zmanjša sam izkoristek imunomagnetnega koncentriranja. Vsako spiranje imunomagnetnih kroglic naj bi poslabšalo izkoristek kar za 50 %.

4.4.6 Koncentracija oligonukleotidnih začetnikov

V reakcijski mešanici za mPCR SALLIS2b smo proučevali vpliv različnih koncentracij oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2 na samo učinkovitost sočasnega pomnoževanja obeh tarčnih DNA.

Iskanje optimalne koncentracije obeh parov oligonukleotidnih začetnikov je potekalo tako, da smo najprej pripravili lizat iz mešanice čistih kultur bakterij, ki je vsebovala 10^7 cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml bakterij seva *S. Enteritidis*. Za vzorec smo pripravili 25 različnih reakcijskih mešanic za PCR, ki so se med seboj razlikovale samo po koncentracijah obeh parov oligonukleotidnih začetnikov. Rezultati so prikazani v preglednici 10. Iz rezultatov t.i. »šahovnice« je razvidno, da smo oba specifična pomnožka dobili pri enakih koncentracijah obeh parov oligonukleotidnih začetnikov (50 pmol) in pri najnižji koncentraciji ST11/ST15 (3,125 pmol) v kombinaciji, ko smo v 50 μ l PCR mešanico dali po 100 pmol, 50 pmol in 25 pmol LM1/LM2.

Preglednica 10: Vpliv koncentracij oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2 na učinkovitost pomnoževanja specifičnih delov DNA bakterij rodu *Salmonella* in bakterij vrste *L. monocytogenes*

Vrsta in koncentracija oligonukleotidnih začetnikov		LM1/LM2 (pmol/50 μ l)									
		100		50		25		12,5		6,25	
ST11/ST15 (pmol/50 μ l)	50	(+)	+	+	+	-	+	-	+	-	+
	25	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+
	12,5	(+)	+	-	+	-	+	-	+	-	+
	6,25	(+)	+	(+)	+	-	+	-	+	-	+
	3,125	+	+	+	+	+	+	(+)	+	-	+
Pomnožek		Lm	Sa	Lm	Sa	Lm	Sa	Lm	Sa	Lm	Sa

Legenda:

LM1/LM2.....oligonukleotidna začetnika specifična za *L. monocytogenes*

ST11/ST15.....oligonukleotidna začetnika specifična za *Salmonella*

+.....pozitiven specifičen pomnožek

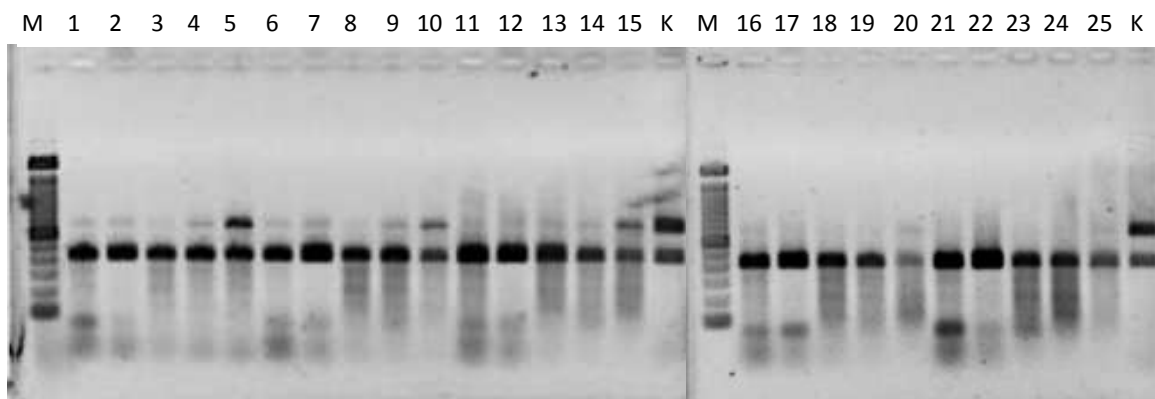
(+).....šibek pozitiven specifičen pomnožek

-.....ni specifičnega pomnožka

Lm.....bakterije vrste *L. monocytogenes*

Sa.....bakterije seva *S. Enteritidis*

Glede na rezultate smo v nadaljevanju na različnih vzorcih primerjali učinkovitost pomnoževanja po dodatku 3,125 pmol ST11/ST15 v kombinaciji s 100 pmol in 50 pmol LM1/LM2. Za optimalno razmerje med koncentracijami obeh parov oligonukleotidnih začetnikov smo izbrali mešanico za mPCR, ki je vsebovala 3,125 pmol ST11/ST15 in 100 pmol LM1/LM2, saj je bil pomnožek v tem primeru najboljši (slika 13, pomnožek na progi 5).



Slika 13: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR pri različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in LM1/LM2 v 50 µl reakcijski mešanici za mPCR

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 100 pmol LM1/LM2 in 50 pmol ST11/ST15

2: 100 pmol LM1/LM2 in 25 pmol ST11/ST15

3: 100 pmol LM1/LM2 in 12,5 pmol ST11/ST15

4: 100 pmol LM1/LM2 in 6,25 pmol ST11/ST15

5: 100 pmol LM1/LM2 in 3,125 pmol ST11/ST15

6: 50 pmol LM1/LM2 in 50 pmol ST11/ST15

7: 50 pmol LM1/LM2 in 25 pmol ST11/ST15

9: 50 pmol LM1/LM2 in 6,25 pmol ST11/ST15

10: 50 pmol LM1/LM2 in 3,125 pmol ST11/ST15

11: 25 pmol LM1/LM2 in 50 pmol ST11/ST15

12: 25 pmol LM1/LM2 in 25 pmol ST11/ST15

13: 25 pmol LM1/LM2 in 12,5 pmol ST11/ST15

14: 25 pmol LM1/LM2 in 6,25 pmol ST11/ST15

15: 25 pmol LM1/LM2 in 3,125 pmol ST11/ST15

K: pozitivna kontrola za *Salmonella* in *L. monocytogenes*

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

16: 12,5 pmol LM1/LM2 in 50 pmol ST11/ST15

17: 12,5 pmol LM1/LM2 in 25 pmol ST11/ST15

18: 12,5 pmol LM1/LM2 in 12,5 pmol ST11/ST15

19: 12,5 pmol LM1/LM2 in 6,25 pmol ST11/ST15

20: 12,5 pmol LM1/LM2 in 3,125 pmol ST11/ST15

21: 6,25 pmol LM1/LM2 in 50 pmol ST11/ST15

22: 6,25 pmol LM1/LM2 in 25 pmol ST11/ST15

23: 6,25 pmol LM1/LM2 in 12,5 pmol ST11/ST15

24: 6,25 pmol LM1/LM2 in 6,25 pmol ST11/ST15

25: 6,25 pmol LM1/LM2 in 3,125 pmol ST11/ST15

K: pozitivna kontrola za *Salmonella* in *L. monocytogenes*

4.4.7 Sestava reakcijske PCR-mešanice in časovno-temperaturni režim pri optimiziranem protokolu SALLIS2b

Glede na rezultate, ki smo jih dobili pri optimizaciji protokola mPCR in so predstavljeni v poglavju 4.4 smo postavili protokol mPCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in bakterij vrste *Listeria monocytogenes*. Sestava reakcijske PCR-mešanice in časovno-temperaturni režim pri optimiziranem protokolu SALLIS2b sta predstavljena v preglednici 11.

Preglednica 11: Sestava reakcijske mešanice za mPCR in časovno-temperaturni režim pri optimiziranem protokolu SALLIS2b

PCR-mešanica	SALLIS2b po optimizaciji
Pufer PCR 10x	10 mM Tris-HCl (pH = 9), 50 mM KCl, Triton X-100: 0,1 %
MgCl ₂	2,0 mM
dNTP	200 μM
LM1	2 μM
LM2	2 μM
ST11	0,06 μM
ST15	0,06 μM
Polimeraza	1,25 U
Tween 20	0,2 %
V _{končni}	50 μl
V _{DNA}	5 μl
Časovno-temperaturni režim za PCR	
Začetna denaturacija	95 °C, 1min (1 cikel)
Denaturacija	95 °C, 15 s
Prileganje	59 °C, 15 s
Podaljševanje	72 °C, 30 s
Število ciklov	30 ciklov
Končno podaljševanje	72 °C, 8 min
Ohladitev	4 °C

Legenda:

V_{DNA}: volumen lizata bakterijskih celic

V_{končni}: volumen reakcijske mešanice po dodatku lizata bakterijskih celic

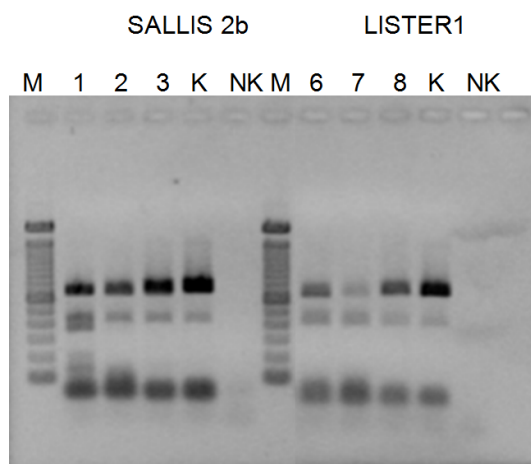
4.5 ZAPOREDNI PCR

Namen diplomskega dela je bila ustrezna izbira razmer za sočasno pomnoževanje specifičnih delov DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* z mPCR v koncentracijah, do katerih omenjeni skupini bakterij zrasteta v obogatitvenem gojišču UPB. Predhodni rezultati proučevanja skupne rasti omenjenih bakterij so pokazali, da bakterije seva *S. Enteritidis* po 24-urni sočasni inkubaciji v gojišču UPB zrastejo najmanj do 10⁷ cfu/ml, bakterije vrste *L. monocytogenes* pa najmanj do 10⁴ cfu/ml (preglednica 4). Z optimiziranim protokolom za mPCR (protokol SALLIS2b) smo tako lahko v koncentracijah, do katerih bakterije zrastejo v gojiščih UPB vedno določili bakterije rodu *Salmonella*, za bakterije vrste *L. monocytogenes* pa smo v prisotnosti bakterij rodu *Salmonella* dobili negativen rezultat. Kljub optimizaciji protokola mPCR nismo uspeli rešiti problema, ko je razlika v koncentracijah obeh bakterij večja od 10² cfu/ml lahko dobimo za bakterije v manjšini lažno negativen rezultat. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju bakterije *L. monocytogenes* določali z zaporednim PCR (nPCR) po mPCR.

Zaporedni PCR (nPCR) smo izvedli tako, da smo za tarčno DNA v novi encimski reakciji uporabili pomnožke mPCR in mešanico za PCR, ki ni vsebovala novega dodatka oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 za določanje bakterij rodu *Salmonella*. Po vsakem pomnoževanju smo količino produkta preverjali z gelsko elektroforezo.

Sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z zaporednim PCR je bilo sestavljeno iz dveh zaporednih PCR reakcij. Najprej smo pripravili reakcijsko mešanico za mPCR po optimiziranem protokolu SALLIS2b, ki je vsebovala 3,125 pmol oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in 100 pmol oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 ter nastavili aparaturo za PCR na program SALLIS2b. Dobljene pomnožke smo uporabili kot tarčno DNA v naslednjem nPCR.

Namen drugega, zaporednega PCR, je bilo predvsem določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, saj je reakcijska mešanica za nPCR vsebovala oligonukleotidne začetnike LM1/LM2. V ta namen smo preizkusili dva programa: protokol LISTER1, ki je bil predhodno optimiziran za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in naš protokol SALLIS2b, pri katerem smo namesto 100 pmol LM1/LM2 pri zaporednem dodali samo 50 pmol oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2. Razlika med omenjenima programoma je v količini $MgCl_2$, temperaturi prileganja oligonukleotidnih začetnikov in številu temperaturnih ciklov (preglednica 3). Rezultati so prikazani na sliki 14.



Slika 14: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z nPCR po programu SALLIS2b in programu LISTER1

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

3: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

5: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

6: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

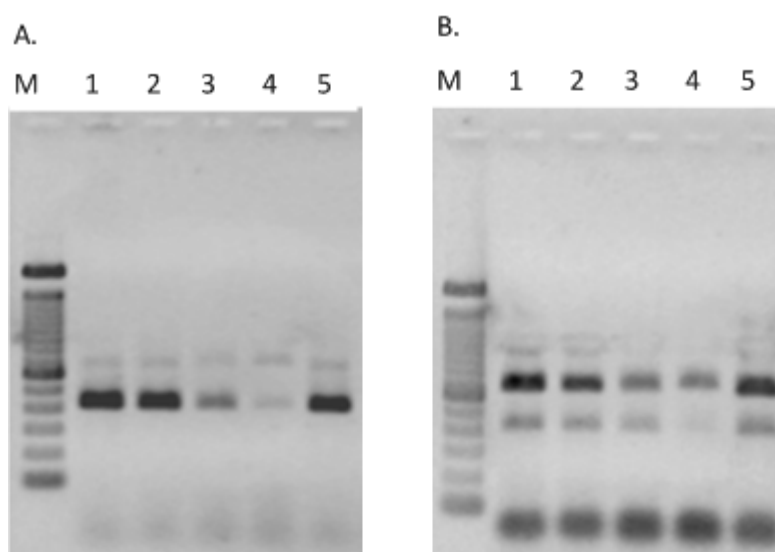
K: pozitivna kontrola za *Salmonella* in *L. monocytogenes*

NK: negativna kontrola

Glede na rezultate, prikazane na sliki 14, smo lahko pri vseh vzorcih z mPCR in sledečim nPCR sočasno določili bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z obema preizkušenima programoma za mPCR. Med preizkušenima programoma je bil boljši

program SALLIS2b, saj so bili pomnožki močnejši (proge 1, 2, 3 na sliki 14). Zato smo v nadaljevanju pri nPCR uporabljali program SALLIS2b.

Rezultati so pokazali, da je optimalna metoda za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* mPCR, ki mu sledi nPCR, v katerem smo uporabili program SALLIS2b. Na sliki 15 (A.) so prikazani rezultati sočasnega določanja obeh skupin bakterij z mPCR. Rezultati so bili pozitivni za bakterije rodu *Salmonella*, medtem ko smo za bakterije *L. monocytogenes* dobili negativne rezultate. Zato smo dobljene pomnožke uporabili kot tarčno DNA v nPCR in na ta način dobili pozitiven rezultat tudi za bakterije *L. monocytogenes* (slika 15 (B.)). Tako smo dosegli glavni namen našega dela, ki je bil sočasno določiti obe skupini bakterij tudi, če je razlika v koncentracijah omenjenih bakterij 2 ali več log enot.



Slika 15: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov, dobljenih z mPCR (A.) in nPCR (B.) za sočasno določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in rodu *Salmonella*

Legenda:

M: molekularni označevalec (100 bp DNA Ladder)

1: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^8 cfu/ml *S. Enteritidis*

2: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

3: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^6 cfu/ml *S. Enteritidis*

4: 10^5 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^5 cfu/ml *S. Enteritidis*

5: 10^4 cfu/ml *L. monocytogenes* in 10^7 cfu/ml *S. Enteritidis*

Občutljivost metode mPCR s sledečim nPCR je bila 10^4 cfu/ml za obe skupini bakterij v mešani kulturi. Vzorcev, ki so vsebovali nižjo koncentracijo obeh bakterij, nismo testirali.

S tako razvitim protokolom smo lahko sočasno določili obe skupini bakterij v vseh preizkušanih vzorcih in na ta način sočasno določili bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v modelni raztopini v tistih koncentracijah, do katerih zrastejo po 24-urni sočasni obogatitvi v gojišču UPB. Z nPCR smo tako lahko sočasno določili obe bakteriji tudi takrat, ko je bila razlika v njuni koncentraciji 3 log enote.

Glede na rezultate bi protokol lahko uporabili pri določanju prisotnosti omenjenih bakterij v živilih in sicer pri preiskavi živil po sočasni obogatitveni kultivaciji v gojišču

UPB. Gojišče UPB se je izkazalo kot primerno za sočasno obogatitev obeh omenjenih skupin bakterij, kljub dejstvu da je rast listerij v prisotnosti salmonel zmanjšana tudi za 10^3 cfu/ml (Bailey in Cox, 1992). Listerije se v gojišču UPB po 24-urah (preglednica 4) ob prisotnosti salmonel namnožijo najmanj do koncentracije 10^4 cfu/ml, salmonelle pa se v prisotnosti listerij namnožijo najmanj do koncentracije 10^7 cfu/ml, tudi ko je njuna začetna koncentracija zelo nizka (10 cfu/ml). Dosežene koncentracije po obogatitvi lahko določimo tudi z našim mPCR-protokolom, ki mu sledi nPCR, saj omogoča sočasno določitev obeh bakterij tudi takrat, ko je razlika v njuni koncentraciji enaka 10^3 cfu/ml. Rezultati so obetavni, saj bi na ta način skrajšali čas preiskave živil na manj kot 30 ur, zmanjšali količino dela in porabljenega materiala.

Klasična metoda za določanje bakterij *Salmonella* po standardu SIST EN ISO 6579: 2003/AC: 2004 (2004) v živilih traja 5 dni in 10 dni za določanje bakterij *L. monocytogenes* po standardu SIST EN ISO 11290-1: 1997/A1: 2005 (2005). Seveda bi to morali preveriti še z določitvijo obeh skupin bakterij direktno iz gojišča UPB.

Rezultati so primerljivi z metodo, ki sta jo razvila Hsieh in Tsen (2001) za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes*. Občutljivost mPCR za mešane kulture je bila enaka naši in je znašala 10^3 – 10^4 cfu/ml, kadar je bila koncentracij omenjenih bakterij enaka. Ko je bila koncentracija obeh skupin bakterij sicer nad mejo občutljivosti, vendar se je razlikovala za več kot 10^2 cfu/ml, pa je bil rezultat za bakterije v manjšini pogosto negativen. Za izboljšanje občutljivosti PCR sta uvedla predhodno 24-urno obogatitev v gojišču UPB in ugotovila, da se koncentracija omenjenih bakterij po obogatitvi v gojišču UPB razlikuje za več kot 10^3 cfu/ml. Zato sta pred postopkom mPCR uvedla imunomagnetno koncentriranje in tako lahko določila obe omenjeni skupini bakterij tudi kadar je bila razlika v njuni začetni koncentraciji 10^5 cfu/ml. Naš poizkus uporabe imunomagnetnih kroglic za koncentriranje omenjenih bakterij je občutljivost metode močno poslabšal, zato smo za uspešno detekcijo obeh bakterij po mPCR izvedli še nPCR.

Jofre in sod. (2005) so določali bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR v kuhanem pršutu. Občutljivost mPCR za mešane kulture omenjenih bakterij je bila 10^5 cfu/ml, ko je bila koncentracija obeh skupin bakterij enaka. Protokol mPCR je omogočal tudi pozitivno detekcijo obeh skupin bakterij, kadar je bila razlika v njuni koncentraciji večja od 10^3 cfu/ml. Rezultati so primerljivi z rezultati našega eksperimentalnega dela. Za uspešno detekcijo omenjenih bakterij v kuhanem pršutu so pred mPCR izvedli ločeno, 48 urno obogatitev gojišču BPW in HF in tako sočasno določili obe skupini bakterij v kuhanem pršutu do koncentracije 1 cfu/25 g. Dosežena občutljivost je zelo dobra, vendar naša predlagana sočasna 24-urna obogatitev v UPB predstavlja krajši, enostavnejši in cenejši način dela, ki bi glede na rezultate dobljene za mešane kulture omenjenih bakterij, tudi omogočala zadovoljivo občutljivost. Njihov preizkus sočasne obogatitve omenjenih bakterij v BPW se je izkazal za neuspešnega, saj pride do prevlade bakterij rodu *Salmonella* nad bakterijami vrste *L. monocytogenes* in posledično njeno neuspešno detekcijo z mPCR.

Bhagwat (2003) je z mPCR v realnem času sočasno določil bakterije vrst *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *Escherichia coli* v umetno kontaminiranih vzorcih

zelenjave (zeleno zelje, cvetača, koriander, mešana solata). Zelenjavo so oprali z umetno kontaminirano vodo, ki je vsebovala 1-1000 cfu/ml zgoraj omenjenih skupin bakterij. Vzorce so pred PCR sočasno obogatili v UPB. Občutljivost metode je bila za bakterije seva *S. Typhimurium* in vrste *E. coli* 1–10 cfu/ml in za bakterije vrste *L. monocytogenes* 1000 cfu/ml. Celoten postopek je trajal 30 ur.

Kim in sod. (2006) so z mPCR v pšeničnem zrnju določali bakterije vrste *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* po 24-urni sočasni obogatitvi v gojišču BPW. Občutljivost metode je bila 56 cfu/ml za bakterije vrste *E. coli*, 1800 cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes* in 54 cfu/ml za bakterije *S. Typhimurium*. Občutljivost za bakterije vrste *L. monocytogenes* se je izboljšala na 62 cfu/ml, kadar so v PCR uporabili samo oligonukleotidne začetnike specifične za te bakterije. Ugotovili so tudi, da se občutljivost metode za vse tri skupine bakterij močno poslabša, kadar ni predhodne obogatitve v gojišču BPW.

Germini in sod. (2009) so razvili mPCR metodo, za sočasno določanje bakterij vrst *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* in *E. coli* v umetno kontaminiranem jajcu, ki je bil predhodno pasteriziran. Občutljivost mPCR metode je bila 10 cfu/ml, ko je bila v vzorcu prisotna samo ena od omenjenih skupin bakterij in 10^6 cfu/ml, ko je vzorec vseboval enako koncentracijo vseh omenjenih bakterij. Občutljivost za mešane kulture bakterij je bila slabša v primerjavi z občutljivostjo našega PCR-protokola. Kljub temu so z mPCR lahko uspešno določili vse tri omenjene bakterije do koncentracije 10 cfu/25 g jajca, ko so pred mPCR izvedli sočasno, 15 urno obogatitev v gojišču TSB.

5 SKLEPI

Pri postavitvi protokola multiple verižne reakcije s polimerazo (mPCR) za določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* smo prišli do naslednjih ugotovitev:

- Univerzalno obogatitveno gojišče (UPB) omogoča sočasno namnožitev omenjenih skupin bakterij do koncentracij, ki so potrebne za njihovo določitev z mPCR.
- Bakterije rodu *Salmonella* se v gojišču UPB namnožijo najmanj do koncentracije 10^7 cfu/ml, ne glede na prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterije vrste *L. monocytogenes* se v gojišču UPB namnožijo najmanj do koncentracije 10^4 cfu/ml, ne glede na prisotnost bakterij rodu *Salmonella*.
- Para oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 (Border in sod., 1990) in ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993) sta primerna za sočasno določanje omenjenih bakterij z mPCR, saj ob optimizaciji encimske reakcije omogočata dobro občutljivost in specifičnost. Poleg tega sta njuna pomnožka ločena in lepo vidna na agaroznem gelu.
- S sočasnim določanjem bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* z mPCR smo lahko uspešno določili obe bakteriji, kadar je bila razlika v njuni koncentraciji manjša od 10^2 cfu/ml in ob predpostavki, da nobena od omenjenih bakterij ni bila v mešanici zastopana v koncentraciji, manjši od 10^6 cfu/ml.
- S sočasnim določanjem bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* z mPCR, ki mu je sledil zaporedni PCR (nPCR) smo lahko uspešno določili obe skupini bakterij, tudi ko je bila razlika v njuni koncentraciji enaka 10^3 cfu/ml. S tako postavljenim protokolom smo lahko sočasno določili obe skupini bakterij v koncentracijah, ki jih dosežeta po 24-urni obogatitvi v UPB.
- Glede na dobljene rezultate predlagan postopek določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* zajema 24-urno obogatitev v gojišču UPB, izvedbo mPCR, kateremu sledi nPCR.

6 POVZETEK

Bakterije rodu *Salmonella*, kot tudi vrste *L. monocytogenes*, so za človeka patogene bakterije, ki pogosto kontaminirajo živila. Za bakterije vrste *L. monocytogenes* je značilno, da preživijo niz tehnoloških operacij, saj so odporne na visoke koncentracije soli in relativno nizko vrednost pH. Posebno velik problem pa je njihova rast pri temperaturah hladilnika. Do okužb s salmonelami pride pogosto preko živil, kot posledica časovnega zamika med pripravo živila in njegovo porabo, saj se število celic lahko hitro poveča.

Salmoneloza je ena izmed najpogostejših bolezni, povezanih z zaužitjem živil, ki so kontaminirana s patogenimi bakterijami. Intenzivnost bolezni je odvisna od odpornosti organizma, količine zaužitih salmonel in seva. Večina ljudi preboli salmonelozo brez zapletov. Listerioza je sicer redka bolezen, ki ogroža predvsem rizične skupine ljudi, vendar je smrtnost najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano in se giblje med 20–50 %. Zato je pravočasno in natančna detekcija omenjenih bakterij v živilih izjemnega pomena za zdravstveno varstvo potrošnikov.

Klasične metode določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* so dolgotrajne, saj poleg dveh obogatitev ter izolacije omenjenih bakterij na selektivnih gojiščih zajemajo še njihovo biokemijsko in serološko identifikacijo. To pa pomeni veliko časa, dela in porabe materiala. Zato v zadnjem času prihajajo v ospredje metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR) kot visoko specifične, občutljive in časovno manj zamudne alternative standardnim metodam. Multipla verižna reakcija s polimerazo (mPCR) omogoča pomnoževanje več kot ene tarčne sekvence DNA znotraj ene same encimske reakcije, s čimer prihranimo veliko dela, časa in reagentov, v primerjavi z posamičnim pomnoževanjem omenjenih tarčnih DNA.

Namen našega dela je bil postavitvev protokola multiple verižne reakcije s polimerazo (mPCR) za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes*.

Pri razvoju metode sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* je bilo potrebno najprej poiskati gojišče, v katerem se omenjeni skupini bakterij lahko sočasno namnožita do zadostne koncentracije za določitev z mPCR. Ker je prag občutljivosti PCR metode okoli 10^3 cfu/ml, patogeni organizmi pa so v živilu lahko prisotni v nižjem številu, večina metod vključuje pred PCR obogatitev vzorca v obogatitvenih gojiščih. S tem korakom se lahko izognemo tudi lažno pozitivnim rezultatom, ki so posledica prisotnosti mrtvih celic v vzorcu. Rezultati so pokazali, da univerzalno obogatitveno gojišče (UPB) omogoča sočasno namnožitev omenjenih skupin bakterij do koncentracij, ki so potrebne za njihovo določitev z mPCR.

V drugem delu eksperimentalnega dela smo izbrali takšne razmere sočasnega pomnoževanja DNA, ki so dovoljevale sočasno pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij rodu *Salmonella* in hkrati pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij vrste *L. monocytogenes*. Za pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij rodu *Salmonella* smo

izbrali oligonukleotidna začetnika ST11 in ST15, ki so ju razvili Aabo in sodelavci (1993) in pomnožita 429 bp dolg del DNA specifičen za bakterije rodu *Salmonella*. Za pomnoževanje specifičnega dela DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* smo izbrali oligonukleotidna začetnika LM1 in LM2, ki pomnožita 701 bp dolg del DNA, specifičen za bakterije vrste *L. monocytogenes* (Border in sod., 1990). Preizkusili smo dva PCR-protokola. Prvi protokol SALLIS1 smo povzeli po Li in sod. (2000) in ga delno modificirali. Drugi protokol SALLIS2 smo izbrali sami, glede na optimalne koncentracije kemikalij, ki se uporabljajo pri PCR, če mešanica vsebuje le en par oligonukleotidnih začetnikov. Zaradi boljše občutljivosti smo protokol SALLIS2 v tretjem delu optimizirali tako, da smo lahko z njim sočasno določili obe omenjeni skupini bakterij v tistih koncentracijah, do katerih sočasno zrastejo v univerzalnem obogatitvenem gojišču (UPB). Določili smo, da je optimalna temperatura prileganja obeh parov oligonukleotidnih začetnikov 59 °C in čas prileganja 15 s, optimalna koncentracija MgCl₂ 2,0 mM, optimalno število ciklov 30, optimalna koncentracija oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 0,06 µM in oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 2 µM.

Občutljivost sočasnega določanja obeh bakterij v mešani kulturi po protokolu SALLIS2b je bila za bakterije rodu *Salmonella* 10⁵ cfu/ml, ne glede na koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes*, in 10⁶ cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes*, ne glede na koncentracijo bakterij rodu *Salmonella*. Rezultati sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z mPCR so pokazali omejitev postopka. Kadar je bila razlika v koncentracijah obeh bakterij, sicer nad mejo občutljivosti vendar večja ali enaka 10² cfu/ml, smo lahko za bakterije prisotne v manjšini, dobili negativen rezultat. Občutljivost metode smo poizkusili izboljšati tudi z imunomagnetnim koncentriranjem celic, ki pa se je izkazalo za neprimerno metodo. Predhodni rezultati proučevanja skupne rasti omenjenih bakterij so pokazali, da bakterije seva *S. Enteritidis* po 24-urni sočasni inkubaciji v gojišču UPB zrastejo najmanj do 10⁷ cfu/ml, bakterije vrste *L. monocytogenes* pa najmanj do 10⁴ cfu/ml. Z optimiziranim protokolom za mPCR smo tako lahko v koncentracijah do katerih bakterije zrastejo v gojiščih UPB, vedno določili bakterije rodu *Salmonella*, za bakterije vrste *L. monocytogenes* pa smo v prisotnosti bakterij rodu *Salmonella* dobili negativen rezultat. Zato smo se odločili, da bomo v nadaljevanju bakterije *L. monocytogenes* določali z zaporednim PCR (nPCR) po mPCR. Zaporedni PCR (nPCR) smo izvedli tako, da smo za tarčno DNA v novi encimski reakciji uporabili pomnožke mPCR in mešanico za PCR, ki ni vsebovala novega dodatka oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 za določanje bakterij rodu *Salmonella*.

S tako razvitim protokolom smo lahko sočasno določili obe skupini bakterij v vseh preizkušanih vzorcih in na ta način sočasno določili bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v modelni raztopini v koncentracijah, do katerih zrastejo po 24-urni sočasni obogatitvi v gojišču UPB. Z nPCR smo tako lahko sočasno določili obe bakteriji tudi takrat, ko je bila razlika v njuni koncentraciji enaka 10³ cfu/ml.

7 VIRI

- Aabo S., Rasmussen O. F., Rossen L., Sorensen P. D., Olsen J. E. 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7: 171–178
- Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1–47
- Aznar R., Alarcon B. 2002. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in food: A comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 109–119
- Border P. M., Howard J. J., Plastow G. S., Siggins K. W. 1990. Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *Letters in Applied Microbiology*, 11: 158–162
- Bailey J. S., Cox N. A. 1992. Universal preenrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods. *Journal of Food Protection*, 55, 4: 256–259
- Bhaduri S., Cottrell B. 2001. Sample preparations methods for PCR detection of *Escherichia coli* 0157: H7, *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes* on beef chuck shoulder using a single enrichment medium. *Molecular and Cellular Probes*, 15: 267–274
- Brehm-Stecher B. F., Johnson E. A. 2007. Rapid methods for detection of *Listeria*. V: *Listeria, listeriosis and food safety*. 3rd ed. Ryser E. T., Marth E. H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc: 257–277
- Broll H. 2010. Polymerase chain reaction. V: *Molecular, biological and immunological techniques and applications for food chemists*. Popping B., Diaz-Amigo C., Hoenicke K. (eds.). New Jersey, John Wiley & Sons, Inc: 41–58
- Bhagwat A. A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 217–224
- Conter M., Paludi D., Zanardi E., Ghidini S., Vergara A., Ianieri A. 2009. Characterization of antimicrobial resistance of foodborne *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 128: 497–500

- Churchill R. L. T., Lee H., Hall J. C. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *Journal of Microbiological Methods*, 64: 141–170
- Dynal. 2003. Product catalogue 2003. Oslo, Dynal, Inc.: 5–10
- Epidemiološko spremljanje prijavljenih nalezljivih bolezní v Sloveniji, 2009. 2010. Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja republike Slovenije: 98 str.
http://www.ivz.si/gradiva_nalezljive_bolezni?pi=5&_5_Filename=2491.pdf&_5_MediaId=2491&_5_AutoResize=false&pl=105-5.3. (1. 4. 2011)
- Gandhi M., Chikindas M. L. 2007. *Listeria*: A foodborne pathogen that knows how to survive. *International Journal of Food Microbiology*, 113: 1–15
- Garrity M. G., Bell A. J., Lilburn G.T. 2004. Taxonomic outline of the procarotes. V: *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 11th ed. New York, Springer: 121–122, 188–188
- Germini A., Masola A., Carnevali P., Marchelli R. 2009. Simultaneous detection of *Escherichia coli*, 0175:H7, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* by multiplex PCR. *Food Control*, 20: 733–738
- Gunson R., Gillespie G., Carman W. F. 2003. Optimization of PCR reactions using chessboarding. *Journal of Clinical Virology*, 26: 369–373
- Grunenwald H. 2003. Optimization of Polymerase Chain Reaction. V: *Methods in molecular biology: PCR protocols*. Vol. 226. 2nd ed. Bartlett J. M. S., Stirling D. (eds.). Totowa, Humana Press, Inc.: 89–97
- Henegariu O., Heerema N. A., Dlouhy S. R., Vance G. H., Vogt P. H. 1997. Multiplex PCR: Critical parameters and step-by-step protocol. *Biotechniques*, 23, 3: 504–511
- Helmick C. G., Griffin P. M., Addiss D.G., Tauxe R. V., Juranck D. D. 1994. Infectious diarrheas. V: *Digestive diseases in the United States: Epidemiology and impact*. Evenhart J. E. (ed.). Washington D. C., Gouvernment Printing Office, 3: 83–124
- Herman L. M. F., De Block J. H. G. E., Moermans R. J. B. 1995. Direct detection of *Listeria monocytogenes* in 25 mililiters of raw milk by two-step PCR with nested primers. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 817–819
- Herman L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology*, 14: 103–110
- Hsieh H. Y., Tsen H.Y. 2001. Combination of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for the simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in food samples. *Journal of Food Protection*, 64, 11: 1744–1750

- Hudson J. A., Lake R. J., Savill M. G., Scholes P., McCormick R. E. 2001. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in ham samples using immunomagnetic separation followed by polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 614–621
- Innis M. A., Gelfand D. H. 1990. Optimization of PCRs. V: PCR protocols: a guide to methods and applications. Innis M. A., Gelfand D. H., Sninsky J. J., White T. J. (eds.). San Diego, Academic Press, Inc.: 3–12
- Jeršek B. 2006. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 15-17, 19–20
- Jeršek B. 2009. Higiena živil: Laboratorijske vaje za študente živilstva in prehrane. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 25-34
http://www.bf.uni-lj.si/fileadmin/groups/2752/Higiena_zivil.pdf (1. 4. 2011)
- Jofre A., Martin B., Garriga M., Hugas M., Pla M., Rodriguez-Lazaro D., Aymerich T. 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22: 109–115
- Karpiškova R., Pejchalova M., Mokrošova J., Vytrasova J., Šmuharova P., Ruprich J. 2000. Application of chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *Listeria monocytogenes* in foodstuffs. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 267–271
- Kim J., Demeke T., Clear R. M., Patrick S. K. 2006. Simultaneous detection by PCR of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* in artificially inoculated wheat grain. *International Journal of Food Microbiology*, 111: 21–25
- Klančnik A., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vpliv priprave DNA na občutljivost odkrivanja bakterij *Listeria monocytogenes* s PCR. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani. *Kmetijstvo*, 81, 1: 65–74
- Kuchta T. 2006a. Polymerase chain reaction as a method for food analysis. V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (eds.). Bratislava, VUP Research Institute: 13-24
- Kuchta T. 2006b. Application of PCR to detection and quantification of pathogenic bacteria in food. V: Application of polymerase chain reaction to food analysis. Kuchta T., Drahovska H., Pangallo D., Siekel P. (eds.). Bratislava, VUP Research Institute: 27-33
- Karcher S. J. 1995. Molecular biology: a project approach. San Diego, Academic Press, Inc.: 81–87
- Lazcka O., Del Campo F. J., Munoz F. X. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1205–1217

- Lawrence L.M., Gilmour A. 1994. Incidence of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in a poultry processing environment and in poultry products and their rapid confirmation by multiplex PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2: 4600–4604
- Levin R. E. 2003. Application of the polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in foods: a review of methodology. *Food Biotechnology*, 17, 2: 99–116
- Lenček A. 2005. Sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* v živilih z metodo PCR. Diplomsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 23–24
- Li X., Boudjellab N., Zhao X. 2000. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 65: 167–177
- Lynch M. J. B., Leon-Velarde C. G., McEwen S., Odumeru J. A. 2004. Evaluation of automated immunomagnetic separation method for the rapid detection of *Salmonella* species in poultry environmental samples. *Journal of Microbiological Methods*, 58: 285–288
- Malorny B., Tassios P. T., Radstrom P., Cook N., Wagner M., Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 83: 39–48
- Medeiros D., Farber J. M. 2001. A single step polymerase chain reaction for combined gene detection and epidemiological typing of *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiology*, 18: 375–386
- Milohnoja M. 2003. Alimentarne infekcije in intoksikacije. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Smole Možina S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 117–139
- Olsen J. E. 2000. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International*, 33: 257–266
- Paternoster. H. 2009. Določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* v živilih s PCR v realnem času. Diplomsko delo. Ljubljana, Univ. v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 26–36, 39–39
- Persing D. H. 1993. Target selection and optimization of amplification reactions. V: *Diagnostic molecular microbiology: Principles and applications*. Persing D. H., Smith T. F., Tenover F. C., White T. J. (eds.). Washington D. C, American Society for Microbiology, Inc.: 88–104

- Piknova L., Štefanovičova A., Drahovska H., Sasik M., Kuchta T. 2002. Detection of *Salmonella* in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction-based method. *Food Control*, 13: 191–194
- Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2010. 2010. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 142 str.
http://www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/zoonoze/Program_monitoringa_zoonoz_za_leto_2010.pdf (1. 4. 2011)
- Pui C. F., Wong W.C., Chai L. C., Nillian E., Ghazali F. M., Cheah Y. K., Nakaguchi Y., Nishibuchi M., Radu S. 2011. Simultaneous detection of *Salmonella* spp, *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Typhimurium in sliced fruits using multiplex PCR. *Food Control*, 22: 337–342
- Rijpens N., Herman L., Vereecken F., Jannes G., De Smedt J., De Zutter L. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy in egg products using immunomagnetic separation and PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 46: 37–44
- Rijpens N., Herman L. 2004. Comparison of selective and nonselective primary enrichment for the detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 94: 15–22
- Rocourt J., Buchrieser C. 2007. The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: Phylogenetic position, taxonomy and identification. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E. T., Marth E. H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc.: 1–20
- Rossen L., Holmstrom K., Olsen J. E., Rasmussen O. F. 1991. A rapid polymerase chain reaction (PCR)-based assay for the identification of *Listeria monocytogenes* in food samples. *International Journal of Food Microbiology*, 14: 145–152
- Sauders B. D., Wiedmann M. 2007. Ecology of *Listeria* species and *L. monocytogenes* in the natural environment. V: *Listeria*, listeriosis and food safety. 3rd ed. Ryser E. T., Marth E. H. (eds.). New York, CRC Press, Taylor & Francis Group, Inc.: 21–54
- Settanni L., Corsetti A. 2007. The use of multiplex PCR to detect and differentiate food and beverage-associated microorganisms: A review. *Journal of Microbiological Methods*, 69: 1–22
- SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krme – Horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov – Tehnika štetja kolonij pri 30 °C (ISO 4833: 2003). 3 izd. = ISO 4833. Microbiology of food and animal feedingstuffs – Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony count technique at 30 (degree) C. 3rd ed. 2003: 9 str.
- SIST EN ISO 6579: 2003/AC: 2004. Mikrobiologija živil in krme – Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp. 2004: 6 str.

- SIST EN ISO 11290-1:1997/A1:2005. Mikrobiologija živil in krme - Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti in števila *Listeria monocytogenes*. Del 1, Metoda za ugotavljanje prisotnosti. Dopolnilo 1, Modifikacija medija za izolacijo in preskus hemolize ter vključitev podatkov o natančnosti (ISO 11290-1:1996/AM1:2004): 13 str.
- Soumet C., Ermel G., Fach P., Colin P. 1994. Evaluation of different DNA extraction procedures for the detection of *Salmonella* from chicken products by polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 19: 294–298
- Trkov M., Majerikova I., Jeršek B., Štefanovičova A., Rijpens N., Kuchta T. 1999. Detection of *Salmonella* in food over 30 h using enrichment and polymerase chain reaction. Food Microbiology, 16: 393–399
- Trkov M., Jeršek B. 2001. Vpliv različnih hitrih metod osamitve genomske DNA salmonel na občutljivost PCR = The effect of different rapid methods for isolation of *Salmonella* genomic DNA on PCR sensitivity. Zbornik Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 77, 1: 27–37
- Uyttendaele M., Troy P., Debevere J., 1999. Incidence of *Salmonella*, *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Listeria monocytogenes* in poultry carcasses and different types of poultry products for sale in the Belgian retail market. Journal of Food Protection, 62, 7: 735–740
- Vierstraete A. 1999. Principle of the PCR. Ghent, University of Ghent: 4 str.
<http://users.ugent.be/~avierstr/principles/pcr.html> (1. 4. 2011)
- Wray C. 2003. *Salmonella* / Properties and occurrence. V: Encyclopedia of food sciences and nutrition. Vol. 8. 2nd ed. Caballero B., Trugo L. C., Finglas P. M. (eds.). Amsterdam, Academic Press: 5074–5079
- Yan S. S., Pendrak L. M., Abela-Ridder B., Punderson W. J., Fedorko P. D., Foley L. S. 2003. An overview of *Salmonella* typing: Public health perspectives. Clinical and Applied Immunology Reviews, 4: 189–199
- Yang H., Qu L., Wimbrow A. N., Jiang X., Sun Y. 2007. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. International Journal of Food Microbiology, 118: 132–138
- Yildirim Y., Gonulalan Z., Pamuk S., Ertas N. 2011. Incidence and antibiotic resistance of *Salmonella* spp on raw chicken carcasses. Food Research International, 44: 725–728
- Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949–6958

Zhao T., Doyle M. P. 2001. Evaluation of universal preenrichment broth for growth of heat-injured pathogens. *Journal of Food Protection*, 64, 11: 1751–1755

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za vse usmeritve in strokovno pomoč pri nastajanju diplomske naloge. Hvala za vaš trud, spodbude, stalno dosegljivost in dobro voljo.

Zahvaljujem se tudi recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina za hiter in strokoven pregled diplomske naloge.

Posebna zahvala gre staršem in Primožu za stalno podporo in razumevanje skozi vsa leta študija. Hvala, ker ste ves ta čas verjeli vame.

Hvala!