

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Sebastjan LEDINEK

**DOLOČANJE BAKTERIJ VRST *SALMONELLA ENTERICA* IN
LISTERIA MONOCYTOGENES S PCR V REALNEM ČASU**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2006

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Opavljeno je bilo v laboratoriju Katedre za živilsko mikrobiologijo na Oddelku za živilstvo in genskem laboratoriju Katedre za biotehnologijo, Oddelka za živilstvo na Biotehniški fakulteti 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:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Sebastjan Ledinek

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
DK UDK 579.67.083:577.2.083(043)=863
KG mikrobiološke metode/patogene bakterije/določanje bakterij/*Salmonella enterica*/*Listeria monocytogenes*/PCR v realnem času/občutljivost PCR v realnem času/specifičnost PCR v realnem času
AV LEDINEK, Sebastjan
SA JERŠEK, Barbara (mentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI 2006
IN DOLOČANJE BAKTERIJ VRST *Salmonella enterica* IN *Listeria monocytogenes* S PCR V REALNEM ČASU
TD Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP XI, 65 str., 20 pregl., 26 sl., 61 vir.
IJ sl
JI sl/en
- AI Bakterije vrste *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* so patogene bakterije, ki povzročajo salmonelozo oziroma listeriozo. Določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* s klasičnimi mikrobiološkimi metodami je zamudno. V našem delu smo uvedli in postavili metodi PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*. Izhodišče sta bili metodi klasičnega PCR z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 za bakterije vrste *S. enterica* in LM1/LM2 za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 je bila $10^1 - 10^2$ cfu/ml, kar je boljše kot pri klasičnem PCR, kjer je bila občutljivost 10^3 cfu/ml. Pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* z metodo PCR v realnem času in oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 smo ugotovili, da je dolžina pomnožka 701 bp predolga in zato učinkovitost encimske reakcije slaba. S programom Primer express smo poiskali nove oligonukleotidne začetnike. Na genu *hlyA* za listeriolizin, ki je značilen za bakterije vrste *L. monocytogenes*, smo oblikovali dva para oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 ter sondo SBS1. Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov smo po optimiranju reakcije določili s testiranjem 52 različnih sevov in določili za par SBF1/SBR1 92 % in za par SBF1/SBR2 88 % specifičnost. Občutljivost oligonukleotidnih začetnikov za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* je bila 10^3 CFU/ml ne glede na uporabljen par oligonukleotidnih začetnikov. PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* je v primerjavi s klasičnim PCR bolj občutljiva metoda, hkrati pa se skrajša in poenostavi postopek določanja obeh vrst bakterij.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- DN Dn
DC UDC 579.67.083:577.2.083(043)=863
CX microbiological methods/ pathogenic bacteria/detection/*Salmonella enterica*/*Listeria monocytogenes*/real-time PCR/sensitivity of real-time PCR/specificity of real-time PCR
AU LEDINEK, Sebastjan
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 2006
TI DETECTION OF *Salmonella enterica* AND *Listeria monocytogenes* WITH REAL-TIME PCR
DT Graduation Thesis (University studies)
NO XI, 65 p., 20 tab., 26 fig., 61 ref.
LA sl
AL sl/en
- AB *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* are pathogenic bacteria that cause salmonellosis and listeriosis, respectively. The detection of these bacteria with classical microbiological methods can be extremely time-consuming. For the purpose of this research, the real-time PCR techniques for detecting *S. enterica* and *L. monocytogenes* were introduced and applied. These were based on the classic PCR method with primers ST11/ST15 for *S. enterica* and LM1/LM2 for *L. monocytogenes*. The sensitivity of the real-time PCR for amplification of *S. enterica* with ST11/ST15 was 10^1 - 10^2 cfu/ml, which is better than the sensitivity of classic PCR with 10^3 cfu/ml. When detecting *L. monocytogenes* with real-time PCR and primers LM1/LM2, it was established that the amplified 701 bp amplicon was too long, and the efficiency of the reaction was therefore very low. New primers were sought with the Primer express programme. On the *hlyA* gene for listeriolysin that is typical of *L. monocytogenes*, two pairs of primers were designed and marked as SBF1/SBR1 and SBF1/SBR2 and probe SBS1. After optimising the enzymatic reaction, their specificity was established through the testing of 52 different strains and the results showed 92 % specificity for SBF1/SBR1 and 88 % specificity for SBF1/SBR2. The sensitivity of primers that amplified *L. monocytogenes* was 10^3 CFU/ml regardless of the primer-pair used. The real-time PCR for detecting *S. enterica* and *L. monocytogenes* is more sensitive in comparison with the classic PCR. However, the detection procedure for both bacteria is shorter and less complex.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VIII
KAZALO SLIK	IX
OKRAJŠAVE	XI
1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	2
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 LASTNOSTI BAKTERIJ RODOV <i>Salmonella</i> in <i>Listeria</i>	3
2.1.1 Splošne lastnosti bakterij rodov	3
2.1.2 Razširjenost in patogenost	4
2.1.3 Določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> s klasičnimi mikrobiološkimi metodami.....	5
2.2 PCR.....	6
2.2.1 Princip PCR	6
2.2.2 Uporaba PCR.....	6
2.3 PCR v realnem času.....	7
2.3.1 Princip PCR v realnem času.....	7
2.3.2 Zgodovina PCR v realnem času	7
2.3.3 Metode določanja pomnožkov	8
2.3.4 Kvantitativni PCR v realnem času	12
2.3.5 Multipli PCR v realnem času	12
2.3.6 Prednosti PCR v realnem času	12
2.3.7 Določanje bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> s PCR v realnem času.....	13
3 MATERIAL IN METODE	15
3.1 MATERIAL	15
3.1.1 Bakterijski sevi.....	15
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	15
3.1.3 Reagenti	16
3.1.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic	16
3.1.3.2 Reagenti za PCR.....	16
3.1.3.3 Reagenti za PCR v realnem času.....	16
3.1.3.4 Reagenti za gelsko elektroforezo.....	17
3.1.3.5 Druge kemikalije	17
3.1.4 Laboratorijska oprema	17
3.2 METODE	18
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela	18
3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur	21
3.2.3 Priprava bakterijske DNK z lizo bakterijskih celic	21
3.2.4 Potek klasičnega PCR	22
3.2.4.1 Reakcijske mešanice za klasični PCR	22
3.2.4.2 PCR.....	22

3.2.4.3 Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo	23
3.2.5 Potek PCR v realnem času.....	23
3.2.5.1 Reakcijske mešanice za PCR v realnem času.....	23
3.2.5.2 PCR v realnem času.....	24
4 REZULTATI.....	25
4.1 Določanje bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> s PCR	25
4.1.1 Občutljivost PCR za določanje čistih kultur bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i>	25
4.1.2 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> v mešani kulturi.....	26
4.1.3 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mešani kulturi	27
4.2 Določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> s PCR v realnem času	27
4.2.1 Optimizacija koncentracije ST11/ST15 za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i>	27
4.2.1.1 Določanje optimalne koncentracije ST11/ST15 med koncentracijama 100 nM in 1000 nM	27
4.2.1.2 Določanje optimalne koncentracije ST11/ST15 med koncentracijama 300 nM in 900 nM	29
4.2.2 Primerjava rezultatov PCR v realnem času dobljenih s programom SALLIS2b in univerzalnim programom aparata Real-time 7500	31
4.2.3 Primerjava količine pomnožka z dodajanjem različnih volumnov lizata v reakcijsko mešanico za PCR v realnem času	33
4.2.4 Primerjava količin pomnožkov iz lizatov, dobljenih z alkalno in toplotno lizo	34
4.2.5 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> v mešanih kulturah.....	35
4.3 Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> s PCR v realnem času.....	37
4.3.1 Določanje učinkovitosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2	37
4.3.2 Iskanje novih oligonukleotidnih začetnikov s programom Primer Express® za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	38
4.3.2.1 Problemi prenosa protokola klasičnega PCR na PCR v realnem času.....	38
4.3.2.2 Pomembni parametri iskanja oligonukleotidnih začetnikov in sond s programom Primer express®	38
4.3.2.3 Iskanje oligonukleotidnih začetnikov in sond za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> glede na znane sekvence gena <i>hlyA</i>	39
4.3.2.4 Preverjanje specifičnosti pomnožka SBF1/SBR1 s poznanimi bakterijskimi sekvencami DNK	42
4.3.3 Optimizacija PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	44
4.3.3.1 Določanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2	44
4.3.3.2 Določanje specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2	46
4.3.3.3 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 v mešani kulturi	50

5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	52
5.1 RAZPRAVA.....	52
5.1.1 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> ...	52
5.1.2 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i>	52
5.1.3 Oblikovanje novih oligonukleotidnih začetnikov s programom Primer Express za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	53
5.1.4 Specifičnost in občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	54
5.2 SKLEPI.....	56
6 POVZETEK.....	57
7 VIRI	59

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih fluorogenov (Lee in sod., 2004).....	9
Preglednica 2: Laboratorijska oprema.....	18
Preglednica 3: Občutljivost PCR za določanje čistih kultur bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i>	25
Preglednica 4: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst <i>S. enterica</i> v mešani kulturi z bakterijami vrste <i>L. monocytogenes</i>	26
Preglednica 5: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> v mešani kulturi z bakterijami vrste <i>S. enterica</i>	27
Preglednica 6: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 od 100 nM do 1000 nM	28
Preglednica 7: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 od 300 nM do 900 nM	30
Preglednica 8: Primerjava programa SALLIS2b in univerzalnega programa aparature Real-time 7500	32
Preglednica 9: Rezultati PCR v realnem času izvedenem po programu SALLIS2b in univerzalnemu programu pri 600 nM in 750 nM koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15	32
Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15 in pri različnih volumnih dodanih lizatov bakterij vrste <i>S. enterica</i>	33
Preglednica 11: Rezultati PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15 po toplotni in alkalni lizi DNK bakterij vrste <i>S. enterica</i>	34
Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> v mešanih kulturah	36
Preglednica 13: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2.....	37
Preglednica 14: Pomembni parametri iskanja oligonukleotidnih začetnikov in sond za PCR v realnem času (Sequence detection systems, 2003; Primer express® software version, 3.0, 2004).....	39
Preglednica 15: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 od 50 nM do 900 nM.....	44
Preglednica 16: Standardne krivulje pri različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov S SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2	45
Preglednica 17: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> s SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 preizkušenimi na različnih vrstah listerij.....	47
Preglednica 18: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> s SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 preizkušenimi na različnih vrstah bakterij	49
Preglednica 19: Parametri za izračun specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2	50
Preglednica 20: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mešanih kulturah.....	50

KAZALO SLIK

Slika 1: Princip PCR (Jeršek, 2003)	6
Slika 2: Princip vezave fluorogena SYBR Green I v dvojno vijačnico DNK (Power SYBR® Green PCR Master Mix and RT-PCR, 2005)	8
Slika 3: Princip PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo »TaqMan« (Real-Time PCR Systems, 2004).....	10
Slika 4: Emisija fluorescence pri PCR v realnem času (Real-Time PCR Systems, 2004).....	11
Slika 5: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (100 bp DNA Ladder 15628-019, Invitrogen, ZDA)	17
Slika 6: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR in PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i>	19
Slika 7: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za mešane kulture bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i>	20
Slika 8: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	21
Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij vrst <i>S. enterica</i> s ST11/ST15 in <i>L. monocytogenes</i> z LM1/LM2	26
Slika 10: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih z ST11/ST15 pri koncentraciji 100 nM (A), 300 nM (B), 900 nM (C) in 1000 nM (D)	29
Slika 11: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> s 600 nM ST11/ST15 ...	31
Slika 12: Standardna krivulja pri PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15	31
Slika 13: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih pri 600 nM (A) in 750 nM (B) koncentraciji ST11/ST15.....	33
Slika 14: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih s ST11/ST15 pri 5 µl dodatku lizata (A) in 2,5 µl dodatku lizata v reakcijsko mešanico (B)	34
Slika 15: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih s ST11/ST15 po dodatku lizatov dobljenih s toplotno lizo (A) in lizatov dobljenih z alkalno lizo (B).....	35
Slika 16: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih S PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i> v mešanih kulturah s bakterijami vrst <i>L. monocytogenes</i> (A) in <i>E. coli</i> (B)	36
Slika 17: Standardna krivulja pri PCR v realnem času za bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> pri 300 nM koncentraciji LM1/LM2	38
Slika 18: Sekundarne strukture oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2: (A): vezava LM1 z LM1, (B): zanka LM2, (C): vezava LM2 z LM2, (D): vezava LM1 z LM2.....	40
Slika 19: Pomnožek (203 bp) na genu <i>hlyaA</i> dobljen z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1	41
Slika 20: Pomnožek (110 bp) na genu <i>hlyaA</i> dobljen z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2	41
Slika 21: Prekrivanje sekvenc DNK bakterij vrste <i>Streptococcus pyogenes</i> s sekvencami pomnožka SBF1/SBR1	43
Slika 22: Prekrivanje sekvenc DNK bakterij vrste <i>Bacillus cereus</i> s sekvencami pomnožka SBF1/SBR1	43
Slika 23: Taljenje pomnožkov dobljenih z pri 50 nM (A), 300 nM (B) in 900 nM (C) koncentraciji SBF1/SBR2	45

Slika 24: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1	46
Slika 25: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2	48
Slika 26: Temperature taljenja pomnožkov oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 (A) in SBF1/SBR2 (B)	51

OKRAJŠAVE

A	adenin
BHI	(angl. Brain Heart Infusion broth)
BPW	puferirana peptonska voda (angl. Buffered Peptone Water)
bp	bazni par
C	citozin
cfu	kolonijska enota
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EtBr	etidijev bromid
G	gvanin
H ₂ O _{KEM}	sterilna, bidestilirana voda
H ₂ O _{PCR}	sterilna, deionizirana, DNK prosta voda
LM1/LM2	oligonukleotidni začetniki za določanje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>
MKTTn	(angl. Muller-Kauffman Tetrathionate-Novobiocin broth)
NA	hranjivi agar (angl. Nutrition Agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo
PCR v realnem času	verižna reakcija s polimerazo v realnem času
RVS	bujon Rappaport Vassiliadis (angl. Rappaport and Vassiliadis broth)
SBF1/SBR1	oligonukleotidni začetniki za določanje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>
SBF1/SBR2	oligonukleotidni začetniki za določanje bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>
SDS	natrijev dodecil sulfat
ST11/ST15	oligonukleotidni začetniki za določanje bakterij vrste <i>Salmonella enterica</i>
T	timin
TAE	elektroforetski pufer: tris, očetna kislina, EDTA
TSYAE	triptični soja agar s kvasnim ekstraktom (angl. Tryptic Soy Yeast Extract Agar)
U	enota (angl. unit)
XLD	gojišče s ksilozo, lizinom in deokiholatom (angl. Xylose Lysine Doexycholate agar)

1 UVOD

Salmoneloza je že nekaj let med najpogostejšimi prijavljenimi boleznimi. V Ameriki je bilo v letu 2005 prijavljenih 6471 primerov salmoneloze (Preliminary foodnet data, 2006). Tudi v Sloveniji je bilo to obolenje v letih 2004 in 2005 med desetimi najpogostejše prijavljenimi boleznimi z incidenco 165,6 okužb/100.000 prebivalcev. Leta 2004 je bilo prijavljenih 3307 primerov salmoneloze pri ljudeh, vendar je dejansko število okuženih bistveno večje (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006, 2005).

Listerioza je redko prijavljena nalezljiva bolezen. V Ameriki je bilo na primer v letu 2005 prijavljenih 135 primerov listerioze (Preliminary foodnet data, 2006). Od leta 1994 do leta 2004 je bilo v Sloveniji 31 prijavljenih primerov listerioze, ki so potekali kot meningitisi in sepse. Od 31 primerov pa so bili 3 primeri s smrtnim izidom, po eden primer v letih 2000, 2001 in 2003 (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006, 2005).

Salmoneloza spada med t.i. alimentarne infekcije. Večina ljudi preboli salmonelozo brez zapletov, v nekaj dneh. Umrljivost je običajno zelo nizka (manj kot 1 %). Intenzivnost bolezni je odvisna od odpornosti organizma in od količine zaužitih salmonel ter serovara. Pri zelo majhnih otrocih je zaradi dehidracije bolezen lahko zelo resna, prav tako tudi pri starejših ljudeh in kroničnih bolnikih (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006, 2005). Salmonele so v naravi zelo razširjene, posebno kot črevesni paraziti različnih sesalcev, ptic in človeka, bolezen pa povzročijo samo, če pridejo žive v organizem. Za minimalno infekcijsko dozo je mnogo let veljalo, da je potrebno najmanj 100.000 do 1.000.000 živih celic /g živila. Pri mladih in starejših ljudeh pa že neznatno število (100 – 1000 salmonel / g živila) lahko povzroči klinično obolenje (Adamič in sod., 2003).

Listerioza se lahko pojavi v različnih oblikah, je oportunistična infekcija, ki ogroža predvsem rizične skupine, kamor prištevamo tudi nosečnice, pri katerih povzroča splav. Smrtnost zaradi listerioze je najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca zelo nizka (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006, 2005). Na človeka se prenaša alimentarno z nezadostno kuhanim mesom, tudi z mlekom in mlečnimi izdelki, ter svežimi jajci bolne perutnine, ter kontaktno, možna je tudi kontaminacija okolja. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so na okoljske dejavnike zelo odporne bakterije in v živilih lahko preživijo sušenje, zmrzovanje, soljenje in razsoljevanje. Infekcijska doza pa je že 100 bakterij (Adamič in sod., 2003).

Po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (2000) je v 6. členu med drugim predpisano, da so živila zdravstveno ustrežna oziroma varna, če ne vsebujejo mikroorganizmov ali parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi. To pa pomeni, da bakterije vrste *L. monocytogenes*, kot tudi bakterije vrste *S. enterica* v živilih ne smejo biti prisotne.

Za določanje in identifikacijo patogenih bakterij s klasičnimi mikrobiološkimi metodami je značilno, da so te metode dolgotrajne, saj so rezultati znani po 4 - 6 dneh. Pri klasičnih mikrobioloških metodah je problem tudi selektivnost gojišč za bakterije vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*, katera naj bi pri izolaciji spodbudila rast preiskovanih bakterij in inhibirala

rast drugih bakterij, ki so v živilih lahko normalno prisotne. Da bi skrajšali čas določanja bakterij, so razvili vrsto alternativnih metod in med njimi so tudi metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR).

V zadnjih letih se vse bolj uveljavlja PCR v realnem času, ki je nadgradnja klasičnega PCR. PCR v realnem času je bolj občutljiva in specifična metoda, ki poleg določevanja omogoča tudi kvantifikacijo. Poleg specifičnih oligonukleotidnih začetnikov se lahko uporablja specifična oligonukleotidna sonda, ki se veže na točno določeno mesto med obema oligonukleotidnima začetnikoma na tarčni DNK. Princip reakcije je podoben kot pri klasičnem PCR, določitev pomnožka pa temelji na meritvah fluorescence. Emisija fluorescence je proporcionalna količini pomnožka med reakcijo (Guilbaud in sod., 2004).

1.1 CILJI NALOGE

Namen našega dela je bil postaviti protokola za PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes*. Izhodišče sta bila protokola za klasičen PCR, ki smo ju želeli prilagoditi tako, da bi optimalno delovala s PCR v realnem času.

Z uvedbo in postavitvijo metode PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* smo glede na klasičen PCR želeli:

- skrajšati in poenostaviti potek določanja omenjenih bakterij,
- povečati specifičnost določanja omenjenih bakterij
- in zboljšati občutljivost določanja omenjenih bakterij.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

Predpostavili smo, da bomo s postavitvijo in uvedbo metode PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* glede na klasičen PCR povečali specifičnost in izboljšali občutljivost določanja, ter skrajšali in poenostavili postopek določanja omenjenih bakterij.

2 PREGLED OBJAV

2.1 LASTNOSTI BAKTERIJ RODOV *Salmonella* in *Listeria*

2.1.1 Splošne lastnosti bakterij rodov

Bakterije rodu *Salmonella* se delijo v dve vrsti *S. enterica* in *S. bongori* (Garitty in sod., 2004). Vrsta *S. bongori* obsega 21 sevov, katerih izvor so večinoma hladnokrvne živali in okolje, redkeje sesalci (Yan in sod., 2003). Vrsta *Salmonella enterica* se deli v šest podvrst:

- *Salmonella enterica* podvrsta *enterica*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *salamae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *arizonae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *diarizonae*,
- *Salmonella enterica* podvrsta *houtenae* in
- *Salmonella enterica* podvrsta *indica*.

Preko 99 % salmonel spada v vrsto *Salmonella enterica*, blizu 60 % sevov te vrste spada v podvrsto *enterica* (Garitty in sod., 2004; Yan in sod., 2003).

Salmonele so gramnegativne, gibljive, citokromoksidaza-negativne, katalaza-pozitivne in fakultativno anaerobne paličice. 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. Salmonele se razmnožujejo pri temperaturah med 7 in 47 °C, optimalno pri 37 °C. Temperatura nad 65 °C jih hitro uniči. Razmnožujejo se pri pH 4,5 do 9,0, pri čemer minimalno vrednost pH, ki še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline. Najhitreje se razmnožujejo v nevtralnem območju pH. Minimalna a_w vrednost za rast je 0,94. Povzročajo alimentarne toksikoinfekcije in so najpogostejši povzročitelj teh obolenj v našem okolju (Adamič in sod., 2003).

Salmonele so razmeroma odporne proti zunanjim vplivom; preživijo 115 dni v vodi, 280 dni v vrtni zemlji, 80 dni v odpadkih, 2 leti v suhem fecesu in kar 13 mesecev v piščančji drobovini pri temperaturi -21 °C (Radšel-Medvešček, 2002).

Bakterije rodu *Listeria* vsebujejo 6 vrst: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* in *L. grayi* (Garrity in sod., 2004). Bakterije rodu *Listeria* so ubikvitarne grampozitivne kokoidne do paličaste bakterije, gibljive, sicer nesporogene, a zelo odporne proti neugodnim dejavnikom okolja. So aerobne do mikroaerofilne, katalaza-pozitivne in citokromoksidaza-negativne. Sladkorje razgrajujejo do kislin brez plina. Razmnožujejo se v širokem temperaturnem območju od 1 °C do 45 °C, pri vrednostih pH od 4,4 do 9,6 in vrednosti a_w do 0,92. Zato jih razmeroma pogosto izoliramo v okolju, npr. na rastlinah, v človeških in živalskih odpadkih, živalski krmi, npr. silaži, kakor tudi iz živil, npr. zelenjave, mleka, sirov, mesa in mesnih izdelkov. Vrsta *L. monocytogenes* je patogena za človeka, najpogostejši vir okužbe je kontaminirana hrana. Za to vrsto je značilno, da tvori β -hemolizo na krvnem agarju, izkorišča ramnozo ne pa ksiloze, ter ima pozitiven test CAMP. Dobimo jo v živilskih proizvodih rastlinskega in živalskega izvora. Listerioza, ki se pojavi v različnih oblikah, je oportunistična infekcija, ki ogroža predvsem rizične skupine, kamor prištevamo tudi nosečnice. Smrtnost zaradi listerioze pa je največja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano, na srečo pa je incidenca zelo nizka (Adamič in sod., 2003).

2.1.2 Razširjenost in patogenost

Bakterije rodu *Salmonella* so že dolgo ena izmed najpomembnejših humanih patogenov, ki se do ljudi lahko prenesejo z uživanjem kontaminirane hrane. Salmonele povzročijo tudi veliko ekonomske škode, ter bolezni kot so črevesni katar, sepse in splav (Clarke in Gyles, 1993). V ZDA povzročijo bakterije rodu *Salmonella* 800.000 od 4 milijonov okužb, ter 500 smrtnih primerov vsako leto (Helmick in sod., 1994). Z odkritjem na večkratno odpornega seva *Salmonella enterica* Typhimurium se je število okužb in smrti še povečalo (Glynn, 1998).

Perutnina je najpomembnejši rezervoar bakterij rodu *Salmonella*. Te so istočasno tudi najpogostejši povzročitelj alimentarnih toksikoinfekcij. Salmonele so prisotne predvsem v slepem črevesu perutnine. Pri perutnini sta specifični vrsti *S. gallinarum* in *S. pullorum*. Vse pogosteje pa registrirajo okužbe z visoko virulentnim sevom *S. Enteritidis*, ki je patogen tudi za ljudi (Weise, 1996).

Mikrobiološke raziskave na belgijskem tržišču so pokazale da je 38,2 % trupov perutnine kontaminiranih z bakterijami vrste *L. monocytogenes* in 28,5 % z bakterijami rodu *Salmonella* (Uytendaele in sod., 1999). V Nemčiji je približno 50 % perutninskega mesa kontaminiranega s salmonelami (Weise, 1996).

Poleg fekalne kontaminacije mesa, mleka in mlečnih izdelkov, ki je posledica slabe higiene in nestrokovnega ravnanja z živili, velikokrat pride tudi do kontaminacije jajc. Do kontaminacije pride že med oblikovanjem jajca (Stroth, 1996) ali pa po valjenju z umazanijo ali fekalijami, kontaktom z deli kletke, naprav, opreme ali prahom iz zraka (Schoeni in sod. 1995). Epidemiološke študije so pokazale, da do salmoneloze pri ljudeh pride najpogosteje po zaužitju kontaminiranih jajc (Stroth, 1996).

V Sloveniji je bilo leta 1999 prijavljenih 2103 primerov salmoneloze (obolevnost 106,5/100.000 prebivalcev), v letu 2000 pa 1839 primerov (obolevnost 92,9/100.000). V letih od 2001 do 2003 je bilo prijavljenih 8451 primerov salmoneloze. Leta 2004 je bilo prijavljenih 3307 primerov salmoneloze pri ljudeh, vendar je dejansko število okuženih bistveno večje. Število prijav se je v primerjavi z letom 2003 zmanjšalo za 18,2%.

Nevarne patogene bakterije novejših dob so bakterije vrste *L. monocytogenes*. Nahajajo se v zemlji, razpadajoči vegetaciji in krmi, ter so pogosto prisotne v gastrointestinalni mikroflori večine sesalcev. Ogrožene so predvsem nosečnice, ker ta vrsta bakterij povzroča splave, pa tudi novorojenci in osebe z zmanjšano imunsko odpornostjo, pri katerih povzroča meningitis, encefalitis in sepse. Smrtnost v primeru okužbe je kar 20-30 %-na. Mleko, tudi pasterizirano, in mlečni izdelki, predvsem sladoled in siri, pa so bili večkrat povezani z izbruhom okužb (Ryser, 1998; DiMaio, 2000). V morski hrani te bakterije lahko najdemo v surovih ribah in školjkah, ter njihovih izdelkih, nahajajo pa se tudi na rastlinah, sladkovodnih sedimentih in v rečni vodi (Diez-de-Medina in sod., 1995).

V letih od 1979 do 1999 je bilo v ZDA in Kanadi 6 velikih izbruhov listerioze. Vzrok je bilo uživanje raznolike hrane, npr. korenje, industrijsko pripravljena zeljna solata, pasterizirano mleko, svinjina, mehki siri, čokoladno mleko in hitro pripravljena hrana (Donnelly, 2001).

Mead in sodelavci so leta 1999 (1999) v severni Ameriki zabeležili 2500 primerov listerioze od katerih je bilo 500 primerov smrtnih. Tako je večina držav sprejela zakonodajo, ki navaja, da v hrani bakterij vrste *L. monocytogenes* ne sme biti, čeprav je minimalna infekcijska doza navadno višja od 100 živih celic (Roberts in sod., 1996). Na Danskem ocenjujejo, da letno obolijo 2,3 osebe na milijon prebivalcev, v ZDA so ugotovili 7,4 obolenj na milijon prebivalcev, v Franciji pa 11,3 obolenj na milijon prebivalcev letno. V Sloveniji je število prijavljenih in ugotovljenih primerov majhno. Prijavljeni so bili 1 primer leta 1995, 3 primeri leta 1997, 5 primerov leta 1998, 3 primeri leta 1999 in 2 primera 2000 (Radšel-Medvešček, 2002). Leta 2001 je bilo prijavljenih 7 primerov z enim smrtnim izidom, leta 2002 ni bilo prijavljenega primera, leta 2003 je bilo 6 prijavljenih primerov z enim smrtnim izidom, ter leta 2004 sta bila prijavljena 2 primera listerioze.

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

Pri določanju bakterij rodu *Salmonella* po standardu SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004 (2004) je najprej potrebna primarna obogatitev v gojišču BPW, ker lahko živilo vsebuje nizko število bakterij rodu *Salmonella* v primerjavi z drugimi bakterijami družine Enterobacteriaceae in drugimi bakterijami. Sledi sekundarna obogatitev. Kot sekundarni obogatitveni gojišči sta predpisani gojišči RVS in MKTTn. Za izolacijo salmonel je predpisano trdo gojišče XLD, drugo selektivno gojišče je prepuščeno na izbiro. Za potrditev bakterij rodu *Salmonella* vzamemo po 5, za salmonele značilnih kolonij in jih precepimo na gojišče NA. Če zrastejo značilne 1-2 mm velike, okrogle kolonije beige barve, naredimo naslednje teste: trojni sladkor, gojišče z ureo, gojišče za dekarboksilacijo L-lizina, določanje β -galaktozidaze, reakcija Voges-Proskauer in tvorba indola. V sklopu preiskav sledi nato še serološka tipizacija, pri čemer določamo prisotnost *Salmonella* O-, Vi- in H-antigenov pri tistih vzorcih, kjer z biokemijskimi testi nismo ovrgli možnosti, da preiskovana bakterijska kultura spada med bakterije rodu *Salmonella*.

Tudi pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* po standardu ISO 11290-1 (2004) je najprej potrebna primarna obogatitev z obogatitvenim gojiščem Half Fraser, ker lahko živilo vsebuje nizko število bakterij vrste *L. monocytogenes* ($<10^2$ cfu / ml) in visoko skupno število bakterij. Sledi sekundarna obogatitev z gojiščem Fraser. Za izolacijo listerij je predpisano selektivno trdo gojišče ALOA, drugo ustrezno selektivno gojišče je prepuščeno izbiri. Za potrditev bakterij rodu *Listeria* vzamemo iz vsake plošče selektivnega gojišča po 5, za listerije značilnih kolonij in jih precepimo na gojišče TSYEA. Če zrastejo 1-2 mm velike, konveksne, brezbarvne, za listerije značilne kolonije, za njihovo potrditev naredimo naslednje teste: test na katalazo, barvanje po Gramu in test gibljivosti. Za potrditev bakterij vrste *L. monocytogenes* pa naredimo še naslednje teste: hemoliza, izkoriščanje ogljikovih hidratov in test CAMP.

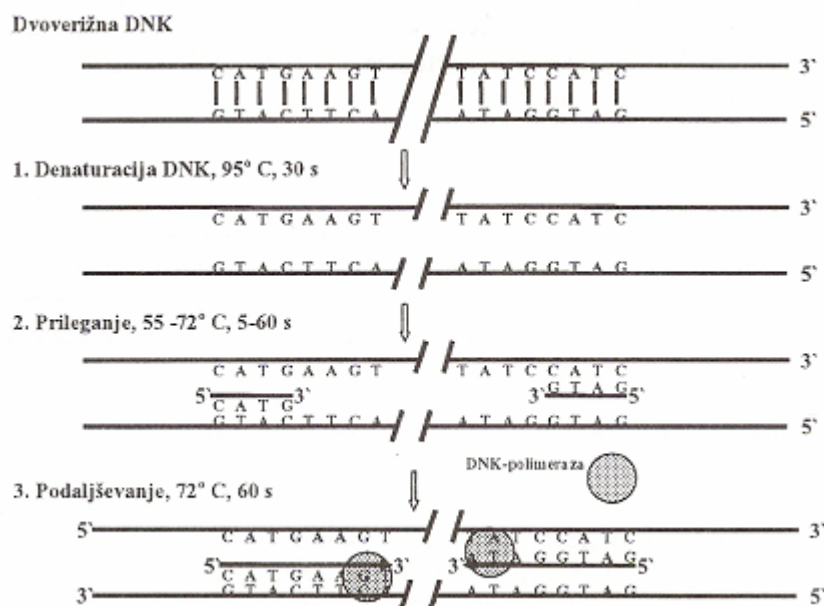
2.2 PCR

2.2.1 Princip PCR

Princip verižne reakcije s polimerazo (PCR) je *in vitro* pomnožitev dela DNK z DNK-polimerazo v cikličnem termostatu (Olsen in sod., 1995; Clark 2005). Metoda omogoča pomnožitev specifičnih delov tarčne molekule DNK. Pomnožitev poteka z zveznim spreminjanjem temperature v zaporednih ciklih, ki zajemajo tri glavne faze (slika 1):

- denaturacija dvojne vijačnice molekule DNK, tako da nastaneta enoverižni molekuli,
- prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno mesto tarčne DNK pri temperaturi, ki je odvisna od sestave oligonukleotidnih začetnikov
- in podaljševanje molekule DNK s pomočjo termostabilnega encima DNK-polimeraza, izoliranega iz termofilnih bakterij vrste *Thermus aquaticus*. Optimalna temperatura tega encima je 72°C, svojo aktivnost ohrani tudi pri višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne DNK.

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji (Clark, 2005). Izbira oligonukleotidnih začetnikov je odvisna od vrste PCR in vrste preiskovanega mikroorganizma (Jeršek, 2003). Pomnožke PCR najenostavneje ugotovimo z agarozno gelsko elektroforezo tako, da njihovo velikost primerjamo z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi fragmentov. Specifičnost pomnožkov moramo kontrolirati s hibridizacijo z inertno DNK-sondo, z restrikcijo ali s sekvenciranjem (Olsen in sod., 1995).



Slika 1: Princip PCR (Jeršek, 2003)

2.2.2 Uporaba PCR

PCR je molekularna metoda, ki se med številnimi drugimi aplikacijami uporablja tudi za določanje in ugotavljanje mikroorganizmov v živilih in različnih drugih vzorcih (Gouws in sod., 1998; Li in sod., 1999; Rijpens in sod., 1999; Malorny in sod., 2003; Jeršek, 2003).

Poleg živilske mikrobiologije so zelo pomembna področja uporabe PCR še klinična diagnostika, genski inženiring in forenzične preiskave (Fung, 1995; Clark, 2005).

Zaradi tveganj povezanih s patogenimi bakterijami, ki so lahko prisotne v živilih in njihovem okolju, je bil in je še vedno trend v razvoju čim hitrejših detekcijskih metod, ki bi bile enako občutljive in imele enako specifičnost kot klasične mikrobiološke metode. Pri klasičnih metodah določanja patogenih bakterij je potrebno kulturo najprej izolirati, dobiti čisto kulturo in jo z biokemijskimi in serološkimi testi identificirati oziroma potrditi (Catteau, 1995; Gledel in Corbion, 1995). Tako je za rezultate po obogatitvi živila potrebno vsaj 4 - 6 dni, če je rezultat negativen, in tudi do 10 ali več dni, če je rezultat pozitiven. Pri metodi PCR je teoretično dovolj že le ena molekula DNK, katera se v 2-3 urah pomnoži več milijonkrat tako, da se lahko faza obogatitve skrajša ali pa celo izpusti.

2.3 PCR v realnem času

2.3.1 Princip PCR v realnem času

PCR v realnem času je v bistvu izboljšava klasičnega PCR (Mackay, 2004). Sama reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih podobno kot pri klasičnem PCR. Vsak cikel poteka v dveh fazah:

- denaturacija dvojne vijačnice DNK pri temperaturi višji od 90 °C,
- prileganje oligonukleotidnih začetnikov (in oligonukleotidne sonde) ter podaljševanje DNK pri temperaturi 50-60 °C s termostabilnim encimom DNK-polimeraza.

Nastali pomnožek določimo med samim potekom encimske reakcije. Delo in čas za določanje pomnožka z gelsko elektroforezo zato nista potrebna. Zato se je PCR v realnem času uveljavila kot izredno hitra metoda. Glavna razlika med klasičnim PCR in PCR v realnem času je v določevanju pomnožka. PCR v realnem času omogoča sprotno spremljanje količine pomnožka s fluorogenim označevanjem oligonukleotidnih začetnikov, sond ali pomnožkov. Povečanje količine pomnožka zaznamo kot povečanje fluorescentnega signala, ki je posledica povezave med fluorogenim barvilom in pomnožkom oziroma njune hibridizacije (Mackay, 2004).

Zaradi fluorogenih barvil, ki so vezana na oligonukleotidne začetnike, specifične sonde ali pomnožke, je specifičnost PCR v realnem času večja kot pri klasičnem PCR.

S PCR v realnem času lahko količino pomnožka tudi kvantificiramo, kar pri klasičnem PCR ni mogoče. PCR v realnem času je zaprt sistem in zato so možnosti za kontaminacijo okolja in navzkrižno kontaminacijo vzorcev mnogo manjše kot pri klasičnem PCR.

2.3.2 Zgodovina PCR v realnem času

V 90-ih letih 20. stoletja je PCR z uvedbo PCR v realnem času postala ena od zelo hitro se razvijajočih metod. Higuchi in sodelavci (1992) so prvi določili specifičen del pomnožene DNK tako, da so reakcijski mešanici za PCR dodali etidijev bromid (EtBr), ki se je vezal na dvojno vijačnico DNK. Nato so reakcijsko mešanico obsevali z UV-svetlobo in EtBr je začel fluorescirati. Več kot je bilo pomnožka, več EtBr se je vezalo na dvojno vijačnico DNK in večja je bila fluorescenca. In tako se je porodila zamisel o metodi PCR v realnem času.

Problem je bil v tem, da se EtBr veže na vsako dvojno vijačnico DNK, kar pomeni, da se veže tudi na dimere oligonukleotidnih začetnikov, ki so lažno pozitivni rezultati reakcije. Razvoj metodike, na primer uvedba fluorogenih sond, ki se vežejo na točno določeno mesto na DNK, je omogočil tudi povečanje specifičnosti PCR v realnem času in zato je metoda postala tudi ena zelo specifičnih metod (Logan in Edwards, 2004).

2.3.3 Metode določanja pomnožkov

Pri PCR v realnem času, kjer pomnožek in njegovo količino določamo z meritvami fluorescence, lahko v splošnem ločimo dve skupini metod določevanja pomnožkov:

- Nespecifične metode:

Te metode temeljijo na vezanju fluorogenih barvil, kot je SYBR[®] Green I, v dvojno vijačnico DNK in fluorescenci vezanih barvil pri določeni valovni dolžini. Barvilo SYBR[®] Green I se veže na vsako dvojno vijačnico DNK in fluorescira le takrat, ko je vezano v DNK (slika 2). Čimveč kot je pomnožkov DNK, temveč barvila SYBR[®] Green I se veže nanje in večja je intenziteta fluorescence. Pri tej encimski reakciji potrebujemo podobno kot pri klasičnem PCR le dva oligonukleotidna začetnika. Nespecifične metode so v primerjavi s specifičnimi metodami cenejše in za postavitve protokolov ne zahtevajo toliko specifičnega znanja o molekulah DNK. Slabost teh metod je v vezanju fluorogenih barvil, tako na specifične kot tudi na nespecifične pomnožke in različne dimere, zaradi česar lahko pride do netočne interpretacije rezultatov ali celo do lažno pozitivnih rezultatov (Saunders, 2005).



Slika 2: Princip vezave fluorogena SYBR Green I v dvojno vijačnico DNK (Power SYBR[®] Green PCR Master Mix and RT-PCR, 2005)

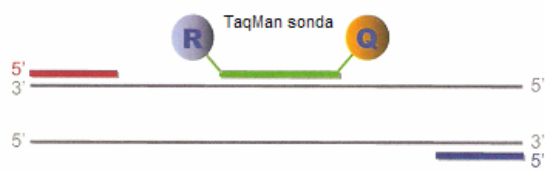
- Specifične metode:

Specifične metode določanja pomnožkov temeljijo na procesu FRET (fluorescentni resonančni prenos energije). Pri teh metodah sta v molekuli oligonukleotidne sonde, oligonukleotidnega začetnika ali pomnožka vezani dve fluorogeni barvili in sicer reporterski in zaviralni fluorogen. Rezultat podvojevanja specifičnega dela DNK je poleg pomnožka tudi ločitev reporterskega in zaviralnega fluorogena, kar vodi k povečevanju intenzitete fluorescence, ki jo merimo tako kot pri nespecifičnih metodah določanja pomnožkov, pri določeni valovni dolžini (Saunders, 2004). Glede na vezavo reporterskega in zaviralnega fluorogena razlikujemo več metod:

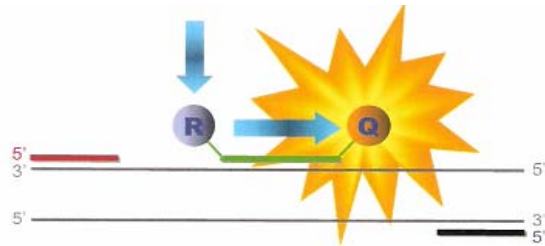
- Dvojno označene oligonukleotidne sonde (5' nukleazne sonde, sonde »TaqMan«):
Oligonukleotidna sonda je na 5'-koncu označena z reporterskim fluorogenom, na katerem koli T na 3'-koncu sonde pa je vezan zaviralni fluorogen (slika 3). Med različnimi fluorogenimi barvili (preglednica 1) je kot reporterski fluorogen največkrat 6-karboksi-fluorescein (6-FAM), kot zaviralni fluorogen pa 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA) (Mackay 2004). Zaviralni fluorogen zavira oddajanje fluorescence reporterskega fluorogena, dokler sta barvili vezani na sondo. Pri podaljševanju določene sekvence DNK pa eksonukleazna aktivnost encima DNK-polimeraze razgradi sondo in s tem se fluorogena ločita. Reporterski fluorogen začne oddajati fluorescenco, ki jo lahko merimo sproti. Osnova merjenju signala dvojno označenih sond je proces FRET. To je spektroskopski proces, pri katerem gre za prenašanje energije med molekulami, ki so oddaljene za 10-100 Å in imajo prekrivajoče se emisijske in absorpcijske spektre. Prenos energije poteka od reporterskega k zaviralnemu fluorogenu, ki oddaja energijo pogosteje v obliki toplote kot pa fluorescence (Mackay, 2004; Lee in sod., 2004). Z uvedbo fluorescentno označene oligonukleotidne sonde, ki se veže na del sekvence DNK med obema oligonukleotidnima začetnikoma, se v primerjavi z nespecifičnimi metodami določanja pomnožkov, poveča specifičnost metode PCR v realnem času, saj se poleg specifičnih oligonuklotidnih začetnikov uporablja tudi specifično sondo.

Preglednica 1: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih fluorogenov (Lee in sod., 2004)

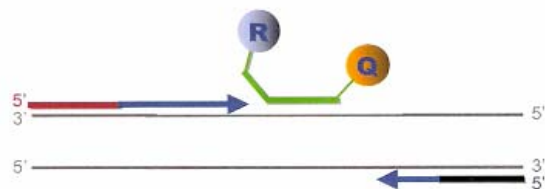
Reporterski fluorogen	Valovna dolžina (nm)	
	Absorpcijski maksimum	Emisijski maksimum
FAM	494	518
Fluorescein	492	520
JOE	520	548
ROX	585	605
TAMRA	565	605
VIC	538	554
TET	521	544
SYBR Gold	495	537
SYBR Green I	494	521
Texas Red	583	603
Yakima Yello	526	549



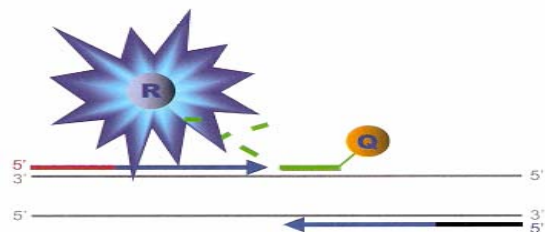
1. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in sonde



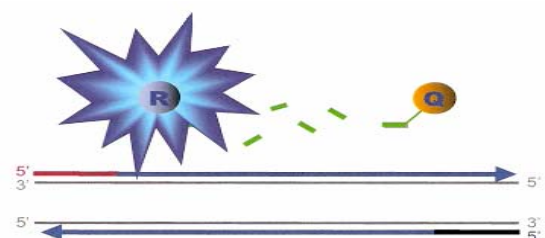
2. Proces FRET (Fluorescentni resonančni prenos energije), kjer pride do prenosa energije med molekulami reporterskega in zaviralnega fluorogena



3. Eksonukleazna aktivnost DNK-polimeraze



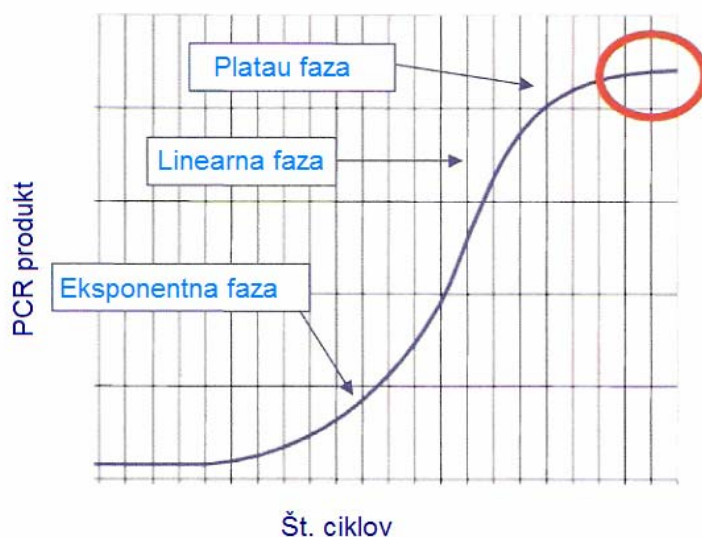
4. Odcepitev reporterskega fluorogena in oddajanje fluorescence



5. Razpad oligonukleotidne sonde. Podvajanje tarčnega dela DNK je končano

Slika 3: Princip PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo »TaqMan« (Real-Time PCR Systems, 2004)

Idealna krivulja podvojevanja dela DNK je sigmoidna krivulja. Podvojevanja DNK se v prvih ciklih ne zazna, saj je fluorescentni signal reporterskega fluorogena manjši od fluorescentnega signala ozadja. Ko preide pomnoževanje v eksponentno in linearno fazo, je količina pomnožka že dovolj velika, da zaznamo signal. Linearni fazi pa sledi t.i. »plateau faza«, kjer se zaradi zmanjšane aktivnosti encima DNK-polimeraze in zmanjšanja koncentracije oligonukleidnih začetnikov ter akumulacije inhibitorjev reakcija upočasni in intenziteta fluorescentnega signala se ne povečuje več (slika 4). Rezultat oz. pomnožek pri PCR v realnem času je torej fluorescentni signal, ki se meri v številu ciklov potrebnih, da pride do linearne faze podvojevanja (Mackay, 2004). Izmerjeno intenziteto fluorescentnega signala izrazimo v obliki vrednosti C_t . Vrednost C_t je število ciklov, pri katerem se intenziteta fluorescentnega signala poveča nad 10x standardno deviacijo fluorescence osnovne črte oz. ozadja. Čimveč je v vzorcu tarčne DNK, tem hitreje bo naraščala intenziteta fluorescence in manjša bo vrednost C_t . Natančnost vrednosti C_t je odvisna od fluorogena in njegove koncentracije, začetne količine DNK, občutljivosti sistema in sposobnosti meritev v sistemu, da razloči med specifičnim fluorescentnim signalom in fluorescentnim signalom ozadja.



Slika 4: Emisija fluorescence pri PCR v realnem času (Real-Time PCR Systems, 2004)

- Fluorescirajoči pomnožki (ang. Self-fluorescing amplicon):
Razlika med to metodo in metodo dvojno označene oligonukleotidne sonde je v tem, da pri tej metodi fluorogeni ostanejo vezani na pomnožku tudi po koncu reakcije in zato pomnožki fluorescirajo. Ločimo dva principa: princip »sunrise primers«, kjer podvojevanje tarčne DNK poruši strukturo oligonukleidnega začetnika (oblika zanke) in povzroči ločitev zaviralnega in reporterskega fluorogena, ter oddajanje fluorescence. Princip »scorpion primers« pa temelji na tem, da hibridizacija sonde na komplementarno zaporedje na pomnožku povzroči ločitev zaviralnega in reporterskega fluorogena in oddajanje fluorescence (Mackay, 2004).
- Linearne oligonukleotidne sonde:
Tu pride do hibridizacije dveh oligonukleotidnih sond na del tarčne DNK. Reporterski fluorogen je vezan na 3`-koncu prve oligonukleotidne sonde in zaviralni fluorogen na 5`-

koncu druge oligonukleotidne sonde, kjer sta lahko oddaljena največ 10 nukleotidov. Pri tem pride do procesa FRET in oddajanja fluorescence (Mackay, 2004).

2.3.4 Kvantitativni PCR v realnem času

Kvantitativni PCR v realnem času omogoča določanje količine pomnožka DNK v vzorcu (Saunders, 2005). Kvantifikacija je lahko relativna ali absolutna. Pri relativni kvantifikaciji določamo spremembe v količini tarčne DNK v primerjavi s količino te sekvence v sorodnem ali istem materialu tako, da primerjamo signal tarčne sekvence s signalom notranje ali drugih referenčnih kontrol. Uporablja se predvsem za ugotavljanje sprememb izražanja genov v vzorcu na podlagi relativne primerjave z referenčnim standardom. Absolutna kvantifikacija je zahtevnejša in omogoča določitev točnega števila tarčne DNK v vzorcu z določenimi enotami in s tem omogoča primerjanje rezultatov različnih metod in različnih laboratorijev (Mackay, 2004).

Zanesljivost kvantifikacije je pogojena s pravilno izbiro in dobro kvaliteto kontrol. Kontrolo poteka PCR omogoča notranja kontrola. Ta se uporablja za določevanje lažno-negativnih rezultatov in ugotavljanje sposobnosti podvojevanja DNK, v primeru kompetitivnega PCR pa tudi za kvantifikacijo. Za kvantifikacijo se uporabljajo predvsem standardi, med katerimi ločimo zunanjo (eksogeno) kontrolo in notranji standard. Zunanjo kontrolo lahko predstavljajo čisti pomnožek, klonirani pomnožek ali pa del tarčnega genoma, kateri se pomnožujejo v isti reakciji, vendar v ločeni epruvetki za PCR. Koncentracijo neznanе DNK v vzorcu razberemo iz standardne krivulje. Standardno krivuljo pripravimo iz standardnih vzorcev v katerih so decimalne razredčitve zunanje kontrole. Notranji standard je del tarčne DNK, ki se pomnožuje istočasno v isti epruvetki za PCR kot tarčna DNK z enakima oligonukleotidnima začetnikoma (Mackay, 2004).

2.3.5 Multipli PCR v realnem času

Pri multiplem PCR v realnem času je v isti reakciji več parov oligonukleotidnih začetnikov. Namen je podvojevanje več različnih sekvenc DNK v isti reakciji. Poleg tega se pri multiplem PCR v realnem času uporablja tudi več različnih oligonukleotidnih sond v isti reakciji, predvsem za razločevanje med pomnožki, ki so produkt podvojevanja enega ali več parov oligonukleotidnih začetnikov. Problem te metode je v dejstvu, da obstaja omejeno število fluorogenov (preglednica 1), saj morajo zaradi specifičnosti reakcije oddajati fluorescenco pri različnih valovnih dolžinah, da ne pride do napačnih rezultatov (Mackay, 2004).

2.3.6 Prednosti PCR v realnem času

Glavne prednosti PCR v realnem času v primerjavi s klasičnim PCR so (Logan in Edwards, 2005):

- podvojevanje in detekcija pomnožka sta v istem sistemu,
- fluorescentna barvila in sonde omogočajo sprotno spremljanje rezultatov reakcije,

- možna je kvantifikacija pomnožkov,
- povečana specifičnost zaradi uporabe specifičnih sond,
- območje detekcije med $10 - 10^{10}$ kopij,
- omogoča analizo velikega števila vzorcev (200-5000 vzorcev/dan),
- pomnoževanje in detekcija pomnožkov potekata v popolnoma zaprtem sistemu, zato je zmanjšana verjetnost kontaminacije vzorcev in okolja.

2.3.7 Določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* s PCR v realnem času

Ne glede na to, da sodi PCR v realnem času med novejšje metode, je že kar nekaj avtorjev s to metodo poizkušalo določiti in kvantificirati bakterije vrste *S. enterica* in *L. monocytogenes*.

Chen in sodelavci (2000) so določali bakterije rodu *Salmonella* s PCR v realnem času z določitvijo pomnožka s »TaqMan sondo« v naravno kontaminiranih živilih in ugotovili, da je občutljivost PCR v realnem času $4,2 \times 10^4$ cfu/ml. Ugotovili so tudi, da prisotnost bakterij vrst *E. coli* in *C. freundii* kot kompetitivnih bakterij ne moti določanja bakterij rodu *Salmonella*.

Schneider in sod. (2002) so izvedli PCR v realnem času za določevanje bakterij rodu *Salmonella* po mehanizmu linearnih oligonukleotidnih sond (»Light-cycler system«). Ugotovili so, da prisotnost bakterij vrste *E. coli* kot kompetitivnih bakterij, tudi v visokih koncentracijah, ne moti določanja bakterij rodu *Salmonella* in izmerili občutljivost reakcije $10^3 - 10^4$ cfu/ml.

Csordas in sodelavci (2004) so testirali različne pare oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella*, med njimi tudi par oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in dobili pozitivne rezultate. Detekcija je bila uspešna do koncentracije 3×10^3 cfu / ml. Potem so postavili nov par oligonukleotidnih začetnikov Sen za določanje bakterij vrste *S. enterica* in jih uspešno detektirali v območju 6×10^5 do 6×10^0 cfu/ml.

Podobno so Malorny in sodelavci (2004) postavili nov par oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde za določanje bakterij rodu *Salmonella* v hrani. Specifičnost reakcije so preverili na 110 sevih bakterij rodu *Salmonella*. Detekcija pri koncentraciji 10^4 cfu/ml je bila 100 %, pri koncentraciji 10^3 cfu/ml pa 70 %.

Huogh in sodelavci (2002) so uspešno določili bakterije vrste *L. monocytogenes* v 25 gramskih vzorcih cvetače, v katere so dodali iskane bakterije v koncentracijah med $10^3 - 10^{10}$ cfu/ml brez predhodne obogatitve vzorca.

Bhagwat (2003) je z PCR v realnem času določil bakterije vrste *L. monocytogenes* do koncentracije $10^2 - 10^3$ cfu/ml. Celoten postopek metode z inkubacijo je trajal le 30 h. Wang in sodelavci (2004) so omenjeno metodo skrajšali in določili bakterije vrste *L. monocytogenes* v koncentracijah $10^3 - 10^4$ cfu/g v vzorcih surove klobase v 10 h.

Hein in sod. (2000) navajajo uporabo programa Primer express 2.0 za iskanje oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidnih sond za določevanje bakterij vrst *L. monocytogenes* in *L. innocua* z metodo PCR v realnem času. Poiskali so 4 pare

oligonukleotidnih začetnikov LMIAP 1/2, LMIAP 3/4, LIM1/LUN1 ter LIM 2/LIMRE, ki se prilegajo na različne dele gena *iap*. Najprej so jih preverili s klasičnim PCR-jem, pri uporabi PCR v realnem času pa so dobili pri določevanju bakterij vrste *L. monocytogenes* same pozitivne rezultate, pri določevanju bakterij vrste *L. innocua* pa same negativne. S tem so določili, da so njihovi oligonukleotidni začetniki visoko specifični za bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Tudi Rodrigez-Lazaro in sod. (2004) navajajo uporabo programa Primer express 2.0 za iskanje oligonukleotidnih začetnikov in sond. S tem programom so poiskali 2 kompleta oligonukleotidnih začetnikov in sond. Poiskali so jih na genih *hlyA* in *iap*, značilnih za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Njihovo teoretično specifičnost so preverili s programom BLAST (NCBI BLAST, 2006), ki je potrdil, da se njihova pomnožka ne ujemata z nobeno bakterijsko sekvenco DNK, razen s tarčno molekulo DNK bakterij vrste *L. monocytogenes*. Praktično so to specifičnost preverili s testiranjem 100 različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* in potrdili 100 % specifičnost.

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:

- *Salmonella* Enterica ŽM348, *S. Enteritidis* ŽM146, *S. Typhimurium* ŽM352, *S. Typhimurium* ŽM375
- *L. monocytogenes* ŽM51, *L. monocytogenes* ŽM52, *L. monocytogenes* ŽM53, *L. monocytogenes* ŽM54, *L. monocytogenes* ŽM55, *L. monocytogenes* ŽM56, *L. monocytogenes* ŽM57, *L. monocytogenes* ŽM58, *L. monocytogenes* ŽM59, *L. monocytogenes* ŽM60, *L. monocytogenes* ŽM61, *L. monocytogenes* ŽM62, *L. monocytogenes* ŽM63, *L. monocytogenes* ŽM64, *L. monocytogenes* ŽM45, *L. monocytogenes* ŽM46, *L. monocytogenes* ŽM71, *L. monocytogenes* ŽM72, *L. monocytogenes* ŽM73, *L. monocytogenes* ŽM74, *L. monocytogenes* ŽM101, *L. monocytogenes* ŽM107, *L. monocytogenes* ŽM113, *L. monocytogenes* ŽM314, *L. monocytogenes* ŽM315, *L. monocytogenes* ŽM343
- *Listeria ivanovii* ŽM65, *L. ivanovii* ŽM279, *L. ivanovii* ŽM235A
- *Listeria seeligeri* ŽM288, *L. seeligeri* ŽM495
- *Listeria innocua* ŽM498, *L. innocua* ŽM499
- *Listeria welshimeri* ŽM496, *L. welshimeri* ŽM497
- *Bacillus cereus* ŽMJ40, *B. cereus* ŽMJ41, *B. cereus* ŽMJ42, *B. cereus* ŽMJ56, *B. cereus* ŽMJ59, *B. cereus* ŽMJ164, *B. cereus* ŽMJ165, *B. cereus* ŽMJ166
- *Clostridium perfringens* ŽMJ167
- *Clostridium tyrobutyricum* ŽMJ168, *Cl. tyrobutyricum* ŽMJ169, *Cl. tyrobutyricum* ŽMJ170
- *Enterococcus faecalis* ŽMJ90
- *Escherichia coli* ŽMJ370
- *Streptococcus pyogenes* ŽM494

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali neselektivna gojišča, ki smo jih pripravljali po navodilih proizvajalcev:

- Gojišče Brain Heart Brath (BHI, 1.10493, Merck, Nemčija)
- Gojišče Tryptone soya agar (TSA, CM 0131, Oxoid, Anglija)

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 Reagenti za lizo bakterijskih celic

- Bi-destilirana sterilna voda (H_2O_{KEM})
- 0,125% raztopina natrijevega dodecil sulfata (SDS) (V 6551, Promega, ZDA)
- 0,05 M raztopina natrijevega hidroksida (NaOH) (S 0845, Sigma, ZDA)

3.1.3.2 Reagenti za PCR

- Puffer PCR 10x (Tris-HCl: 100 mM (pH = 9,0), KCl: 500 mM, Triton X-100: 1 %) (M190A, Promega, ZDA)
- Magnezijev klorid: 25 mM ($MgCl_2$) (A351B, Promega, ZDA)
- Tween 20: 0,05 g/ml (1.09280.0100, Merck, Nemčija)
- Mešanica deoksinukleotid trifosfatov – dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) (303, Promega, ZDA): 2 mM
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993):
 - ST11 (5' - AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGC A -3'): 100 pmol/ μ l
 - ST15 (5' - GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG -3'): 100 pmol/ μ l
- 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/ μ l
 - LM2 (5' - AAG CGC TTG CAA CTG CTC -3'): 100 pmol/ μ l
- Taq DNA-polimeraza: 5U/ μ l (M1661, Promega, ZDA)
- H_2O_{PCR} (0032 006.159, Eppendorf, Nemčija)

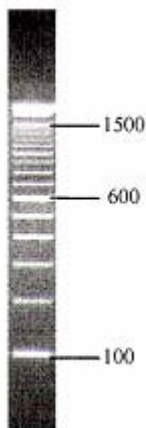
3.1.3.3 Reagenti za PCR v realnem času

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x (4309155, Applied Biosystems, ZDA):
 - SYBR Green 1 barvilo
 - AmpliTaq Gold® DNA-polimeraza
 - Mešanica deoksinukleotid trifosfatov – dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) z dUTP
 - Pasivna Referenca 1
 - Optimizirane komponente pufra
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993):
 - ST11 (5' - AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGC A -3'): 100 pmol/ μ l
 - ST15 (5' - GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG -3'): 100 pmol/ μ l
- 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/ μ l
 - LM2 (5' - AAG CGC TTG CAA CTG CTC -3'): 100 pmol/ μ l
- Dva para oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1, ter SBF1/SBR2 za bakterije vrst *Listeria monocytogenes*:
 - SBF1 (5' - CAT AAA AAC TGG AGC GAA AAC AAT AA -3'): 10 pmol/ μ l
 - SBR1 (5' - TAA AGT GTA CCC CAG ATG GA -3'): 10 pmol/ μ l

- SBR2 (5` - CCA GTG CAT TCT TTA GCG TAA ACA -3`): 10 pmol/ μ l
- SBS1 (6-FAM- AGG TAA CGC AAG AAA T-MGB):10 pmol/ μ l
- H₂O_{PCR} (0032 006.159, Eppendorf, Nemčija)

3.1.3.4 Reagenti za gelsko elektroforezo

- Pufer TAE 10x (pH = 8,1)
 - 0,4 M raztopina Tris baze (H5131, Promega, ZDA)
 - 0,2 M raztopina očetne kisline (Merck, 1.0063.1000, Nemčija)
 - 0,02 M raztopina Na₂ –EDTA (E 5134, Sigma, ZDA)
- Agarozni gel:
 - Agaroz (50014, FMC BioProducts, ZDA)
 - Pufer TAE 0,5x
- Barvilo za nanos pomnožkov na gel 10x (0032 006.850 Eppendorf, Nemčija)
- Molekularni označevalec dolžin pomnožkov DNK – 100bp DNA Ladder (15628-019, Invitrogen, ZDA)



Slika 5: Velikost fragmentov molekularnega označevalca dolžin pomnožkov na agaroznem gelu (100 bp DNA Ladder 15628-019, Invitrogen, ZDA)

- Raztopina etidijevega bromida: 0,5mg/l (E 2028, Sigma, ZDA)

3.1.3.5 Druge kemikalije

- Raztopina etanola: 96 % (vol.), 70 % (vol.) (1.00971.6025, Merck, Nemčija)
- Raztopina natrijevega hipoklorita: 10 % (vol.) (1455 201, Kemika, Hrvaška)

3.1.4 Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali različno laboratorijsko opremo, ki je navedena v preglednici 2.

Preglednica 2: Laboratorijska oprema

APARATURA	OZNAKA	PROIZVAJALEC
Aparatura PCR	Gene Amp DNA Termal Cycler 2400	Perkin Elmer, ZDA
Aparatura PCR	Real time PCR 7500	Applied Biosystems, ZDA
Avtomatske pipete	P10, P100, P1000	Gilson, Francija
Centrifuga	Mini spin PLUS	Eppendorf, Francija
Elektroforeza	PowerPac Basic	BioRad, ZDA
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
	/	Gorenje, Slovenija
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Komora za PCR	Holten Laminar Air	Heto-Holten, Nemčija
Mikrovalovna Pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Sistem za dokumentiranje gelov	Gel doc 20H00	BioRad, ZDA
Tehtnica	Mono Bloc PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
Vrtično mešalo	Yello Linw TTS2	IKA, ZDA
Vodna kopel	E7805028	Sutjeska, Jugoslavija
Zmrzovalnik (-20°C)	/	Gorenje, Slovenija

Poleg opreme, našete v preglednici 2, smo pri eksperimentalnem delu uporabili tudi gorilnike, čaše, Eppendorfove mikrocentrifugirke (1,5 ml, 2 ml), epruvete, erlenmajerice, merilne valje, nastavke za pipete (1 ml, 100 µl, 10 µl), petrijevke, steklene palčke, cepilne zanke, stojala, aluminijasto folijo, vrečke za sterilizacijo, žlice.

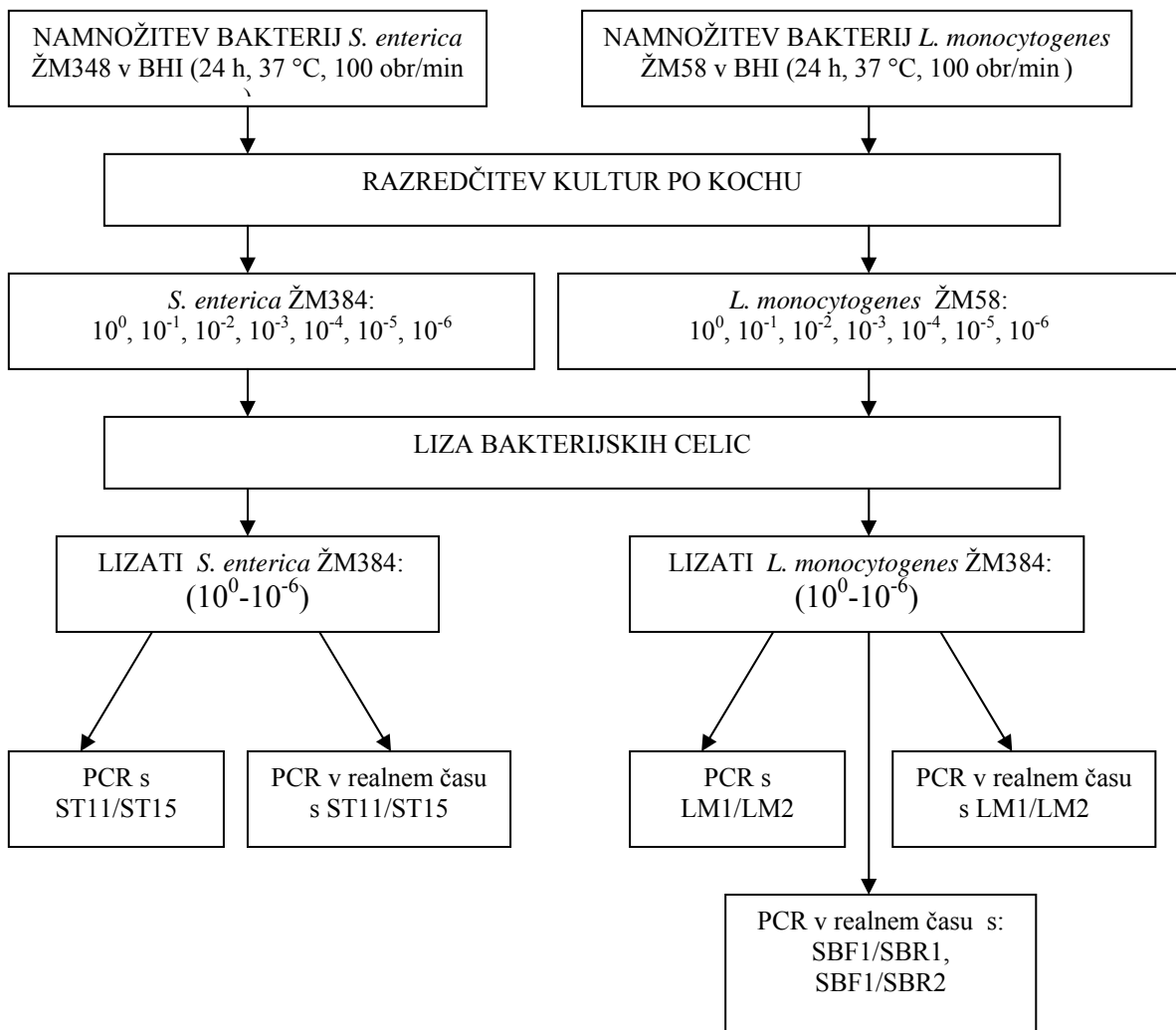
3.2 METODE

3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Naš eksperiment je potekal v štirih delih:

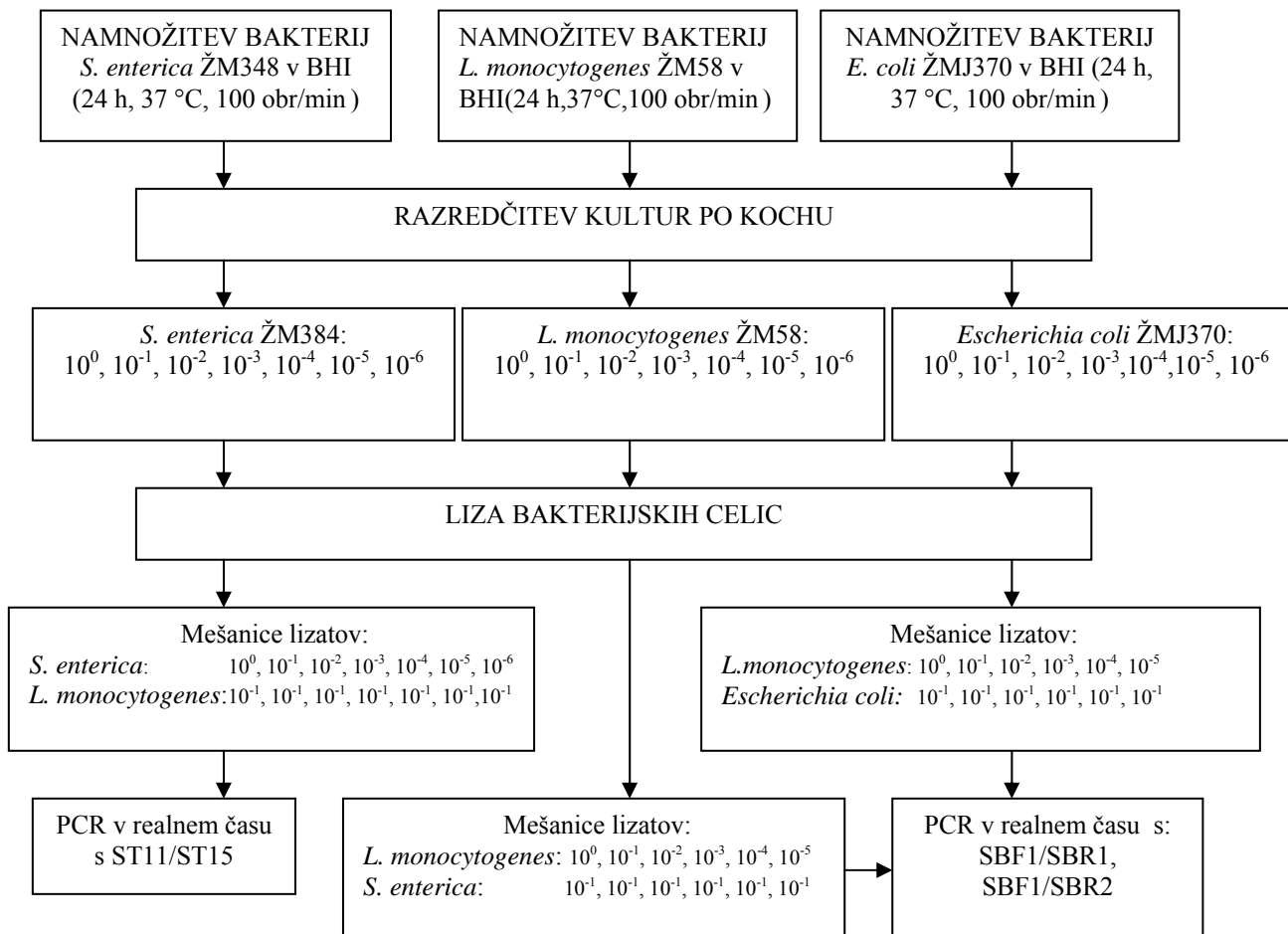
- V prvem delu smo izvedli klasičen PCR z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 za določanje bakterij vrste *S. enterica* in oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.
- V drugem delu smo postavili protokol PCR v realnem času ter določili občutljivost PCR in PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15. Z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 smo poskušali postaviti protokol izvedbe PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.

S poizkusi prikazanimi kot shema na sliki 6, smo določili občutljivost PCR in PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*.



Slika 6: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR in PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

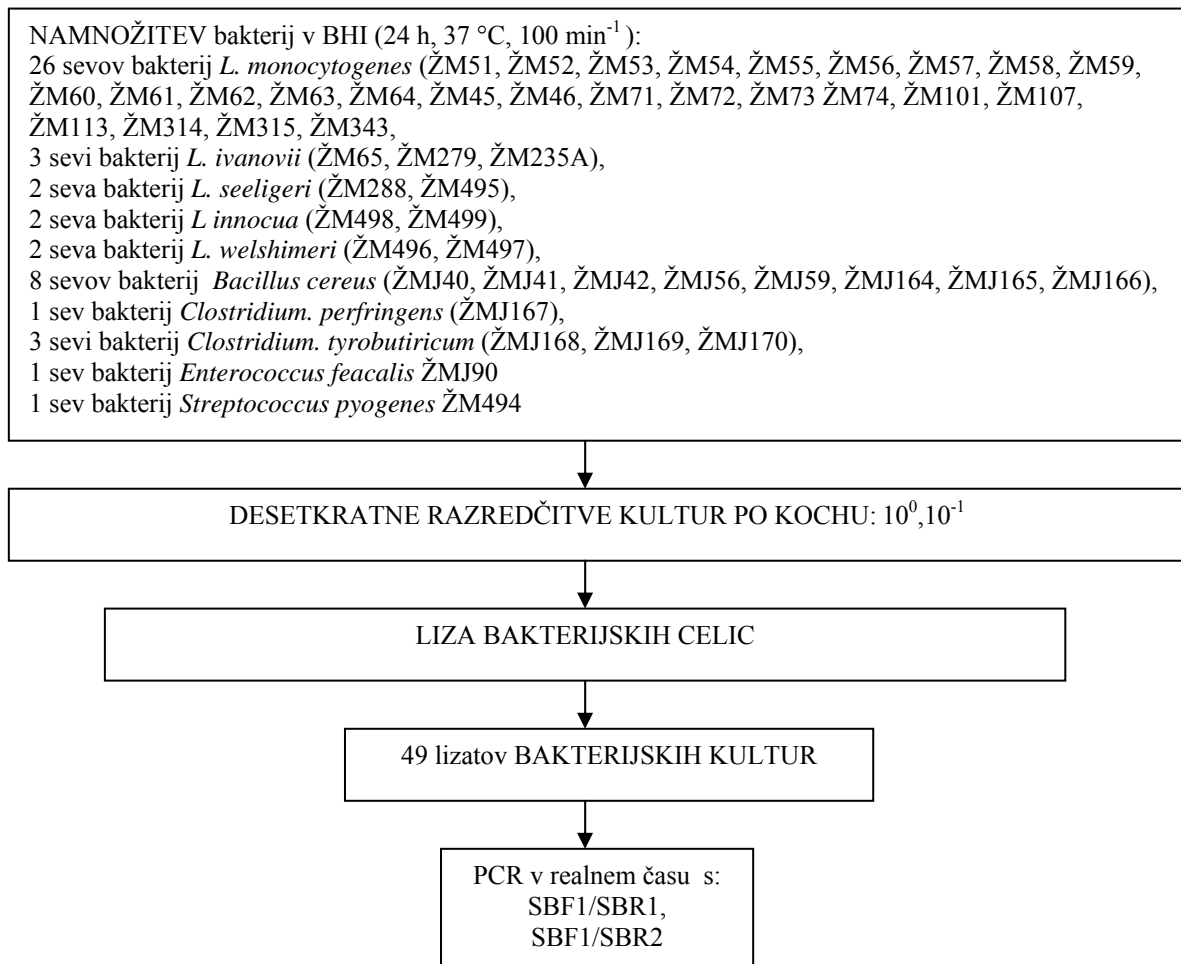
S poizkusi prikazanimi kot shema na sliki 7, smo določili občutljivost PCR in PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* v mešanih kulturah



Slika 7: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za mešane kulture bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

- V tretjem delu smo zaradi slabe učinkovitosti PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 med poznanimi sekvencami gena *hlyA* za listeriolizin poiskali nove oligonukleotidne začetnike in sondo za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.
- V četrtem delu smo praktično preverili ter določili občutljivost in specifičnost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2.

S poizkusi prikazanimi kot shema na sliki 8 smo določili specifičnost parov oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 pri PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.



Slika 8: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve specifičnosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur

V 4 ml ne-selektivnega gojišča BHI smo suspendirali izbrano bakterijsko kolonijo ali dodali 1 ml suspenzije bakterij, navedenih v poglavju 3.1.1. Suspenzijo smo 24 h inkubirali v inkubatorju na mešalu (100 obratov/min) pri 37 °C.

3.2.3 Priprava bakterijske DNK z lizo bakterijskih celic

- Alkalna liza (Trkov in Jeršek, 2001)

Po 24-h inkubaciji bakterij v neselektivnem gojišču BHI smo 1 ml suspenzije prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in vsebino centrifugirali 5 min s hitrostjo 13000 obratov/min. Nato smo

odstranili supernatant, dodali 100 μ l H₂O_{KEM} in ponovno centrifugirali 5 min pri 13000 obratov/min. Nato smo dodali 100 μ l mešanice NaOH (0,05 M) in SDS (0,125 %) (1:1) ter suspenzijo 15 minut segrevali pri temperaturi 94 °C.

- Toplotna liza (Trkov in sod., 1999)

Po 24-h inkubaciji bakterij v ne-selektivnem gojišču BHI smo 1 ml suspenzije prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko in vsebino centrifugirali 5 min pri 13000 obratov/min. Nato smo odstranili supernatant, dodali 100 μ l H₂O_{KEM} in ponovno centrifugirali 5 min s hitrostjo vrtenja 13000 obratov/min. Nato smo dodali 100 μ l H₂O_{KEM} ter suspenzijo 15 minut segrevali pri temperaturi 94 °C.

3.2.4 Potek klasičnega PCR

3.2.4.1 Reakcijske mešanice za klasični PCR

Za vsak PCR smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice.

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *S. enterica*

V 50 μ l reakcijske mešanice za določevanje bakterij vrste *S. enterica* so bili naslednji reagenti (Lenček, 2005):

- Pufer PCR 10x: 5 μ l
- MgCl₂: 2 mmol / l
- Tween 20 (0,05 g / ml): 0,2 μ l
- Mešanica dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP): 200 μ mol / l
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* ST11/ST15
 - ST11: 100 pmol/ μ l
 - ST15: 100 pmol/ μ l
- Taq DNA – polimeraza: 2,5 U

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

V 50 μ l reakcijske mešanice za določevanje bakterij vrste *Listeria monocytogenes* so bili naslednji reagenti (Lenček, 2005):

- Pufer PCR 10x: 5 μ l
- MgCl₂: 2 mmol / l
- Tween 20 (0,05 g / ml): 0,2 μ l
- Mešanica dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP): 200 μ mol / l
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *Listeria monocytogenes* LM1/LM2:
 - LM1: 100pmol/ μ l
 - LM2: 100pmol/ μ l
- Taq DNA-polimeraza: 2,5 U

3.2.4.2 PCR

Mikrocentrifugirke (0,2 ml) s 45 μ l reakcijske mešanice in 5 μ l lizata smo razvrstili v aparaturo za PCR. Pomnoževanje je vključevalo 5 min denaturacijo DNK, 30 ciklov, sestavljenih iz 15 s denaturacije pri 95 °C, 15 s prileganja oligonukleotidnih začetnikov na

specifične dele DNK pri 55 °C in 30 s podaljševanja DNK pri 72 °C. Na koncu je sledilo 8 min podaljševanje DNK pri 72 °C in hlajenje na 4 °C.

3.2.4.3 Dokazovanje pomnožkov z agarozno gelsko elektroforezo

Pomnožke smo dokazovali z agarozno gelsko elektroforezo. K 8 µl pomnožka smo dodali 2 µl barvila za nanos pomnožkov. Nato smo raztopino nanесли v 1,5 % agarozni gel v pufru TAE 0,5x. Na gel smo nanесли tudi molekularni označevalec pomnožkov DNK (100bp DNA Ladder). Elektroforeza je potekala pri konstantni napetosti 100 V. Gel smo 10 – 15 min barvali v raztopini EtBr, ter ga potem opazovali pod UV svetlobo in ga računalniško dokumentirali. Velikost pomnožkov smo odčitali glede na velikost fragmentov molekularnega označevalca. Velikost pomnožkov 701 bp je pomenila prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes*. Velikost pomnožkov 429 bp pa prisotnost bakterij vrste *S. enterica*.

3.2.5 Potek PCR v realnem času

3.2.5.1 Reakcijske mešanice za PCR v realnem času

Za vsak PCR smo pripravili reagente v obliki skupne reakcijske mešanice.

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *S. enterica* z ST11/ST15

V reakcijski mešanici za določanje bakterij vrste *S. enterica* so bili naslednji reagenti:

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella*
 - ST11: 10 pmol/µl
 - ST15: 10 pmol/µl

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z LM1/LM2

V reakcijski mešanici za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* so bili naslednji reagenti:

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *L. monocytogenes*
 - LM1: 10 pmol/µl
 - LM2: 10 pmol/µl

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z SBF1/SBR1

V reakcijski mešanici za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* so bili naslednji reagenti:

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *L. monocytogenes*
 - SBF1: 10 pmol/µl
 - SBR1: 10 pmol/µl

Reakcijska mešanica za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z SBF1/SBR2

V reakcijski mešanici za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* so bili naslednji reagenti:

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x : 12,5 µl
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *L. monocytogenes*
 - SBF1: 10 pmol/µl
 - SBR2: 10 pmol/µl

3.2.5.2 PCR v realnem času

Potek PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15 in LM1/LM2:

V ploščico s 96 prostori smo dali po 22,5 µl reakcijske mešanice in 2,5 µl lizata DNK ter ploščico postavili na posebno držalo v aparaturo Real-time 7500. Prvi cikel je bila 10 min aktivacija DNA-polimeraze. Sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz 15 s denaturacije pri 94 °C, 15 s prileganja oligonukleotidnih začetnikov na specifične dele DNK pri 55 °C in 30 s podaljševanja DNK pri 72 °C. Na koncu je sledila še faza disociacije DNK. Ta cikel je sestavljen iz 15 s denaturacije pri 95 °C, 1 min prileganja pri 60 °C in 15 s denaturacije pri 95 °C.

Potek PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2:

V ploščico s 96 prostori smo dali po 22,5 µl reakcijske mešanice in 2,5 µl lizata ter ploščico postavili na posebno držalo v aparaturo Real-time 7500. Prvi cikel je bila 10 min aktivacija polimeraze AmpliTaq Gold® DNA. Sledilo je 40 ciklov, sestavljenih iz 15 s denaturacije pri 95 °C in 1 min prileganja oligonukleotidnih začetnikov na specifične dele DNK, ter podaljševanja DNK pri 60 °C. Na koncu je sledila še faza disociacije DNK. Ta cikel je sestavljen iz 15 s denaturacije pri 95 °C, 1 min prileganja pri 60 °C in 15 s denaturacije pri 95 °C.

4 REZULTATI

4.1 Določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* s PCR

4.1.1 Občutljivost PCR za določanje čistih kultur bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

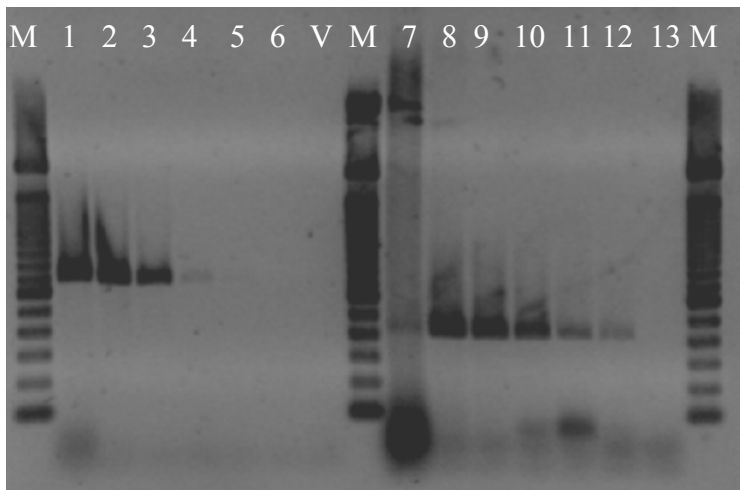
Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* smo določili z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 (200 nM), specifičnima za bakterije rodu *Salmonella* in LM1/LM2 (200 nM), specifičnima za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Pomnožke smo dokazali z gelsko elektroforezo.

Preglednica 3: Občutljivost PCR za določanje čistih kultur bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

Oznaka vzorca	Vrsta bakterij	Oligonukleotidni začetniki	N (cfu/ml)	PCR (+/-)
1	<i>S. enterica</i>	ST11/ST15	$3,2 \times 10^8$	-
2			$3,2 \times 10^7$	+
3			$3,2 \times 10^6$	+
4			$3,2 \times 10^5$	+
5			$3,2 \times 10^4$	+
6			$3,2 \times 10^3$	+
7			$3,2 \times 10^2$	-
8	<i>L. monocytogenes</i>	LM1/LM2	$2,1 \times 10^8$	+
9			$2,1 \times 10^7$	+
10			$2,1 \times 10^6$	+
11			$2,1 \times 10^5$	+
12			$2,1 \times 10^4$	-
13			$2,1 \times 10^3$	-

Pri bakterijah vrste *S. enterica* so bili vsi rezultati PCR pozitivni, razen pri vzorcu z oznako 1 (preglednica 3, slika 9) pri katerem je prišlo do inhibicije reakcije zaradi prevelike koncentracije bakterijskih celic in pri vzorcu z oznako 7, kjer ne zaznamo pomnožka, zaradi premajhne koncentracije celic. Občutljivost klasičnega PCR za določanje bakterij vrste *S. enterica* po dokazovanju pomnožkov z gelsko elektroforezo in barvanju z EtBr je bila 10^3 cfu/ml.

Pri bakterijah vrste *L. monocytogenes* so bili rezultati PCR pri vzorcih z oznakami 8, 9, 10 in 11 pozitivni, medtem ko so bili rezultati negativni pri vzorcih v katerih je bila koncentracija celic enaka ali manjša od $2,1 \times 10^4$ cfu/ml. Občutljivost klasičnega PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* po dokazovanju pomnožkov z gelsko elektroforezo in barvanju z EtBr je bila 10^5 cfu/ml.



Slika 9: Agarozna gelska elektroforeza pomnožkov bakterij vrst *S. enterica* s ST11/ST15 in *L. monocytogenes* z LM1/LM2

Legenda:

M: molekularni označevalec pomnožkov DNK (100bp DNA Ladder)

1: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^8$ cfu /ml

2: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^7$ cfu /ml

3: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^6$ cfu /ml

4: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^5$ cfu /ml

5: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^4$ cfu /ml

6: *L. monocytogenes*, $2,1 \times 10^3$ cfu /ml

V: negativna kontrola (vzorec vsebuje H_2O_{PCR})

7: *S. enterica*, $3,2 \times 10^8$ cfu /ml

8: *S. enterica*, $3,2 \times 10^7$ cfu /ml

9: *S. enterica*, $3,2 \times 10^6$ cfu /ml

10: *S. enterica*, $3,2 \times 10^5$ cfu /ml

11: *S. enterica*, $3,2 \times 10^4$ cfu /ml

12: *S. enterica*, $3,2 \times 10^3$ cfu /ml

13: *S. enterica*, $3,2 \times 10^2$ cfu /ml

4.1.2 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste *S. enterica* v mešani kulturi

V tem eksperimentalnem delu smo različnim koncentracijam bakterij vrste *S. enterica* dodali visoko koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 4) in izvedli PCR z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 (200 nM).

Preglednica 4: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst *S. enterica* v mešani kulturi z bakterijami vrste *L. monocytogenes*

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)		PCR (+/-)
	<i>S. enterica</i>	<i>L. monocytogenes</i>	
1	$2,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^8$	+
2	$2,8 \times 10^4$	$1,7 \times 10^7$	+
3	$2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^8$	+
4	$2,8 \times 10^3$	$1,7 \times 10^7$	+

Pri vseh vzorcih je bil rezultat določanja bakterij vrste *S. enterica* s PCR pozitiven, določena občutljivost klasičnega PCR je bila 10^3 cfu/ml.

4.1.3 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mešani kulturi

V tem eksperimentalnem delu smo različnim koncentracijam bakterij vrste *L. monocytogenes* dodali bakterije vrste *S. enterica* (preglednica 5) in izvedli PCR z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 (200 nM).

Preglednica 5: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst *L. monocytogenes* v mešani kulturi z bakterijami vrste *S. enterica*

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)		PCR
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>	
1	$1,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^8$	+
2	$1,7 \times 10^5$	$2,8 \times 10^7$	+
3	$1,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^8$	-
4	$1,7 \times 10^4$	$2,8 \times 10^7$	-

Pri vzorcih 1 in 2 je bil rezultat pozitiven, občutljivost klasičnega PCR za določanje bakterij vrste *L.monocytogenes* v mešani kulturi, pa je bila 10^5 cfu/ml.

4.2 Določanje bakterij vrste *S. enterica* s PCR v realnem času

4.2.1 Optimizacija koncentracije ST11/ST15 za določanje bakterij vrste *S. enterica*

4.2.1.1 Določanje optimalne koncentracije ST11/ST15 med koncentracijama 100 nM in 1000 nM

Določanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 je potekalo tako, da smo vzorcem z oznakami 1, 2, 3, 4 in 5 dodali v reakcijske mešanice za PCR v realnem času različne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in sicer 100 nM, 300nM, 900nM in 1000 nM (preglednica 6). Vzorec z oznako 5 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 6: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 od 100 nM do 1000 nM

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	C (nM)	Št. ciklov	C _t	Dimeri
1	2,2 x 10 ⁸	100	30	29,20	malo
		300	30	29,06	malo
		900	30	29,22	nezaznavno
		1000	30	29,20	nezaznavno
2	2,2 x 10 ⁶	100	30	19,90	nezaznavno
		300	30	18,11	nezaznavno
		900	30	17,72	nezaznavno
		1000	30	18,98	nezaznavno
3	2,2 x 10 ⁴	100	30	25,29	malo
		300	30	22,62	nezaznavno
		900	30	22,25	nezaznavno
		1000	30	22,66	malo
4	2,2 x 10 ²	100	30	nezaznavno	nezaznavno
		300	30	29,54	srednje
		900	30	29,21	srednje
		1000	30	29,21	veliko
5	0	100	30	nezaznavno	nezaznavno
		300	30	nezaznavno	nezaznavno
		900	30	nezaznavno	malo
		1000	30	nezaznavno	malo

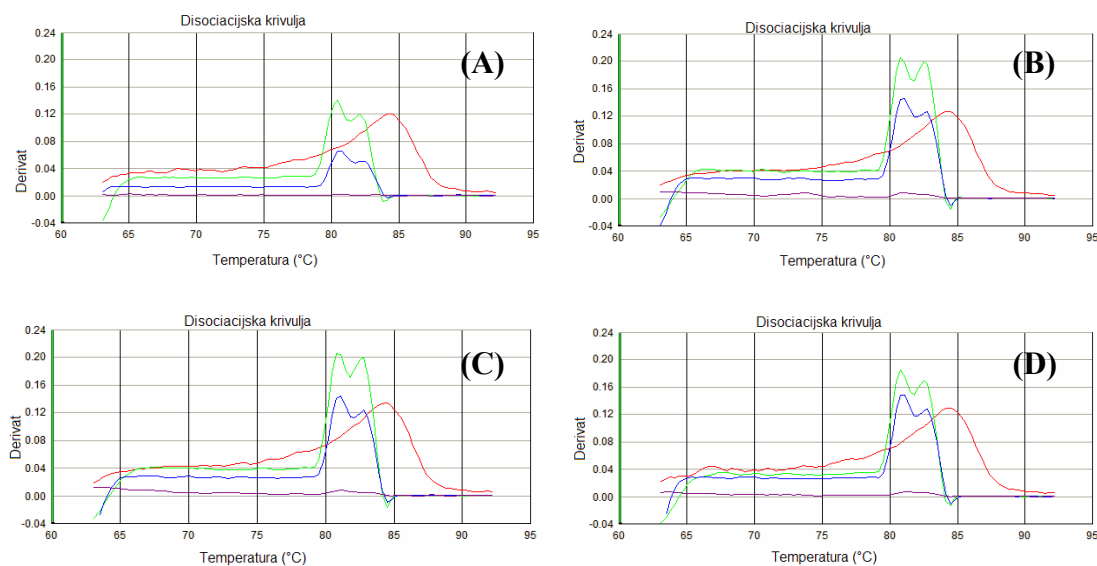
Količino dimerov smo ocenili relativno glede na količino pomnožka. Če je bilo dimerov manj kot pomnožka, smo te ocenili kot »malo«, če je bilo dimerov toliko kot pomnožka, smo jih ocenili z »srednje« in če jih je bilo več kot pomnožka, smo jih ocenili z »veliko«. Če dimerov ni bilo, smo označili kot »nezaznavno«, če pa so bili le dimeri, pa smo označili s »samo dimeri«.

Pri koncentraciji ST11/ST15 100 nM je bila količina pomnožka manjša, glede na koncentraciji 300 nM in 900 nM. V preglednici 6 vidimo, da pri nizki koncentraciji celic (vzorec z oznako 4) in koncentraciji ST11/ST15 100 nM pomnožek ni bil zaznaven. Pri visoki koncentraciji ST11/ST15 1000 nM pride do tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Le-ti se tvorijo med samimi oligonukleotidnimi začetniki predvsem takrat, ko je koncentracija bakterij oziroma DNK nizka in takrat, ko je previsoka koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. To se vidi pri vzorcu z oznako 3, kjer pride do nastanka dimerov pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 100 nM in 1000 nM.

Pri optimizaciji smo upoštevali tudi vrednosti C_t, ki povedo koliko ciklov je potrebno, da aparaturna zazna fluorescentni signal pri določenih razmerah reakcije. Ta signal je v našem primeru posledica tvorbe pomnožka z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 in dimerov ter emisije fluorescentnega barvila SYBR[®] Green I, ki se veže na dvojne vijačnice

DNK. Vrednosti C_t so pri koncentracijah ST11/ST15 300 nM in 900 nM večinoma nižje kot pri koncentracijah 100 ali 1000 nM, kar je zaželjeno, saj aparatura hitreje zazna signal.

Na sliki 10 so prikazane temperature taljenja dvojnih vijačnic DNK, ki so nastale pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 100 nM (A), 300 nM (B), 900 nM (C) in 1000 nM (D). Pomnožki so predstavljeni kot vrhovi krivulj na grafih, ki prikazujejo temperature njihove disociacije oz. taljenja v temperaturnem območju od 80 do 85 °C. Količina pomnožkov je odvisna od koncentracije ST11/ST15.



Slika 10: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov, dobljenih s 100 nM (A), 300 nM (B), 900 nM (C) in 1000 nM (D) koncentracijo ST11/ST15

Legenda:

- Rdeč signal** – vzorec 1: $2,2 \times 10^8$ cfu/ml
- Zelen signal** – vzorec 2: $2,2 \times 10^6$ cfu/ml
- Moder signal** – vzorec 3: $2,2 \times 10^4$ cfu/ml
- Vijoličen signal** – vzorec 4: $2,2 \times 10^2$ cfu/ml

Glede na rezultate smo koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 100 nM in 1000 nM izločili iz nadaljnega preizkušanja in za nadaljnje optimiranje encimske reakcije izbrali koncentraciji 300 nM in 900 nM, saj pride pri obeh primerih do približno enako velike količine pomnožka.

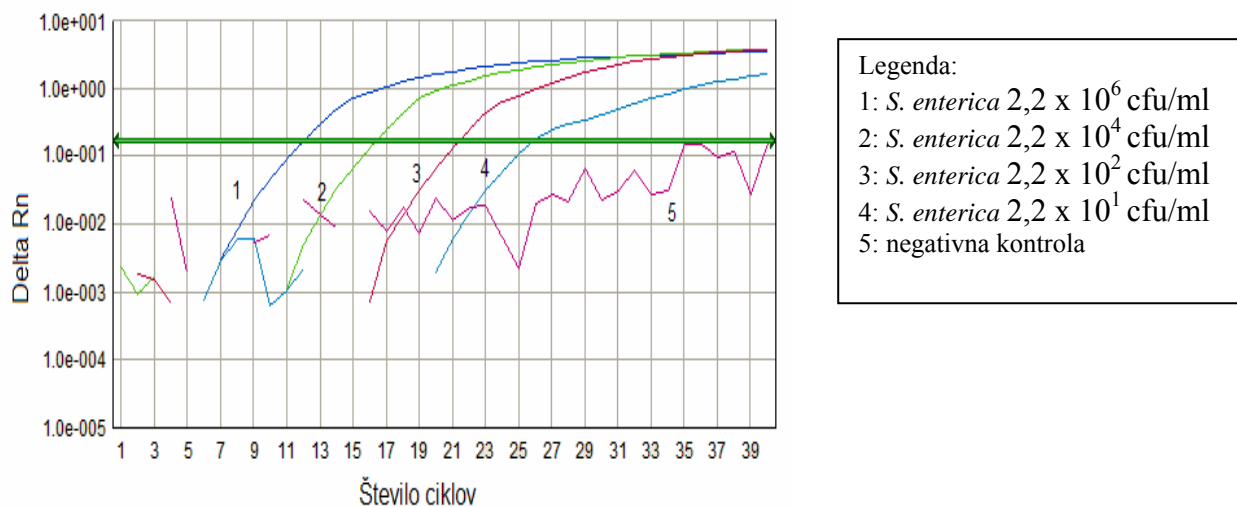
4.2.1.2 Določanje optimalne koncentracije ST11/ST15 med koncentracijama 300 nM in 900 nM

Iskanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 med koncentracijama 300 nM in 900 nM smo nadaljevali tako, da smo preizkusili dodatne tri koncentracije in sicer 450 nM, 600 nM in 750 nM (preglednica 7). Povečali smo tudi število ciklov PCR iz 30 na 49 zato, da bi dobili pomnožke tudi pri nižjih koncentracijah salmonel. Vzorec z oznako 5 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 7: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 od 300 nM do 900 nM

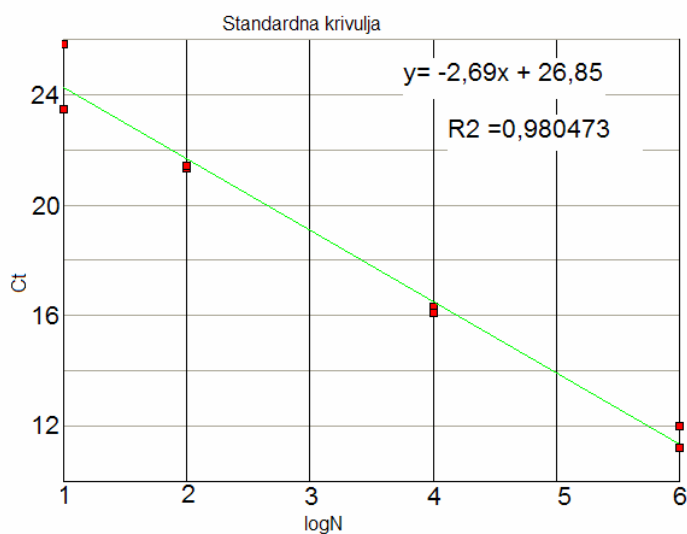
Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	C (nM)	Št. ciklov	C _t	Dimeri
1	2,2 x 10 ⁶	300	49	11,87	nezaznavno
		450	49	11,24	malo
		600	49	11,43	malo
		750	49	11,55	malo
		900	49	11,13	malo
2	2,2 x 10 ⁴	300	49	16,21	malo
		450	49	16,19	srednje
		600	49	16,04	veliko
		750	49	15,86	malo
3	2,2 x 10 ²	900	49	15,80	veliko
		300	49	22,05	srednje
		450	49	21,04	veliko
		600	49	21,22	veliko
4	2,2 x 10 ¹	750	49	21,08	veliko
		900	49	20,69	veliko
		300	49	24,65	veliko
		450	49	23,69	veliko
		600	49	24,58	veliko
5	0	750	49	21,98	veliko
		900	49	29,86	veliko
		300	49	nezaznavno	nezaznavno
		450	49	nezaznavno	nezaznavno
		600	49	nezaznavno	nezaznavno
		750	49	nezaznavno	nezaznavno
		900	49	nezaznavno	nezaznavno

Pri nižjih koncentracijah ST11/ST15 300 nM in 450nM se je tvorilo manj dimerov oligonukleotidnih začetnikov, hkrati pa je bila tudi količina pomnožkov manjša kot pri koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 600nM. Pri višjih koncentracijah ST11 in ST15 750 nM in 900 nM je bila koncentracija dimerov predvsem v vzorcih z malo tarčne DNK zelo velika. Za optimalno smo določili koncentracijo ST11/ST15 600nM. Določili smo tudi občutljivost PCR v realnem času za določevanje bakterije vrste *S.enterica* 22 cfu/ml oziroma 10¹ cfu/ml.



Slika 11: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* s 600 nM ST11/ST15

Pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15 je bil naklon standardne krivulje $-2,69$ najbližje idealnemu naklonu, ki znaša $-3,32$ (slika 12).



Slika 12: Standardna krivulja pri PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15

4.2.2 Primerjava rezultatov PCR v realnem času dobljenih s programom SALLIS2b in univerzalnim programom aparata Real-time7500

Program SALLIS 2b (Jeršek in Smole, 2003) je bil predhodno optimiziran za določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* s klasičnim PCR. Razlika med

programom SALLIS2b in univerzalnim programom aparata Real-time 7500 je v fazi pomnoževanja DNK (preglednica 8).

Preglednica 8: Primerjava programa SALLIS2b in univerzalnega programa aparature Real-time 7500

Faza	Program			
	Program SALLIS 2b		Univerzalni program	
	t	T	t	T
Denaturacija DNK	15 s	94 °C	15 s	95 °C
Prileganje oligonukleotidnih začetnikov	15 s	59 °C	60 s	60 °C
Podaljševanje DNK	40 s	72 °C		

Vzorcem, ki so vsebovali različne koncentracije bakterij vrste *S. enterica* z oznakami od 1 do 8 (preglednica 9), smo v reakcijske mešanice za PCR v realnem času dodali 600 nM in 750 nM oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 in izvedli pomnoževanje s programom SALLIS2b in univerzalnim programom aparature Real-time 7500. Pri obeh programih je bilo enako število ciklov (40). Vzorec z oznako 8 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR})

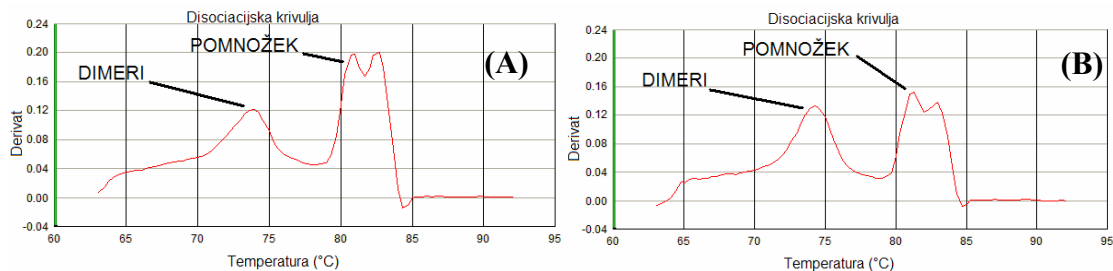
Preglednica 9: Rezultati PCR v realnem času, izvedenem po programu SALLIS2b in univerzalnem programu pri 600 nM in 750 nM koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	C (nM)	Program SALLIS2b		Univerzalni program	
			C _t	Dimeri	C _t	Dimeri
1	1,7 x 10 ⁷	600	14,19	nezaznavno	16,38	srednje
	1,7 x 10 ⁷	750	14,01	nezaznavno	nezaznavno	srednje
2	1,7 x 10 ⁶	600	17,36	nezaznavno	19,36	srednje
	1,7 x 10 ⁶	750	16,79	nezaznavno	19,48	srednje
3	1,7 x 10 ⁵	600	19,51	malo	22,04	veliko
	1,7 x 10 ⁵	750	19,16	malo	27,17	veliko
4	1,7 x 10 ⁴	600	22,69	malo	25,45	veliko
	1,7 x 10 ⁴	750	22,86	malo	25,07	veliko
5	1,7 x 10 ³	600	26,37	srednje	29,42	veliko
	1,7 x 10 ³	750	26,22	veliko	29,80	veliko
6	1,7 x 10 ²	600	30,60	veliko	30,33	samo dimeri
	1,7 x 10 ²	750	30,24	veliko	32,17	samo dimeri
7	1,7 x 10 ¹	600	32,34	veliko	30,26	samo dimeri
	1,7 x 10 ¹	750	30,45	veliko	32,50	samo dimeri
8	0	600	31,03	samo dimeri	29,35	samo dimeri
	0	750	30,32	samo dimeri	31,93	samo dimeri

Pri pomnoževanju s programom SALLIS 2b je bila tvorba dimerov oligonukleotidnih začetnikov ne glede na koncentracijo celic in koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov manjša. Tudi vrednosti C_t so bile nižje pri programu SALLIS2b in zato smo se odločili, da je

ta program v kombinaciji z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 boljši od univerzalnega programa aparature Real-time 7500.

V preglednici 9 in na sliki 13 vidimo, da je pri vzorcu z oznako 5, ki je vseboval $1,7 \times 10^3$ cfu/ml celic, pri 600 nM koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 (A) manj dimerov, ter večja količina pomnožka, kot pri 750 nM koncentraciji ST11/ST15 (B). Zato smo koncentracijo 750 nM izključili iz nadaljnjih poizkusov in uporabljali le koncentracijo 600 nM.



Slika 13: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov, dobljenih pri 600 nM (A) in 750 nM (B) koncentraciji ST11/ST15

4.2.3 Primerjava količine pomnožka z dodajanjem različnih volumnov lizata v reakcijsko mešanico za PCR v realnem času

V sledečem eksperimentalnem delu smo želeli preveriti vpliv volumna dodanega lizata v reakcijsko mešanico za PCR v realnem času na količino pomnožka in količino dimerov. V 25 μ l reakcijske mešanice smo zato dodali vzorcem z oznakami od 1 do 7 enkrat 5 μ l lizata in drugič 2,5 μ l lizata. Vzorec z oznako 7 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

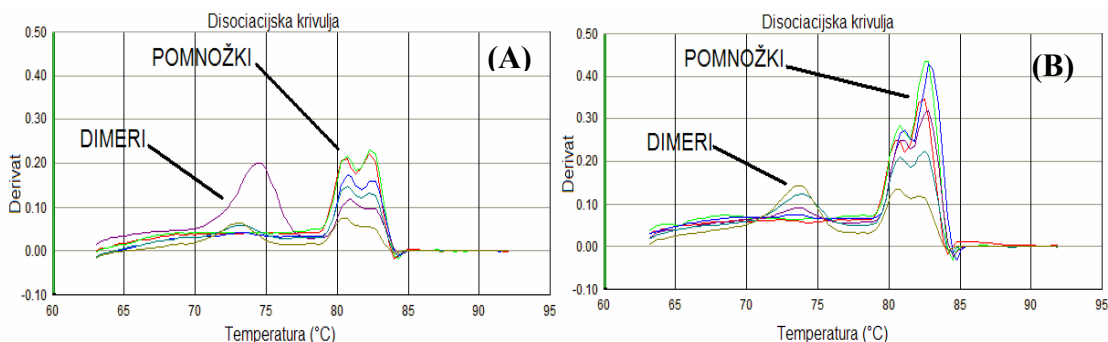
Preglednica 10: Rezultati PCR v realnem času pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15 in pri različnih volumnih dodanih lizatov bakterij vrste *S. enterica*

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	Volumen lizata 5 μ l		Volumen lizata 2,5 μ l	
		C_t	Dimeri	C_t	Dimeri
1	$2,0 \times 10^7$	13,47	nezaznavno	14,19	nezaznavno
2	$2,0 \times 10^6$	16,12	nezaznavno	17,36	nezaznavno
3	$2,0 \times 10^5$	20,22	malo	19,51	malo
4	$2,0 \times 10^4$	22,54	malo	22,69	malo
5	$2,0 \times 10^3$	26,33	srednje	26,37	srednje
6	$2,0 \times 10^2$	30,66	veliko	30,60	veliko
7	0	33,59	samo dimeri	34,02	samo dimeri

Vrednosti C_t so približno enake oziroma malo nižje v primeru, ko smo v reakcijo dodali 5 μ l celičnega lizata. Ugotovili smo, da je količina pomnožkov veliko večja v primeru manjšega volumna lizata (slika 14), prav tako pa je bila večja tudi količina dimerov.

Zaradi večjega volumna dodanega lizata v reakcijsko mešanico pride v encimsko reakcijo tudi več SDS in NaOH, ki smo ju uporabljali za lizo celic, s tem pa do večje inhibicije reakcije. Predvsem SDS deluje kot detergent in zavira delovanje polimeraze. V

nadaljevanju poizkusov smo zato uporabljali 2,5 µl volumen lizata v 25 µl reakcijski mešanici.



Slika 14: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih s ST11/ST15 pri pri 5 µl dodatku lizata (A) in 2,5 µl dodatku lizata v reakcijsko mešanico (B)

Legenda:

- Rdeč signal** – vzorec 1: $2,0 \times 10^7$ cfu/ml
- Zelen signal** – vzorec 2: $2,0 \times 10^6$ cfu/ml
- Moder signal** – vzorec 3: $2,0 \times 10^5$ cfu/ml
- Vijoličen signal** – vzorec 4: $2,0 \times 10^4$ cfu/ml
- Temno zelen signal** – vzorec 5: $2,0 \times 10^3$ cfu/ml
- Rjavo zelen signal** – vzorec 6: $2,0 \times 10^2$ cfu/ml

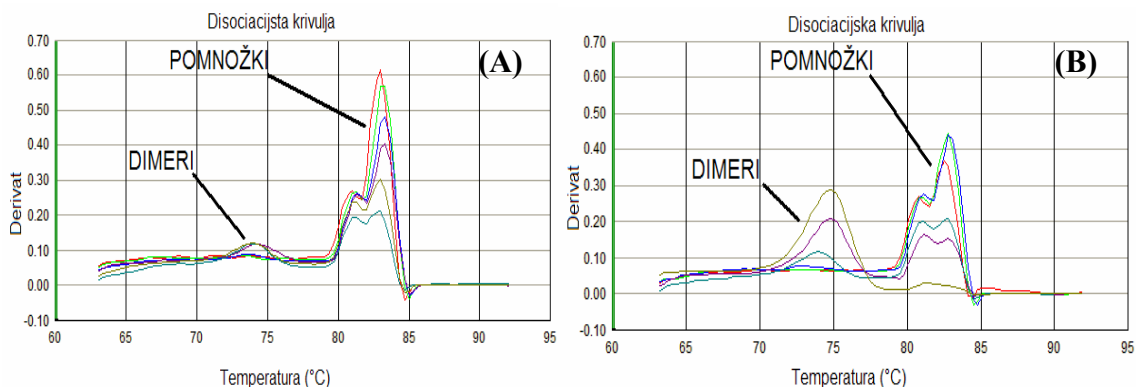
4.2.4 Primerjava količin pomnožkov iz lizatov, dobljenih z alkalno in toplotno lizo

V tem eksperimentalnem delu smo vzporedno pripravili lizate bakterij vrste *S. enterica* z alkalno lizo, kjer smo poleg segrevanja vzorcem predhodno dodali SDS in NaOH, in s samo toplotno lizo. Znano je namreč, da SDS in NaOH povzročata inhibicijo PCR, ker zavirata delovanje DNA-polimeraze. Vzorec z oznako 7 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 11: Rezultati PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15 po toplotni in alkalni lizi DNK bakterij vrste *S. enterica*

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	Toplotna liza		Alkalna liza	
		C_t	Dimeri	C_t	Dimeri
1	$2,0 \times 10^7$	15,26	nezaznavno	14,19	nezaznavno
2	$2,0 \times 10^6$	18,43	nezaznavno	17,36	nezaznavno
3	$2,0 \times 10^5$	22,98	malo	19,51	malo
4	$2,0 \times 10^4$	24,45	malo	22,69	malo
5	$2,0 \times 10^3$	29,31	malo	26,37	srednje
6	$2,0 \times 10^2$	32,79	srednje	30,60	veliko
7	0	35,07	samo dimeri	34,02	samo dimeri

V preglednici 11 in na sliki 15 vidimo, da je količina pomnožka večja po dodatku lizatov, ki so bili pripravljani s toplotno lizo. Prav tako je manjša tudi količina dimerov. Glede na rezultate in glede na to, da SDS in NaOH, ki smo ju uporabljali pri alkalni lizi, zavirata delovanje DNK-polimeraze, smo se odločili, da v nadaljevanju eksperimentalnega dela uporabljamo toplotno lizo za pripravo DNK za PCR v realnem času.



Slika 15: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov dobljenih s ST11/ST15 po dodatku lizatov dobljenih s toplotno lizo (A) in lizatov dobljenih z alkalno lizo (B)

Legenda:

Rdeč signal – vzorec 1: $2,0 \times 10^7$ cfu/ml

Zelen signal – vzorec 2: $2,0 \times 10^6$ cfu/ml

Moder signal – vzorec 3: $2,0 \times 10^5$ cfu/ml

Vijoličen signal – vzorec 4: $2,0 \times 10^4$ cfu/ml

Temno zelen signal – vzorec 5: $2,0 \times 10^3$ cfu/ml

Rjavo zelen signal – vzorec 6: $2,0 \times 10^2$ cfu/ml

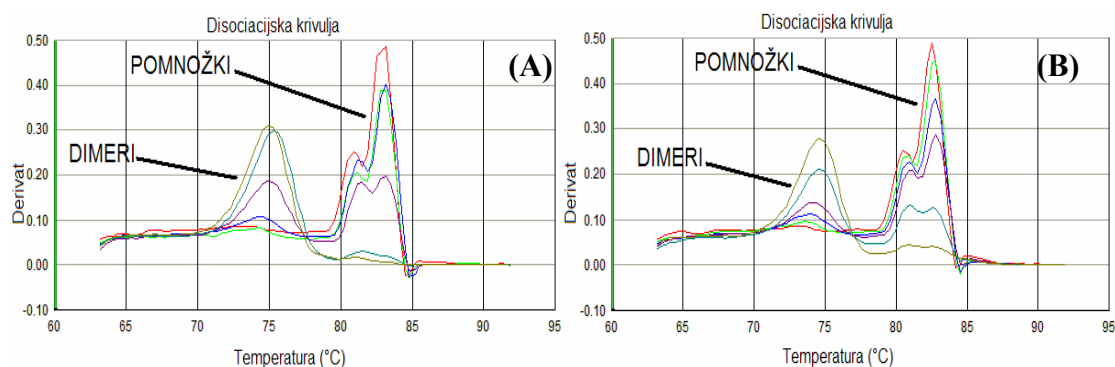
4.2.5 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* v mešanih kulturah

S tem eksperimentalnim delom smo želeli določiti občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* v mešanih kulturah. Vzorce smo pripravili tako, da smo različnim koncentracijam celic bakterij vrste *S. enterica* dodali visoke koncentracije bakterij vrst *L. monocytogenes* in *Escherichia coli*. Po toplotni lizi mešanih kultur smo uporabili 2,5 μ l lizata v 25 μ l reakcijski mešanici, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 (s koncentracijo 600 nM) in izvedli encimsko reakcijo s programom SALLIS2b. Vzorca z oznako 7 in 14 sta bili negativni kontroli, ki sta namesto tarčne DNK vsebovala vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* v mešanih kulturah

Oznaka vzorca	N (cfu / ml)		C _t	Dimeri
	<i>S. enterica</i>	<i>E. coli</i> / <i>L. monocytogenes</i> *		
1	2,8 x 10 ⁷	1,5 x 10 ⁷	16,60	nezaznavno
2	2,8 x 10 ⁶	1,5 x 10 ⁷	19,60	malo
3	2,8 x 10 ⁵	1,5 x 10 ⁷	23,83	malo
4	2,8 x 10 ⁴	1,5 x 10 ⁷	26,60	srednje
5	2,8 x 10 ³	1,5 x 10 ⁷	30,08	veliko
6	2,8 x 10 ²	1,5 x 10 ⁷	31,84	veliko
7	0	0	31,71	samo dimeri
8	2,8 x 10 ⁷	1,0 x 10 ^{7*}	16,53	nezaznavno
9	2,8 x 10 ⁶	1,0 x 10 ^{7*}	20,41	malo
10	2,8 x 10 ⁵	1,0 x 10 ^{7*}	23,49	malo
11	2,8 x 10 ⁴	1,0 x 10 ^{7*}	27,94	veliko
12	2,8 x 10 ³	1,0 x 10 ^{7*}	31,38	veliko
13	2,8 x 10 ²	1,0 x 10 ^{7*}	31,49	veliko
14	0	0	29,70	samo dimeri

Glede na rezultate prikazane v preglednici 12, je občutljivost določanja bakterij vrste *S. enterica* v mešanih kulturah 2,8 x 10⁴ cfu / ml, saj vse rezultate C_t vrednosti nad 29,70 določimo kot negativne. Na sliki 15 vidimo, da količine dimerov naraščajo pri vseh vzorcih obratno sorazmerno s koncentracijo salmonel v vzorcih, ne glede na vrsto drugih bakterij v vzorcih.



Slika 16: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov, dobljenih s PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* v mešanih kulturah s bakterijami vrst *L. monocytogenes* (A) in *E. coli* (B)

Legenda k A:

Rdeč signal – vzorec 7: *S. enterica*: 2,8 x 10⁷ cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Zelen signal – vzorec 8: 2,8 x 10⁶ cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Moder signal – vzorec 9: 2,8 x 10⁵ cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Vijoličen signal – vzorec 10: 2,8 x 10⁴ cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Temno zelen signal – vzorec 11: 2,8 x 10³ cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Rjavo zelen signal – vzorec 12: 2,8 x 10² cfu/ml, *L. monocytogenes*: 1,0 x 10⁷ cfu/ml

Legenda k B:

Rdeč signal – vzorec 1: *S. enterica*: $2,8 \times 10^7$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

Zelen signal – vzorec 2 : *S. enterica*: $2,8 \times 10^6$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

Moder signal – vzorec 3 : *S. enterica*: $2,8 \times 10^5$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

Vijoličen signal – vzorec 4 : *S. enterica*: $2,8 \times 10^4$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

Temno zelen signal – vzorec 5 : *S. enterica*: $2,8 \times 10^3$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

Rjavo zelen signal – vzorec 6: *S. enterica*: $2,8 \times 10^2$ cfu/ml, *E. coli*: $1,5 \times 10^7$ cfu/ml

4.3 Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času

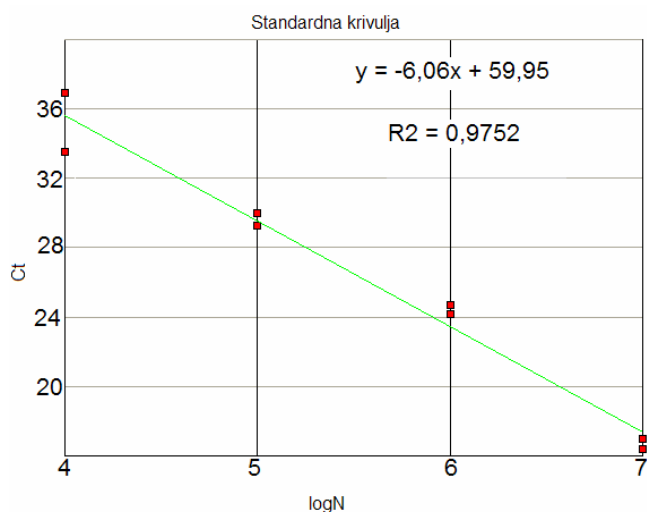
4.3.1 Določanje učinkovitosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2

Optimalna dolžina pomnožka PCR v realnem času je od 50 do 150 bp (Sequence detection systems, 2003). Specifičen pomnožek za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, ki ga dobimo z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 je dolg 701 bp, kar je že teoretično pomenilo, da je predolg in da bo učinkovitost reakcije slaba. To smo preverili tako, da smo z različnimi koncentracijami celic bakterij vrste *L. monocytogenes* (preglednica 13) in z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 koncentracije 300 nM izvedli PCR v realnem času. Vzorec z oznako 7 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 13: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	C_t	Dimeri
1	$1,2 \times 10^7$	16,69	nezaznavno
2	$1,2 \times 10^6$	24,43	nezaznavno
3	$1,2 \times 10^5$	29,66	nezaznavno
4	$1,2 \times 10^4$	35,15	nezaznavno
5	$1,2 \times 10^3$	nezaznavno	nezaznavno
6	$1,2 \times 10^2$	nezaznavno	nezaznavno
7	0	nezaznavno	nezaznavno

Glede na dobljene vrednosti C_t smo naredili standardno krivuljo (slika 17) in ugotovili oziroma potrdili slabo učinkovitost reakcije, ki je razvidna iz naklona standardne krivulje. Optimalen naklon je -3,32, v našem primeru pa -6,06.



Slika 17: Standardna krivulja pri PCR v realnem času za bakterije vrste *L. monocytogenes* pri 300 nM koncentraciji LM1/LM2

4.3.2 Iskanje novih oligonukleotidnih začetnikov s programom Primer Express® za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

4.3.2.1 Problemi prenosa protokola klasičnega PCR na PCR v realnem času

Za klasičen PCR za specifično določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* smo uporabili oligonukleotidna začetnika LM1 (5'-CCT AAG ACG CCA ATC GAA-3') in LM2 (5'-AAG CGC TTG CAA CTG CTC-3'), katera se prilegata na gen *hlyA*, in pomnožita 701 bp dolg del DNK (Border in sod., 1990). Problem pri prenosu encimske reakcije v sistem PCR v realnem času je nastal zaradi dolžine pomnožka, ki je za ta sistem predolg. Optimalna dolžina pomnožka za PCR v realnem času naj bi bila od 50 bp do 150 bp in zaradi tega je bila učinkovitost reakcije slaba (poglavje 4.3.1). Naklon premice, ki prikazuje odvisnost vrednosti C_t od logaritmiranih vrednosti desetkratnih razredčitev števila celic ($\log N$) bi moral biti $-3,32$. V našem primeru je bila učinkovitost encimske reakcije veliko manjša, saj je bil naklon standardne krivulje le $-6,06$. Standardna krivulja je prikazuje vrednosti C_t v odvisnosti od $\log N$. To pomeni, da je idealna razlika C_t -jev med dvema desetkratnima razredčitvama 3,32.

Občutljivost klasičnega PCR je bila do 10^5 cfu/ml (preglednica 3). Ko smo enako encimsko reakcijo izvedli v aparatu Real time 7500 in uporabili fluorescentno barvilo SYBR® Green I, je bila občutljivost boljša in je znašala 10^4 cfu/ml (preglednica 13).

Nove oligonukleotidne začetnike za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* smo oblikovali zato, da bi izboljšali učinkovitost encimske reakcije. Pri oblikovanju smo uporabljali program Primer express®.

4.3.2.2 Pomembni parametri iskanja oligonukleotidnih začetnikov in sond s programom Primer express®

Pri iskanju oligonukleotidnih začetnikov in sond veljajo določena pravila in zakonitosti, ki so odvisne od načina delovanja aparata za PCR (Sequence detection systems, 2003; Primer

express[®] software version, 3.0, 2004). Velikost pomnožka naj bo od 50 do 150 bp, 3'-konec oligonukleotidnega začetnika naj bo čim bližje sondi, pomembne lastnosti oligonukleotidnega začetnika: temperatura taljenja (T_m) naj bo med 58 – 60 °C, ima naj od 20 do 80 % G in C, dolžina naj bo od 9 do 40 baz ter med zadnjimi petimi bazami naj ne bi bilo več kot dveh gvaninov ali citozinov, razlika med temperaturama taljenja med oligonukleotidnima začetnikoma naj ne bi presegla 2 °C. Lastnosti, ki so pomembne pri iskanju sonde: temperatura taljenja T_m naj bo za 10 °C višja kot pri oligonukleotidnih začetnikih, ne sme imeti gvanina na koncu 5', mora vsebovati več citozina kot gvanina, ne sme imeti več kot štiri gvanine skupaj, dolžina sonde naj bo med 9 in 40 baz, sonda naj ima med 20 in 80 % G in C (preglednica 14).

Preglednica 14: Pomembni parametri iskanja oligonukleotidnih začetnikov in sond za PCR v realnem času (Sequence detection systems, 2003; Primer express[®] software version, 3.0, 2004)

Lastnost	Pomnožek	Oligonukleotidni začetnik	Sonda
Velikost	50 – 150 bp	9 – 40 bp	9 – 40 bp
T_m	/	58°C – 60°C	za 10°C višja kot pri oligonukleotidnih začetnikih
% GC	/	20 – 80	20 – 80
Posebne zahteve	/	razlika v T_m med oligonukleotidnima začetnikoma naj bo manjša kot 2°C	na 5'-koncu naj ne bo gvanina
	/	v zadnjih petih bazah na 3'-koncu naj ne bo več kot dveh gvaninov ali citozinov	za povrstjo naj ne bo več kot štirih gvaninov
	/	3'-konec oligonukleotidnega začetnika naj bo čim bližje sondi	sonda naj vsebuje več citozina kot gvanina

4.3.2.3 Iskanje oligonukleotidnih začetnikov in sond za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* glede na znane sekvence gena *hlyA*

Delo s programom Primer Express je potekalo tako, da smo v program vnesli specifično sekvenco DNK, značilno za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Izhodišče je bila znana 1590 bp dolga sekvenca gena *hlyA* bakterij vrste *L. monocytogenes* str. 4b F2365 za listeriolizin – gen *hlyA* (NC_002973).

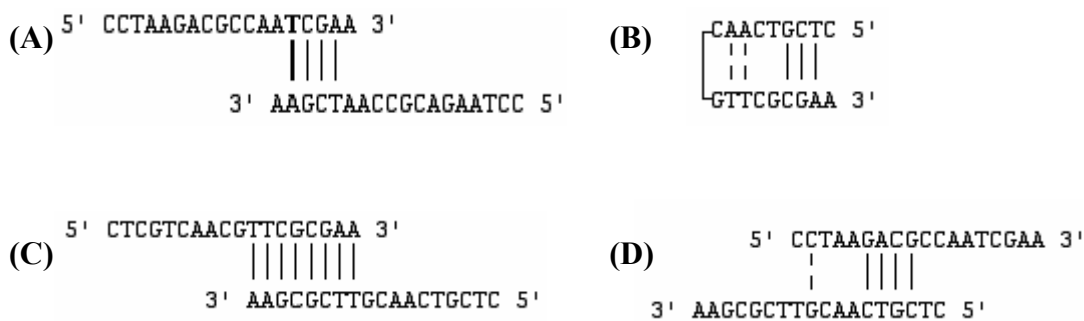
(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi??db=nucleotide&val=NC_002973&from=211179&to=212768&dopt=gb).

Najprej smo poizkušali oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 poiskati ustrezen drug oligonukleotidni začetnik, ki bi izpolnjeval kar največ pogojev, navedenih v preglednici 14.

Rezultati so pokazali, da je temperatura taljenja oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 izven zahtevanega območja (T_m za LM1: 53,4 °C, T_m za LM2: 56,5 °C). Temperatura taljenja oligonukleotidnega začetnika je pomembna, ker je v univerzalnem programu v aparatu za

PCR v realnem času druga stopnja prilaganja oligonukleotidnih začetnikov in samega pomnoževanja DNK optimizirana pri 60 °C. Zaradi tega naj bi imeli oligonukleotidni začetniki temperaturo taljenja v območju med 58 in 60 °C in ne pod temi vrednostmi, kakor sta temperaturi za oligonukleotidna začetnika LM1/LM2.

Preverili smo tudi sekundarno strukturo oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 (slika 18) in ugotovili, da oba lahko tvorita eno ali več zank, dimere samega pomnožka (angl. self dimer) in navzkrižne dimere (angl. cross dimer).



Slika 18: Sekundarne strukture oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2: (A): vezava LM1 z LM1, (B): zanka LM2, (C): vezava LM2 z LM2, (D): vezava LM1 z LM2

Glede na te rezultate smo se odločili poiskati nov par oligonukleotidnih začetnikov, vendar še vedno na istem genu *hlyA*. Na končnem delu gena *hlyA*, od 1000 do 1590 baz, to je zadnjih 590 baz gena *hlyA* bakterij vrste *L. monocytogenes* 4b F 2365 (NC 002973) je bil rezultat 50 različnih parov oligonukleotidnih začetnikov in sond.

Pri pregledovanju teh parov oligonukleotidnih začetnikov smo naleteli na oligonukleotidni začetnik, ki je izpolnjeval vse pogoje navedene v preglednici 14 in ki v svoji sekundarni strukturi ni imel zanke in dimerov. Označili smo ga z SBF1: 5'-CAT AAA AAC TGG AGC GAA AAC AAT AA-3'.

Nato smo v območju naslednjih 200 baz ročno oblikovali še drugi oligonukleotidni začetnik, ki je bil brez zank in dimerov in ga označili z SBR1: 5'-TAA AGT GTA GTG CCC CAG ATG GA-3'. Pri oligonukleotidnih začetnikih SBF1/SBR1 smo preverili, da vsebujeta zadosten odstotek gvanina in citozina in da imata ustrezno temperaturo taljenja. Velikost pomnožka oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 je 203 bp.

Nato smo med sekvencami pomnožka ročno oblikovali sondo in jo označili kot SBS1: 5'-AGG TAA CGC AAG AAA T-3'). Za sondo SBS1 smo preverili, da nima zank in dimerov in da ustreza pogojem navedenim v preglednici 14.

```
5'-CATAAAAACT GGAGCGAAAA CAATAAAAGT AAGCTAGCTC ATTTACATC 50
3'-GTATTTTTGA CCTCGCTTTT GTTATTTTCA TTCGATCGAG TAAAGTGTAG

GTCCATCTAT TTGCCAGGTA ACGCAAGAAA TATTAATGTT TACGCTAAAG 100
CAGGTAGATA AACGGTCCAT TGCCTTCTTT ATAATTACAA ATGCGATTTC

AATGCACTGG TTTAGCTTGG GAATGGTGGG GAACGGTAAT TGATGACCGG 150
TTACGTGACC AAATCGAACC CTTACCACCT CTGCCATTA ACTACTGGCC

AACCTACCGC TTGTGAAAAA TAGAAATATC TCCATCTGGG GCACTACACT 200
TTGGATGGCG AACACTTTTT ATCTTTATAG AGGTAGACCC CGTGATGTGA

TTA -3' 203
AAT -5'
```

Slika 19: Pomnožek (203 bp) na genu *hlyA* dobljen z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1

Legenda:

Modro označeno: oligonukleotidni začetnik SBF1

Vijolično označeno: sonda SBS1

Zeleno označeno: oligonukleotidni začetnik SBR1

Program Primer Express oligonukleotidnega začetnika SBR1 ni zaznal kot ustreznega, kar je pomenilo, da ni bil v območju zelenih parametrov.

Zato smo s programom Primer Express avtomatično oligonukleotidnemu začetniku SBF1 in sondi SBS1 poiskali še drugi oligonukleotidni začetnik in ga označili z SBR2: 5'-CCA GTG CAT TCT TTA GCG TAA ACA-3'. Velikost pomnožka oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2 je 110 bp (slika 20).

```
5'-CATAAAAACT GGAGCGAAAA CAATAAAAGT AAGCTAGCTC ATTTACATC 50
3'-GTATTTTTGA CCTCGCTTTT GTTATTTTCA TTCGATCGAG TAAAGTGTAG

GTCCATCTAT TTGCCAGGTA ACGCAAGAAA TATTAATGTT TACGCTAAAG 100
CAGGTAGATA AACGGTCCAT TGCCTTCTTT ATAATTACAA ATGCGATTTC

AATGCACTGG - 3' 110
TTACGTGACC - 5'
```

Slika 20: Pomnožek (110 bp) na genu *hlyA* dobljen z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2

Legenda:

Modro označeno: oligonukleotidni začetnik SBF1

Vijolično označeno: sonda SBS1

Zeleno označeno: oligonukleotidni začetnik SBR2

4.3.2.4 Preverjanje specifičnosti pomnožka SBF1/SBR1 s poznanimi bakterijskimi sekvencami DNK

Specifičnost pomnožka, ki bi ga dobili z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1, smo preverili tako, da smo sekvenco pomnožka primerjali s poznanimi sekvencami DNK bakterij vrste *L. monocytogenes*, bakterij rodu *Listeria* in drugimi bakterijami. Na ameriški podatkovni bazi NCBI je program BLAST (NCBI BLAST, 2006), v katerega smo vnesli sekvenco pomnožka, ki bi ga dobili z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1. Program BLAST preveri prileganje sekvenc, ki je popolno ali delno.

Specifičnost pomnožka, ki bi ga dobili z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2 smo določili že pri določevanju specifičnosti pomnožka oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2, saj pomnožek z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2 leži znotraj pomnožka oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2.

Ujemanje sekvenc pomnožka SBF1/SBR1 je bilo 100 % pri 100 različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes*, kar pomeni z vsemi dosegljivimi sekvencami za to vrsto bakterij.

Ujemanje sekvenc je bilo določeno tudi pri vrsti *L. ivanovii* (sevi NRRL 33017, NRRL 33021), katera proizvaja ivanolizin, ki je zelo podoben listeriolizinu, ter vrsti *L. seeligeri* (sev NRRL 33019), katera tvori seligerilizin, ki je prav tako zelo podoben listeriolizinu. Pri bakterijah vrste *L. ivanovii* pride do prekrivanja pri prvih 137 bazah, kar pomeni v območju, v katerem se prilega oligonukleotidni začetnik SBF1 in sonda SBS1. Pri bakterijah vrste *L. seeligeri* pride do prekrivanja pri prvih 177 bazah, kar pomeni v območju, v katerem se prilega oligonukleotidni začetnik SBF1 in sonda SBS1.

Zelo pomemben rezultat je bil tudi, da se sekvenca pomnožka, ki bi ga dobili s SBF1/SBR1, ni prekrivala s kakršnokoli sekvenco na genomu bakterij vrste *L. innocua*, ki za ljudi ni patogena.

Med drugimi bakterijskimi sekvencami DNK smo našli prekrivanje s petimi sevi bakterij vrste *Streptococcus pyogenes* (sevi: M1 GAS, MGAS5005, MGAS10394, MGAS8232, MGAS315), katerih prekrivajoči se 24 baz dolg del DNK (med 94 in 117 bazami) ne leži na mestu, kjer se prilegajo oligonukleotidni začetniki SBF1/SBR1 in sonda SBS1 (slika 21).

Glede na dobljene rezultate smo se odločili, da para oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 uporabimo kot specifična kompleta, s katerima bi lahko določili bakterije vrste *L. monocytogenes* in morda tudi drugi dve patogeni vrsti listerij, *L. ivanovii* in *L. seeligeri*.

```
5'-CATAAAAACT GGAGCGAAAA CAATAAAAAGT AAGCTAGCTC ATTTACATC 50
3'-GTATTTTTGA CCTCGCTTTT GTTATTTTCA TTCGATCGAG TAAAGTGTAG

GTCCATCTAT TTGCCAGGTA ACGCAAGAAA TATTAATGTT TACGCTAAAG 100
CAGGTAGATA AACGGTCCAT TGC GTTCTTT ATAATTACAA ATGCGATTTC

AATGCACTGG TTTAGCTTGG GAATGGTGGA GAACGGTAAT TGATGACCGG 150
TTACGTGACC AAATCGAACC CTTACCACCT CTTGCCATTA ACTACTGGCC

AACCTACCGC TTGTGAAAAA TAGAAATATC TCCATCTGGG GCACTACACT 200
TTGGATGGCG AACACTTTTT ATCTTTATAG AGGTAGACCC CGTGATGTGA

TTA -3' 203
AAT -5'
```

Slika 21: Prekrivanje sekvenc DNK bakterij vrste *Streptococcus pyogenes* s sekvencami pomnožka SBF1/SBR1

Legenda:

Modro označeno: oligonukleotidni začetnik SBF1

Vijolično označeno: sonda SBS1

Zeleno označeno: oligonukleotidni začetnik SBR1

Rumeno označeno: prekrivajoča se sekvenca DNK bakterij vrste *Streptococcus pyogenes*

Prekrivanje sekvenc pomnožka SBF1/SBR1 smo našli tudi pri petih sevih bakterij vrste *Bacillus cereus*, katerih prekrivajoče se sekvence so zelo kratke (prilegajo se delu med 83 in 99 bazami) in niso na delih DNK, kjer se prilagajo oligonukleotidni začetniki SBF1/ SBR1, SBR2 in sonda SBS1.

```
5'-CATAAAAACT GGAGCGAAAA CAATAAAAAGT AAGCTAGCTC ATTTACATC 50
3'-GTATTTTTGA CCTCGCTTTT GTTATTTTCA TTCGATCGAG TAAAGTGTAG

GTCCATCTAT TTGCCAGGTA ACGCAAGAAA TATTAATGTT TACGCTAAAG 100
CAGGTAGATA AACGGTCCAT TGC GTTCTTT ATAATTACAA ATGCGATTTC

AATGCACTGG TTTAGCTTGG GAATGGTGGA GAACGGTAAT TGATGACCGG 150
TTACGTGACC AAATCGAACC CTTACCACCT CTTGCCATTA ACTACTGGCC

AACCTACCGC TTGTGAAAAA TAGAAATATC TCCATCTGGG GCACTACACT 200
TTGGATGGCG AACACTTTTT ATCTTTATAG AGGTAGACCC CGTGATGTGA

TTA -3' 203
AAT -5'
```

Slika 22: Prekrivanje sekvenc DNK bakterij vrste *Bacillus cereus* s sekvencami pomnožka SBF1/SBR1

Legenda:

Modro označeno: oligonukleotidni začetnik SBF1

Vijolično označeno: sonda SBS1

Zeleno označeno: oligonukleotidni začetnik SBR1

Rumeno označeno: prekrivajoča se sekvenca DNK bakterij vrste *Bacillus cereus*

4.3.3 Optimizacija PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

4.3.3.1 Določanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2

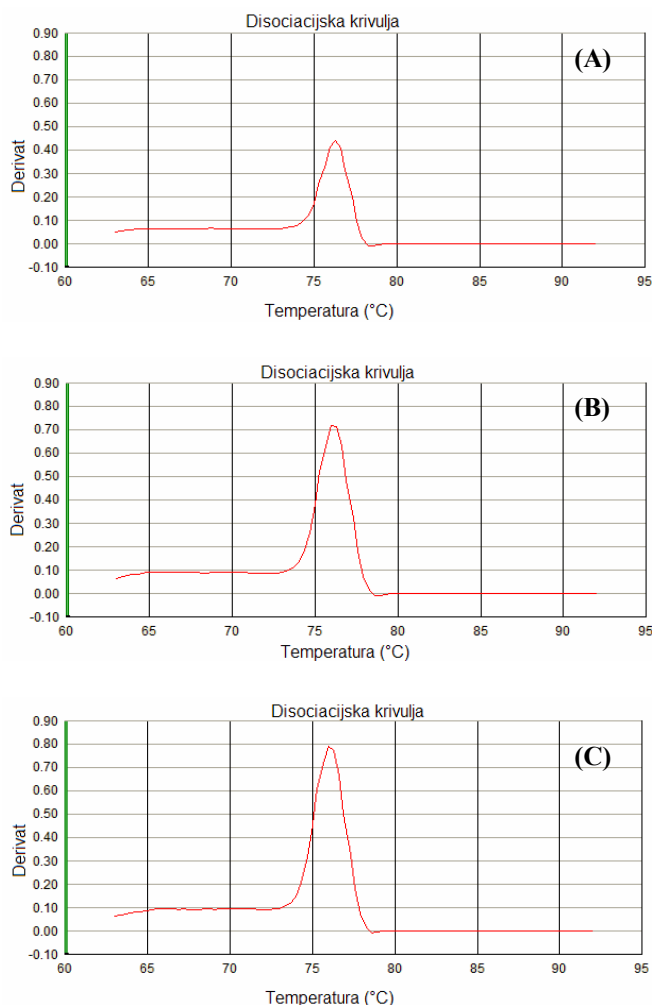
Določanje optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 je potekalo tako, da smo vzorcem z oznakami 1 do 5 dodali v reakcijske mešanice za PCR v realnem času različne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov in sicer 50 nM, 300 nM in 900 nM (preglednica 15). Vzorec z oznako 6 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H_2O_{PCR}).

Preglednica 15: Rezultati PCR v realnem času pri koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 od 50 nM do 900 nM

Oznaka vzorca	N (cfu/ml)	C (nM)	C _t	
			SBF1/SBR1	SBF1/SBR2
1	1,1 x 10 ⁷	50	20,71	10,63
		300	10,61	10,09
		900	10,33	8,79
2	1,1 x 10 ⁶	50	26,16	24,92
		300	21,87	21,96
		900	21,78	21,35
3	1,1 x 10 ⁵	50	30,26	27,53
		300	24,56	24,00
		900	23,41	23,37
4	1,1 x 10 ⁴	50	39,87	34,32
		300	30,17	29,86
		900	30,30	29,64
5	1,1 x 10 ³	50	nezaznaven	39,69
		300	34,13	34,19
		900	32,95	33,16
6	0	50	nezaznaven	nezaznaven
		300	nezaznaven	nezaznaven
		900	nezaznaven	nezaznaven

Glede na vrednosti C_t v preglednici 15 je razvidno, da je najboljša koncentracija oligonukleotidnih začetnikov 900 nM, saj je pri tej koncentraciji vrednost C_t najnižja, ne glede na vrsto oligonukleotidnih začetnikov, SBF1/SBR1 ali SBF1/SBR2.

Pri 900 nM koncentraciji SBF1/SBR1 ali SBF1/SBR2 je bila količina pomnožka tudi večja kot pri nižjih koncentracijah (slika 23). Dimeri niso bili zaznani pri nobeni preizkušeni koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2. Za oligonukleotidne začetnike SBF1/SBR2 so bili znani teoretični dimeri, praktični pa ne.



Slika 23: Taljenje pomnožkov dobljenih z pri 50 nM (A), 300 nM (B) in 900 nM (C) koncentraciji SBF1/SBR2

Pri določitvi optimalne koncentracije oligonukleotidnih začetnikov smo upoštevali tudi učinkovitost reakcije. Izračunali smo standardne krivulje (preglednica 16).

Preglednica 16: Standardne krivulje pri različnih koncentracijah oligonukleotidnih začetnikov S BFB1/SBR1 in SBF1/SBR2

Par oligonukleotidnih začetnikov	Koncentracija (nM)	Enačba standardne krivulje	R ²	Območje (cfu/ml)
SBF1 /SBR1	50	$y = -6,85 + 66,37$	0,9081	1,1 x 10 ⁴ - 1,1 x 10 ⁷
	300	$y = -4,24 + 46,75$	0,9627	
	900	$y = -4,04 + 45,25$	0,9265	
SBF1/SBR2	50	$y = -5,02 + 54,11$	0,9648	
	300	$y = -4,25 + 46,63$	0,9691	
	900	$y = -4,17 + 45,66$	0,9598	

Pri izračunih in za nadaljnje poizkuse smo se odločili, da vse rezultate pri katerih je vrednost C_t vrednost nad 33, obravnavamo kot negativne.

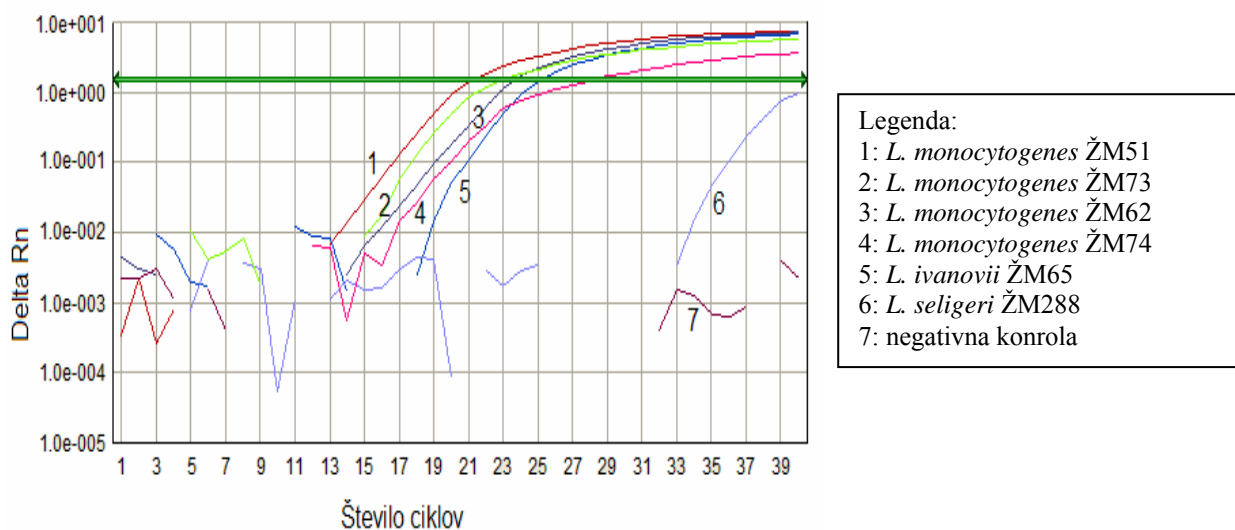
Učinkovitost reakcije je najboljša pri koncentraciji 900 nM, saj se vrednosti naklona standardne krivulje pri tej koncentraciji pri obeh parih oligonuklotidnih začetnikov najbolj približata optimalnemu naklonu -3,32.

4.3.3.2 Določanje specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2

Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 smo določili tako, da smo izvedli PCR v realnem času najprej s čistimi kulturami bakterij vrst *L. monocytogenes* (26 sevov), *L. ivanovii* (3 sevi) in *L. seeligeri* (2 seva) (preglednica 17). Vsi vzorci so vsebovali 10^7 cfu/ml, DNK je bila pripravljena s toplotno lizo, v mešanico za PCR smo dodali 900 nM oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2, uporabili smo univerzalni program za PCR v realnem času.

Izmed 26 sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* smo dobili pozitiven rezultat pri 25 sevih, izmed 3 sevov bakterij vrste *L. ivanovii* smo dobili 2 pozitivna rezultata, izmed 2 sevov bakterij vrste *L. seeligeri* pa pozitivnega rezultata nismo dobili, ne glede na vrsto uporabljenega para oligonukleotidnih začetnikov.

Kot primer je na sliki 24 prikazan potek PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1.



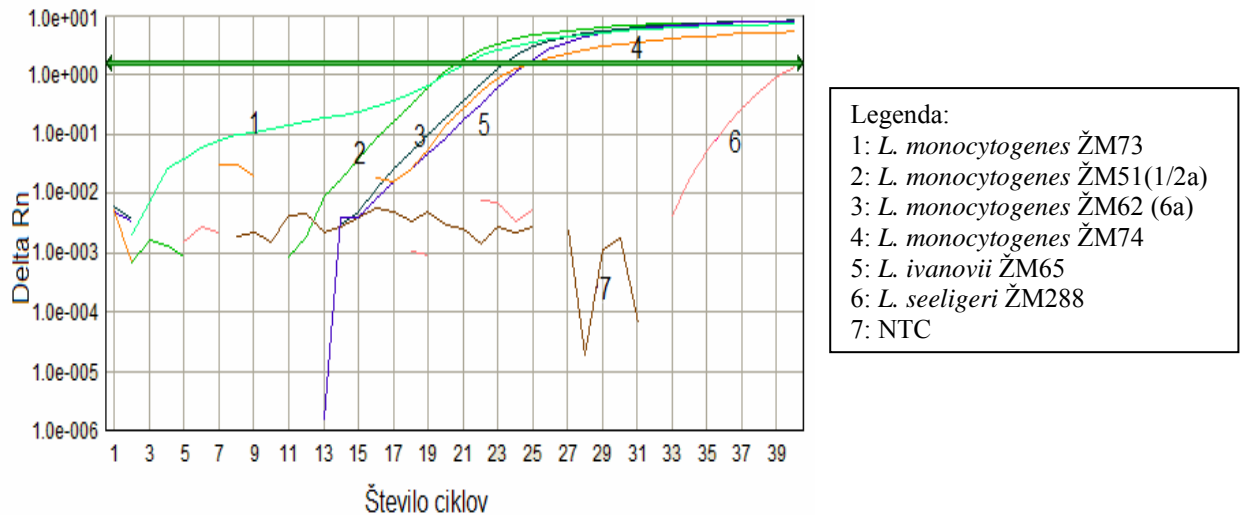
Slika 24: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1

Preglednica 17: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2, preizkušenimi na različnih vrstah listerij

Sev	Serotip ali izvor	Oligonukleotidni začetniki			
		SBF1/SBR1		SBF1 / SBR2	
		C _t	+/-	C _t	+/-
<i>L. monocytogenes</i> ŽM51	1/2 a	21,32	+	20,52	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM52	1/2b	23,23	+	22,73	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM53	1/2 c	21,18	+	20,38	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM54	3a	18,90	+	18,31	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM55	3b	20,47	+	20,00	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM56	3c	21,34	+	20,93	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM57	4a	24,46	+	24,19	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM58	4b	20,37	+	18,66	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM59	4c	18,02	+	17,14	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM60	4d	20,81	+	19,50	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM61	4e	18,44	+	17,41	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM62	6a	23,75	+	23,28	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM63	6b	39,55	-	37,80	-
<i>L. monocytogenes</i> ŽM64	7	22,67	+	22,37	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM45	parjeno piščančje meso	23,35	+	22,27	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM46	parjeno piščančje meso	23,58	+	22,68	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM71	sluhovod	22,41	+	21,36	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM72	oči	20,99	+	20,51	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM73	koža	23,19	+	21,03	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM74	hemokultura	28,48	+	24,83	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM88	humani izolat	29,32	+	31,10	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM89	humani izolat	31,59	+	29,67	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM101	francoska solata	23,98	+	21,90	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM107	kalamari v solati	22,13	+	21,19	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM113	jajčni namaz	22,03	+	21,19	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM314	K9/13	19,22	+	18,39	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM315	K9/17	20,59	+	20,88	+
<i>L. monocytogenes</i> ŽM343	J19/10	21,96	+	21,57	+
<i>L. ivanovii</i> ŽM65	5	25,18	+	24,54	+
<i>L. ivanovii</i> ŽM279	K2/4	39,22	-	34,86	-
<i>L. ivanovii</i> ŽM235A	K5/8C	20,25	+	19,55	+
<i>L. seeligeri</i> ŽM288	J5/24	nezaznaven	-	nezaznaven	-
<i>L. seeligeri</i> ŽM495	krompirjeva solata	34,04	-	33,17	-
<i>L. welshimeri</i> ŽM496	HPA 332	37,23	-	33,77	-
<i>L. welshimeri</i> ŽM497	mešano mleto meso	34,64	-	35,10	-
<i>L. innocua</i> ŽM498	HPA 44/A	33,96	-	33,51	-
<i>L. innocua</i> ŽM499	HPA 340	nezaznaven	-	33,24	-

(Opomba: Vsi vzorci, pri katerih je vrednost C_t večja od 33 oz. nezaznaven, se štejejo kot negativen rezultat)

Kot primer je na sliki 25 prikazan potek PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2.



Slika 25: PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR2

Specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 smo v nadaljevanju določili še z izvedbo PCR v realnem času s čistimi kulturami bakterij, ki so imele vsaj delno podobne sekvence DNK, kot jih je imel teoretično dobljen pomnožek, ki ga dobimo s parom oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 (poglavje 4.3.2.4) in z nekaterimi drugimi bakterijami, ki teoretično niso imele podobnih sekvenc (preglednica 18). Vsi vzorci so vsebovali enako koncentracijo celic 10^7 cfu/ml, DNK je bila pripravljena s toplotno lizo, v mešanico za PCR smo dodali 900 nM oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2, uporabili smo univerzalni program za PCR v realnem času.

V preglednici 18 vidimo, da s parom oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 nismo dobili pri nobeni od 15-ih testiranih vrst bakterij pozitivnega rezultata, medtem ko smo pri paru oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2 dobili dva pozitivna rezultata (*B. cereus* ŽMJ40, *Streptococcus pyogenes* ŽM494).

Preglednica 18: Rezultati PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2, preizkušenimi na različnih vrstah bakterij

Sev	Serotip ali izvor	Oligonukleotidni začetniki			
		SBF1/SBR1		SBF1 / SBR2	
		C _t	+/-	C _t	+/-
<i>Cl. perfringens</i> ŽMJ167	prašič	nezaznaven	-	nezaznaven	
<i>Cl. tyrobutyricum</i> ŽMJ168	DSM 2637	38,06	-	34,53	-
<i>Cl. tyrobutyricum</i> ŽMJ169	NCDO 1754	35,71	-	nezaznaven	-
<i>Cl. tyrobutyricum</i> ŽMJ170	sir	38,63	-	nezaznaven	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ40	bonboni	36,58	-	28,00	+
<i>B. cereus</i> ŽMJ41	vanilijev puding	34,54	-	36,81	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ42	gobice v solati	35,29	-	38,00	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ56	kuhana govedina	38,34	-	38,96	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ59	sladoled	36,29	-	38,57	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ164	WSBC 10530	nezaznaven	-	37,42	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ165	WSBC 10543	nezaznaven	-	nezaznaven	-
<i>B. cereus</i> ŽMJ166	WSBC 10549	nezaznaven	-	nezaznaven	-
<i>S. aureus</i> ŽMJ72	ATCC 25932	nezaznaven	-	36,05	-
<i>Enterococcus faecalis</i> ŽMJ90	humani izolat	34,16	-	nezaznaven	-
<i>Streptococcus pyogenes</i> ŽM494	7915 PHLS	34,16	-	32,66	+

(Opomba: Vsi vzorci, pri katerih je vrednost C_t večja od 33 oz. nezaznaven, se štejejo kot negativen rezultat)

V preglednici 19 so zbrani rezultati določanja specifičnosti za oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2. Specifičnost smo izračunali po modificirani metodi, ki je predpisana v standardu SIST EN ISO 16140:2003 (2003), po formuli v kateri pomeni SP specifičnost v %; UR število rezultatov PCR v realnem času, ki se ujemajo z identifikacijo posameznega seva; LN število lažno negativnih rezultatov dobljenih s PCR v realnem času in LP: število lažno pozitivnih rezultatov dobljenih s PCR v realnem času:

$$\text{Specifičnost} = (\text{UR} / (\text{UR} + \text{LN} + \text{LP})) \times 100$$

Določena specifičnosti za oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 je 92 % in za drug par SBF1/SBR2 88 %.

Preglednica 19: Parametri za izračun specifičnosti oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2

Število in vrsta testiranih sevov	Število rezultatov PCR v realnem času					
	UR		LN		LP	
	SBF1/SBR1	SBF1/SBR2	SBF1/SBR1	SBF1/SBR2	SBF1/SBR1	SBF1/SBR2
35 sevov vrst <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. ivanovii</i> , <i>L. seeligeri</i>	31	31	4	4	0	0
2 seva <i>L. innocua</i> in 15 sevov, ki ne sodijo v rod <i>Listeria</i>	17	15	0	0	0	2
Skupaj: 52 sevov	48	46	4	4	0	2

Legenda:

UR: Ujemanje rezultatov

LN: Lažno negativni rezultati

LP: Lažno pozitivni rezultati

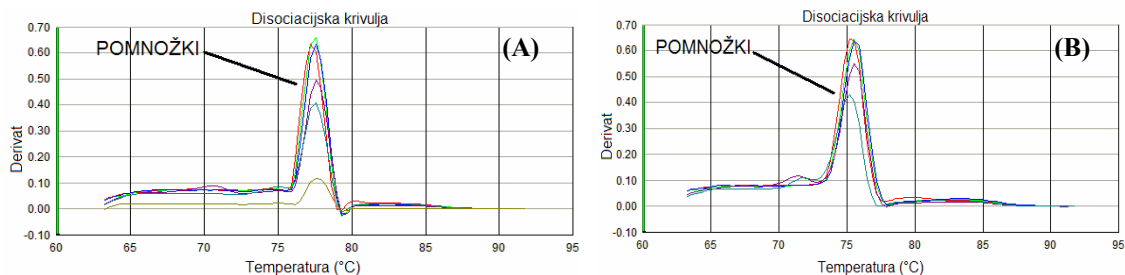
4.3.3.3 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 v mešani kulturi

S tem eksperimentalnim delom smo želeli določiti občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mešanih kulturah. Vzorce smo pripravili tako, da smo različnim koncentracijam celic bakterij vrste *L. monocytogenes* dodali visoke koncentracije bakterij vrste *S. enterica*. Po toplotni lizi mešanih kultur smo uporabili 2,5 µl lizata v 25 µl reakcijski mešanici, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 (s koncentracijo 900 nM) ali oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR2 in izvedli encimsko reakcijo z univerzalnim programom. Vzorec z oznako 6 je bil negativna kontrola, ki je namesto tarčne DNK vseboval vodo (H₂O_{PCR}).

Preglednica 20: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mešanih kulturah

Oznaka vzorca	N (cfu / ml)		SBF1/SBR1		SBF1/SBR2	
	<i>L. monocytogenes</i>	<i>S. enterica</i>	C _t	dimeri	C _t	dimeri
1	1,3 x 10 ⁷	2,1 x 10 ⁷	18,59	/	18,15	/
2	1,3 x 10 ⁶	2,1 x 10 ⁷	21,45	/	20,53	/
3	1,3 x 10 ⁵	2,1 x 10 ⁷	24,25	/	23,42	/
4	1,3 x 10 ⁴	2,1 x 10 ⁷	27,74	/	27,24	/
5	1,3 x 10 ³	2,1 x 10 ⁷	30,53	/	29,61	/
6	0	0	35,85	/	34,26	/

Glede na rezultate, prikazane v preglednici 20, je občutljivost določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* v mešanih kulturah 1,3 x 10³ cfu / ml. Na sliki 26 vidimo, da dimerov pri teh reakcijah ni.



Slika 26: Temperature taljenja pomnožkov oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 (A) in SBF1/SBR2 (B)

Legenda:

- Rdeč signal** – vzorec 1: *L. monocytogenes*: $1,3 \times 10^7$ cfu/ml, *S. enterica*: $2,1 \times 10^7$ cfu/ml
- Zelen signal** – vzorec 2 : *L. monocytogenes*: $1,3 \times 10^6$ cfu/ml, *S. enterica*: $2,1 \times 10^7$ cfu/ml
- Moder signal** – vzorec 3 : *L. monocytogenes*: $1,3 \times 10^5$ cfu/ml, *S. enterica*: $2,1 \times 10^7$ cfu/ml
- Vijoličen signal** – vzorec 4 : *L. monocytogenes*: $1,3 \times 10^4$ cfu/ml, *S. enterica*: $2,1 \times 10^7$ cfu/ml
- Temno zelen signal** – vzorec 5 : *L. monocytogenes*: $1,3 \times 10^3$ cfu/ml, *S. enterica*: $2,1 \times 10^7$ cfu/ml
- Rjavo zelen signal** – vzorec 6: voda (H_2O_{PCR})

Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mešani kulturi je bila 10^3 cfu/ml, kakor tudi v čisti kulturi, kar pomeni da dodatek visokih koncentracij bakterij vrste *S. enterica* ne vpliva na občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 je tudi boljša od učinkovitosti PCR v realnem času za določevanje bakterij *L.monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2, ki je 10^5 cfu/ml.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 Občutljivost PCR za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

S PCR in oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 smo določili bakterije vrste *S. enterica* v koncentraciji $3,2 \times 10^3$ cfu/ml (preglednica 3 in slika 9). Gouws in sodelavci (1997) so z enako metodo in enakimi oligonukleotidnimi začetniki dosegli občutljivost PCR za določanje čiste kulture bakterij rodu *Salmonella* 50 cfu/ml. PCR z oligonukleotidnimi začetniki ST11/ST15, ki so jih razvili Aabo in sodelavci (1993), je specifična in občutljiva, vendar le kvalitativna metoda.

V mešani kulturi je bila občutljivost PCR za določanje bakterij vrste *S. enterica* $2,8 \times 10^3$ cfu/ml ob dodatku $1,7 \times 10^8$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*.

S PCR in oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 smo dokazali prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v vzorcih, ki so vsebovali $2,1 \times 10^5$ cfu/ml bakterij vrste *Listeria monocytogenes* (preglednica 3 in slika 9). Li in sodelavci (1999) so z enako metodo in enakimi oligonukleotidnimi začetniki dosegli občutljivost PCR za določanje čiste kulture teh bakterij 10^4 CFU/ml.

V mešani kulturi pa smo dosegli občutljivost PCR za bakterije vrste *L. monocytogenes* $1,7 \times 10^5$ cfu/ml ob dodatku $2,8 \times 10^7$ CFU/ml bakterij vrste *S. enterica*.

Specifičnosti zgoraj omenjenih oligonukleotidnih začetnikov nismo preverjali, saj ST11/ST15 izhajajo iz leta 1993, LM1/LM2 pa iz leta 1990, tako da sta oba para specifična, kar je tudi dokumentirano v različni literaturi (Li in sod., 1999; Gouws in sod., 1997; Aabo in sod., 1993; Border in sod., 1990).

5.1.2 Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica*

Občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 za določanje bakterij vrste *S. enterica* je bila boljša kot pri klasičnem PCR, saj smo dokazali prisotnost omenjenih bakterij v vzorcu, ki je vseboval 10^1 - 10^2 cfu/ml bakterij vrste *S. enterica* (preglednica 7, slika 11). Določili smo tudi optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 600 nM (slika 13). Chen in sodelavci (2000) pa so po lizi in izolaciji DNK kvantitativno določili bakterije rodu *Salmonella* vse do koncentracije 2 cfu/ml.

Pri 600 nM koncentraciji ST11/ST15 smo določili tudi naklon standardne krivulje, ki je znašal -2,69 in bil najbližje idealnemu naklonu - 3,32 (slika 12) in pomeni v danih razmerah encimske reakcije najboljše učinkovitost pomnoževanja DNK.

Za oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 smo določili, da je program pomnoževanja Sallis2b za klasični PCR (Jeršek in Smole, 2003) boljši od univerzalnega programa aparata Real-time 7500 ne glede na koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov (preglednica 9). Pri programu Sallis2b je bila občutljivost $1,7 \times 10^3$ cfu/ml bakterij vrste *S. enterica*, pri univerzalnem programu aparata Real-time 7500 pa $1,7 \times 10^4$ cfu/ml. Pri tem poizkusu smo ugotovili tudi, da je količina nastalih dimerov pri PCR v realnem času manjša, kadar uporabljamo program Sallis2b, kar pomeni bolj natančne rezultate kot jih dobimo po pomnoževanju z univerzalnim programom aparature Real-time 7500.

Preverjali smo tudi, ali ima volumen lizata dodanega v reakcijsko mešanico vpliv na občutljivost in učinkovitost reakcije. Tako pri 5 μ l volumnu lizata, kot tudi pri 2,5 μ l volumnu lizata smo uspešno določili bakterije vrste *S. enterica* do koncentracije $2,0 \times 10^2$ cfu/ml. S tem poizkusom smo določili, da je občutljivost PCR v realnem času ob različnem volumnu lizata enaka, vendar smo se glede na količine nastalih pomnožkov za nadaljnje poizkuse odločili za volumen lizata 2,5 μ l, saj je bila količina pomnožka večja kot pri dodatku 5 μ l lizata (preglednica 10, slika 14).

Določili smo tudi vpliv priprave DNK, alkalne in toplotne lize, na reakcijo PCR v realnem času. Pri obeh lizah smo uspešno določili bakterije vrste *S. enterica* do koncentracije $2,0 \times 10^2$ cfu/ml, vendar smo se odločili, da kot optimalno uporabljamo toplotno lizo, ker smo pri istih vzorcih v primerjavi z alkalno lizo dobili več pomnožka (preglednica 11, slika 15). Tako smo se izognili enemu od inhibitorjev encimske reakcije – to je ionski detergent SDS, ki že v zelo nizki koncentraciji (0,01 %) inhibira delovanje encima DNA-polimeraza (Rossen in sod., 1992).

Pri določevanju bakterij vrste *S. enterica* s PCR v realnem času v mešanih kulturah, kjer smo vzorcem dodali bakteriji vrste *L. monocytogenes* in *E. coli*, je bila občutljivost 10^4 cfu/ml bakterij vrste *S. enterica* (preglednica 12, slika 16). Naši rezultati skladni z literaturo, saj na primer Schneider in sod. (2002) navajajo, da so pri določanju bakterij rodu *Salmonella* s PCR v realnem času ugotovili, da prisotnost visokih koncentracij bakterij vrste *E. coli* ne moti določanja prisotnosti bakterij rodu *Salmonella* niti v zelo visokih koncentracijah in določili občutljivost $10^3 - 10^4$ cfu/ml.

5.1.3 Oblikovanje novih oligonukleotidnih začetnikov s programom Primer Express za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

Pomnožek oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* je dolg 701 bp. Ker smo ugotovili, da je učinkovitost PCR v realnem času zelo slaba, smo se odločili oblikovati nove oligonukleotidne začetnike. Poiskali smo jih s pomočjo programa Primer express 3.0 (Applied Biosystems, 2004) na genu *hlyA*, ki je značilen za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Našli smo dva kompleta oligonukleotidnih začetnikov in ju označili kot SBF1/SBR1 ter SBF1/SBR2. Njunjo teoretično specifičnost smo najprej preverili s programom BLAST (NCBI BLAST, 2006), ki je primerjal sekvenci pomnožkov dobljenih z novo oblikovanimi oligonukleotidnimi začetniki s poznanimi sekvencami DNK različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes*, različnih bakterij v rodu *Listeria* in drugih bakterij, ki niso iz rodu *Listeria*. Ugotovili smo 100 % prekrivanje sekvenc pomnožka dobljenega z

SBF1/SBR1 ali SBF1/SBR2 in sekvenc DNK 100 različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Hein in sod. (2001) navajajo uporabo programa Primer express 2.0 za iskanje oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidnih sond za določanje bakterij vrst *L. monocytogenes* in *L. innocua* s PCR v realnem času. Poiskali so 4 pare oligonukleotidnih začetnikov LMIAP 1/2, LMIAP 3/4, LIM 1/LUN 1 ter LIM 2/LIMRE, ki se prilegajo na različne dele gena *iap*.

Tudi Rodrigez-Lazaro in sod. (2004) so uporabili program Primer express 2.0 za iskanje oligonukleotidnih začetnikov in sond. S pomočjo tega programa so poiskali 2 kompleta oligonukleotidnih začetnikov in sond. Poiskali so jih na genih *hlyA* in *iap* značilnih za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Njihovo teoretično specifičnost so preverili s programom BLAST, ki je potrdil, da se njihova pomnožka ne ujema z nobeno drugo poznano sekvenco DNK, razen s tarčno molekulo DNK bakterij vrste *L. monocytogenes*.

5.1.4 Specifičnost in občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Praktično smo specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 preverjali na 28 različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes* in razen pri sevu *L. monocytogenes* ŽM63 dobili pozitivne rezultate pri obeh kompletih oligonukleotidnih začetnikov. Specifičnost smo preverili tudi s 3 sevi vrste *L. ivanovii* in 2 sevoma vrste *L. seeligeri*. Pri sevu *L. ivanovii* ŽM279 in obeh sevih *L. seeligeri* so bili rezultati lažno negativni. Pravilno negativne rezultate smo dobili pri 2 sevih *L. welshimeri* in 2 sevih *L. innocua*, saj ti dve vrsti listerij ne vsebujeta gena listeriolizin. Specifičnost obeh kompletov oligonukleotidnih začetnikov smo preverjali tudi s 15 sevi različnih bakterij, ki ne sodijo v rod *Listeria*. Za komplet oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 smo med 8 sevi *B. cereus*, 3 sevi *Cl. tyrobutyricum*, ter po 1 sevom *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pyogenes* in *Clostridium perfringens* dobili pravilno negativne rezultate. Pri kompletu oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2 pa smo za iste preiskovane seve dobili 2 lažno pozitivna rezultata, in sicer pri sevu *B. cereus* ŽMJ40 in *Streptococcus pyogenes* ŽM494. Izračunana specifičnost za oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 je 92 % in za SBF1/SBR2 88 %.

Tudi Hein in sod. (2001) so po uporabi programa Primer express in izdelavi novih oligonukleotidnih začetnikov za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, le tem preverili specifičnost. S PCR v realnem času so dobili pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* med 42 različnimi sevi vse pozitivne rezultate, pri določanju bakterij vrste *L. innocua* pa same negativne rezultate. S tem so določili, da so njihovi oligonukleotidni začetniki specifični za bakterije vrste *L. monocytogenes*.

Da bi ugotovili, ali sta oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 ali SBF1/SBR2 poleg določanja bakterij vrst *L. monocytogenes* uporabna tudi za določanje bakterij vrst *L. ivanovii* in *L. seeligeri* bi morali preiskovati mnogo več sevov iz omenjenih vrst. Rodrigues-Lazaro in sod. (2004) so specifičnost določili na preko 120 različnih sevih bakterij rodu *Listeria* in pri

vseh dobili 100 % ujemanje rezultatov. Nogva in sod. (2000) so potrdili 100 % specifičnost novih oligonukleotidnih začetnikov za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s testiranjem 90 bakterijskih izolatov.

Občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 je bila po optimiranju reakcije (koncentraciji oligonukleotidnih začetnikov 900 nM (preglednici 15 in 16, slika 23) v obeh primerih enaka in je znašala 10^3 cfu/ml.

Bhagwat (2003) je s PCR v realnem času določil bakterije vrste *L. monocytogenes* do koncentracij $10^2 - 10^3$ cfu/ml. Celoten postopek določanja teh bakterij v izpirkih z inkubacijo je trajal 30 h.

Nogva in sod. (2000) so določili občutljivost PCR v realnem času za bakterije vrste *L. monocytogenes* v območju 6 – 10 cfu/ml. Eden od razlogov za boljšo občutljivost je ta, da so za določanje pomnožka poleg specifičnih oligonukleotidnih začetnikov uporabili še sondo. Boljša je bila tudi učinkovitost njihove pomnožitve (naklon standardne krivulj – 3,33), medtem ko je bila pri nas učinkovitost slabša (naklona standardnih krivulj sta bila -4,04 pri SBF1/SBR1, -4,17 pri SBF1/SBR2).

Huogh in sodelavci (2002) so določili bakterije vrste *L. monocytogenes* v 25 gramskih vzorcih cvetače, v katere so dodali iskane bakterije v koncentracijah med $10^3 - 10^{10}$ cfu / ml brez predhodne obogatitve vzorca. Wang in sodelavci (2004) so metodo skrajšali na 10 h in določili bakterije vrste *L. monocytogenes* v koncentracijah $10^3 - 10^4$ cfu/g v vzorcih surove klobase.

Ugotovili smo tudi, da dodatek bakterij vrste *S. enterica* ne moti PCR v realnem času za določevanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, saj smo kljub visoki koncentraciji bakterij vrste *S. enterica* določili občutljivost 10^3 cfu/ml.

5.2 SKLEPI

S postavitvijo protokolov in uvedbo PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* in *L. monocytogenes* smo:

- ugotovili, da je par oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993) po optimizaciji priprave DNK in encimske reakcije primeren za določanje bakterij vrste *S. enterica* s PCR v realnem času,
- ugotovili, da oligonukleotidna začetnika LM1/LM2 (Border in sod., 1990) nista primerna za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času zaradi slabe učinkovitosti reakcije,
- glede na poznane sekvence DNK bakterij vrste *L. monocytogenes* oblikovali nova para oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 in sonde SBS1,
- s testiranjem 52 bakterijskih izolatov s PCR v realnem času določili 92 % specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in 88 % specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR2,
- glede na klasičen PCR smo z uvedbo PCR v realnem času zboljšali občutljivost določanja bakterij vrste *S. enterica* (10^1 - 10^2 cfu/ml) in *L. monocytogenes* (10^3 cfu/ml), ter poenostavili in skrajšali postopek določanja bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*.

6 POVZETEK

Bakterije vrste *Salmonella enterica* kot tudi *Listeria monocytogenes* so za človeka patogene bakterije. Salmoneloza je v primerjavi z listeriozo pogostejša bolezen, vendar pa je smrtnost pri listeriozi zelo visoka. Do okužb s salmonelami pride najpogosteje prek živil. Glavni vir listerij za človeka pa je hrana kontaminirana z bakterijami vrste *L. monocytogenes*. Za te bakterije je značilno, da preživijo niz tehnoloških operacij, saj so odporne na visoke koncentracije soli in relativno nizko vrednost pH. Še posebno velik problem je njihova rast v živilih tudi pri temperaturah hladilnika.

Klasične metode določanja bakterij vrste *S. enterica* in *L. monocytogenes* so dolgotrajne in poleg obogatitev ter izolacije omenjenih bakterij na selektivnih gojiščih zajemajo še njihovo biokemijsko in serološko identifikacijo. To pomeni veliko dela, veliko materiala, predvsem pa veliko časa. Bolj specifične in časovno manj zamudne metode temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR). PCR je hitra metoda, z veliko specifičnostjo in občutljivostjo za odkrivanje in identifikacijo različnih bakterij.

Namen te naloge je bila postavitvev in uvedba metode PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*. S to metodo naj bi skrajšali in poenostavili potek določanja omenjenih bakterij, povečali specifičnost in zboljšali občutljivost določanja omenjenih bakterij.

Izhodišče za postavitvev metod PCR v realnem času sta bili klasični metodi PCR (Jeršek in smole, 2003) z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993) za določanje bakterij vrste *S. enterica* in LM1/LM2 (Border in sod., 1990) za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*.

Ugotovili smo, da je par oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 primeren za določanje bakterij vrste *S. enterica* z metodo PCR v realnem času, če uporabimo optimizirane razmere pomnoževanja (koncentracija ST11/ST15 600 nM, program spreminjanja temperatur Sallis2b). Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* ST11/ST15 je bila 10^1 - 10^2 cfu/ml.

Pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* z metodo PCR v realnem času in z oligonukleotidnima začetnikoma LM1/LM2 smo teoretično znano dejstvo, da je dolžina pomnožka 701 bp predolga, potrdili tako, da smo določili učinkovitost reakcije. Ker je bila v primerjavi z idealno učinkovitostjo (naklon standardne krivulje -3,32) slaba (naklon standarden krivulje -6,06), smo se odločili oblikovati nove oligonukleotidne začetnike in sondo.

Nove oligonukleotidne začetnike in sondo smo iskali s programom Primer express na poznanih sekvencah gena *hlyA*, ki je značilen za bakterije vrste *L. monocytogenes*. Oblikovali smo dva para oligonukleotidnih začetnikov in ju označili SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 ter specifično sondo SBS1. Teoretično smo specifičnost obeh parov oligonukleotidnih začetnikov in sonde preverili s programom BLAST.

Za oligonukleotidne začetnike SBF1/SBR1 je značilno, da ne tvorijo dimerov in to smo tudi praktično potrdili. Pri oligonukleotidnih začetnikih SBF1/SBR2 smo teoretično v sekundarnih strukturah videli tvorbo dimerov, vendar le teh pri praktični izvedbi PCR v realnem času nismo zaznali.

Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času je potekalo z obema paroma oligonukleotidnih začetnikov enako in z univerzalnim programom aparature Real-time 7500. Ta program je namenjen za sočasno določevanje različnih bakterij s PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki oblikovanimi s programom Primer expres.

S pomočjo standardnih krivulij smo določili koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov pri kateri je učinkovitost reakcije najboljša in ta je bila v obeh primerih 900 nM. Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 je znašala do 10^3 cfu/ml.

Uvedba PCR v realnem času v primerjavi s klasičnim PCR je bolj občutljiva metoda, hkrati pa tudi skrajša in poenostavi postopek določanja bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*.

7 VIRI

Aabo S., Rasmussen O.F., Rossen L., Sorensen P.D., Olsen J.E. 1993. *Salmonella* identification by 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., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-47.

Bhagwat A.A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 217-224.

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.

Catteau M., 1995. The genus *Listeria*. V: *Microbiological control for foods and agricultural products*. Bourgeois C.M., Leveau, J.Y. (eds.). New York, VCH publishers: 373-382.

Chen W., Martinez G., Mulchandani A. 2000. Molecular beacons: A real-time polymerase chain reaction assay for detecting *Salmonella*. *Analytical Biochemistry*, 280: 166-172.

Clark D. 2005. *Molecular biology*. Amsterdam, Elsevier Science: 634-660.

Clarke R.C., Gyles C.L. 1993. *Salmonella*. V: *Pathogenesis of bacterial infections in animals*. 2nd ed. Bourgeois C.M., Theon C.O. (eds). Ames, Iowa State University Press: 133-153.

Csordas A.T., Barak J.D., Delwiche M.J. 2004. Comparison of primers for detection of *Salmonella enterica* serovars using real-time PCR. *Applied Microbiology*, 39: 187-193.

Diez de Medina D., Flick G., Wittman R., Diallo A., Croonenberghs R. 1995. Growth of *Listeria monocytogenes* in fresh blue crab (*Callinectes sapidus*) meat in the presence of naturally occurring microflora during refrigerated storage. V: *1995 IFT Annual Meeting: book of abstracts*. Chicago, Institute of Food Technologists: 178-178.

DiMaio, H. 2000. *Listeria* infection in women. *Primary Care Update Journal for OB/GYNS*, 7, 1: 40-45.

Donnelly C.W. 2001. *Listeria monocytogenes*: a continuing challenge. *Nutrition Reviews*, 59: 183-194.

Fung D.Y. 1995. Rapid methods and automation in food microbiology: an update. V: *Microbiological control for foods and agricultural products*. Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (eds.). New York, VCH publishers: 3-22.

Garitty M. G., Bell A. J., Lilburn G. T. 2004. Taxonomic outline of the procariotes. V: Bergey's manual of systematic bacteriology. 11th ed. Release 5.0,. New York, Springer: 121-122, 181.

Guilbaud M., de Coppet P., Bourion F., Rachman C., Prevost H., Dousset X. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR. Applied and Environmental Microbiology, 71: 2190-2194.

Gledel J., Corbion B. 1995. The genus *Salmonella*. V: Microbiological control for foods and agricultural products. Bourgeois C.M., Leveau J.Y. (eds.). New York, VCH publishers: 309-324.

Glynn M.K., Bopp C., Dewitt W., Dabney P., Mokhtar M., Angulo F.J. 1998. Emergence of multidrug-resistant *Salmonella enterica* serotype *typhimurium* DT104 infections in the United States. Atlanta, Centers for Disease Control and Prevention: 1333-1338.

Gouws P.A., Visser M., Brozel V.S. 1998. A polymerase chain reaction procedure for the detection of *Salmonella* spp. within 24 hours. Journal of Food Protection, 61, 8: 1039-1042.

Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M. 2000. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. Research in Microbiology, 152: 37-46.

Helmick C.G., Griffin P.M., Addis 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., Government Printing Office, 3: 83-124.

Higuchi R., Dollinger G., Walsh S.P. and Griffin R. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. Biotechnology, 10: 413-417.

Hough A.J., Harbison S.A., Savill M.G, Melton L.D., and Fletcher G. 2002. Rapid enumeration of *Listeria monocytogenes* in artificially contaminated cabbage using real-time polymerase chain reaction. Journal of Food Protection, 65: 1329-1332.

Jeršek B., Smole Možina S. 2003. Sočasno določanje prisotnosti bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* z metodo PCR. V: 1. Interdisciplinarni simpozij "DDD, zdravje in okolje" z mednarodno udeležbo = 1st Interdisciplinary Symposium "DDD, Health and Environment" with international participation. Dobeic M., Vudrag M., Berger T. (ur.). Ljubljana, Slovenska veterinarska zveza, Sekcija za DDD in higieno okolja: Zavod za zdravstveno varstvo:187-193.

Jeršek B., 2003. Higiena živil: Laboratorijske vaje za predmet Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

Lee M.A., Squirrell D.J., Leslie D.L. and Brown T. 2004. Homogeneous fluorescent chemistries for real-time PCR. V: Real-time PCR an essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). London, Health Protection Agency: 31-70.

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: 6-14.

Li X., Boudjellab N., Zhao X. 1999. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology, 56: 167-177.

Logan J.M.J., Edwards K.J. 2004. An overview of Real-time PCR platforms. V: Real-time PCR an essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.), London, Health Protection Agency: 13-30.

Mackay I.M., 2004. Real-time PCR in the microbiological laboratory. Clinical Microbiology and Infection, 10, 3: 190-212.

Mackay I.M., Arden, E.K., Nitsche, A. 2002. Real-time PCR in virology. Nucleic Acid Research, 30, 6: 1292-1305.

Malorny B., Hoorfar J., Bunge C., Helmuth R. 2003. Multicenter validation of the analytical accuracy of *Salmonella* PCR: towards an international standard. Applied and Environmental Microbiology, 69, 1: 290-296.

Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A. and Heluth R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. Applied and Environmental Microbiology, 70: 7046-7052.

Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. 1999. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infectious Diseases, 5: 607-625.

NCBI BLAST. 2006. Bethesda, NCBI – National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>, 12.3.06)

Nogva H.K., Knut R. Naterstad K., Holck A., Lillehaug D. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4266-4271.

Olsen J.E., Aabo S., Hill W., Notermans S., Wernars K., Granum P. E., Popovic T., Rasmussen H. N., Olsvik O. 1995. Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens. International Journal of Food Microbiology, 28: 1-78.

Power SYBR® green PCR Master Mix and RT-PCR. 2005. Foster City, USA, Applied Biosystems: 1-1 – 1-13.

Preliminary foodnet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food of 10 states. 2005. MMWR – Morbidity and Mortality Weekly Report 55(14): 392-395.

(http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5514a2.htm?s_cid=mm5514a2_e, 11.8.2006)

Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2006, 2005. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 1-99.

(www.vurs.gov.si/fileadmin/vurs.gov.si/pageuploads/PDF/program-zoonoze2006.pdf 10.7.2006)

Radšel-Medvešček A. 2002. Salmoneloza. V: Infekcijske bolezni. Marolt-Gomilšek M., Radšel-Medvešček A. (ur.). Ljubljana, Tangram: 98-108.

Real-Time PCR Systems. Applied Biosystems 7900HT Fast Real-Time PCR SYstem and 7300/7500/7500 Fast. Chemistry guide. 2004. Foster city, USA, Applied Biosystems: 2-1 – 2-7.

Rijpens N., Herman L., Vereecker F., Jannes G., Smedt J.D., Zutter L.D. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. International Journal of Food Microbiology, 46: 37-44.

Roberts T.A., Baird-Parker A.C., Tompkin R.B. 1996. *Listeria monocytogenes*. V: Microorganisms in foods: 5. Characteristics of microbial pathogens. London, Blackie Academic and Profesional: 141-182.

Rodríguez-Lázaro D., Hernández M., Scotti M., Esteve T., Vázquez-Boland J.A., Pla M. 2004. Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by real-time PCR: Assessment of *hly*, *iap* and *lin02483* targets and Amplifluor technology. Applied and Environmental Microbiology, 70, 3: 1366-1377 .

Rossen L., Norskov, P. Holmstrom K., Rasmussen O.F. 1992. Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assay and DNA extraction solutions. International Journal of Food Microbiology, 17: 37-45.

Ryser E.T. 1998. Public health concerns. V: Applied dairy microbiology. Marth E.H., Steele J.L. (eds.). New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker: 263-404.

Saunders N.A. 2004. An introduction to real-time PCR. V: Real-time PCR an essential guide. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). London, Health Protection Agency: 1-12.

Schoeni J.L., Glass K.A., McDermonnt J.L., Wong A.C.L. 1995. Growth and penetration of *Salmonella enteritidis*, *Salmonella heidelberg* and *Salmonella typhimurium* in eggs. International Journal of Food Microbiology, 24, 3: 385-396.

Schneider A., Grönewald C., Fandke M., Kurth B., Brakowski S., Berghof-Jäger K. 2002. Real-time detection of genus *Salmonella* with lightcycler system. *Biochemica*, 4: 19-21.

Sequence detection systems. Chemistry guide. 2003. Foster City, USA, Applied Biosystems: 2-2 – 2-7.

SIST EN ISO 16140:2003. 2003. Mikrobiologija živil in krme: protokol za validacijo alternativnih metod: 78 str.

SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004. 2004. Mikrobiologija živil in krme – Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp.: 6 str.

SIST EN ISO 11290-1:1997/A1:2005. Mikrobiologija živil in krme - Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti in števila *Listerie 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): 4 str.

Stroth R. 1996. Mikrobiologie von Eiern und Eierprodukten. V: Mikrobiologie der Lebensmittel Fleisch und Fleisch erzeugnisse. Weber H. (ed.). Hamburg, Behr's Verlag: 633-658.

Trkov M., Majerikova I., Jeršek B., Stefanovicová A., Rijpens N., Kuchta T. 1999. Detection of *Salmonella* in food over 30h using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 16: 393-399.

Trkov M., Jeršek B., 2001. Vpliv različnih hitrih metod osamitve genomske DNK salmonel na občutljivost PCR = The effect of different rapid methods for isolation of *Salmonella* genomic DNA on PCR sensitivity. Zbornik Biotehniške fakakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, 1: 27-37.

Uytendaele 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.

Wang X., Jothikumar N., Griffiths M.W., 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 67: 189-192.

Weise E. 1996. Mikrobiologie des Geflügels. V : Mikrobiologie der Lebensmittel Fleisch und Fleischerzeugnisse. Weber H. (ed.). Hamburg, Behr's Verlag: 557-631.

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živili. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6958.

Yan S. S., Pendrak L. M., Abela-Ridder B., Pounderson 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.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorici doc. dr. Barbari Jeršek za vso pomoč in nasvete tako pri laboratorijskem delu, kot tudi pri pisanju diplomskega dela, ter za odlično mentorstvo. Prav tako prof. dr. Sonji Smole Možina, za opravljeno delo recenzenta. Zahvaljujem se tudi ge. Jani Avbelj in Mariji Kurinčič za vso pomoč, nasvete in vzpodbude pri delu v laboratoriju. Zahvaljujem se Nataši Toplak za vso strokovno pomoč pri uvajanju nove metode. Zahvaljujem pa se tudi vsem domačim in prijateljem, ki so mi stali ob strani skozi vsa leta študija. Še enkrat hvala vsem imenovanim in tudi tistim, ki jih nisem omenil, pa ste mi kakorkoli pomagali.