

Ing. Gabriela Jeníková **Vývoj metody rychlé detekce salmonel ve vzorcích potravin**
Školitel: **Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.**
Studijní program: **Mikrobiologie**
Studijní obor: **Mikrobiologie**
Datum obhajoby: **21.2.2001**

SOUHRN

Četnost onemocnění, která jsou způsobena přítomností pathogenních bakterií v potravinách se stále zvyšuje. Standardní normované metody stanovení patogenních mikroorganismů jsou časově náročné (např. stanovení salmonel podle ISO normy trvá nejméně 5 dnů). Se zvyšujícími se nároky na rychlost a kvalitu mikrobiologické kontroly poživatin vzrůstá i tlak na zavedení rychlých metod detekce pathogenních mikroorganismů do potravinářského průmyslu a zdravotnictví. Cílem této práce byl vývoj rychlé metody stanovení bakterií rodu *Salmonella* v potravinách.

Prvním krokem optimalizace postupu stanovení bylo spojení neselektivního nabohacení mikroflóry potravinového vzorku s filtrací. Byly testovány filtrační sáčky vyrobené z různých materiálů, které by umožnily průchod mikroorganismů do média a zabránily průniku potravinových částic. Materiál polyamid s definovanou velikostí pórů umožňoval velmi jemnou filtraci, ale neosvědčil se pro konstrukci filtračních sáčků. Přednost byla dána materiálu na výrobu čajových sáčků (papír s polyethylenem) a komerčně vyráběným homogenizačním sáččkům s filtrační přepážkou (A.E.S. Laboratoire). Doba potřebná pro průchod mikroorganismů filtrační přepážkou byla stanovena na 7 hod.

Při pokusu o optimalizaci protokolu zkráceného pomnožení salmonel z potravinových vzorků za účelem zkrácení doby kultivace byl testován přídavek sloučenin železa do pufrované peptonové vody a pomnožení v různých elektivních médiích. Dosažené výsledky ukázaly, že růst salmonelových buněk nebyl za testovaných podmínek výrazně ovlivněn. Komerčně dostupné soupravy pro zkrácené pomnožení salmonel Oxoid SPRINT *Salmonella* test (Oxoid) a Salmosyst test (Merck) nesplňovaly požadovaná kritéria účinnosti selektivního nabohacení a kompatibility výsledného vzorku s následujícím stanovením. Nejlepších výsledků bylo dosaženo při kombinaci zkráceného pomnožení mikroflóry potravinového vzorku v pufrované peptonové vodě a následné selektivní kultivaci v médiu dle Rappaporta a Vassiliadise.

Jako rychlá a specifická metoda pro konečnou detekci byla zvolena polymerasová řetězová reakce (PCR). Pro PCR stanovení byly používány primery komplementární k sekvencím chromosomálního *invA* a plasmidového *spvC* genu. PCR amplifikace je však často inhibována složkami potravinové matrice. Z těchto důvodů bylo nutné před PCR reakcí provést separaci cílových buněk nebo DNA ze vzorku. Vzorky byly upraveny pomocí separačních metod: imunomagnetická separace (IMS) salmonel pomocí Dynabeads s povrchově vázanými anti-*Salmonella* protilátkami (Dynal), dvoustupňová centrifugace, magnetická separace DNA pomocí Dynabeads DNA Direct system I (Dynal) a centrifugace na vrstvě sacharosy. Dosažené výsledky se lišily v závislosti na typu potravinového vzorku. Imunomagnetickou separací se u vzorků s vysokým obsahem tuku a kompetující mikroflóry v matrici nepodařilo účinně separovat cílové bakterie ani DNA. Centrifugační metody poskytovaly pro analyzované masné a vaječné vzorky uspokojivé výsledky.

Metoda stanovení salmonel zahrnující zkrácené neselektivní pomnožení mikroflóry v pufrované peptonové vodě spojené s filtrací, následované selektivním pomnožením v médiu dle Rappaporta a Vassiliadise, separaci bakterií dvoustupňovou centrifugací a konečnou

detekci salmonel polymerasovou řetězovou reakcí byla aplikována na reálné vzorky potravin. Dosažená citlivost metody byla jednotky salmonelových buněk ve 25 g vzorku potravin. Metodou byla dále pozitivně identifikována přítomnost salmonel ve vnitřnostech infikovaných zvířat.

Pro stanovení salmonel ve vzorcích mletého masa a kuřecího oplachu byla využita PCR metoda s fluorescenční detekcí produktů v reálném čase. Pro úpravu vzorku před PCR byla srovnána účinnost gradientové centrifugace s využitím roztoku BactXtractor™ (Quintessence Research AB), magnetické separace DNA pomocí Dynabeads DNA Direct (Dyna) a izolace DNA pomocí DNeasy™ Tissue Kitu (Qiagen). Reprodukovatelných výsledků stanovení s citlivostí požadovanou pro standardní metody bylo dosaženo při použití centrifugace v roztoku BactXtractor™ a DNeasy™ Tissue Kitu.

Získané výsledky lze využít při automatizaci PCR detekce patogenů v potravinách, která by měla být v budoucnu využívána v praxi pro rutinní stanovení salmonel během jednoho dne.

Klíčová slova: *Salmonella*, potravinové vzorky, PCR, separační techniky, 5' nukleasová PCR

Ing. Gabriela Jeníková **Development of the method for rapid detection of *Salmonella* in food samples**
Supervisor: **Prof. Ing. Kateřina Demnerová, CSc.**
Study programme: **Microbiology**
Study subprogramme: **Microbiology**
Date of defence: **21.2.2001**

SUMMARY

Pathogenic bacteria occurring in foods cause various human illnesses. Standard methods for the detection of pathogenic microorganisms are time consuming (e. g. the determination of *Salmonella* in a food sample takes more than 5 days). In the food industry and health service there is a demand for a rapid pathogen detection methods. The aim of this work was to develop a rapid method for the detection of *Salmonella* in food samples.

The first step of the process optimisation was connection of nonselective pre-enrichment of bacteria and filtration. Various materials were tested for the construction of the filtration bag, which would allow the passage of bacteria into the cultivation medium and at the same time avoid the release of food particles. Usage of polyamide material with pore defined sizes for the construction of filtration bags was not successful. Better results were obtained with materials of paper with polyethylene (used for production of tea bags), or filtration membranes of commercially produced homogenisation bag (A.E.S. Laboratoire). The cultivation time required for filtration pre-enrichment was estimated at seven hours.

Optimisation of shortened cultivation procedure for *Salmonella* enrichment in food samples was evaluated. Both the addition of iron compounds to buffered peptone water and the growth in various elective media did not enhance the growth rate of *Salmonella* cells significantly. Commercial kits for the shortened enrichment of *Salmonella* cells did not fulfil demands for efficacy of selectivity. Good results were obtained using a combination

of shortened enrichment in buffered peptone water followed by selective cultivation in Rappaport-Vassiliadis medium.

The polymerase chain reaction (PCR) was chosen for the final specific detection of *Salmonella*. Primers were prepared according to sequences of the chromosomal gene *invA* and plasmid gene *spvC*. PCR is often inhibited by compounds from food matrices. To prevent this inhibition it is necessary to separate target bacteria or DNA from the sample. After the enrichment of bacteria from food sample the following separation methods were applied: immunomagnetic separation using anti-*Salmonella* Dynabeads (Dyna), two step centrifugation, magnetic separation of DNA using Dynabeads DNA Direct (Dyna) and centrifugation on sucrose layer. Results differed according to the composition of sample food matrices. Immunomagnetic separation was not successful when applied to samples with high contents of fat and competitive microflora. Centrifugation methods provided good results for meat and egg samples.

The optimised protocol including shortened non-selective enrichment in buffered peptone water, selective enrichment in Rappaport-Vassiliadis medium, two step centrifugation and final detection by PCR was applied on real food samples. The sensitivity was reached units *Salmonella* cells added to 25 g of food sample. Positive determination of *Salmonella* occurrence in entrails of infected animals was achieved by this method.

Real-time fluorescence PCR was used for determination of *Salmonella* in samples of minced meat and chicken carcass rinse. The efficacy of four separation methods for sample pre-treatment before PCR was compared: gradient centrifugation using Bactxtractor™ solution (Quintessence Research AB), magnetic separation of DNA using Dynabeads DNA Direct (Dyna), DNA isolation by DNeasy™ Tissue kit (Qiagen) and the combination of Bactxtractor™ with DNeasy™ Tissue kit. Bactxtractor™ and DNeasy™ Tissue kit provided reproducible results with the required sensitivity.

Results obtained during this work can be exploited for the automation of food pathogen detection by PCR. This could be used in the future for routine determinations allowing detection time to be shortened to just one day.

Keywords: *Salmonella*, food samples, PCR, separation techniques, 5' nuclease PCR