

DETEKCIA SALMONEL V ŽIVOTNOM PROSTREDÍ

DETECTION OF SALMONELLAE IN THE ENVIRONMENT

Holoda, E., Holečková, B.¹, Gondol', J.¹, Bis-Wencel, H.², Novák, P.³

Katedra mikrobiológie a imunológie, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice;

¹ Výskumný ústav veterinárnej medicíny, Košice;

² Pracownia Biologii Rozrodu Katedry Higieny Zwierzat i Srodowiska Wydziału Zootechnicznego, Akademii Rolniczej w Lublinie, Polsko;

³ Ústav zoohygieny Fakulty veterinární hygieny a ekologie VFU Brno

Abstract

The presence of plasmids coding for expression of K88 antigen is used in the diagnostics of enteropathogenic *E.coli* strains. The proposal of primers for diagnostics of various strains of enteropathogenic *E.coli* is based on the knowledge of plasmid DNA sequence (Gaastra et al., 1981).

Úvod

Pri mikrobiálnej diagnostike je hlavný dôraz kladený na morfológické a biochemické znaky sledovaných bakteriálnych druhov. V klinickej diagnostike mikroorganizmov sa v súčasnosti uplatňujú metodické prístupy, ktoré analyzujú hlavne fenotypové prejavy sledovaných mikroorganizmov (mikroskopická identifikácia, kultivačné metódy a testy rezistencie na antibiotiká, serotypizácia, fagotypizácia, biochemické testy, analýza bunkových proteínov, atď.) Väčšina týchto testov je však náročná na čas ako i na materiál. Je snaha zaviesť do klinickej diagnostiky metódy molekulárnej analýzy DNA, ktoré sú značne rýchlejšie, pri vhodnej optimalizácii citlivejšie a spoľahlivejšie a môžu byť aj ekonomicky menej náročné. Vo všeobecnosti sú tieto metódy menej ovplyvnené variabilitou bakteriálneho rastu. Sú známe viaceré metódy DNA analýzy ako hybridizačné techniky, restrikčná analýza, PCR a jej rôzne modifikácie a aplikácie, elektroforetické techniky (PFGE, SSCP, elektroforéza v gradiente). Adhézia enterotoxigénnych *E.coli* na povrch tenkého čreva bola rozpoznaná ako skorá fáza patogenézy hnačkových ochorení. Medzi adhezínmi *E.coli* izolovaných z infikovaných zvierat sa často objavujú antigény **K88/ F4**, **K99/ F4** a tiež **987P/ F6** a **F4** fimbrie. Od r. 1975 slúži adhezín K88 ako model pri štúdiu závislosti medzi adhéziou *E.coli* a incidenciou infekcie (Sellwood et al. 1992). Prítomnosť plazmidov kódujúcich expresiu K88 antigénu v spomenutých kmeňoch môže byť využitá v diagnostike enteropatogénnych kmeňov *E.coli*. Na základe poznania sekvencie plazmidovej DNA (Gaastra et al. 1981) boli navrhnuté primery pre diagnostiku rôznych kmeňov enteropatogénnych *E.coli*.

Materiál a metodika

Bakteriálne kmene: V práci boli použité bakteriálne kmene *E.coli* M1, *Salmonella enteritidis* *Salmonella typhimurium* 4/5, *E.coli* HB 101 a *Proteus vulgaris*. Kmene boli kultivované v LB médiu cez noc pri 37°C za trepania.

Izolácia DNA: Z nočnej kultúry (1,5ml) centrifigáciou získané bakteriálne bunky (14 000g, 2 min) boli premyté STE pufrom a resuspendované v roztoku 0,5% SDS, Proteinase K vo finálnej koncentrácii 100 µg.ml⁻¹. Po jedn hodinovej inkubácii pri 37°C bolo pridané 100 µl 5M NaCl, 80 µl CTAB/ NaCl roztoku a následne 10 min inkubované pri 65°C. Vzorky boli následne extrahované zmesou chloroform/ izoamylalkohol, opäť fenol/ chloroform/ izoamylalkohol, vyzrážané dvoma objemami etanolu a premyté 70% etanolom. Sediment po

centrifugácii bol resuspendovaný v TE pufri, opracovaný RN-ázou, premytý etanolom a opäť resuspendovaný v TE pufri.

Plazmidová DNA bola izolovaná metódou Miniprep podľa Ausubel kol. (1989).

Reakčné podmienky PCR : Na PCR reakciu bola použitá AmpliTaq DNA polymeráza (Perkin Elmer) v množstve 0,5 U, 2 mM dNTPs, PCR pufer Perkin Elmer s $MgCl_2$ v celkovom objeme reakčnej zmesi 50 μ l. Podmienky PCR boli testované v rozsahu teplôt a časovej závislosti. V reakčnom pufri bola testovaná koncentrácia $MgCl_2$ v rozsahu 2,0; 2,5; 3,0 a 3,5 mM.

Agarózová gélová elektroforéza: PCR produkty boli identifikované agarózovou gélovou elektroforézou pomocou 2% agarózového gélu v elektroforetickom TAE pufri. DNA bola vizualizovaná po ofarbení ethídium bromidom (koncentrácia $0,5\mu g.ml^{-1}$) pomocou UV svetla. Ako štandardy molekulových hmotností bola použitá λ DNA, štiepená restriktívnymi endonukleázami HindIII a EcoRI (Ausubel a kol., 1989).

Výsledky a diskusia

Pre stanovenie optimálnych podmienok PCR bola použitá DNA, izolovaná z bakteriálnych kmeňov E.coli alkalicko-denaturačnou metódou podľa Birnboim a Doly (1979). Podmienky pre PCR sme testovali v rozsahu teplôt a časovej závislosti:

- úvodný denaturačný krok $94-95^{\circ}C$ po dobu 1-4 min
- denaturačný krok $92-95^{\circ}C$, annealing krok $52-58^{\circ}C$, predlžovací $72^{\circ}C$ v časovom rozmedzí 0,3-1,0 min, počet cyklov 25, 30, 35
- záverečný predlžovací krok $72^{\circ}C$ 2-3 min

Rovnako bola testovaná koncentrácia $MgCl_2$ v reakčnom pufri v rozsahu 2,0-4,0 mM.

Pre detekciu génu kódujúceho K88 aderenčný antigén enteropatogénnych Eschericia coli s primermi označenými 318 a 320 sme testovali optimálne podmienky PCR reakcie. Po amplifikácii DNA izolovanej z kmeňov, E.coli M1 a E.coli HB 101 Salmonella enteritidis, Salmonella typhimurium PCR reakciou (s primermi 318 a 320) sme predpokladali v prípade kmeňa E.coli M1 detegovať agarózovou gélovou elektroforézou fragment o molekulovej hmotnosti 800 b.p. Dobré výsledky boli dosiahnuté pri reakčných podmienkach uvedených v tabuľke pri koncentrácii $MgCl_2$ 2,5 resp. 3,0 mM.

Tabuľka č.:1

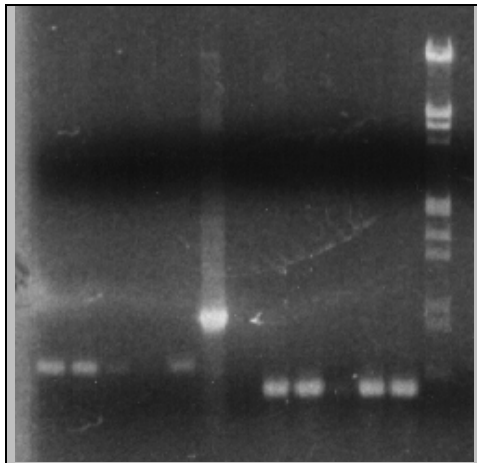
Teplota	Čas (min)	Počet cyklov
$95^{\circ}C$	4	1-úvodný
$95^{\circ}C$	1,0	30
$56^{\circ}C$	1,0	
$72^{\circ}C$	1,5	
$72^{\circ}C$	2,5	1-záverečný

Agarózovou gélovou elektroforézou v prípade DNA izolovanej z kmeňa E.coli M1 bol detegovaný jasný band v predpokladanej oblasti molekulovej hmotnosti 800 b.p. V prípade DNA izolovanej z bakteriálnych kmeňov neobsahujúcich DNA kódujúcu K88 aderenčný antigén (E.coli HB 101 - tento kmeň bol použitý ako recipientný kmeň pre transformáciu rekombinantnej DNA kódujúcej K88 aderenčný antigén) a Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis výsledky boli jednoznačne negatívne.

V ďalšom sme pristúpili ku PCR diagnostike jednotlivých bakteriálnych druhov bez purifikácie amplifikovanej DNA. Jednotlivé bakteriálne kmene boli najprv pomnožované v LB médiu cez noc (12 - 14 hodín). Z takto získaných bakteriálnych kultúr boli stanovené

počty kolónie tvoriacich zárodokov metódou desiatkového riedenia vo fyziologickom roztoku. Jeden militer z každého takto získaného riedenia (v rozsahu od riedenia 10^{-1} do 10^{-9}) sme centrifugovali a sediment resuspendovali v 1 ml fyziologického roztoku. Vzorky sme preniesli do vodnej lázne z vriacou vodu na 5, 10, 15 a 20 minút (v ďalšom 100° C). Po príslušnej dobe expozície boli vzorky centrifugované a na PCR diagnostiku bolo použité aliquotné množstvo supernatantu.

V prípade detekcie pozitívneho fragmentu s primermi 318 a 320 pre enteropatogénne E.coli s génom kódujúcim K88 antigén 10 min expozícia vzorky pri 100° bola postačujúca. Predĺžením tejto doby rozdiely v kvalite produktov minimálne, preto túto dobu z ohľadom na snahu o skrátenie celkového vyšetrovacieho času sme považovali za postačujúcu. Hranica detekovateľnosti za týchto podmienok sa pohybovala v rozsahu riedení 10^{-3} - 10^{-4} kolónie tvoriacich zárodokov na 1 ml fyziologického roztoku pre E.coli M1. Výsledky PCR v prípade použitia kmeňa E.coli HB 101 a Salmonella typhimurium, Salmonella enteritidis—boli negatívne.



Obrázok: Vzorky zľava:1-3. PCR produkt Salmonella enteritidis, 4-5. negatívne kontroly, 6. K88 PCR produkt, 7 negatívna kontrola, 8-12 PCR produkty Salmonella; štandarda molekuloých hmotností λ DNA štiepená restričnými endonukleázami HindIII a EcoRI;

Limitujúcimi faktormi pre úspešné použitie metódy z priamo z bakteriálnych kultúr v médiu bez ich premytia sú najmä: médium nevykazujúce inhibičný účinok na priebeh PCR reakcie, životaschopnosť zárodokov, neprítomnosť antimikrobiálnych látok vo vyšetrovaných vzorkách.

Citlivosť PCR reakcie ovplyvňuje aj druh vzorky, kedy pri vzorke z čistej kultúry je dosahovaná citlivosť 10 násobne vyššia v porovnaní so vzorkou pripravenou napr. z fečes (Stone, 1994). Ďalším významným faktorom, ktorý sa môže podieľať na zvýšení citlivosti PCR je aj otázka spôsobu detekcie amplifikovaného fragmentu. V prípade použitia detekcie fragmentu prostredníctvom ethídium bromidom je táto citlivosť najmenej 10 násobne nižšia v porovnaní s technikou Southern blot hybridizácie (Stone, 1994). Použitie tejto techniky si ale vyžaduje zvýšené finančné náklady, ako aj predĺženie času, potrebného na detekciu príslušných zárodokov.

S ohľadom na možné kontaminácie klinických vzoriek, ktoré často vedú, najmä pri tradičných izolačných technikách k predĺženiu doby potrebnej na získanie výsledku, eventuálne až k falošne negatívnym výsledkom, testovali sme možnosti PCR detekcie jednotlivých bakteriálnych druhov v značne kontaminovanej vzorke. Na PCR boli použité vyšetrované vzorky kontaminované s E.coli, S.typhimurium, S.enteritidis a Proteus vulgaris v rôznych kombináciach. Ani v jednom prípade sme nezískali falošne negatívny alebo falošne pozitívny výsledok. Tieto výsledky boli získané po inokulácii média známou koncentráciou KTZ jednotlivých zárodokov, preto v prípade prirodzenej infekcie je možné predpokladať isté rozdiely vo výsledkoch. Tieto rozdiely môžu byť spôsobené

pomerným zastúpením jednotlivých zárodkov a v neposlednej rade aj druhom zárodkov vo vzorke s ohľadom na vzájomné interakcie medzi mikroorganizmami.

Abstrakt

Prítomnosť plazmidov kódujúcich expresiu K88 antigénu využitá v diagnostike enteropatogénnych kmeňov *E.coli*. Na základe poznania sekvencie plazmidovej DNA (Gaastra et al. 1981) boli navrhnuté primery pre diagnostiku rôznych kmeňov enteropatogénnych *E.coli*.

LITERATÚRA

1. AABO, S., RASMUSSEN, O. F., ROSSEN, L., SØRENSEN, P. D. a OLSEN, J. E.: Salmonella identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 1993, str. 171 - 178
2. AUSUBEL, F.M., BRENT, R., KINGSTON, R.E., MOORE, D.D., SEIDMAN, J.G., SMITH, J.A., STRUHL, K.: *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publ. Assoc. and Wiley - Interscience, New York, 1989.
3. LAMPEL, K. A., JAGOW, J. A., TRUCKSESS, M. a HILL, W. E.: Polymerase chain reaction for detection of invasive *Shigella flexneri* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1990, str. 1536 - 1540
4. McPHERSON, M.J., QUIRKE, P. a TAYLOR, G.R.: *PCR a practical approach*. Oxford University Press, 1993, str. 253
5. Miffin, T. E., Sansieri, C. A., Kapp, D. W., Casciato, J.: Characterisation of a rapid method for isolation of genomic DNA suitable for amplification, *Clin. Chem.*, 40, 1994, 6, s. 1091-1092
6. MIKULA, I., PILIPČINEC, E., TKÁČIK, J., PISTL, J., HOLODA, E.: *Veterinárna mikrobiológia a imunológia - Praktické cvičenia*. Príroda Bratislava, 1985
7. PARKER, M.T., DUERDEN, B. I.: *Principles of Bacteriology, Virology and Immunology*. Vol.2.: *Systematic Bacteriology*. Topley and Wilson's, B.C.Decker Inc., 1990
8. Pilipčinec E., Huisman T.T., Willemsen P.T.J., Appelmelk B.J., Graaf de F.K., Oudega B.: Identification by Tn10 transposon mutagenesis of host factors involved in the biosynthesis of K99 fimbriae of *Escherichia coli*: Effect of LPS mutations.
9. POLLARD, D. R., JOHNSON, W. M., LIOR, H., TYLER, S. D. a ROZEE, K. R.: Rapid and specific detection of verotoxin genes in *Escherichia coli* by the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28, 1990, str. 540 - 545
10. POULTRY COMPANY REFERENCE BOOK, published by Misset International, the Netherland, 1996, str. 95
11. RADOSTITS, O. M., BLOOD, D. C. a GAY, C. C.: *Veterinary Medicine - A textbook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses*, 8th ed., Baillière Tindall, 1994, str. 1763
12. SARDELLI, S., WILLIAMS, J.F.: PCR optimization- Reaction conditions and components, *PCR Technical Information*, 1995, str.93-98
13. SHIBATA, D.: Preparation of Nucleic Acids for Archival Material, In: Mullis, K.B. (Ed.): *The Polymerase Chain Reaction*, Birkhauser, Boston, 1994, s. 47-51
14. STONE, G. G., OBERST, R. D., HAYS, M. P., McVEY, S. a CHENGAPPA, M. M.: Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation - PCR procedure. *J. Clin. Microbiol.*, 32, 7, 1994, str. 1742 - 1749