

Agrovoc Descriptors: salmonella, listeria monocytogenes, food safety, microbiological analysis, analytical methods, culture media

Agris Category Codes: Q03

COBISS koda 1.01

Vrednotenje metode PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* v živilih

Sonja SMOLE MOŽINA¹, Anže LENČEK², Barbara JERŠEK³

Delo je prispelo: 3. oktobra 2005; sprejeto: 11. oktobra 2005

Received: October 3, 2005; accepted: October 11, 2005

IZVLEČEK

Salmoneloza in listerioza sta alimentarni infekciji zato so hitre in zanesljive metode določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* pogoj za zagotavljanje varne hrane. Metode na osnovi PCR imajo teoretične prednosti v primerjavi s tradicionalnimi mikrobiološkimi metodami, vendar morajo biti pred rutinsko uporabo ustrezno vrednotene. V prispevku je predstavljeno vrednotenje metode PCR za sočasno določitev bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih kot primer validacije alternativne kvalitativne metode glede na referenčne metode. Ustrezna izvedba metode PCR je hitrejša od standardnih mikrobioloških metod, ima enako relativno točnost, relativno občutljivost in relativno specifičnost ter pomeni dobro osnovo za nadaljnje medlaboratorijsko vrednotenje.

Ključne besede: Varnost živil, kvalitativne mikrobiološke metode, vrednotenje, PCR, gojišče UPB, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

EVALUATION OF PCR METHOD FOR SIMULTANEOUS DETECTION OF *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* IN FOODS

Salmonellosis and listeriosis are foodborne illnesses and therefore the rapid and accurate detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* are important for food safety assurance. PCR-based methods offer theoretically many advantages over traditional microbiological methods but they should be evaluated prior implementation in routine testing. The evaluation of PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in foods is presented as an example of validation of an alternative qualitative method against the reference methods. Appropriate procedure of PCR method is faster than standard

¹ Izr. prof. dr., Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1111 Ljubljana, Slovenija

² Univ. dipl. ing. živ. tehnol., Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1111 Ljubljana, Slovenija

³ Doc. dr., Univ. v Ljubljani, Biotehniška fak., Odd. za živilstvo, Jamnikarjeva 101, 1111 Ljubljana, Slovenija

microbiological methods, it has the same relative accuracy, relative sensitivity and relative specificity and means good basis for further interlaboratory validation.

Keywords: Food safety, qualitative microbiological methods, evaluation, PCR, UPB medium, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*

1 UVOD

Salmoneloza in listerioza sta bolezni, ki sta lahko posledici uživanja živil, kontaminiranih z bakterijami rodu *Salmonella* oziroma vrste *Listeria monocytogenes*. Salmonele so najpogostejši povzročitelj bakterijskih črevesnih obolenj pri nas (v letu 2004 je bila incidenca salmoneloze 169 primerov na 100.000 prebivalcev) (Hočevar Grom in sod., 2005). Tudi po svetu je salmoneloza med najpogostejšimi z živili prenosljivimi obolenji (na primer v ZDA je bila incidenca v letu 2004 14,7 primerov na 100.000 prebivalcev) (Preliminary .., 2005). Humana listerioza je sicer redka bolezen (incidenca v letu 2004 v ZDA 2,7 primerov na 1.000.000 prebivalcev), a je smrtnost zelo velika, med 20 in 60 % (Vazquez-Boland in sod., 2001). Zato je zelo pomembno zgodnje in zanesljivo določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih. Pogoj za to so hitre, specifične in občutljive detekcijske metode.

Klasične metode izolacije in identifikacije bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* vključujejo bolj ali manj selektivno primarno obogatitev, selektivno sekundarno obogatitev, izolacijo ter identifikacijo izolatov z morfološkimi, biokemijskimi in serološkimi testi (Andrews in sod., 2001; Beumer in Hazeleger, 2003). Te metode so delovno in materialno zahtevne, rezultati so znani šele v 3 - 7 dneh. Dolgotrajnost klasičnih metod določanja patogenih bakterij v živilih je glavni vzrok za razvoj novih, hitrejših metod.

Pri uvajanju alternativnih metod je pomembno, da poleg hitreje izvedbe, visoke občutljivosti in specifičnosti metode upoštevamo še možnost avtomatizacije metode, neodvisnost izvedbe metode glede na vrsto živila, ceno, enostavno izvedbo, dostopnost potrebnih kemikalij ter možnost standardizacije metode (Mothershed in Whitney, 2005). Te zahteve teoretično dobro izpolnjujejo metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR).

Standard SIST EN ISO 16140:2003 (2003) določa splošna načela in tehnični postopek vrednotenja alternativnih metod mikrobiološke preiskave živil in živalske krme. Alternativno metodo definira z istim objektom preiskave kot pri referenčni metodi, znotraj določene kategorije oziroma skupine živil. Lahko pomeni izboljšavo le dela analitičnega postopka ali izboljšavo celotnega analitičnega postopka od odvzema oziroma priprave vzorcev do končnega vrednotenja rezultatov in poročila. Pri alternativni metodi je važen krajši čas preiskave, enostavnejša izvedba ali večje možnosti avtomatizacije. Izbrana referenčna metoda pa mora biti mednarodno priznana in splošno uporabna metoda, kar velja za metode po standardih ISO.

Postopek vrednotenja kvalitativnih in kvantitativnih alternativnih metod je dvostopenjski; Prvo stopnjo opravi en laboratorij, druga pa vključuje medlaboratorijsko testiranje. Vrednotenje kvalitativne alternativne metode mora biti

izvedeno na različnih skupinah živil (na primer mesni izdelki, mlečni izdelki, izdelki iz sadja in zelenjave) in na različno obdelanih živilih (na primer surova živila, toplotno obdelana živila, zmrznjena živila). Izbira skupin in stopnje obdelave živil je odvisna od vrste bakterij, ki jih določamo z alternativno metodo. Za vrednotenje alternativne metode so najbolj primerni naravno kontaminirani vzorci živil. Uporabna so tudi umetno kontaminirana živila in referenčni vzorci živil, ki vsebujejo točno določeno koncentracijo iskanih bakterij. Alternativna in referenčna metoda morata biti izvedeni istočasno na istem vzorcu živila. Rezultati primerjanih metod služijo izračunu različnih parametrov, kot so relativna točnost, relativna občutljivost in relativna specifičnost alternativne metode, s katerimi opišemo in vrednotimo alternativno metodo glede na referenčno metodo.

Prispevek prikazuje primer prvostopenjskega vrednotenja alternativne mikrobiološke metode - kvalitativne metode PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih. Ovrednotili smo tri različne postopke metode PCR, kot referenčni metodi pa smo uporabili standardni mikrobiološki metodi določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih.

2 MATERIALI IN METODE

2.1 Bakterijski sevi in umetna kontaminacija živil

Za umetno kontaminacijo živil smo uporabili seva *Salmonella* Enteritidis ŽM 2 in *Listeria monocytogenes* ŽM 54 (Zbirka Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelek za živilstvo, Biotehniška fakulteta), ki smo ju gojili 24 ur v bujonu BHI (Brain Heart Infusion, Biolife 401230, Italija) pri 37 °C. Čisti kulturi posameznega seva smo 10-kratno serijsko redčili s sterilno fiziološko raztopino in ju uporabili za umetno kontaminacijo živil.

Vsak vzorec živila smo razdelili na 6 delov (6 x 25 g), kot je prikazano na sliki 1. V treh delih vzorca živila smo določali naravno prisotne bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* in sicer: v prvem delu bakterije rodu *Salmonella* z metodo po standardu SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004 (2004), v drugem delu bakterije vrste *L. monocytogenes* z metodo po standardu ISO 11290-1 (Anon., 2004) in v tretjem delu sočasno bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z metodo PCR. Naslednjim trem delom vzorca živila smo dodali hkrati oba seva bakterij *S. Enteritidis* ŽM 2 in *L. monocytogenes* ŽM 54 znanih koncentracij (od 10 do 1000 cfu / 25 g). Posamezne dele umetno kontaminiranega vzorca živila smo nato preiskali z enakimi metodami kot naravno kontaminirane dele vzorca živila (slika 1).

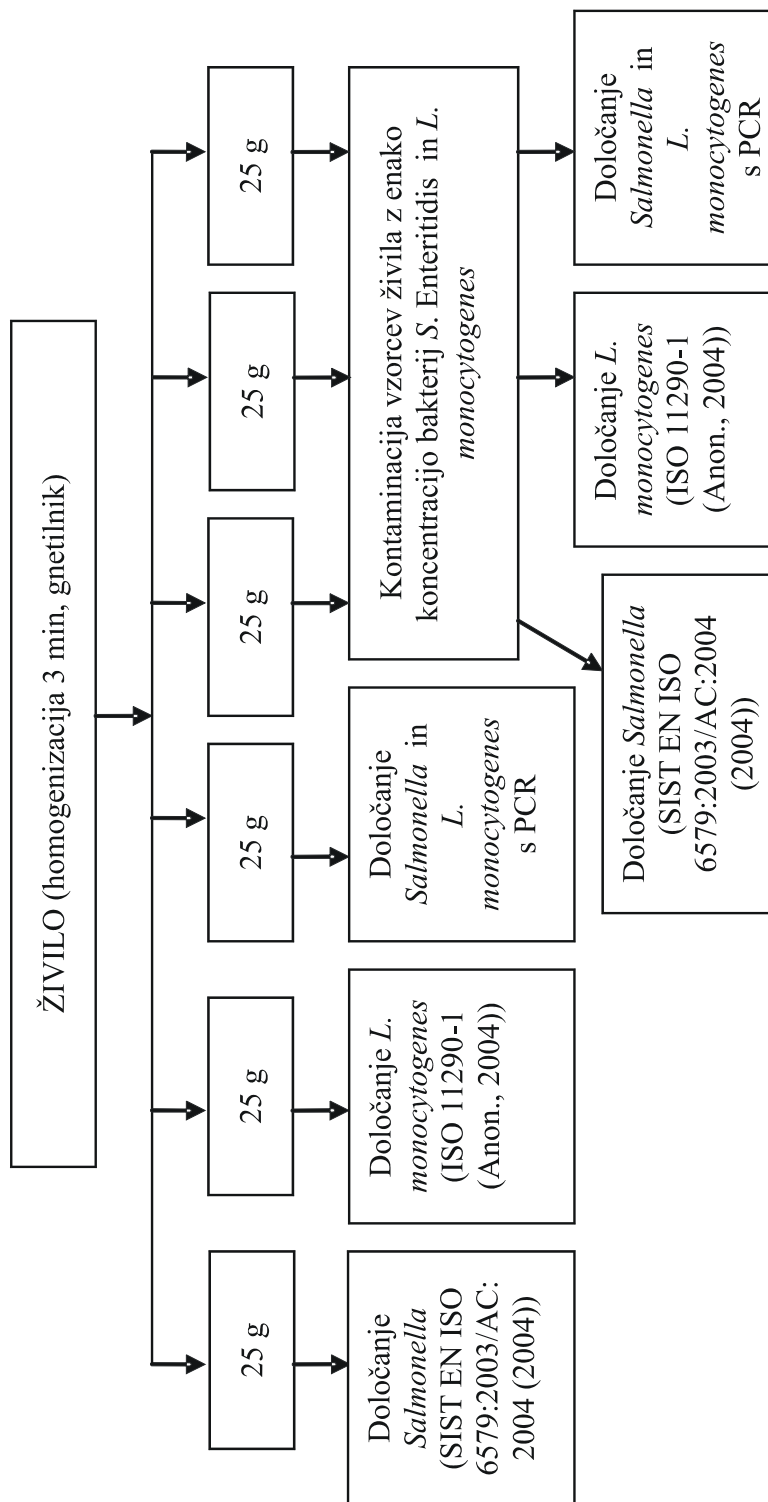
2.2 Živila

V raziskavo smo vključili živila iz različnih skupin: meso in mesni izdelki (mleto svinjsko in goveje meso, n = 2), perutninsko meso (piščančje meso, n=4), mleko in mlečni izdelki (kravje mleko, n = 2, kozje mleko, n = 2), jajca (n = 2) ter sadje, zelenjava oziroma sadno-zelenjavni izdelki (n = 6). Skupno smo preiskali 18 naravno kontaminiranih in 18 umetno kontaminiranih vzorcev živil.

2.3 Postopek sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* s PCR v živilih

Postopek sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* s PCR v živilih je vseboval naslednje faze (slika 2):

- homogenizacija živila (25 g) v gojišču UPB (Universal Preenrichment Broth, Becton Dickinson Microbiology Systems 223510, ZDA) (225 ml),
- 24-urna inkubacija in 48-urna inkubacija obogatitvene suspenzije UPB pri 37 °C,
- priprava bakterijskega lizata iz obogatitvene suspenzije UPB po 24- in 48-urni inkubaciji UPB z alkalno lizo bakterijskih celic (Herman, 1997; Trkov in Jeršek, 2001),

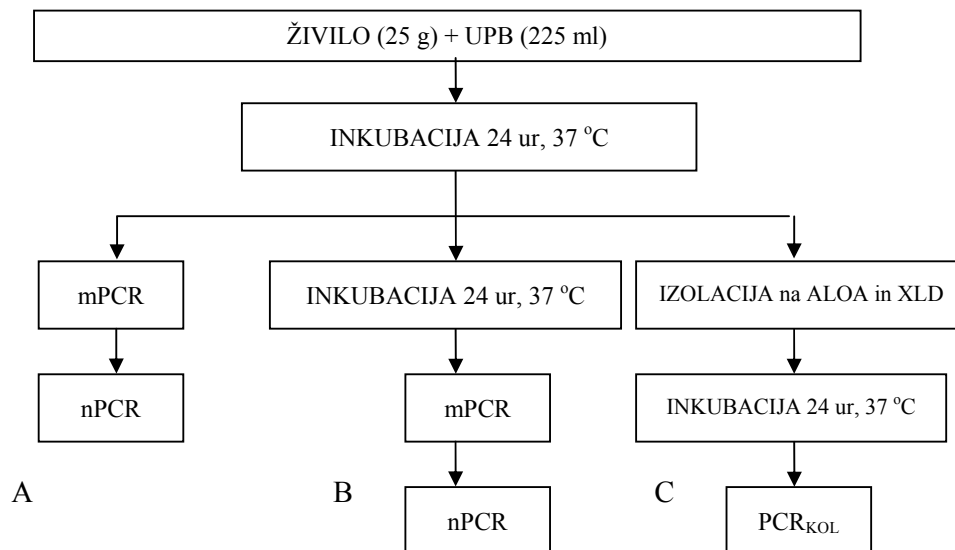


Slika 1: Potek vzporednega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v naravno in umetno kontaminiranih vzorcih živil s standardnima metodama in z metodo PCR

Figure 1: Course of parallel *Salmonella* and *L. monocytogenes* detection in naturally and artificially contaminated food samples with standard and PCR methods

- mPCR (multipli PCR) (Jeršek in Smole, 2003) in nPCR (zaporedni PCR). Zaporedni PCR smo izvedli tako, da smo kot tarčno DNK v novi encimski reakciji uporabili pomnožke mPCR in mešanico za PCR, ki ni vsebovala oligonukleotidnih začetnikov ST11/ ST15 za določanje bakterij rodu *Salmonella*.

Primerjali smo tri postopke (A, B, C) metode PCR (slika 2): pri postopku A smo mPCR in nPCR izvedli po 24-urni inkubaciji UPB, pri postopku B pa po 48-urni inkubaciji UPB. Po 24-urni inkubaciji UPB smo izvedli tudi izolacijo listerij iz obogatitvene suspenzije UPB na selektivno gojišče ALOA (Biolife 4016052, Italija) in izolacijo salmonel na selektivno gojišče XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar, Biolife 402206, Italija). Gojišči ALOA in XLD smo inkubirali 24 ur pri 37 °C. Za izvedbo PCR (PCR_{KOL}) smo uporabili lizate iz za bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* značilnih kolonij, zraslih na gojiščih ALOA in XLD (postopek C, slika 2).



Slika 2 : Določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* z metodo PCR (postopki A, B in C)

Legenda: mPCR: multipli PCR, nPCR: zaporedni PCR, PCR_{KOL}: PCR iz značilnih kolonij bakterij rodu *Salmonella*, zraslih na gojišču XLD in značilnih kolonij bakterij *L. monocytogenes*, zraslih na gojišču ALOA

Figure 2: Detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes* strains with PCR (flowcharts A, B and C)

Legend: mPCR: multiplex PCR, nPCR: nested PCR, PCR_{KOL}: PCR was performed from typical *Salmonella* and *L. monocytogenes* colonies on XLD and ALOA plates

2.3.1 Reagenti in izvedba PCR

PCR smo izvedli v 50 µl mešanici, sestavljeni iz 5 µl lizata bakterijskih celic in 45 µl reakcijske mešanice za PCR. Sestava reakcijskih mešanic za različne PCR je predstavljena v tabeli 1. Za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* smo uporabili par specifičnih oligonukleotidnih začetnikov LM1/LM2 (Border in sod., 1990), za določanje bakterij rodu *Salmonella* pa par specifičnih oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993).

Tabela 1: Sestavine reakcijskih mešanic za različne PCR

Table 1: Components of reaction mixtures for different PCR

Sestavina	Količina sestavine v različnih PCR		
	mPCR	nPCR	PCR _{KOL}
Pufer PCR 10x (Promega 338, ZDA)	10 µl	10 µl	10 µl
dNTP (Promega 303)	0,2 mM vsakega dNTP	0,2 mM vsakega dNTP	0,2 mM vsakega dNTP
MgCl ₂ (Promega A351B)	2 mM	2 mM	2 mM
LM1/LM2 (38-3271- 2/34MWG Biotech AG)	100 pmol	50 pmol	100 pmol
ST11/ST15 (38-3271- 2/34MWG Biotech AG)	3,125 pmol	0	3,125 pmol
Tween 20 (Merck 1.09280, Nemčija)	2 % (ut.)	2 % (ut.)	2 % (ut.)
Taq DNAPolimeraza (Promega M1661)	2,5 U	2,5 U	1,25 U

Legenda: mPCR: multipli PCR, nPCR: zaporedni PCR, PCR_{KOL}: PCR iz značilnih kolonij bakterij rodu *Salmonella*, zraslih na gojišču XLD in značilnih kolonij bakterij *L. monocytogenes*, zraslih na gojišču ALOA; LM1/LM2: par oligonukleotidnih začetnikov za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*, ST11/ST15: par oligonukleotidnih začetnikov za določanje bakterij rodu *Salmonella*

Legend: mPCR: multiplex PCR, nPCR: nested PCR, PCR_{KOL}: PCR was performed from typical *Salmonella* and *L. monocytogenes* colonies, grown on XLD and ALOA plates, LM1/LM2: primers for detection of *L. monocytogenes*, ST11/ST15: primers for detection of *Salmonella*

Encimska reakcija pomnoževanja DNK bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* je potekala po shemi: 5 minutna začetna denaturacija DNK pri 95 °C, sledilo je 30 ciklov (15 sekundna denaturacija DNK, 15 sekundno prileganje oligonukleotidnih začetnikov pri 59 °C, 30 sekundno podaljševanje pri 72 °C) in pet minutno zaključno podaljševanje pri 72 °C. Vse reakcije smo izvedli na cikličnem termostatu Gene Amp DNA Thermal Cycler 2400 (Perkin-Elmer, ZDA).

2.3.2 Dokazovanje pomnožkov in interpretacija rezultatov

Pomnožke smo dokazovali z gelsko elektroforezo v 1,5 % agaroznem gelu (Seakem ME, FMC Bioproducts 50014, ZDA) v pufru TAE 0,5x (pH 8,1) (Tris, očetna kislina, Na₂EDTA) pri 14 V/cm. Kot velikostni standard smo uporabili molekularni označevalec dolžin DNK – 100 bp (100 bp DNA Ladder, Gibco BRL 15628-019, ZDA). Po elektroforezi smo gel 10 minut barvali v raztopini EtBr (1 µg/ml), opazovali pod UV transiluminatorjem in ga računalniško dokumentirali. Kot pozitiven rezultat PCR za določitev bakterij rodu *Salmonella* smo določili reakcijo s 429 bp velikim pomnožkom, kot pozitiven rezultat za določitev bakterij vrste *L. monocytogenes* pa reakcijo s 701 bp velikim pomnožkom.

2.4 Določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih s standardnima metodama

Bakterije rodu *Salmonella* smo v vzorcih živil določali v skladu s standardom SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004 (2004), bakterije vrste *L. monocytogenes* pa v skladu s standardom ISO 11290-1 (Anon., 2004). Obe metodi zajemata primarno in sekundarno selektivno obogatitev živila, izolacijo iskanih bakterij na selektivnih trdnih gojiščih ter vrsto biokemijskih testov za potrditev rodu oziroma vrste. Namesto serološke identifikacije smo izolate potrdili s PCR s specifičnim parom oligonukleotidnih začetnikov (PCR_{KOL}).

2.5 Vrednotenje metode PCR

Za vrednotenje postopka sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih z metodo PCR smo primerjali rezultate preiskav 36 vzorcev živil, ki so bili istočasno kot z metodo PCR (točka 2.3) kot alternativno metodo preiskani tudi s standardnima referenčnima metodama (točka 2.4). Ker smo metodo PCR izvedli s postopki A, B in C, smo izračunali relativno točnost, relativno specifičnost in relativno občutljivost za vsak postopek posebej, kot to predpisuje standard SIST EN ISO 16140:2003 (2003).

Relativna točnost je stopnja skladnosti rezultatov alternativne in referenčne metode za iste vzorce.

$$\text{Relativna točnost} = ((\text{PU} + \text{NU}) / \text{N}) \times 100 [\%]$$

PU: pozitivno ujemanje: je število pozitivnih rezultatov, dobljenih z alternativno in referenčno metodo,

NU: negativno ujemanje: je število negativnih rezultatov, dobljenih z alternativno in referenčno metodo,

N: skupno število preiskanih vzorcev.

Relativna občutljivost je zmožnost alternativne metode določiti bakterije, ko so bile le-te določene z referenčno metodo.

$$\text{Relativna občutljivost} = (\text{PU} / \text{N}+) \times 100 [\%]$$

PU: pozitivno ujemanje: je število pozitivnih rezultatov, dobljenih z alternativno in referenčno metodo,

N+: število pozitivnih vzorcev, dobljenih z referenčno metodo.

Relativna specifičnost je zmožnost alternativne metode, da ne določi bakterij, ko le-te niso bile določene z referenčno metodo.

$$\text{Relativna specifičnost} = (\text{NU} / \text{N}-) \times 100 [\%]$$

NU: negativno ujemanje: je število negativnih rezultatov, dobljenih z alternativno in referenčno metodo,

N-: število negativnih vzorcev, dobljenih z referenčno metodo.

3 REZULTATI IN RAZPRAVA

Namen našega dela je bil vrednotiti metodo PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih glede na standardni mikrobiološki metodi (SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004 (2004); ISO 11290-1 (Anon., 2004)). Metodo PCR smo uporabili v postopkih A, B in C, za katere smo izračunali relativno točnost, relativno občutljivost in relativno specifičnost izvedbe. Kot zahteva standard SIST EN ISO 16140:2003 (2003) so bili vzorci živil izbrani iz različnih skupin živil (rdeče meso, perutninsko meso, mleko, jajca, sadje in zelenjava) in kontaminirani z različnimi koncentracijami salmonel in listerij (10-1000 cfu/ 25g).

V primerih, ko smo bakterije določali po obogatitvah živil v gojišču UPB (postopek A in B), je bila najšibkejši člen določitev bakterij vrste *L. monocytogenes*. Kar v 12-ih oziroma 16-ih vzorcih smo jih določili samo z referenčno metodo (tabela 2: Postopek A in B, negativni odklon pri *L. monocytogenes*).

Tabela 2: Rezultati sočasnega določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih z metodo PCR s postopki A, B in C, glede na rezultate referenčnih metod

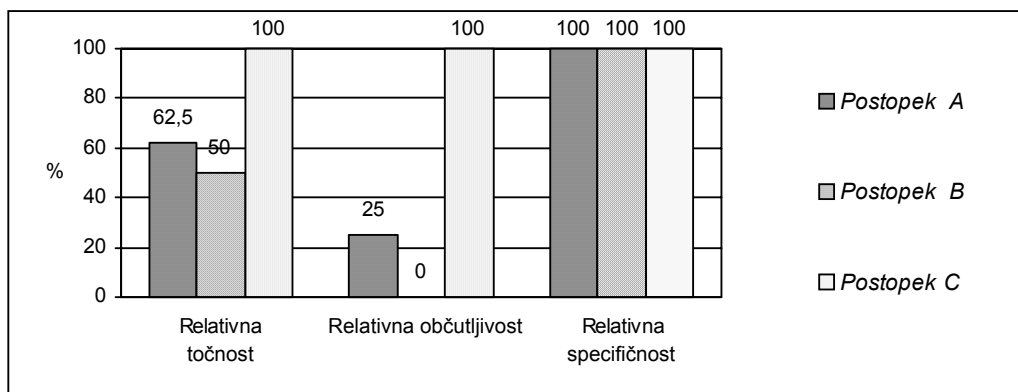
Table 2: Results of simultaneous PCR detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in foods and results of *Salmonella* and *L. monocytogenes* detection obtained by reference methods

Stopnja PCR	Število vzorcev / določanje bakterij	Rezultati (PCR / ISO)			
		PU (+/+)	NU (-/-)	NO (-/+)	PO (+/-)
Stopnja A	36 / <i>L. monocytogenes</i>	4	16	12	0
	36 / <i>Salmonella</i>	13	16	3	0
	36 / <i>L. monocytogenes</i> in <i>Salmonella</i>	4	16	12	0
Stopnja B	Število vzorcev / določanje bakterij	Rezultati (PCR / ISO)			
		PU (+/+)	NU (-/-)	NO (-/+)	PO (+/-)
Stopnja B	32 / <i>L. monocytogenes</i>	0	16	16	0
	32 / <i>Salmonella</i>	12	16	4	0
	32 / <i>L. monocytogenes</i> in <i>Salmonella</i>	0	16	16	0
Stopnja C	Število vzorcev / določanje bakterij	Rezultati (PCR / ISO)			
		PU (+/+)	NU (-/-)	NO (-/+)	PO (+/-)
Stopnja C	36 / <i>L. monocytogenes</i>	18	18	0	0
	36 / <i>Salmonella</i>	18	18	0	0
	36 / <i>L. monocytogenes</i> in <i>Salmonella</i>	36	36	0	0

Legenda: PU: pozitivno ujemanje: št. pozitivnih rezultatov, dobljenih s PCR in s standardno metodo, NU: negativno ujemanje: št. negativnih rezultatov, dobljenih s PCR in s standardno metodo, NO: negativni odklon: št. negativnih rezultatov dobljenih s PCR v primerih, ko so bili rezultati standardne metode pozitivni, PO: št. pozitivnih rezultatov, dobljenih s PCR v primerih, ko so bili rezultati standardne metode negativni, A: PCR po 24-urni inkubaciji obogatitvenega gojišča UPB, B: PCR po 48-urni inkubaciji obogatitvenega gojišča UPB; C: PCR iz značilnih kolonij, zraslih na gojiščih ALOA in XLD

Legend: PU: positive agreement: no. of positive results obtained with PCR and standard methods, NU: negative agreement: no. of negative results obtained with PCR and standard methods, NO: negative deviation: no. of negative results obtained with PCR when results of standard method were positive, PO: positive deviation: no. of positive results obtained with PCR when results of standard method were negative, A: PCR after 24-h incubation of UPB, B: PCR after 48-h incubation of UPB, C: PCR performed from typical *Salmonella* and *L. monocytogenes* colonies on XLD and ALOA plates

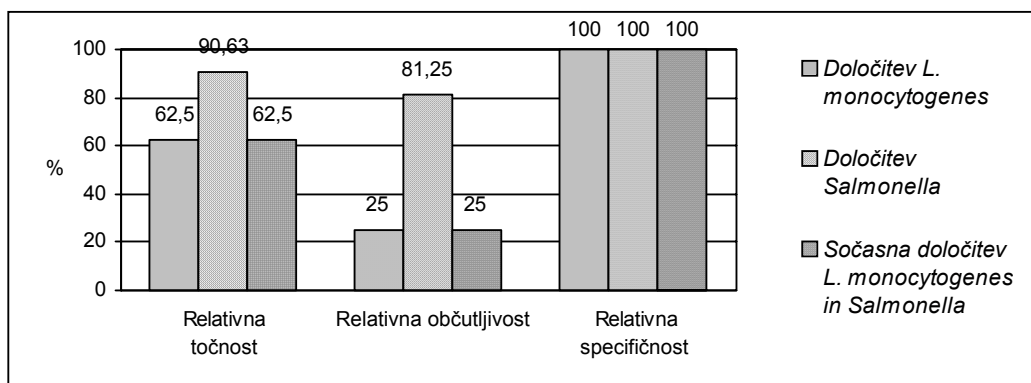
Rezultati kažejo, da je 24-urna inkubacija obogatitvenega gojišča UPB bolj primerna od 48-urne obogatitve, saj sta bili relativna točnost in občutljivost metode PCR boljši po krajšem času inkubacije (slika 3). Eden od vzrokov za slabe rezultate metode PCR po 48-urni inkubaciji gojišča UPB je slabša rast listerij ob prisotnosti salmonel, ki so se že med prvo 24-urno obogatitvijo namnožile do višje koncentracije kot listerije (Bailey in Cox, 1992).



Slika 3 : Vrednotenje različnih postopkov metode PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih

Figure 3: Evaluation of different flowcharts of simultaneous PCR detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in foods

Iz vrednotenja metode PCR glede na določanje listerij in salmonel po 24-urni inkubaciji gojišča UPB (postopek A) je razvidno, kateri del alternativne metode zahteva dodatne raziskave – povečati bi morali občutljivost PCR za določitev bakterij vrste *L. monocytogenes* v gojišču UPB (slika 4). Rezultati določanja bakterij rodu *Salmonella* z metodo PCR (relativna točnost 90,63 %) so primerljivi z literaturnimi podatki (relativna točnost 97,3 % (Malorny in sod., 2003) in 93,42 % (Rijpens in sod., 1999)).



Slika 4 : Vrednotenje metode PCR (postopek A) glede na določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih

Figure 4: Evaluation of PCR procedure A for detection of *Salmonella* and *L. monocytogenes* in foods

Visoka relativna specifičnost (100 %) metode PCR v vseh postopkih ne glede na vrsto določitve potrjuje, da metoda ne daje lažno pozitivnih rezultatov. To kaže na ustrezno izbiro oligonukleotidnih začetnikov za specifično določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes*.

Popolnoma identične rezultate standardnima metodama določanja bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* smo dobili z metodo PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v živilih s postopkom C, ki je vključeval 24-urno inkubacijo gojišča UPB, izolacijo bakterij na gojišča XLD in ALOA ter PCR_{KOL} iz za bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* značilnih kolonij. Ti rezultati so obetavni, saj smo skrajšali čas preiskave živil, količino dela in materiala, ob tem pa ohranili 100 % relativno točnost, občutljivost in specifičnost metode (slika 3). Vrednotenje tega dela eksperimenta po standardu SIST EN ISO 16140:2003 (2003) je pokazalo ujemanje vrednotene alternativne metode PCR z referenčnima metodama. Pridobili smo osnovo za drugi del vrednotenja metode PCR, ki obsega vzporedno medlaboratorijsko preiskavo živil.

Rezultati so v skladu z nedavnimi objavami (Mothershed in Whitney, 2005), ki navajajo, da alternativne metode na osnovi PCR ob ustrezni postavitvi in izvedbi postopka, omogočajo izboljšavo klasičnih mikrobioloških metod

4 ZAHVALA

Raziskavo je omogočilo Ministrstvo za šolstvo, znanost in šport ter Ministrstvo za kmetijstvo, gozdarstvo in prehrano s financiranjem projektov L4-2275, L4-3188 in V4-0466-01.

5 LITERATURA

- Aabo S., Rasmussen O. F., Rossen L., Sørensen P. D., Olsen J. E. 1993. *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes* 7: 171-178.
- Anonymous. ISO 11290-1. 2004. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*. Part 1, Detection method. Amendment 1, Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data: 13 p.
- Andrews W. H., Flowers R. S., Siliker J., Bailey J. S. 2001. *Salmonella*. V: *Compendium of methods for microbiological examination of foods*. 4th ed. Downes F. P., Ito K. (eds.). Washington, American Public Health Association, Inc.: 357-380.
- Bailey J. S., Cox N. A. 1999. Universal Preenrichment Broth for the Simultaneous Detection of *Salmonella* and *Listeria* in Foods. *Journal of Food Protection* 55,4: 256–259.
- Beumer R. R., Hazeleger W. C. 2003. *L. monocytogenes*: diagnostic problems. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 35: 191-197.
- 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.
- Herman L. 1997. Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* by PCR. *Food Microbiology* 14: 103-110.
- Hočevar Grom A., Grgič Vitek M., Klavs I., Pahor L. 2005. Spremljanje gibanja nalezljivih bolezni. V: *Zdravstveni statistični letopis, Slovenija 2004*. Moravec Berger D., Pribaković Brinovec R., Ulrih Lazar T., Kujundžič B. (ur.). Ljubljana, Inštitut za varovanje zdravja RS: 74-80.

- 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. Dobeic M., Vudrag M., Berger T. (ur.). Ljubljana, Zavod za zdravstveno varstvo Ljubljana: 187-193.
- Malorny B., Tassios P. T., Rådström P., Cook N., Wagner M., Hoorfar J. 2003. Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology* 89: 241-249.
- Mothershed E., Whitney A. M. 2005. Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory. *Clinica Chimica Acta* (Article in press, available on line at www.sciencedirect.com)
- Olsen, J. E. 2000. DNA-based methods for detection of food-borne bacterial pathogens. *Food Research International* 33: 257-266.
- Preliminary FoodNet Data on the Incidence of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food -10 Sites, United States, 2004. 2005. *MMWR* 54(14);352-356. (21.9.2005: <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5414a2.htm>)
- Rijpens N., Herman L., Vereecken F., Jannes G., de Smedt J., de Zutter L. 1999. Rapid detection of stressed *Salmonella* spp. in dairy and egg products using immunomagnetic separation and PCR. *International Journal of Food Microbiology* 46, 1: 37-44.
- SIST EN ISO 16140:2003. 2003. Mikrobiologija živil in krme: protokol za validacijo alternativnih metod. Ljubljana, Slovenski inštitut za standardizacijo: 78 str.
- SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004. 2004. Mikrobiologija živil in krme – Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp. Ljubljana, Slovenski inštitut za standardizacijo: 6 str.
- Trkov M., Jeršek B. 2001. The effect of different rapid methods for isolation of *Salmonella* genomic DNA on PCR sensitivity. *Zbornik Biotehniške fakultete, Kmetijstvo*, 77: 27-37.
- Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews* 14, 3: 584-640.