

Typizácia salmonel polymerázovou reťazovou reakciou orientovanou na repetetívne extragénové palindrómy

ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ - LUBICA PIKNOVÁ
- NANCY RIJSENS - JURAJ SATKO - TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. 33 kmeňov zahŕňajúcich 10 sérotypov *Salmonella* spp. sa analyzovalo polymerázovou reťazovou reakciou orientovanou na repetetívne extragénové palindrómy (REP-PCR). V relevantnej oblasti 500 bp až 2500 bp sa v prípade jednotlivých kmeňov amplifikovalo 3 až 7 fragmentov, ktoré predstavovali kombinácie 8 druhov fragmentov. Získané REP-profilu umožňovali čiastočnú diferenciáciu kmeňov podľa sérotypov alebo skupín sérotypov.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: salmonela, typizácia, polymerázová reťazová reakcia, repetetívne sekvencie

Salmonely sú patogénne baktérie, ktoré patria k najdôležitejším kontaminantom potravín. Veľké úsilie sa venuje skúšaniam potravín na prítomnosť salmonel a zdokonaľovaniu metód na ich dôkaz v potravinách. V prípade, že sa z potraviny izoluje kmeň salmonely, je potrebné tento presnejšie identifikovať. V súčasnosti sa na účely typizácie používajú najmä metódy sérotypizačné a fagotypizačné [1-3].

S rozvojom molekulárno-biologických metód sa na typizáciu salmonel začali používať aj metódy založené na analýze DNA, ako sú napríklad plazmidová profilácia, ribotypizácia, restrikčná analýza genómu (RFLP) alebo náhodná polymerázová reťazová reakcia (AP-PCR = RAPD) [4-7]. Ako lepšie reprodukovateľná alternatíva poslednej menovanej metódy bola vyvinutá metóda polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) orientovanej na repetetívne sekvencie. Táto metóda využíva primery komplementárne k časti repetetívnej sekvencie na amplifikáciu príľahlých, resp. medziľahlých oblastí genómu. Vzhľadom na rozličný počet kópií a umiestnenie repetetívnych

Ing. Alena ŠTEFANOVIČOVÁ, RNDr. Lubica PIKNOVÁ, Ing. Juraj SATKO, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

Dr. Nancy RIJSENS, Rijkszuivelstation, Brusselsesteenweg 370, 9090 Melle, Belgicko.

sekvencií v genóme rôznych kmeňov salmonel sa pomocou tejto metódy amplifikujú súbory viacerých fragmentov DNA, profily, ktoré môžu byť charakteristické pre rod, druh, sérotyp alebo kmeň. Jednou z repetitívnych sekvencií vhodných na takúto aplikáciu je repetitívny extragénový palindróm (REP), približne 35-bázová sekvencia, ktorá sa vyskytuje v genóme mnohých baktérií vo väčšom počte kópií [8,9]. Cieľom predkladanej práce bolo zistiť parametre metódy REP-PCR pri jej použití na typizáciu salmonel.

Materiál a metódy

Mikroorganizmy

Kmene *S. enteritidis* 1, 2, 3, 4, 5, 8, 9 a *S. adelaide* 11, 12 pochádzali zo Štátneho zdravotného ústavu, Bratislava, kmene *S. enteritidis* 170, 186, *S. saintpaul* 129, 131, 175, *S. typhimurium* 135, 190, *S. montevideo* 111, 121, 122, *S. isangi* 185, 188, *S. schwarzengrund* 112, 179, *S. heidelberg* 176, *S. infantis* 184 a *S. tennessee* 178 pochádzali zo Štátneho veterinárneho ústavu, Bratislava, *S. saintpaul* 102, 104, 105 pochádzali z Biotechnologickej fakulty Lublanskej univerzity, Lubľana, Slovinsko, *S. typhimurium* 48 pochádzala z Výskumného ústavu Liko, Bratislava, *S. enteritidis* CCM 4420 a *S. typhimurium* CCM 4419, CCM 5156 pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov, Brno, ČR. Jednotlivé kmene sa kultivovali v médiu Brain heart infusion (Oxoid, Basingstoke, Veľká Británia) 24 h pri 37 °C za miešania a potom sa vyočkovali na médium Brain heart infusion agar (Oxoid) a kultivovali 24 h pri 37 °C.

Izolácia DNA

Chromozomálna DNA sa izolovala modifikovaným postupom podľa Pitcher a kol. [10]. 3 očka z kultúry vyrastenej na tuhom médiu sa suspendovali v 0,5 ml tlmivého roztoku RS (0,15 mol.l⁻¹ NaCl, 0,01 mol.l⁻¹ EDTA, pH 8,0). Po centrifugácii (13 000 g, 2 min) sa sediment suspendoval v 100 µl roztoku, obsahujúceho 10 mmol.l⁻¹ Tris-HCl, 1 mmol.l⁻¹ EDTA a 50 g.l⁻¹ lyzozým (Serva, Heidelberg, Nemecko), pH 8,0. Suspenzia sa inkubovala 30 min pri 37 °C. V ďalšom kroku sa pridalo 0,5 ml roztoku GES, obsahujúceho 5 mol.l⁻¹ guanidíntiokyanát (Sigma, Deisenhofen, Nemecko), 100 mmol.l⁻¹ EDTA a 0,5 % (v/v) N-lauroylsarkozín (Sigma). Vzniknutý viskózný roztok sa inkuboval 10 min v ľadovom kúpeli. K takto pripravenému bunkovému lyzátu sa pridalo 0,25 ml ľadového 7,5 mol.l⁻¹ octanu amónneho a po 10 minútovej inkubácii v ľade 0,5 ml ľadovej zmesi chloroform-izoamylalkohol (480 : 20). Pri centrifugácii (13 000 g, 20 min) vznikli tri fázy. Celý

objem vrchnej fázy sa preniesol do očiachovanej skúmavky a následne sa pridalo 0,54 objemu ľadového izopropanolu. Po opatrnom premiešaní vznikla biela zrazenina, ktorá sa oddelila centrifugáciou (7000 g, 20 s). Sediment sa viackrát premyl po 100 μ l 70 %-ného etanolu a vysušil vo vákuu. Izolovaná DNA sa rozpustila v 100 μ l deionizovanej vody (cez noc pri teplote 4 °C) a následne sa inkubovala 1 h pri 37 °C po pridaní 10 μ l roztoku RNázy (Serva; 10 g.l⁻¹, pripravená podľa [11]). Kvalita a množstvo izolovanej DNA sa stanovili elektroforeticky a spektrofotometricky na základe absorbie pri 260 nm a 280 nm [11].

Amplifikácia DNA

Na amplifikáciu sa použili primery [8]:

REP-1R (5'-IIIICGICGICATCIGGC-3') a

REP-2R (5'-ICICTTATCIGGCCTAC-3').

Primery obsahujú nukleotid inozín (I) na miestach, kde je REP-konsenzus variabilný [8]. Inozín sa páruje s A, T, G alebo C. Reakčná zmes o objeme 50 μ l obsahovala 75 mmol.l⁻¹ Tris-HCl pH 9,0, 20 mmol.l⁻¹ (NH₄)₂SO₄, 0,01 % (v/v) Tween 20, 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 25 pmol každého primeru (Isogen, Maarssen, Holandsko), 200 μ mol.l⁻¹ každého dNTP (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), 25 ng DNA a 1,5 U GoldStar DNA polymerázy (Eurogentec, Seraing, Belgicko). Reakčná zmes sa prevrstvila 50 μ l parafrínového oleja a amplifikácia sa realizovala v termálnom cykléri PHC-3 (Techne, Cambridge, Veľká Británia). Teplotný program pozostával z úvodnej denaturácie počas 3 min pri 95 °C, z tridsiatich cyklov (denaturácia 1 min pri 90 °C, annealing 1 min pri 40 °C a polymerizácia 1 min pri 72 °C) a zo záverečnej polymerizácie počas 8 min pri 72 °C. Ohrev z teploty annealingu na teplotu polymerizácie sa naprogramoval tak, aby prebehol počas 5 min. Produkty amplifikácie sa separovali elektroforeticky v 1,5 % agarózovom géli (Seakem LE agarose; FMC Bioproducts, Rockland, USA) v tlmivom roztoku TBE (0,1 mol.l⁻¹ Tris-HCl, 0,1 mol.l⁻¹ H₃BO₃, 2 mmol.l⁻¹ EDTA, pH 8,0) pri 4 V.cm⁻¹, vyfarbovali roztokom etídiumbromidu [11] a fotografovali prístrojom CU-5 (Polaroid, St. Albans, Veľká Británia) pri transiluminácii UV-svetlom.

Spracovanie výsledkov

Fotografie sa skenovali a následne spracovali pomocou programu GelCompar (Applied Maths, Kortrijk, Belgicko). Spracovanie pozostávalo z korekcie sýtosti vyfarbenia gélu, korekcie smeru dráhy, korekcie nepravidelnosti tvaru pásov a z normalizácie na štandard molekulových hmotností 500 bp, 600 bp, 700 bp, 800 bp, 900 bp, 1000 bp a 1500 bp.

Výsledky a diskusia

Prvým krokom práce bola izolácia DNA z 33 kmeňov salmonel, zaradených do 10 sérotypov. Na tento účel sa použila bezfenolová metóda [10]. Množstvo templátovej DNA a jej kvalita významne ovplyvňovali výsledky amplifikácie, preto bolo potrebné stále dodržiavať ich rovnaké hodnoty. Hoci je izolácia DNA týmto postupom pomerne zdĺhavá a prácna, považujeme ju v záujme reprodukovateľnosti výsledkov za vhodnejšiu ako použitie bunkových lyzátov, ktoré publikovali iní autori [12,13]. Výsledky amplifikácie podstatne ovplyvňoval tiež druh použitej polymerázy (podrobné výsledky neuvádzame).

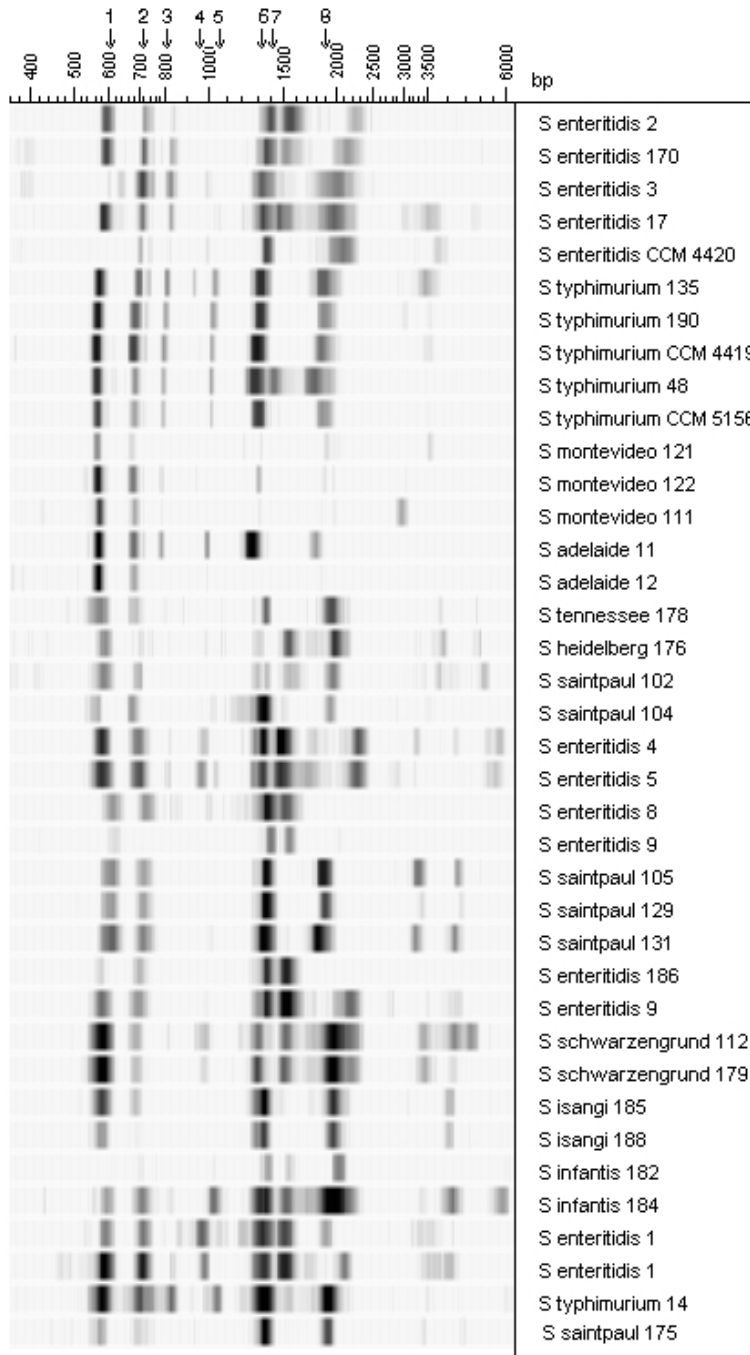
Aplikáciou PCR sa v jednotlivých vzorkách v relevantnej oblasti 500 bp až 2500 bp amplifikovalo 3 až 7 fragmentov. Na základe stanovenia ich molekulovej hmotnosti sa ukázalo, že išlo o kombinácie 8 druhov fragmentov (tabuľka 1). Na základe porovnania profilov po normalizácii (obr. 1) bolo možné priradiť určité charakteristické profily jednotlivým analyzovaným sérotypom (tabuľka 2). Pomocou REP-profilov bolo možné odlíšiť od seba napríklad *S. enteritidis*, *S. saintpaul* a *S. typhimurium*. Na druhej strane, nebolo možné spoľahlivo odlíšiť *S. tennessee*, *S. montevideo* a *S. saintpaul*. Fragmenty **1**, **2**, **6** a **8** sa vyskytovali v REP-profiloch všetkých analyzovaných sérotypov a boli charakteristické pre celý rod *Salmonella*. Fragment **5** bol charakteristický pre *S. typhimurium*, *S. adelaide* a *S. infantis*. Fragment **7** bol charakteristický pre *S. enteritidis*, *S. schwarzengrund*, *S. heidelberg* a *S. infantis*.

TABUĽKA 1. Parametre amplifikovaných fragmentov pri 33 kmeňoch salmonel.
TABLE 1. Parameters of the amplified fragments for 33 strains of *Salmonella* spp.

| Číslo fragmentu ¹ | Veľkosť fragmentu \pm SEM ² [bp] | Počet kmeňov výskytu ³ |
|------------------------------|---|-----------------------------------|
| 1 | 577 \pm 3 | 32 |
| 2 | 692 \pm 3 | 32 |
| 3 | 799 \pm 5 | 10 |
| 4 | 976 \pm 6 | 6 |
| 5 | 1020 \pm 3 | 7 |
| 6 | 1326 \pm 5 | 32 |
| 7 | 1495 \pm 9 | 14 |
| 8 | 1920 \pm 15 | 20 |

SEM - štandardná chyba priemeru.

1 - fragment number, 2 - fragment length \pm standard error of the mean, 3 - number of strains for which the fragment was present.



OBR. 1. Normalizované a rekonštituované REP-profilu salmonel.
FIG. 1. Normalized and reconstituted REP-profiles of *Salmonella* spp.

TABUĽKA 2. Výskyt jednotlivých fragmentov v REP-profiloch analyzovaných kmeňov salmonel.

TABLE 2. Occurrence of individual fragments in REP-profiles of the *Salmonella* strains analyzed.

| Fragment ¹ | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|--------------------------|----------------|---|----|---|---|---|----|---|---|
| Sérotyp ² | n _Σ | n | | | | | | | |
| <i>S. enteritidis</i> | 10 | 9 | 10 | 5 | 3 | 0 | 10 | 8 | 8 |
| <i>S. saintpaul</i> | 6 | 6 | 6 | 0 | 0 | 0 | 6 | 0 | 6 |
| <i>S. typhimurium</i> | 5 | 5 | 5 | 5 | 0 | 5 | 5 | 0 | 5 |
| <i>S. montevideo</i> | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 2 |
| <i>S. adelaide</i> | 2 | 2 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 0 | 2 |
| <i>S. isangi</i> | 2 | 2 | 1 | 0 | 0 | 0 | 2 | 0 | 2 |
| <i>S. schwarzengrund</i> | 2 | 2 | 2 | 0 | 2 | 0 | 2 | 2 | 2 |
| <i>S. heidelberg</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 |
| <i>S. infantis</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| <i>S. tennessee</i> | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 |

n_Σ - celkový počet kmeňov, n - počet kmeňov, ktorých REP-profil obsahoval daný fragment.

n_Σ - total number of strains, n - number of strains whose REP-profile contained the fragment.

1 - fragment, 2 - serotype.

Pomerne malý počet fragmentov amplifikovaných uvedenou metódou REP-PCR a fakt, že polovica z nich sa vyskytovala vo všetkých analyzovaných sérotypoch, neumožnil lepšie rozlíšenie medzi sérotypmi, resp. ešte jemnejšie rozlíšenie na úroveň jednotlivých kmeňov. Tieto výsledky korešpondujú s výsledkami iných autorov, ktorí aplikovali analogické metódy, alternatívne orientované tiež na ďalšie repetitívne sekvencie [6,12,14].

Metóda neuspokojila všetky očakávania z hľadiska reprodukovateľnosti, keďže sa v REP-profiloch objavovali niektoré málo intenzívne, resp. nereprodukované pásy. Príčinou je pravdepodobne nevyhnutnosť použitia degenerovaných primerov a teplotného programu s fázou pomalého ohrevu, čím sa do amplifikácie vnáša prvok náhodnosti. Dôsledkom je amplifikácia nešpecifických fragmentov, ktoré nemajú súvis s repetitívnymi sekvenciami [15]. Z hľadiska reprodukovateľnosti bolo prínosom použitie počítačového spracovania výsledkov, ktoré zlepšilo koreláciu medzi výsledkami z rôznych experimentov.

Vypracovaná metóda REP-PCR umožňuje na základe amplifikácie DNA získať charakteristické profily, zodpovedajúce určitým sérotypom, resp. sku-

pinám sérotypov salmonel. Výhodou metódy je jej nezávislosť na fyziologickom stave mikroorganizmu, ktorá vyplýva z toho, že hodnotí jeho genotyp. Metódu je možné použiť ako doplnkovú pri typizácii salmonel.

Táto práca vznikla v rámci projektu COPENICUS 940234.

Literatúra

1. ANDREWS, W. H. - BRUCE, V. R. - JUNE, G. - SATCHELL, F. - SHERROD, P.: *Salmonella*. In: FDA Bacteriological Analytical Manual, 7th Edition. Arlington : AOAC International, 1992, s. 51-69.
2. STN ISO 6579 : 1993. Všeobecné pokyny pre metódy na dôkaz baktérií rodu *Salmonella*.
3. HELMUTH, R. - SCHROETER, A.: Molecular typing methods for *S. enteritidis*. International Journal of Food Microbiology, 21, 1994, s. 69-77.
4. BARRETT, T. J.: Molecular fingerprinting of foodborne pathogenic bacteria: An introduction to methods, uses, and problems. In: Food Microbiological Analysis. New Technologies. Ed. M. L. Tortorello a S. M. Gendel. New York : Marcel Dekker, 1997, s. 249-264.
5. AARTS, H. J. M. - VAN LITH, L. A. J. T. - KEIJER, J.: High-resolution genotyping of *Salmonella* strains by AFLP-fingerprinting. Letters in Applied Microbiology, 26, 1998, s. 131-135.
6. BURR, M. D. - JOSEPHSON, K. L. - PEPPER, I. L.: An evaluation of ERIC PCR and AP PCR fingerprinting for discriminating *Salmonella* serotypes. Letters in Applied Microbiology, 27, 1998, s. 24-30.
7. LANDERAS, E. - MENDOZA, M. C.: Evaluation of PCR-based methods and ribotyping performed with a mixture of *Pst*I and *Sph*I to differentiate strains of *Salmonella* serotype Enteritidis. Journal of Medical Microbiology, 47, 1998, s. 427-434.
8. VERSALOVIC, J. - KOEUTH, T. - LUPSKI, J. R.: Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research, 19, 1991, s. 6823-6831.
9. ATLAS, R. M. - BEJ, A. K.: Polymerase chain reaction. In: Methods for general and molecular bacteriology. Ed. P. Gerhardt. Washington : American Society for Microbiology, 1994, s. 418-435.
10. PITCHER, D. G. - SAUNDERS, N. A. - OWEN, R. J.: Rapid extraction of bacterial genomic DNA with guanidium thiocyanate. Letters in Applied Microbiology, 8, 1989, s. 151-156.
11. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. New York : Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545 s.
12. KOH-LUAR, S. I. - CHOO, G. H. B. - TAN, S. L. R. - TAN, C. W. K.: Genomic fingerprints of *Salmonella* species generated with repetitive element sequence-based PCR. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 14, 1998, s. 17-22.
13. LÓPEZ-MOLINA, N. - LACONCHA, I. - REMENTERÍA, A. - AUDICANA, A. - PERALES, I. - GARAIZAR, J.: Typing of *Salmonella enteritidis* of different phage types by PCR fingerprinting. Journal of Applied Microbiology, 84, 1998, s. 877-882.
14. BEYER, W. - MUKENDI, F. M. - KIMMIG, P. - BÖHM, R.: Suitability of repetitive-DNA-sequence-based PCR fingerprinting for characterizing epidemic isolates of *Salmonella enterica* serovar Saintpaul. Journal of Clinical Microbiology, 36, 1998, s. 1549-1554.

15. GILLINGS, M. - HOLLEY, M.: Repetitive element PCR fingerprinting (rep-PCR) using enterobacterial repetitive intergenic consensus (ERIC) primers is not necessarily directed at ERIC elements. Letters in Applied Microbiology, 25, 1997, s. 17-21.

Do redakcie došlo 25.1.1999.

Typing of *Salmonella* spp. using the polymerase chain reaction oriented to repetitive extragenic palindromes

ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - PIKNOVÁ, L. - RIJPENS, N. - SATKO, J. - KUČHTA, T.:
Bull. potrav. Výsk., 38, 1999, p. 37-44.

SUMMARY. Thirty-three strains belonging to 10 serotypes of *Salmonella* spp. were analyzed by a polymerase chain reaction oriented to repetitive extragenic palindromes (REP-PCR). For individual strains, 3 to 7 fragments were amplified in a relevant range of 500 bp to 2500 bp, which were the combinations of 8 types of fragments. Based on the REP-profiles obtained, it was possible to discriminate partially the strains belonging to different serotypes or serotype groups.

KEYWORDS: *Salmonella*, typing, polymerase chain reaction, repetitive sequences