

## **Dôkaz salmonel v potravinách metódami založenými na polymerázovej reťazovej reakcii**

TOMÁŠ KUČHTA - ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ - HANA DRAHOVSKÁ

**SÚHRN.** Na dôkaz baktérií rodu *Salmonella* v potravinách je možné použiť polymerázovú reťazovú reakciu (PCR), pomocou ktorej sa amplifikujú charakteristické úseky DNA. V súčasnosti dostupné metódy pozostávajú z rozmnoženia salmonel kultiváciou, extrakcie, amplifikácie a analýzy DNA. Viacerí autori opísali vhodné primery umožňujúce selektívny dôkaz salmonel. Priama extrakcia DNA z potravín je prácna a časovo náročná, vhodnejšie je pred extrakciou zaradiť kultivačné rozmnoženie salmonel. Vyvinutých bolo viacero metodík rozmnoženia salmonel, od jednoduchej kultivácie v neselektívnych pôdach po viacstupňové alebo rozvetvené metodiky, využívajúce kombinácie neselektívnych a selektívnych kultivácií, prípadne imunomagnetickú separáciu. Z pripravených kultúr sa DNA extrahuje lýzou buniek, dôkladná izolácia DNA nie je potrebná. Pre dôkaz salmonel je možné dosiahnuť dostatočnú amplifikáciu DNA použitím PCR s rýchlymi teplotnými programami. Amplifikovaná DNA sa analyzuje zvyčajne elektroforézou v agarózovom géli, opísané však boli tiež hybridizačné postupy umožňujúce automatizáciu celej metódy. Úlohou vývoja metód na princípe PCR ostáva dosiahnutie ekvivalencie výsledkov so štandardnou kultivačnou metódou pri analýze prirodzene kontaminovaných vzoriek potravín.

**KLÚČOVÉ SLOVÁ:** salmonela, polymerázová reťazová reakcia, bezpečnosť potravín

Salmonely sú patogénne baktérie, ktoré patria k dôležitým kontaminantom potravín, najmä mäsa, hydiny, vajec a výrobkov z nich. Konzumácia potravín kontaminovaných salmonelami spôsobuje gastrointestinálne ochorenie salmonelózu. Ich výskyt je možné redukovať najmä zabezpečením vhodných technologických postupov spracovania rizikových druhov potravín a prísnyim dodržiavaním hygienických zásad pri ich výrobe. Dôležitá je však tiež vhodná analytická metóda na dôkaz salmonel v potravinách. V súčasnosti používaná metóda [1], založená na klasických kultivačných postupoch, má síce veľmi dobré analytické parametre, avšak je časovo náročná, keďže

---

RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Ing. Alena ŠTEFANOVIČOVÁ, Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

RNDr. Hana DRAHOVSKÁ, Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta Univerzity Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava.

vyžaduje 4 až 7 dní. O prekonanie tohoto závažného nedostatku je veľký záujem a mnoho výskumných pracovísk sa usiluje o vývoj alternatívnych rýchlejších metód. Vzhľadom na vysoké požiadavky, akými sú detekčný limit  $10^0$  KTČ/25 g, 100 % záchytnosť všetkých sérotypov *Salmonella* spp. a 0 % pozitivita s inými príbuznými baktériami, vývoj alternatívnych metód naráža na určité problémy. Kým imunochemické metódy nie sú dostatočne selektívne [2], metódy založené na polymerázovej reťazovej reakcii (PCR) majú veľký potenciál z hľadiska selektivity i citlivosti. Princípom PCR je enzýmová amplifikácia špecifických úsekov mikrobiálnej DNA s použitím krátkych oligonukleotidov – primerov [3,4]. Pre využitie tejto progresívnej metódy je však potrebné skĺbiť ju s efektívnymi postupmi prípravy DNA z potravy. V nasledujúcom texte sa venujeme doteraz vyvinutým metodikám a ich aplikácii na dôkaz salmonel v potravinách.

### **Rozmnoženie salmonel pred prípravou templátovej DNA**

Hoci sa pôvodne predpokladalo, že PCR umožní, vzhľadom na svoju citlivosť, dôkaz mikroorganizmov priamo v potravine, niekoľkoročný výskum ukázal, že minimálne v prípade salmonel musí príprave templátovej DNA a vlastnej PCR predchádzať kultivačné rozmnoženie. Tým sa bez väčšej práce zvýši počet cieľových buniek a tým aj počet molekúl DNA. Okrem toho sa tým podstatne zníži podiel mŕtvych buniek a dôjde tiež k zriedeniu inhibítorov PCR, pochádzajúcich z potravy [5,6]. Na rozdiel od klasických kultivačných metód nemusí byť rozmnoženie vysoko selektívne, keďže PCR toleruje prítomnosť iných baktérií. Pozornosť však treba venovať zloženiu kultivačných pôd, pretože môžu obsahovať inhibítory PCR, napríklad soli žľčových kyselín a niektoré organické farbivá [7]. Najjednoduchší prístup k rozmnoženiu salmonel pred extrakciou DNA predstavuje kultivácia v neselektívnej pôde, napríklad 16 až 18 h v tlmivej peptónovej vode [8,9] alebo 4 až 6 h resp. 16 až 18 h v tryptón-sójovej pôde [10, resp. 11]. Kultivácia v neselektívnej pôde, hoci i dlhšie trvajúca, však nemusí zabezpečiť nárast salmonel na dostatočnú hustotu, najmä ak sú vo vzorke potravy prítomné väčšie počty iných, vitálnejších baktérií, s čím potom korešponduje zvýšenie detekčného limitu celej metódy [12]. Preto sa na rozmnoženie salmonel použila dvojstupňová kultivácia (20 až 24 h v tlmivej peptónovej vode a 20 až 24 h v tetratiónátovej, resp. Rappaport-Vassiliadisovej pôde; analogicky ako v klasickej kultivačnej metóde) [13,14], trojstupňová kultivácia (24 h v tlmivej peptónovej vode, 7 h v tetratiónátovej, resp. Rappaport-Vassiliadisovej pôde, 14 až 16 h v neselektívnej pôde Luria-Bertani; analogicky ako v niek-

torých imunochemických metódach na dôkaz salmonel) [15] alebo kombinácia neselektívnej kultivácie (6 h v tlmivej peptónovej vode) s imunomagnetickou separáciou a selektívnou kultiváciou (16 až 18 h v Rappaport-Vassiliadisovej pôde) [12].

### Príprava templátovej DNA

Templátová DNA, ktorá sa používa v PCR, musí byť neporušená v amplifikovanej oblasti, musí byť v dostatočnom množstve a nesmie byť kontaminovaná látkami, ktoré by inhibovali PCR. Pre použitie PCR na dôkaz mikroorganizmov nie je potrebné použiť na prípravu templátovej DNA štandardné metódy izolácie, ktorými sa síce pripraví kvalitný templát, ale za cenu prácnosti a časovej náročnosti. Navyše PCR spravidla nevyžaduje templátovú DNA vysokej čistoty. Namiesto izolácie DNA sa často používajú jednoduchšie a rýchlejšie metódy lýzy bakteriálnych buniek, pomocou ktorých sa určitý podiel bakteriálnej DNA uvoľňuje do roztoku. Na dôkaz salmonel pomocou PCR sa úspešne použili ako zdroj templátovej DNA bunkové lyzáty, pripravené povarením suspenzie buniek [10], inkubáciou buniek s proteinázou K [8,16], povarením v prítomnosti iónového [15,17] alebo neiónového detergentu [11], alebo s použitím komerčných súprav na prípravu čiastočne prečistenej DNA [9,18]. Pri príprave templátovej DNA lýzou bakteriálnych buniek je potrebné optimalizovať podmienky tak, aby dochádzalo ku kvantitatívnemu uvoľňovaniu DNA a pritom nie k jej degradácii [12]. Aby sa zabránilo inhibícii PCR, je možné prečistenie bunkového lyzátu [16], ale spravidla postačuje, ak sa optimalizuje množstvo bunkového lyzátu, použitého do PCR tak, aby bol dostatok amplifikovateľnej DNA a prítomné kontaminanty ešte neinhibovali PCR.

Pri použití bunkových lyzátoov nie je presne známe, koľko amplifikovateľnej templátovej DNA sa pridáva do PCR, ani do akej miery je účinnosť PCR ovplyvnená prítomnými inhibítormi. Detekčný limit PCR je preto vhodné vyjadrovať vo vzťahu k počtu detegovaných bakteriálnych buniek, ktorý je spravidla väčší alebo rovný  $10^2$  KTČ na reakciu, resp. pri vyjadrení vo vzťahu k hustote analyzovanej bakteriálnej suspenzie je spravidla väčší alebo rovný  $10^4$  KTČ.ml<sup>-1</sup>. Pri vhodne zvolených podmienkach lýzy prítomnosť inej mikrofóry (až do  $10^3$ -násobného nadbytku) neovplyvňuje detekčný limit PCR [12].

### Voľba primerov na dôkaz salmonel

Dalšou podmienkou PCR je použitie vhodných primerov komplementárnych k určitým sekvenciám v templátovej DNA [3,4]. Pri voľbe primerov na dôkaz patogénnych baktérií je možné vychádzať z určitých génov, ktoré kódujú vlastnosť charakteristickú pre daný patogén a ktorých nukleotidová sekvencia je známa. V diagnostike patogénnych mikroorganizmov sú najčastejšie využívanými markerovými génmi tzv. patogénne determinanty, čo sú gény zúčastňujúce sa pri interakcii patogénu s hostiteľom. Takýmito génmi sú gén *invA* zodpovedný za inváziu do eukaryotickej bunky [16,19,20], gén *spvA* zodpovedný za virulenciu umiestnený na plazmide, gény kódujúce syntézu bakteriálnych fimbrií *fimA* [13] a *agfA* [21] a gény zabezpečujúce príjem železa *iroB* [22]. Inou možnosťou je využiť špecifické úseky génov zabezpečujúcich základné životné funkcie, a preto prítomných vo všetkých (mikro-)organizmoch, najčastejšie sa využívajú variabilné oblasti génov pre rRNA

TABUĽKA 1. Cieľové sekvencie použité na detekciu salmonel.  
TABLE 1. Target sequences used for *Salmonella* detection.

Cieľová sekvencia <sup>1</sup>	Veľkosť produktu <sup>2</sup> [bp]	Počet testovaných kmeňov <sup>3</sup>	Špecifická <sup>4</sup>	Citácia <sup>5</sup>
<i>invA</i>	275	630	4 falošne negatívne výsledky	19
<i>invA</i>	545; 283 (nested)	43 S / 53 NS	100 %	16
<i>invE-invA</i>	457	47 S / 53 NS	100 %	20
<i>fimA</i>	85	376 S / 40 NS	100 %	13
<i>iroB</i>	606	189 S / 26 NS	špecifická pre <i>S. enterica</i> , negatívna pre <i>S. bongori</i>	22
neznáma funkcia	429	146 S / 86 NS	falošne negatívne 2 sérotypy <i>S. arizona</i>	25
počiatok replikácie	163	25 S / 16 NS	100 %	24
<i>hns</i>	152	44 S / 45 NS	100 %	18
<i>ompC</i>	159	60 S / 42 NS	100 %	10
<i>spvA</i>	351	100 S / 31 NS	špecifická pre <i>S. enteritidis</i> , gén je na plazmide	27

S – *Salmonella* spp., NS – iné baktérie.

S – *Salmonella* spp., NS – non-*Salmonella*, 1 - target sequence, 2 - product size, 3 - number of strains tested, 4 - specificity, 5 - reference.

[23]. Podobne bol na detekciu salmonel použitý špecifický úsek kódujúci počiatok replikácie bakteriálneho chromozómu [24]. Iný postup pre vyhľadanie špecifických primerov použili Aabo a kol. [25], ktorí získali pomocou hybridizácie fragment DNA s neznámou funkciou prítomný výlučne v chromozóme salmonel a na základe jeho sekvencie boli navrhnuté primery.

Každý navrhnutý pár primerov je potrebné overiť na dostatočne širokom spektre kmeňov, aby sa zistila selektivita detekcie a určili sa prípadné falošne pozitívne alebo falošne negatívne reagujúce sérotypy [25,26]. Prehľad niektorých génov použitých pri detekcii salmonel pomocou PCR uvádza tabuľka 1.

### **Amplifikácia DNA**

Amplifikácia DNA pomocou PCR je cyklický proces v reakčnej zmesi obsahujúcej tlmivý roztok, zmes nukleotidov, enzým termostabilnú DNA-polymerázu, primery a templátovú DNA. Proces sa uskutočňuje v termocykléri, ktorý zabezpečuje inkubáciu vzoriek pri definovaných teplotách podľa naprogramovaného algoritmu. Výsledkom je znásobenie množstva cieľového fragmentu DNA, ktoré je možné následne detegovať [3,4]. Aplikácia PCR na dôkaz salmonel v potravinách nevyžaduje špeciálne modifikácie všeobecne používaných metodík, možné je tiež používanie urýchlených teplotných programov [17].

### **Identifikácia amplifikovaného fragmentu DNA**

Identifikácia amplifikovaných fragmentov DNA sa dosiahne buď na základe ich veľkosti alebo na základe prítomnosti určitej sekvencie nukleotidov. Na stanovenie veľkosti resp. relatívnej molekulovej hmotnosti fragmentov DNA sa používa elektroforéza v agarózovom géli, ktorý sa vyfarbuje roztokom etídiumbromidu a vyhodnocuje v ultrafialovom svetle [4,28]. Prítomnosť určitej sekvencie nukleotidov sa zisťuje pomocou hybridizácie so sondou. Vo väčšine prípadov postačuje na identifikáciu amplifikovaných fragmentov DNA elektroforéza, ktorá je pomerne lacným a rýchlym riešením. Hybridizácia je na druhej strane exaktnejšia, a tiež umožňuje robotizáciu. Hybridizáciu s rádioaktívne označenou sondou použili Jones a kol. [18], so sondou označenou digoxigenínom použili Aabo a kol. [15] a so sondou pripravenou pomocou biotinylovaných primerov a imobilizovanú v mikrotitračnej platničke, s chemiluminiscenčným výstupom, použili Soumet a kol. [8].

V prípade, že sa pri dôkaze salmonel pomocou PCR s danými primermi amplifikuje jediný fragment DNA, je možné jeho prítomnosť určiť tiež pomocou 5'-nukleázovej metódy [9].

### **Hodnotenie detekčného limitu metód založených na PCR**

Detekčný limit v súčasnosti dostupných metód na dôkaz salmonel v potravinách založených na PCR stanovovali jednotliví autori na vzorkách potravín umelo kontaminovaných kultúrami salmonel. Ako matrice boli použité potraviny, v ktorých sa salmonely najčastejšie vyskytujú – mäso, vajcia, mlieko a výrobky z nich, morské živočíchy a pod. V niektorých prípadoch sa podarilo dosiahnuť požadovaný detekčný limit  $10^0$  KTČ/25 g [9,12,15], v iných bol vyšší alebo nie je k dispozícii dostatok údajov. Salmonely v prirodzene kontaminovaných vzorkách potravín sú však vystavené rôznym chemickým a fyzikálnym vplyvom, a tiež vplyvom sprievodnej, konkurenčnej mikroflóry. Preto sú menej vitálne a ťažšie dokázateľné, z čoho vyplýva odlišnosť detekčného limitu stanoveného na umelo a prirodzene kontaminovaných potravinách. Jednou z možností riešenia tohoto problému je použitie referenčných materiálov, obsahujúcich definovaný počet stresovaných bakteriálnych buniek [12]. Z praktického hľadiska je však najdôležitejšie hodnotenie detekčného limitu na prirodzene kontaminovaných potravinách. Pri analýze prirodzene kontaminovaných vzoriek doteraz opísané metódy nedosahujú reprodukovateľne rovnaký detekčný limit ako štandardná metóda, t.j.  $10^0$  KTČ/25 g.

### **Záver**

Napriek značnému pokroku vo vývoji metód na dôkaz salmonel v potravinách založených na PCR, zatiaľ nie sú k dispozícii metódy, ktoré by poskytovali výsledky ekvivalentné štandardnej kultivačnej metóde a vo vývoji metód sa pokračuje.

### **Literatúra**

1. STN ISO 6579. Všeobecné pokyny pre metódy na dôkaz baktérií rodu *Salmonella*. 1993.
2. MAJERÍKOVÁ, I. - KUCHTA, T.: Hodnotenie imunochemickej detekcie salmonel s použitím komerčne dostupných systémov. Bulletin potravinárskeho výskumu, 34, 1995, s. 141-146.

3. SAIKI, R. K. - GELFAND, D. H. - STOFFEL, S. - SCHARE, S. J. - HIGUCHI, R. - HORN, G. T. - MULLIS, K. B. - ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 1988, s. 487-491.
4. ZIGOVÁ, M. - JURÍKOVÁ, K. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A.: Polymerázová reťazová reakcia, princíp a využitie na detekciu mikroorganizmov. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 33, 1994, s. 57-68.
5. LANTZ, P.-G. - HAHN-HÄGERDAL, B. - RADSTRÖM, P.: Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens. *Trends in Food Science and Technology*, 5, 1994, s. 384-389.
6. SCHEU, P. M. - BERGHOF, K. - STAHL, U.: Detection of pathogenic and spoilage microorganisms in food with the polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, 15, 1998, s. 13-31.
7. ROSSEN, L. - NORSKOV, P. - HOLMSTROM, K. - RASMUSSEN, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. *International Journal of Food Microbiology*, 17, 1992, s. 37-45.
8. SOUMET, C. - ERMEL, G. - SALVAT, G. - COLIN, P.: Detection of *Salmonella* spp. in food products by polymerase chain reaction and hybridization assay in microplate format. *Letters in Applied Microbiology*, 24, 1997, s. 113-116.
9. CHEN, S. - YEE, A. - GRIFFITHS, M. - LARKIN, C. - YAMASHIRO, C. T. - BEHARI, R. - PASZKO-KOLVA, C. - RAHN, K. - DE GRANDIS, S. A.: The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 35, 1997, s. 239-250.
10. KWANG, J. - LITTLEDIKE, E. T. - KEEN, J. E.: Use of the polymerase chain reaction for *Salmonella* detection. *Letters in Applied Microbiology*, 22, 1996, s. 46-51.
11. WANG, R.-F. - CAO, W.-W. - CERNIGLIA, C. E.: A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *Journal of Applied Microbiology*, 83, 1997, s. 727-736.
12. TRKOV, M. - MAJERÍKOVÁ, I. - JERŠEK, B. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - RIJSENS, N. - KUČHTA, T.: Detection of *Salmonella* in food in 30 hours using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, v tlači.
13. COHEN, H. J. - MECHANDA, S. M. - LIN, W.: PCR amplification of the *fimA* gene sequence of *Salmonella typhimurium*, a specific method for detection of *Salmonella* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1996, s. 4303-4308.
14. MARSIGLIA, M. L. - IKUTA, N. - FONSECA, A. K. - SCHUH, D. T. - HÖTZEL, I. - OZAKI, L. S. - MARQUES, E. K. - LUNGE, V. R.: Development of a combined selective enrichment method and polymerase chain reaction (PCR) assay for sensitive detection of *Salmonella* in food samples. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13, 1997, s. 649-654.
15. AABO, S. - ANDERSEN, J. K. - OLSEN, J. E.: Detection of *Salmonella* in minced meat by the polymerase chain reaction method. *Letters in Applied Microbiology*, 21, 1995, s. 180-182.
16. BURKHALTER, P. W. - MÜLLER, C. - LÜTHY, J. - CANDRIAN, U.: Detection of *Salmonella* spp. in eggs: DNA analyses, culture techniques, and serology. *Journal of AOAC International*, 78, 1995, s. 1531-1537.
17. ZIGOVÁ, M. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - RIJSENS, N. - KUČHTA, T.: Detekcia salmonel polymerázovou reťazovou reakciou. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 34, 1995, s. 135-139.
18. JONES, D. D. - LAW, R. - BEJ, A. K.: Detection of *Salmonella* spp. in oysters using polymerase chain reactions (PCR) and gene probes. *Journal of Food Science*, 58, 1993, s. 1191-1197.
19. RAHN, K. - DE GRANDIS, S. A. - CLARKE, R. C. - MC EWEN, S. A. - GALAN, J. E. -



- GINOCCHIO, C. - CURTISS, L. R. - GYLES, C. L.: Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Molecular and Cellular Probes*, 6, 1992, s. 271-279.
20. STONE, G. S. - OBERST, R. D. - HAYS, M. P. - McVEY, S. - CHENGAPPA, M. M.: Detection of *Salmonella* serovars from clinical samples by enrichment broth cultivation - PCR procedure. *Journal of Clinical Microbiology*, 32, 1994, s. 1742-1749.
21. DORAN, J. D. - COLLINSON, S. C. - BURIAN, J. - SARLOS, G. - TODD, W. C. D. - MUNRO, C. K. - KAY, C. M. - BANSER, P. A. - PETERKIN, P. I., - KAY, W. W.: DNA-based diagnostic tests for *Salmonella* species targeting *agfA*, the structural gene for thin, aggregative fimbriae. *Journal of Clinical Microbiology*, 31, 1993, s. 2263-2273.
22. BAUMLER, A. J. - HEFFRON, F. - REISSBROT, R.: Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 1997, s. 1224-1230.
23. GURTLER, V. - STANISICH, V. A.: New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S - 23S spacer region. *Microbiology*, 142, 1996, s. 3-16.
24. WIDJOATMODJO, M. N. - FLUIT, A. C. - TORENSMA, R. - KELLER, B. H. I. - VERHOEF, J.: Evaluation of the magnetic immuno PCR assay for rapid detection of *Salmonella*. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 10, 1991, s. 935-938.
25. AABO, S. - RASMUSSEN, O. F. - ROSSEN, L. - SORENSEN, P. D. - OLSEN, J. E.: *Salmonella* identification by the polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7, 1993, s. 171-178.
26. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - REHÁKOVÁ, H. - ŠKARKOVÁ, A. - RIJSENS, N. - KUCHTA, T.: Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies by the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 61, 1998, s. 1381-1383.
27. LAMPEL, K. A. - KEASLER, S. P. - HANES, D. E.: Specific detection of *Salmonella enterica* serotype *enteritidis* using the polymerase chain reaction. *Epidemiology and Infection*, 116, 1996, s. 137-145.
28. MANIATIS, T. - FRITSCH, E. F. - SAMBROOK, J.: *Molecular cloning*. New York, Cold Spring Harbor Laboratory 1982. 545 s.

Do redakcie došlo 8.7.1998.

#### Detection of salmonella in food by methods based upon the polymerase chain reaction

KUCHTA, T. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - DRAHOVSKÁ, H.: *Bull. potrav. Výsk.*, 37, 1998, p. 153-161.

**SUMMARY.** The polymerase chain reaction (PCR), a method of the amplification of characteristic DNA sequences, can be utilized to detect the bacteria from the genus *Salmonella* in food. Currently available methods involve *Salmonella* enrichment by cultivation, extraction, amplification and analysis of DNA. Primers enabling a selective detection of *Salmonella* have been described. Since direct extraction of DNA from food is laborious and time-consuming, it seems more suitable to enrich *Salmonella* by culture before the extraction. Several protocols for *Salmonella* enrichment have been developed, ranging from a simple cultivation in a non-selective broth to multi-step or branched methods, utilizing combinations of non-selective and selective cultivations and, in some cases, the immunomagnetic separation. A thorough isolation of DNA from the cultures prepared is not necessary, lysis of cells is used to provide DNA instead. For the detection of *Salmonella*, rapid PCR-programmes produce



satisfactory DNA amplification. The amplified DNA is usually analyzed by the agarose gel electrophoresis, but hybridization protocols have been described as well, which allow the automation of the entire method. However, achieving the equivalence of the results of PCR-based methods with the standard cultivation one when naturally-contaminated food samples are analyzed, remains a task for current research.

KEYWORDS: *Salmonella*, polymerase chain reaction, food safety