

Påvisning av næringsmiddelpatogener med PCR

Jaran Strand Olsen, Else Marie Fykse, Morten Opsahl, Gunnar Skogan, Janet Martha Blatny

Forsvarets forskningsinstitutt/Norwegian Defence Research Establishment (FFI)

12. desember 2006

FFI-rapport 2006/03900

89501

ISBN 978-82-464-1054-8

Emneord

Næringsmidler

PCR

DNA isolering

Deteksjon/identifikasjon

Feltlaboratorium

Godkjent av

Jan Ivar Botnan

Avdelingssjef/Director

Sammendrag

Denne rapporten beskriver bruken av den molekylære metoden ”Polymerase Chain Reaction” (PCR) for identifisering av utvalgte sykdomsfremkallende bakterier i næringsmidler. Arbeidet er basert på et samarbeidsprosjekt mellom Forsvarets sanitet (FSAN) og Forsvarets forskningsinstitutt (FFI). Prosjektet har omhandlet forstudier for bruken av real-time PCR for å raskere kunne identifisere potensielle næringsmiddelpatogener.

Rapporten beskriver isolering av nukleinsyrer fra matpatogenene *Bacillus cereus* og *Salmonella typhimurium* i hhv melk og egg, samt en optimalisert real-time PCR-analyse, med spesifikke primere, for identifisering av disse bakterieartene. Analysene er utført ved hjelp av et SmartCycler® PCR-instrument. Deteksjonsgrensen for identifisering av *B. cereus* i melk (H- og lett melk) og *S. typhimurium* i egg (hvite og plomme) ble bestemt til hhv 10^3 og 10^4 celler/ml.

I tillegg ble betingelsene for real-time PCR-reaksjonene optimalisert og tilrettelagt for identifisering av *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157 og *Clostridium perfringens*.

English summary

This report describes real-time PCR analyses of the food pathogens *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, and *Vibrio cholerae*. The study has been outlined in close collaboration with the Joint Medical Service, Norwegian Armed Forces, in order to establish and obtain fast and reliable PCR methods supplementary to traditional microbiological methods currently in use.

Various primer sets were selected for real-time PCR analyses of five bacterial species and the PCR assays were optimised. In order to mimic real conditions, milk and egg were spiked with various concentrations of *B. cereus* and *S. typhimurium* cells followed by DNA isolation and real-time PCR analyses. Results showed that *B. cereus* and *S. typhimurium* were detected at levels of 10^3 and 10^4 cells/ml, respectively, in these food items. It was not possible to perform successful PCR analyses without any DNA isolation prior to the analyses.

This work may be considered as a step towards implementing molecular techniques as a supplement to traditional microbiological methods for detecting and identifying food- and waterborne pathogens in the Norwegian Armed Forces.

Innhold

1	Formål med studiet	7
2	Innledning	7
2.1	Næringsmiddelbåren sykdom	7
2.2	Prinsipper for real-time PCR	10
2.3	Fordeler og ulemper med PCR	14
3	Materialer og metoder	15
3.1	Bakterier og primere	15
3.2	Isolering av nukleinsyrer	16
3.3	PCR	17
3.4	Komplekse prøver	18
4	Resultater	18
4.1	Deteksjonsgrenser for <i>B. cereus</i> , <i>S. typhimurium</i> , <i>V. cholerae</i> , <i>E. coli</i> og <i>C. perfringens</i>	18
4.2	Analyser av komplekse prøver	21
4.2.1	<i>S. typhimurium</i> i egg	21
4.2.2	<i>B. cereus</i> i melk	22
5	Diskusjon	23
6	Konklusjon	26
7	Acknowledgements	26
	Referanser	27
	Appendix A	29
	Appendix B	32

1 Formål med studiet

Formålet med studiet var å etablere real-time PCR-analyser (Polymerase Chain Reaction) for identifisering av utvalgte næringsmiddelpatogener.

Hensikten var å optimalisere og bestemme deteksjonsgrenser ved bruk av real-time PCR for ulike næringsmiddelpatogener både i rene prøvematrikser (bakterier i kultur eller vann) og i komplekse prøver (melk og egg). I tillegg skulle det vurderes om PCR analysene kunne utføres uten isolering av nukleinsyrer, herunder DNA¹, før PCR-analysene ble utført (dvs direkte på komplekse prøver).

Valg av bakterier til dette arbeidet ble basert på forslag og ønske fra FSAN. FSAN har ansvar for utvikling av sanitets- og veterinærtjenesten samt det militærmedisinske fagområdet i Forsvaret. I utgangspunktet var det ønskelig med etablering av PCR-analyser for bakterieartene listet i tabell 2.1.

Bacillus cereus og *Salmonella* spp. (*S. typhimurium*) ble valgt for innledende analyser da FFI har lang erfaring med dyrking og analyse av *B. cereus* via pågående forskningsprosjekter, og har pr i dag ikke laboratoriefasiliteter som tillater arbeid med bakterier tilhørende risikoklasse 3.

Da prosjektet var tidsbegrenset ble DNA-ekstraksjon og PCR-analyser kun utført for *B. cereus* og *S. typhimurium* i hhv melk og egg. Reaksjonsbetingelser for real-time PCR mht optimalisering av spesifikke primere for identifisering av *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* O157 og *Clostridium perfringens* ble også etablert.

2 Innledning

2.1 Næringsmiddelbåren sykdom

Matforgiftning er et begrep på matbårne infeksjoner og intoksinasjoner² (Granum, 1999). Slike sykdommer skyldes konsum av mat og drikkevann som inneholder patogene mikroorganismer, parasitter, muggsopp eller alger, toksiner produsert av bakterier, eller ved sabotasje/terror (bioterrorisme). Hovedgruppene av bakterier som kan føre til matforgiftning er *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio cholerae*, *Escherichia coli* (ETEC³), *Aeromonas* spp, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Yersinia*

¹ DNA: deoksyribonukleinsyre

² Intoksinasjon skyldes bakterier som produserer toksiner under vekst i næringsmidler, såkalte preformerte toksiner.

³ ETEC : Enterotoksogene *E. coli*. ETEC er en vanlig årsak til "turistdiaré" og diaré hos barn i utviklingsland. De vanligste gruppene av tarmbakterien *E. coli* er i tillegg til ETEC, EIEC (enteroinvasive), EPEC (enteropatogene) og EHEC (enterohemorragiske, f eks *E. coli* O157). EHEC kalles ofte for VTEC

enterocolitica, *Salmonella typhi*, *Salmonella paratyphi* og *Listeria monocytogenes* (Granum, 1999). Det er økende interesse for næringsmiddelhygiene og kontroll da dette kan være et betydelig problem. FSAN har bl a ansvar for mathygiene ved ulike militære operasjoner, både nasjonalt og internasjonalt. Enkelte sykdomsfremkallende bakteriearter som FSAN utfører tradisjonelle mikrobiologiske analyser for er vist i tabell 2.1.

Tabell 2.1. Utvalgte sykdomsfremkallende bakteriearter.

Bakterieart	Sykdom	Risikoklasse ^a
<i>Salmonella</i> spp. (herunder <i>S. typhimurium</i>)	Salmonellose, akutt gastroenteritt	2
<i>Escherichia coli</i> O157	EHEC blodig diaré ^(footnote 3)	3
<i>Bacillus cereus</i>	Diaré (infeksjon) oppkast (intoksinasjon)	2
<i>Clostridium perfringens</i>	Type A: Magesmerter, kvalme, diaré. Type C: kraftig magesmerter, nekrose i tarm.	2
<i>Clostridium botulinum</i>	Botulisme	2
<i>Campylobacter jejuni</i>	Campylobacteriose,	2
<i>Shigella</i> spp.	Shigellose, dysenteri	2 (3 for <i>S. dysenteria</i> Type 1)
<i>Vibrio cholerae</i>	Kolera	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ved matforgiftning som skyldes toksin: Kvalme, oppkast, diaré	2
<i>Brucella melintensis</i>	Brucellose	3
<i>Listeria monocytogenes</i>	Listeriose	2

^a Risikoklasse er betegnelsen på hvilke smitterisikoklasse bakterien tilhører i henhold til FOR 1997-12-19 nr 1322, "Forskrift om vern mot eksponering for biologiske faktorer (bakterier, virus, sopp m.m.) på arbeidsplassen".

Bakterier tilhørende slektene *Bacillus* og *Clostridium* er Gram-positive sporedannere og artene *B. cereus* og *C. perfringens* er kanskje de viktigste årsakene til matforgiftning i Norge (Granum, 1999, www.fhi.no). *B. cereus* er en vanlig forekommende bakterie i jord og kan lett spres til matvarer som ris, krydder, grønnsaker, kjøtt, meieriprodukter og egg. Sporene er varmeresistente og kan overleve en pasteuriseringsprosess. Varme kan føre til at sporene germineres (spires) som fører til en aktivering av celleveksten. *B. cereus* kan gi opphav til to typer matforgiftning; infeksjon (diare type) og intoksinasjon (emetisk type). For intoksinasjon er inkubasjonstiden fra 30 minutter til 6 timer med kvalme etterfulgt av oppkast og muligens diaré. Varigheten er ofte 6 til 24 timer. Diarétypen (infeksjon) har en inkubasjonstid på 8-16 timer og starter med magesmerter etterfulgt av diaré og noen ganger kvalme. Infeksjonsdosen for diarétypen er 10^5 - 10^7 bakterier (tab 2.2).

("verycytotoxic" *E. coli*) og er en shigatoksin produserende human patogen (STEC). Storfe er reservoar for EHEC. Mennesker er reservoar for ETEC, EPEC og EIEC.

Tabell 2.2. Infeksiøse doser for utvalgte næringsmiddelpatogener.

Bakterieart	Infeksiøs dose (totalt antall bakterieceller)	Referanser
<i>B. cereus</i>	10 ⁵ -10 ⁷	Granum (1999)
<i>S. typhimurium</i>	10 ⁶ , 10-100	Blaser og Newman (1982)
<i>V. cholerae</i>	via mat; 10 ² -10 ⁴ , via vann; 10 ³ -10 ⁶	http://www.emedicine.com/med/topic351.htm
<i>C. perfringens</i>	>10 ⁸	http://www.cfsan.fda.gov/~mow/chap11.html
<i>E. coli</i>	10-10 ¹⁰ , avhengig av type	http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html

Noen bakteriestammer av *B. cereus* er nært genetisk beslektet med *B. anthracis* (Helgason et al., 2000), men ofte er det mulig å differensiere disse stammene fenotypisk og ved biokjemiske og immunologiske metoder. Slikt arbeid kan være tidkrevende. Spesifikke genetiske markører for identifisering av *B. anthracis* vha PCR er publisert og benyttet (Ramisse et al., 1996), men det viser seg vanskelig å utføre tilsvarende for *B. cereus* (upubliserte resultater ved FFI).

B. thuringiensis er nært beslektet til *B. cereus* og *B. anthracis* og brukes i sprøytemidler for å beskytte planter og åker mot insektskader. Det er vist at *B. thuringiensis* kan føre til matbåren sykdom (Jackson et al., 1995) og sårinfeksjoner (Hernandez et al., 1998).

Bakterier tilhørende *Salmonella* spp. er Gram-negative og kan føre til salmonellose (Granum, 1999, www.fhi.no). Det er beskrevet mer enn 2500 forskjellige serovarianter av *Salmonella* spp., og de mest vanlige i Norge er *S. enteritidis* og *S. typhimurium*. De kliniske symptomene er vanligvis diaré, magesmerter, feber, og nedsatt allmenntilstand. Inkubasjonstiden kan variere mellom 12 timer og 7 dager, med 1 til 3 dager som mest vanlig. *S. typhi* og *S. paratyphi* forårsaker hhv typhoid- og paratyfoidfieber som er alvorlige systemiske infeksjoner. Infeksjonsdosen antas å være 10⁶ bakterieceller, men 10-100 bakterieceller kan være nok hos eldre, barn og personer med generelt nedsatt allmenntilstand (tab 2.2). Nomenklaturen til slekten *Salmonella* har vært, og er fremdeles, kompleks. *S. typhimurium* er ikke en egen *Salmonella* art, men en spesifikk serotype av arten *S. enterica*. Den korrekte nomenklaturen av denne serotypen er i) *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ser. Typhimurium, ii) *Salmonella* ser. Typhimurium, eller iii) *Salmonella* Typhimurium (Brenner et al., 2000). I denne rapporten benyttes betegnelsen *S. typhimurium* som er i samsvar med nomenklaturen benyttet for andre omtalte bakterier.

I Norge har det i 2006 vært utbrudd av *E. coli* 103 (EHEC) og *Salmonella kedougou* som førte til hhv 18 og 42 sykdomstilfeller (registrert juni 2006). Av de 18 med *E. coli* 103 infeksjonen, var det 10 av totalt 16 barn som utviklet nyresykdommen hemolytisk-uremisk syndrom (HUS). Ett barn døde. Sporingen og identifisering av *E. coli* 103 har vært vanskelig og tidkrevende. Samme DNA profil som utbruddstammen ble funnet i Gildes Birkebeiner Sognemorr, Gildes Haugpølse og Gildes Birkebeiner Fjellmorr, samt fra frosset sauekjøtt (www.fhi.no). *S. kedougou* er en sjelden serotype av *Salmonella* spp. og fører til kvalme og diaré. I Norge har det kun vært registrert 6 tilfeller av *S. kedougou* infeksjoner siden 1979. Det er første gang *S. kedougou* er

påvist i mat her i landet. For videre lesing se Sluttrapporter for *E. coli* 103 og *S. kedougou* utbruddene (Nasjonalt Folkehelseinstitutt 2006a, Nasjonalt Folkehelseinstitutt 2006b).

I april 2006 opplevde mer enn 100 norske soldater stasjonert i Afghanistan (ISAF-soldater) å få dysenteri som er en alvorlig sykdom og kan ha dødelig utgang. Årsaken var trolig mat som inneholdt bakterien *Shigella sonnei*.

Det henvises til Nasjonalt folkehelseinstituttet (www.fhi.no) og til Mattilsynet (www.mattilsynet.no) for mer informasjon om hhv næringsmiddelbårne sykdommer og tilsyn og lovverk.

Kontaminering av mat- og drikkevann har blitt benyttet i ulike sabotasje- og terroraksjoner. Et av de mest kjente eksemplene er kontaminering av mat med *Salmonella typhimurium* i salatbarer i Oregon i USA (1984) hvor 750 mennesker ble syke (Török et al., 1997). Denne hendelsen ble utført av den religiøse Rajneesh sekten for å redusere deltakelsen til et politisk valg i delstaten. Det tok over ett år før det ble avdekket at dette var en bevisst terrorhendelse, og det skjedde etter tilståelse fra et av medlemmene i sekten. I 1996 ble 12 personer forgiftet av muffins som inneholdt *Shigella dysenteriae* ved St. Paul Medical Center i Dallas, USA (Kolavic et al., 1997). En tidligere kvinnelig ansatt hadde tilgang til de nedfrosne kulturene av *S. dysenteriae* som ble benyttet i angrepet. Biologivåpenprogrammet i Japan (1937-1945) omfattet studier av den kinesiske befolkningen som bl a fikk utdelt matvarer som inneholdt biologiske trusselagens tilhørende kategori A gruppen til Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Biologiske agens som antas å lett kunne spres, ha høy smitteeffekt, forårsake høy dødelighet, krever unike beredskapsplaner og behandlingsrutiner og vil kunne føre til store helsemessige- og økonomiske konsekvenser for landet er klassifisert som kategori A (www.cdc.gov). Denne gruppen inkluderer *B. anthracis* (anthrax), botulinum toksin (botulisme), *Y. pestis* (pest), Variola major (kopper), *Francisella tularensis* (tularemi) og virus som forårsaker hemoragisk feber (blødningsfeber).

Evnen til å lykkes med sabotasje- og terrorhandlinger krever kunnskap om mikroorganismen og toksinet som benyttes til å utføre handlingen. En slik bevisst handling kan effektivt påføre skade eller sykdom hos en liten populasjon, f eks soldater i internasjonale operasjoner.

2.2 Prinsipper for real-time PCR

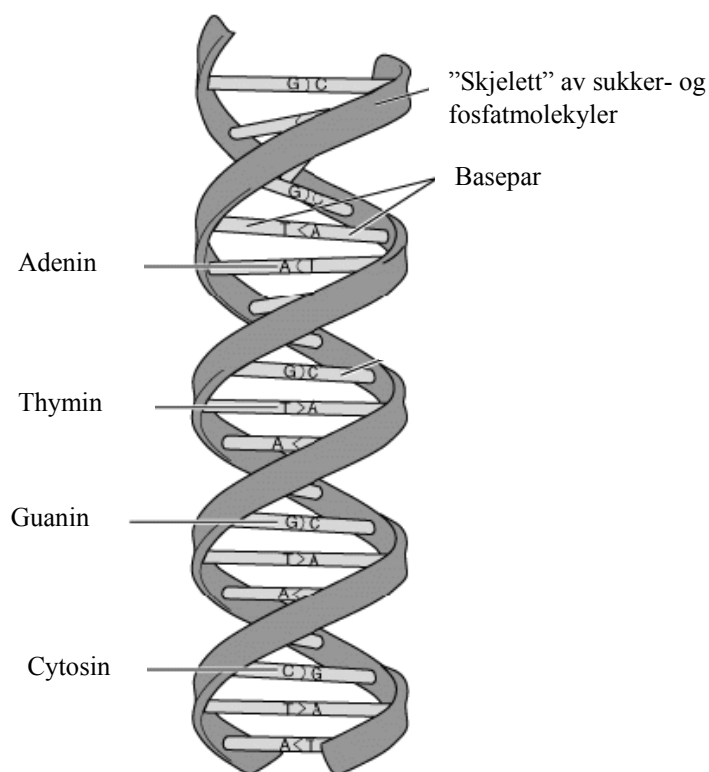
De fleste levende organismer inneholder DNA som genetisk materiale med unntak av enkelte virus som har RNA⁴. DNA-molekylet består av to komplementære kjeder av deoksyribonukleotider som danner en dobbelheliks (fig 2.1). Et deoksyribonukleotid består av en sukker-fosfatenhet bundet til en av de fire aromatiske basene adenin (A), guanin (G), cytosin (C) eller thymin (T). Den genetiske informasjonen bestemmes av rekkefølgen (sekvensen) til de ulike basene i polynukleotidkjedene. Et gen er en del av DNA-molekylet som koder for et protein. DNA blir først transkribert til mRNA⁵ som translateres til et protein. Et funksjonelt protein er

⁴ RNA: ribonukleinsyre

⁵ mRNA: messenger RNA

avhengig av en rekke faktorer, bl a ekspresjon av genet, signalelementer for genekspressjon, reguleringen av genekspressjon og miljø.

Ulike spesifikke DNA-regioner av et genom kan benyttes som markører for identifisering av den tilhørende organismen. DNA regioner som er konserverte i flere bakterier, f eks 16S rRNA genet⁶, kan benyttes til å detektere en gruppe bakterier eller en bakterieart. Slike markører kalles ofte for generelle markører, i motsetning til spesifikke markører som kan benyttes for å differensiere mellom ulike bakteriearter.



Figur 2.1. Modell av en DNA-dobbelheliks.

Til analyse av DNA kan man benytte PCR som på norsk ofte kalles for ”in vitro amplifikasjon av DNA”. PCR teknikken har blitt benyttet siden 1985 (Saiki et al., 1985) og blir stadig videreutviklet. Denne metoden tillater at utvalgte regioner av DNA-molekylet raskt kopieres (amplifiseres). DNA-amplifiseringen fører til at DNA som finnes i meget små mengder er lettere å detektere. I teorien er det nok med ett DNA-molekyl, som inneholder ønsket region, som DNA-kilde (templat), men i praksis er det nødvendig med flere molekyler (10-100).

Generelt, er det nødvendig å kjenne til ca 20 basepar (bp) av DNA-sekvensen som flankerer DNA-fragmentet som skal amplifiseres. På grunnlag av dette lages det to syntetiske enkeltrådede oligonukleotider som er komplementære til de flankerende områdene og som fungerer som primere for DNA-syntesen (startsekvenser). De to primerne vil sammen med enzymet DNA

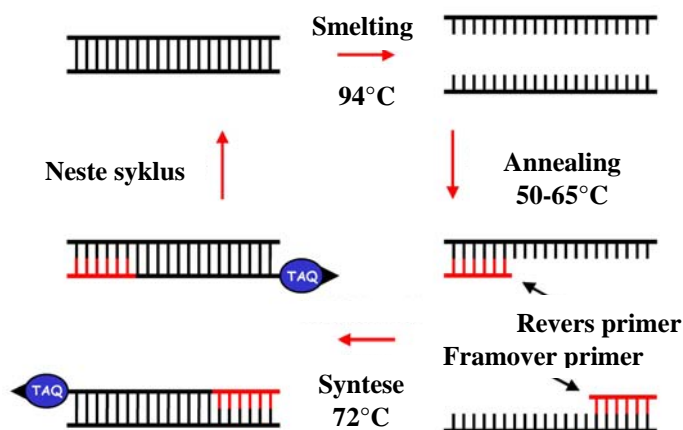
⁶ 16S rRNA genet: genet som koder for 16S ribosomalt (r) RNA og som gjenkjennes av ribosomet

polymerase syntetisere ny DNA tråd i hver retning. Dette fører til at de to nysyntetiserte trådene blir komplementære til hverandre og danner et produkt som er definert av de to primerne.

PCR er en tre-trinns reaksjon, i) denaturering (smelting), ii) annealing (sammensmelting) og iii) DNA syntese. Ved denaturering smeltes de dobbeltrådede DNA-molekylene og deoksyribonukleotidene skiller lag. Dette skjer bl a ved oppvarming. Smeltepunktet til templatet er definert som ”når 50 % av DNA-trådene har skilt lag og blitt enkeltrådet”. De to enkeltrådene (ssDNA) vil hver danne et ssDNA-primer kompleks når temperaturen senkes. Dette kalles for ”annealing” (sammensmelting). Figur 2.2 viser en skjematisk beskrivelse av en PCR syklus.

Primere som benyttes i en PCR-reaksjon definerer reaksjonens spesifisitet. Slike markører konstrueres vha publiserte DNA-sekvenser som er samlet i internasjonale gendatabaser. Med bakgrunn i at kun 1- 10 % av det totale reservoaret av bakterier som finnes i miljøet er dyrkbare, så inneholder disse databasene kun en liten del av den totale genetiske informasjonen fra miljøet. Det er derfor viktig at nye primere evalueres i praktiske forsøk i laboratoriet mot flest praktisk mulig mikroorganismer for å kunne antyde noe om spesifisiteten.

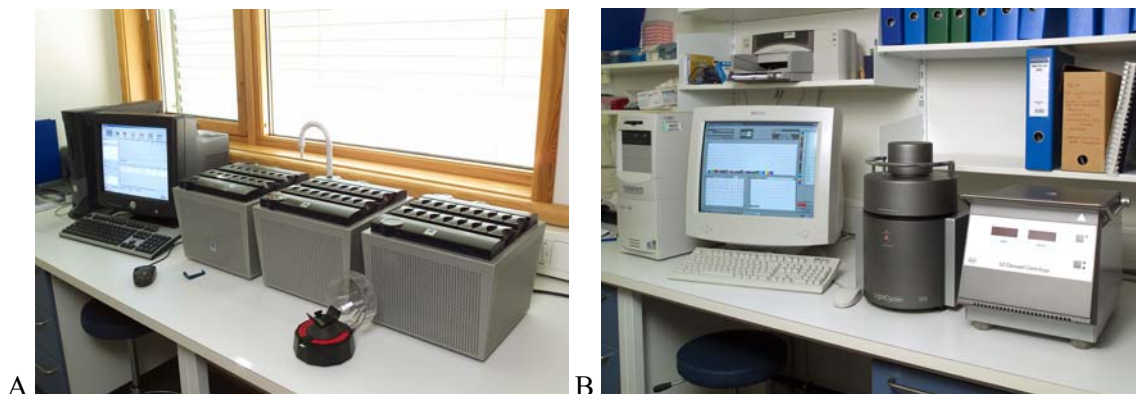
Reaksjonsblandingen for PCR må inneholde templat-DNA, de to komplementære primerne, de fire deoksyribonukleotidene (A, G, C og T) og enzymet DNA-polymerase for å oppnå syntese av DNA. En PCR syklus består av i) oppvarming av templatet til ca 95 °C for å oppnå ssDNA, ii) avkjøling til ca 55-60 °C for binding av primerne til ssDNA (annealing) og iii) DNA syntese ved 72 °C. Det syntetiseres DNA der primerne er bundet og det lages en ny komplementær DNA-tråd på hver av de to opprinnelige. Når denne tråden er ferdig startes en ny runde med oppvarming, avkjøling og syntese. Denne syklusen kan gjentas 20-40 ganger hvor det skjer en dobling av antall DNA-molekyler for hver runde. I teorien dannes 256 molekyler etter 10 sykluser med kun ett molekyl som utgangstemplat. Etter 20 og 30 runder, kan det dannes hhv 262 144 og ca 268 millioner kopier av samme DNA-molekyl. Ved endepunktet av PCR-reaksjonen vil PCR-produktet ha en veldefinert størrelse gitt av avstanden mellom primerne.



Figur 2.2. Skjematisk fremstilling av DNA-amplifisering vha PCR. En PCR-syklus inneholder tre trinn; i) dobbeltrådet DNA (dsDNA) varmes opp (94°C) til det denatureres (smelting), ii) primerne binder seg til enkeltrådet DNA (ssDNA) ved en lavere temperatur (50- 65 °C) (annealing), og iii) enzymet Taq polymerase syntetiserer en komplementær DNA tråd ved å addere nukleotider til primeren (72 °C) (syntese).

I real-time PCR-maskiner kan både syntese og analyse av produktene gjennomføres i løpet av 20-40 minutter. Slike instrumenter består av to ulike hovedkomponenter, en syntesedel samt en fluorimeterdel til analyse og deteksjon av produktene. Ved real-time PCR kan produkt dannelsen detekteres direkte etter hver syklus. Mengde PCR-produkt oppnådd under amplifiseringsreaksjonen kan bestemmes ved hjelp av kvantitativ real-time PCR. Eksempler på real-time PCR maskiner er LightCycler™ fra Roche (Sveits) og SmartCycler® fra Cepheid (USA) (fig 2.3).

Ved real-time PCR kan smeltepunktanalyser være av nytte for å verifisere om et eller flere produkter har blitt amplifisert. Dersom identiske PCR-produkter smelter ved ulike temperaturer kan dette tyde på uspesifikt produkt eller dannelse av primerdimere. Dette kan bekreftes med gelelektroforese.



Figur 2.3. A. SmartCycler[®] System (Cepheid) og B LightCycler[™] fra Roche.

Ved FFI benyttes både SmartCycler[®] og LightCycler instrumentene. Syntesedelen i slike instrumenter er optimalisert for å utføre hurtige PCR-analyser. I SmartCycler[®] forgår reaksjonene i flate plastrør med høy overflate til volum forhold. Plastrør er en fordel for å unngå knusing av kapillærrør som benyttes i LightCycler. Temperaturen i PCR-instrumentet forandres med 5 °C per sekund, og det fører til at hver syklus kan gjennomføres på under 1 minutt (for fragmenter < 1000 bp). SmartCycler[®] er et robust instrument som kan benyttes i feltlaboratorier. Den består av moduler med 12 separate reaksjonskamre som kan programmeres og styres uavhengig av hverandre. Systemet er fleksibelt og tillater analyse av ulike biologiske agens med ulike temperaturprogram samtidig.

Kommersielt finnes det et lite utvalg av små og bærbare PCR-instrumenter godt egnet for feltbruk. Det henvises til Blatny et al., (2005) for videre beskrivelse og informasjon om innkjøpspriser på ulike PCR-instrumenter.

2.3 Fordeler og ulemper med PCR

Med real-time PCR kan selve PCR-analysen utføres i løpet 30 minutter, men dette er avhengig av prøvematriks og det biologiske agenset som skal påvises. FFI har tidligere publisert en rapport der real-time PCR for flere biologiske trusselagens er etablert (Fykse et al., 2004).

PCR detekterer både levende og døde celler da det er DNA som analyseres. Upubliserte studier ved FFI har vist at DNA er relativt stabilt og brytes ikke ned umiddelbart etter at organismen dør (Fykse et al., 2006). Det er derfor nødvendig med mikrobiologiske analyser, eventuelt andre metoder, for å påvise levende bakterieceller.

Det kan også være nødvendig å opparbeide prøvematriksen og isolere DNA før PCR analysen gjennomføres. Dette gjelder spesielt når prøvematriksen er av kompleks natur. Det er viktig å fjerne eventuelle substanser tilstede i prøvematriksen som kan inhibere PCR-analysen. En prøve med rent DNA vil gi bedre PCR-effektivitet sammenlignet med en forurenset DNA-prøve. Det er nødvendig å teste ut forekjellige metoder for å isolere DNA fra komplekse prøvematrikser for å

oppnå optimale resultater. I noen tilfeller er det imidlertid ikke nødvendig med et prøveopparbeidelsestrinn, men dette er avhengig av prøvematriks og hvilket biologisk agens som skal påvises. Det finnes kommersielt tilgjengelig ”kits” for isolering av DNA fra forskjellige prøvematrikser som blod, vev, avføring, jord og bakteriekulturer. FFI har utarbeidet en egen prosedyre for ekstraksjon av DNA fra jord. Foreløpige resultater tyder på at ekstraksjonsutbytte av DNA er tilsvarende og i enkelte tilfeller bedre enn ved bruk av kommersielle kit (upubliserede data, FFI).

En vellykket PCR-analyse er avhengig av gode og spesifikke primere. Valg av optimale primere gjøres vha litteraturstudier, sekvensanalyser (bioinformatikk) og eksperimentelle forsøk. For identifisering er det viktig at primerene ikke fører til kryssreaksjoner med DNA fra andre mikroorganismer som gir opphav til falske positive resultater. Negative kontroller er også viktig i PCR for å redusere faren for falske positive reaksjoner. Dersom det er for lite DNA tilstede i en prøve, dvs under deteksjonsgrensen for PCR-analysen, så vil dette kunne gi opphav til et falsk negativt resultat. Det finnes kommersielt en rekke primere konstruert for identifisering av næringsmiddelpatogener, andre patogene- og ikke-patogene mikroorganismer. Det anbefales allikevel at nødvendige uttestinger gjøres på forhånd før det endelige valget av primersett foretas.

Etter at PCR-reaksjonen er ferdig gjennomføres smeltepunktanalysen. Denne forteller noe om PCR produktens lengde og innhold av G og C. Et optimalt primersett skal kun gi et spesifikt smeltepunktssignal. Tilstedeværelse av flere smeltepunktssignaler kan indikere primerdimer⁷ -dannelse eller uspesifikk PCR-reaksjon. Dimerdannelse kan redusere effektiviteten til PCR-reaksjonen. Dimertoppene gjenkjennes ofte ved en lavere smeltetemperatur enn de spesifikke produkttoppene. Vanligvis kan en del dimerdannelse aksepteres, men er denne for omfattende kan PCR-resultatene bli tvetydige og usikre. Derfor er det nødvendig med faglig kompetanse eller opplæring i å kunne analysere real-time PCR-resultatene.

3 Materialer og metoder

3.1 Bakterier og primere

Bakterier og primere benyttet i denne studien er vist i tabell 3.1.

E. coli ble mottatt fra Nasjonalt Folkehelseinstitutt, *B. cereus*, *C. perfringens*, og *S. typhimurium*⁸ fra American Type Culture Collection (ATCC) og *V. cholerae* fra Pasteur Instituttet.

Bakteriene ble dyrket på Luria-Bertani agar (LB) (*E. coli* og *S. typhimurium*), brain heart infusion (BHI) (*C. perfringens* (anaerobt) og *B. cereus*) og tryptic soya broth (TSB) (*V. cholerae*) ved 37 °C i 16-20 timer. Celler fra enkeltkolonier ble inokulert i respektive flytende medier uten agar og inkubert med risting ved 37 °C i 16-20 timer. Kulturene ble deretter vasket i Tris-EDTA buffer

⁷ Primerdimer kan dannes når det er likhet mellom de to primersekvensene.

⁸ *S. typhimurium* er valgt som modellorganisme for *Salmonella* spp. i dette studiet.

(TE) og antall celler ble bestemt vha mikroskopering.

Tabell 3.1. Bakterier, primere og produktstørrelser for primere benyttet i denne studien.

Bakterieart	Målgen	Sekvenser	Produkt-	Referanse
Stamme	Primer	(genprodukt)	Størrelse (bp)	
<i>E. coli</i>				
(FHI-j.nr. 102-11796-1)	ECO157per-f	<i>per</i>		
	ECO157per-r	(perosamin syntetase)	225	O'Hanlon et al., (2004)
	ECO157eae-f	<i>eae</i>		
	ECO157eae-r	(intimin)	106	Sharma et al., (1999)
<i>S. typhimurium</i>	stn-f	<i>stn</i>		
(ATCC13311)	stn-r	(enterotoksin)	284	Makino et al., (1999)
	invA-f	<i>invA</i>		
	invA-r	(invasjon toksin)	260	Rahn et al., (1992)
		<i>ctxA</i> og <i>ctxB</i>		
<i>V. cholerae</i>	VCet-1	(kolera enterotoksin		Wang et al., (1997)
(CIP106855)	VCet-2	subenhet A og B)	563	Fields, et al (1992)
		<i>ctxA</i> og <i>ctxB</i>		
	VctxA-3	(kolera enterotoksin		
	VctxA-5	subenhet A og B)	284	Fykse et al., (2004)
		<i>hblD</i>		
<i>B. cereus</i>	hblD-f	(hemolysin BL lytisk		Hansen og Hendriksen
(ATCC14579)	hblD-r:	komponent L1)	429	(2001)
		<i>nheA</i>		
	BCgnheA-f:	(nonhemolytisk		
	BCgnheA-f:	enterotoksin A)	208	FFI ⁹
	BCgroEL-f	<i>GroEL</i>		
<i>Bacillus</i> spp.	BCgroEL-r	(Chaperonin)	140	FFI ¹⁰
<i>C. perfringens</i>	cpa-1	<i>cpa</i>		
(ATCC13124)	cpa-2	(alfa toksin)	280	Fach og Popoff (1997)

3.2 Isolering av nukleinsyrer

På grunn av tykkere cellevegg trenger Gram-positive bakterier kraftigere lysesbehandlinger enn Gram-negative bakterier. Kulturer (ca 16-20 timers vekst) med *B. cereus* og *C. perfringens* (1 ml) ble derfor tilsatt 0,5 gram av en blanding av 0,1 og 0,5 mm silikakuler og lysert ved hjelp av en Mini beadbeater 8 (Biospec products) ved maksimal hastighet. Denne prosessen er senere omtalt som beadbeating. Lyserte celler ble deretter sentrifugert 1 minutt ved 12000 X g i en bordsentrifuge og supernatanten ble videre rensert som beskrevet under eller benyttet direkte som templat i PCR-reaksjonen. Gram-negative bakterier gjennomgikk ikke beadbeating før DNA-ekstraksjon.

Isolering av nukleinsyrer ble utført med NucliSens® Basic kit (BioMerieux) eller QIAamp® DNA Stool Mini kit (Qiagen). Kitet fra Qiagen ble brukt i henhold til produsentenes anbefalinger (Appendix A) mht isolering av DNA fra egg tilsatt *S. typhimurium*. Utbyttet av DNA var imidlertid ikke tilfredsstillende slik at kitet fra BioMerieux ble brukt videre i studiet for isolering

^{9,12} Primerne laget ved FFI, upubliserte data

av DNA fra melk tilsatt *B. cereus*.

Isolering av nukleinsyrer ved NucliSens metoden (Appendix B) ble utført som beskrevet i Fykse et al., (2006). Kort forklart; 0,1 ml melk som var tilsatt *B. cereus* celler ble lysert ved beadbeating og tilsatt lysisbuffer (0,9 ml) og silikakuler (50 µl) for å binde DNA til kulene. Etter 10 min ble kulene sentrifugert ned (30 sekunder ved 10000 X g) og vasket med vaskebuffer to ganger (70 % etanol og aceton). Pelleten ble tørket 10 minutter ved 56 °C og nukleinsyrer ble eluert i elueringsbuffer. De rensede nukleinsyrene bestod av en blanding av DNA og RNA.

3.3 PCR

Optimalisering av primere med hensyn på Mg-konsentrasjon (2-5 mM), primer- konsentrasjon (0,5-1,5 µM) og annealingstemperatur (56-64 °C med 2 °C trinn) ble utført som beskrevet i Fykse et al. (2004). Etter optimaliseringen ble deteksjonsgrensen bestemt ved å kjøre PCR på ulike konsentrasjoner av lyserte bakterier i vann. Ved alle PCR-analysene ble det benyttet positive kontroller med DNA isolert fra respektive bakterier og negative kontroller bestående av destillert vann.

Det har blitt gjennomført optimalisering og deteksjonsgrensebestemmelse for totalt 21 primerpar, men kun primere med tilfredsstillende lav deteksjonsgrense (dvs < 20 bakterieceller i PCR reaksjonen) er omtalt i rapporten (tab 3.1). Alle reaksjonsbetingelser med bruk av primere i tabell 3.2 for real-time PCR-analyse er blitt optimalisert med Lithos qPCR™ MasterMix (Eurogentec). Unntaket er primersettet BCgnheA-f/r, hvor kitet LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics) ble benyttet.

Alle PCR produktene ble verifisert vha smeltepunktsanalyse og elektroforese (BioAnalyzer, Agilent Technology).

Tabell 3.2. Reaksjonsblandinger brukt ved PCR.

Lithos qPCR™	
Reagenser	Sluttkonsentrasjon
2X Mastermix	1 X
MgCl ₂	2-5
Primer fwd	0,5-1,5
Primer rev	0,5-1,5
SYBR Green I	1/20000
Templat	2 µl
Vann	Til 25 µl total volum
LightCycler® FastStart	
5X Mastermix	1 X
Primer fwd	0,5-1,5
Primer rev	0,5-1,5
Templat	2 µl
Vann	Til 25 µl total volum

3.4 Komplekse prøver

PCR-analyse av *B. cereus* og *S. typhimurium* i hhv melk og egg ble utført på to måter: i) direkte på prøvematriks tilsatt bakterier (uten DNA isolering) og ii) på isolerte DNA prøver fra prøvematriks tilsatt bakterier. Der hvor deteksjonsgrensen viste $>10^4$ bakterieceller/ml for metode i) ble DNA videre isolert med ekstraksjonskitet QIAamp DNA Stool Mini kit for *S. typhimurium* i egg eller NucliSens® Basic kit for *B. cereus* i melk.

Komplekse prøver ble konstruert ved å tilsette en kjent konsentrasjon av vaskede bakterieceller til egg (hvite og plomme) og melk (lettmelk og H-melk). Til 990 µl av de respektive næringsmidler ble det tilsatt 10 µl av en vasket *S. typhimurium* eller *B. cereus* kultur (10^8 - 10^9 celler/ml). Prøvene ble mikset i 30-60 sekunder. Det ble laget fortyningsserier med konsentrasjoner mellom 10^2 og 10^7 bakterieceller/ml. Melkeprøvene tilsatt *B. cereus* ble beadbeated før videre DNA isolering.

4 Resultater

4.1 Deteksjonsgrenser for *B. cereus*, *S. typhimurium*, *V. cholerae*, *E. coli* og *C. perfringens*

Deteksjonsgrenser for *B. cereus*, *S. typhimurium*, *V. cholerae*, *E. coli* og *C. perfringens* ved optimale PCR betingelser med tilhørende primersett er vist i tabell 4.1. Med unntak av invA-f/r primeren for *S. typhimurium*, var deteksjonsgrensene < 10 celler/PCR-reaksjon. Dette tilsvarer en konsentrasjon på mindre enn 1000 celler/ml av opprinnelig prøve med næringsmidler.

Analysetiden for samtlige PCR-reaksjoner var kortere enn 45 minutter (tilsvarende ca 35 sykluser).

Tabell 4.1. Deteksjonsgrenser ved optimale PCR betingelser.

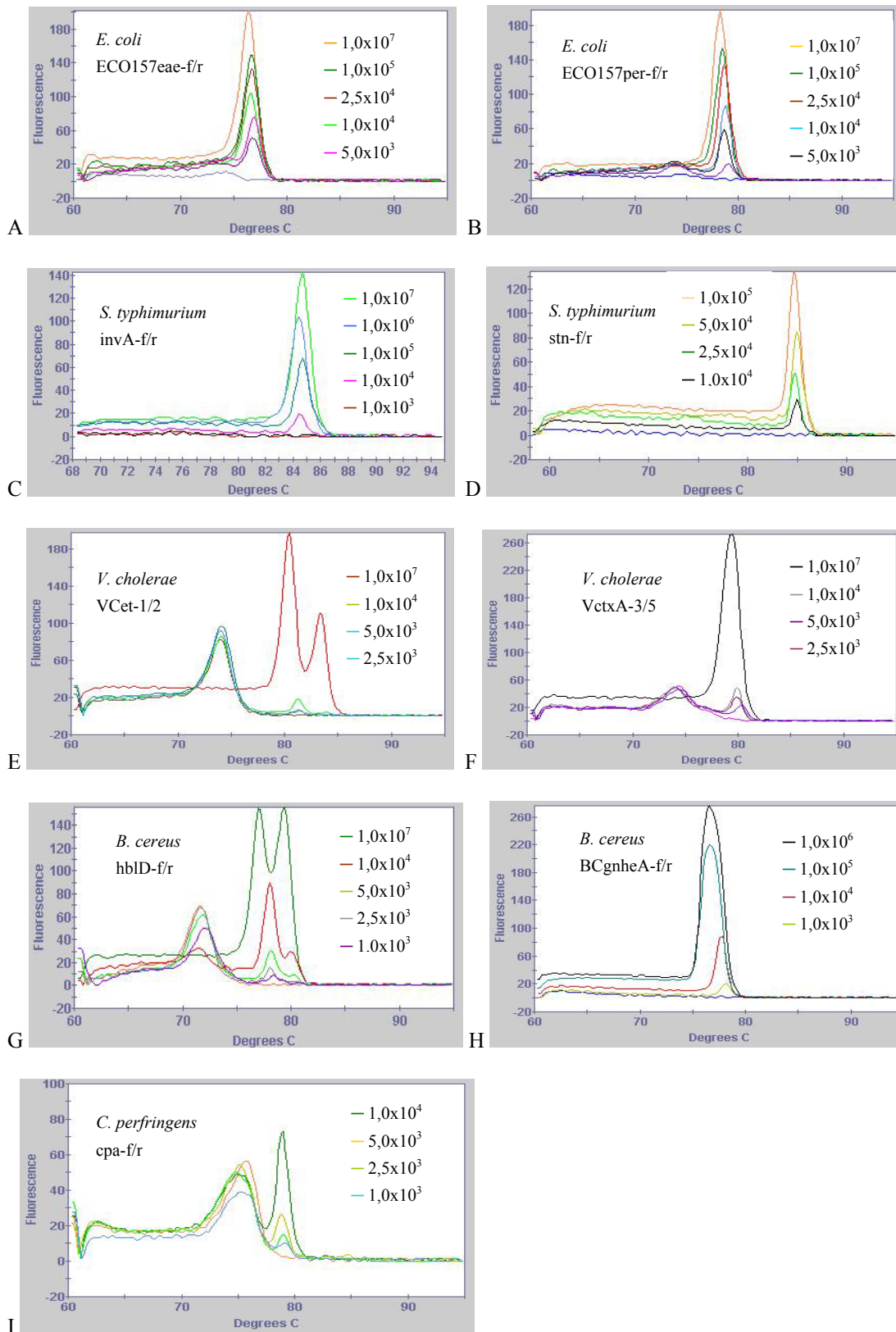
Primerpar	Bakterieart	Primerkons. (μ M)	Mg kons. (mM)	Annealingtemp. ($^{\circ}$ C)	Holdtid ^a (sekunder)	Deteksjonsgrense (celler/ml)
ECO157per-f/r	<i>E. coli</i> O157	1,0	3	58	5-5-15	< 1000
ECO157eae-f/r	<i>E. coli</i> O157	1,0	3	60	5-5-10	< 1000
stn-f/r	<i>S. typhimurium</i>	1,0	2	58	5-10-20	< 1000
invA-f/r	<i>S. typhimurium</i>	1,0	2	55	5-5-20	< 2000
Vcet-1/2	<i>V. cholerae</i>	1,0	3	62	5-10-30	< 1000
VctxA-3/5	<i>V. cholerae</i>	1,0	3	58	5-10-20	< 1000
hblD-f/r	<i>B. cereus</i>	1,5	3	55	5-10-25	< 1000
BCgnheA-f/r	<i>B. cereus</i>	0,5	- ^b	60	5-5-15	< 1000
cpa-1/2	<i>C. perfringens</i>	1,2	2	55	5-10-25	< 1000

^a Holdtid angir tid for oppvarming, annealing og DNA-syntese i PCR reaksjonen.

^b Mg-konsentrasjonen behøver ikke optimaliseres ved bruk av LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche Diagnostics).

Primerne i tabell 4.1 viste noe varierende resultater mht smeltepunktanalysene (fig 4.1). Primersettene ECO157per-f/r og ECO157eae-f/r for *E. coli*, stn-f/r og invA-f/r for *S. typhimurium* og BCgnheA-f/r for *B. cereus* resulterte i veldefinerte smeltepunktssignaler (fig 4.1, A-D og H). Dette viser at primerene dannet kun et produkt og førte til minimalt med primerdimere.

Primersettene VctxA-3/5 og VCet-1/2 (begge *V. cholerae*), cpa-1/2 (*C. perfringens*) og hblD-f/r (*B. cereus*) viste dannelse av dimere ved lave templatkonsentrasjoner (fig 4.1, E-G og I). VCet-1/2 og hblD-f/r dannet også doble smeltepunktssignaler (fig 4.1, E og G). Elektroforese viste imidlertid at samtlige primere ga kun et produkt av forventet lengde (data ikke vist).



Figur 4.1. Smeltepunktsanalyser for bestemmelse av deteksjonsgrenser for *B. cereus*, *S. typhimurium*, *V. cholerae*, *E. coli* og *C. perfringens* med ECO157*eae-f/r* (A), ECO157*per-f/r* (B), *invA-f/r* (C), *stn-f/r* (D), VCet-1/2 (E), VctxA-3/5 (F), *hblD-f/r* (G), BCg*nheA-f/r* (H), *cpa-f/r* (I). Kurvene representerer ulike cellekonsentrasjoner (celler/ml).

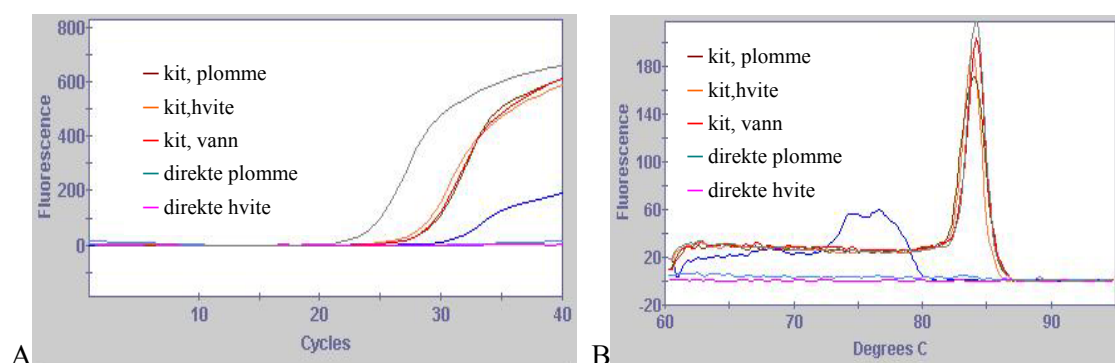
4.2 Analyser av komplekse prøver

Deteksjonsgrenser for real-time PCR-analyse av *S. typhimurium* og *B. cereus* ble bestemt for fire ulike komplekse prøver; eggehvite og eggeplomme (*S. typhimurium*), H-melk og lettmeik (*B. cereus*). Det ble først undersøkt om PCR-analysene kunne utføres direkte på prøvematriksen uten DNA isolering.

4.2.1 *S. typhimurium* i egg

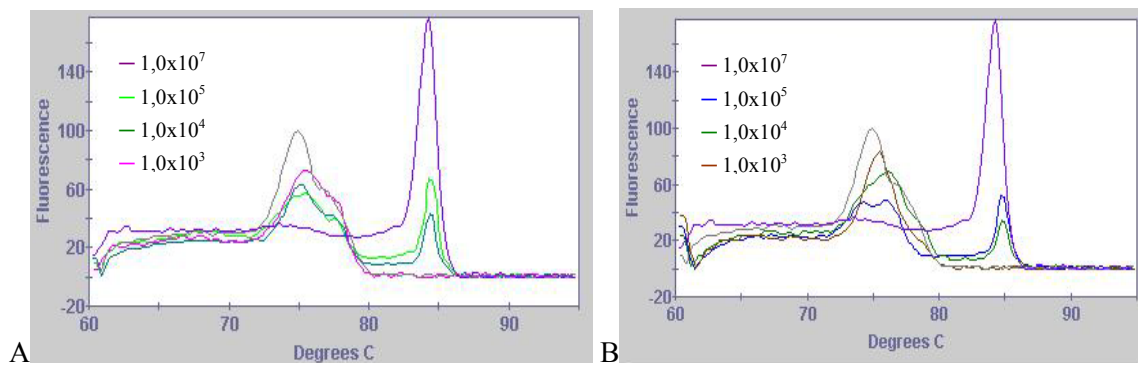
Primeren stn-f/r ble valgt for analyse av *S. typhimurium* i egg fordi den oppnådde den beste deteksjonsgrensen (tabell 4.1). Ingen amplifisering ble oppnådd ved direkte analyse av eggehvite og eggeplomme tilsatt *S. typhimurium* (fig 4.2). Negativ kontroll viste imidlertid amplifisering av primerdimere. Resultatene indikerer at PCR-reaksjonen inhiberes av komponenter tilstede i eggehvite og eggeplomme.

Figur 4.2 viser også at direkte analyse av *S. typhimurium* i vann gav en tidligere amplifisering sammenlignet med prøver der *S. typhimurium* DNA er isolert fra vann. Dette kan tyde på at DNA tapes under ekstraksjonen når Qiagen kitet benyttes.



Figur 4.2. Analyse av *S. typhimurium* (10^7 celler/ml) med stn-f/r primersettet, direkte og etter DNA-isolering i eggehvite, eggeplomme og vann. A; PCR, B: smeltepunktanalyse.

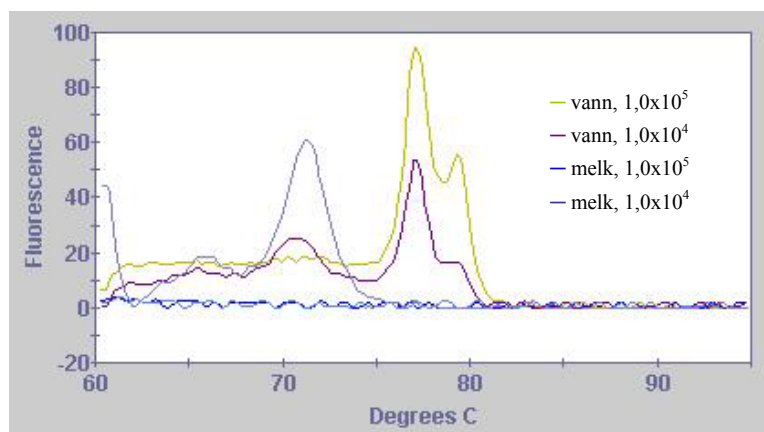
Figur 4.3 viser at *S. typhimurium* kan detekteres ned til 10^4 celler/ml i både eggehvite og eggeplomme etter DNA isolering med QIAamp DNA Stool Mini kit.



Figur 4.3. Bestemmelse av deteksjonsgrense for *S. typhimurium* tilsatt i eggehvite (A) og eggeplomme (B). Konsentrasjoner oppgitt i celler/ml.

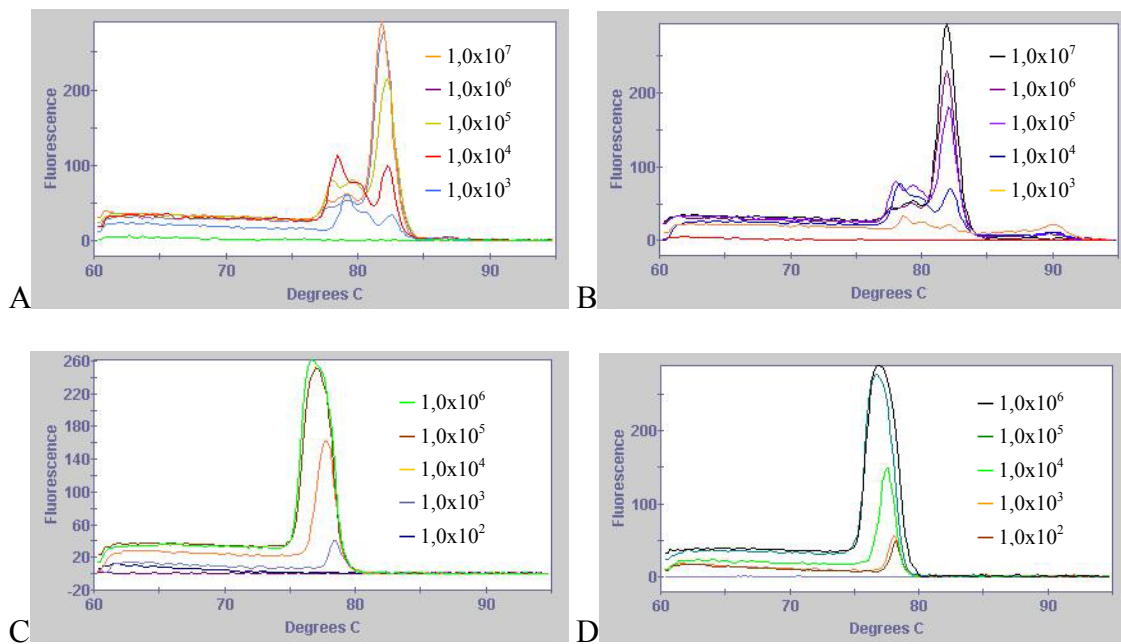
4.2.2 *B. cereus* i melk

Direkte PCR analyse av *B. cereus* tilsatt i melk (sluttkonsentrasjoner; 10^4 og 10^5 celler/ml) viste at ingen amplifisering ble oppnådd med primeren hblD-f/r (fig 4.4).



Figur 4.4. Direkte PCR-analyse av *B. cereus* i vann og melk med hblD-f/r primeren. Konsentrasjoner; 10^4 og 10^5 celler/ml.

DNA fra melkeprøver med en sluttkonsentrasjon av *B. cereus* mellom 10^2 og 10^7 celler/ml ble isolert med ekstraksjonskitet fra NucliSens. PCR-analyser av H-melk og lettmelk var positive ned til 10^3 celler/ml der hvor hblD-f/r primeren ble benyttet. Ved den laveste konsentrasjonen (10^3 celler/ml) var amplifiseringen svak, og smeltepunktssignalet kunne tyde på dimerdannelse eller uspesifikk amplifisering (fig 4.5, A og B). BCgnheA-f/r primeren ga amplifisering og veldefinerte smeltepunktssignaler ned i 10^3 celler/ml i H-melk og lettmelk (fig 4.5, C og D). Det var vanskelig å oppnå god reproducerbarhet ved 10^2 - 10^3 celler/ml.



Figur 4.5. Påvisning av *B. cereus* i melk etter DNA ekstraksjon med kit fra NucliSens. Konsentrasjoner mellom 10^2 og 10^7 celler/ml melk. A; *hblD* primer og H-melk, B; *hblD* primer og lettmelk, C; *BCgnheA* primer og H-melk, D; *BCgnheA* primer og lettmelk.

5 Diskusjon

I dag benyttes vanligvis tradisjonelle mikrobiologiske analyser for påvisning av næringsmiddelpatogener i Forsvarets feltlaboratorier. Metodene er godt gjennomarbeidet og enkelte har svært lave deteksjonsgrenser. Ulempen er at metodene ofte kan være tidkrevende mht dyrkning av bakteriene for videre undersøkelser med mikroskopering, farging, biokjemiske tester og tilsvarende metoder. Siden molekylære metoder har vesentlig kortere analysetid vil man kunne oppnå analyseresultater på et tidligere tidspunkt. Dette er en stor fordel under smitteoppsporing eller i forbindelse med kontroll av næringsmiddelhygiene. Ved sykdomstilfeller med veldefinerte kliniske trekk kan supplerende PCR-analyser bekrefte smitemistanke på et tidlig tidspunkt slik at medisinsk behandling kan raskere iverksettes. Utføres PCR-analyser som en del av næringsmiddelkontrollen, vil en indikasjon på kontaminering kunne foreligge etter kort tid. Mat som er under mistanke vil da være mulig å fjerne før den serveres.

Det er nødvendig å evaluere PCR-primere mot flere nært beslektede bakteriestammer og arter. Tidligere studier har vist at primersettene *invA-f/r*, *stn-f/r*, *cpa-1/2* og *VCet-1/2* er spesifikke ved uttesting mot flere ulike stammekolleksjoner (se referanser i tabell 3.1). Hansen og Hendriksen (2001) fant at primeren *hblD-f/r* kun kunne detektere 8 av 22 *B. cereus* stammer og 2 av 41 *B. thuringiensis* stammer. Dette skyldes at mange *B. cereus* og *B. thuringiensis* stammer mangler hemolysingenet (tabell 3.1). En annen ulempe er at primeren ikke er spesifikk for *B. cereus* og fører til amplifisering av flere nært beslektede arter. Det skyldes at *Bacillus* arter i *B. cereus*

gruppen¹¹ er genetisk meget like og kan føre til problemer mht konstruksjon av artsspesifikke primere. FFI har konstruert et nytt primersett som indikerer god spesifisitet mot *B. cereus* gruppen (BCgnheA-f/r). PCR ved bruk av BCgnheA-f/r primersettet krever ytterligere tester for å avkrefte eventuell tilstedeværelse av *B. thuringiensis* eller *B. anthracis*.

ECO157per-f/r fører til amplifisering for 7 av 8 undersøkte *E. coli* O157 stammer og gir ingen PCR-reaksjon for 19 andre ikke-O157 *E. coli* stammer (O'Hanlon et al., 2004). Dette viser at selv om primersettet trolig er spesifikt, så bør det utføres flere uttestinger. ECO157eae-f/r primersettet er testet mot 13 *E. coli* O157 stammer og synes å være spesifikk. Allikevel viser studien at 16 % av de testede stammene ga falske positive PCR resultater (Sharma et al., 1999). Primeren Vctx-3/5 er kun testet mot én *V. cholerae* stamme. Dette primersettet bør evalueres ytterligere.

Generelt er det et omfattende og tidkrevende arbeid å evaluere og definere spesifisiteten til PCR-primere. Dette skyldes at forskningslaboratoriene ofte ikke har tilstrekkelige stammekolleksjoner av ulike bakteriearter som det er ønskelig å etablere PCR-protokoller for. Det finnes godt validerte PCR-primersett i litteraturen, men dette gjelder ikke for alle bakteriearter. Gode kontaktrelasjoner med andre forskningsinstitutter eller etater som har stammekolleksjoner er derfor viktig. Nasjonale og internasjonale import- og eksportreglementer setter også begrensinger for utveksling av bakteriekolleksjoner. Disse er etablert for å forhindre at farlige mikroorganismer er tilgjengelige for personer som ønsker å misbruke dem.

Optimalt sett bør PCR kunne detektere bakteriekonsentrasjoner i mat som ved inntak kan føre til infeksjoner hos mennesker. Som utgangspunkt for en slik vurdering er en del infeksjøs dose for næringsmiddelpatogener angitt i tabell 2.2. For *B. cereus* er denne dosen oppgitt å være mellom 10^5 og 10^7 bakterier totalt (Granum 1999). Inntak av en slik dose via melk (200-300 ml) vil gi en konsentrasjon av bakterier på 5×10^2 - 5×10^4 celler/ml melk. I denne studien var deteksjonsgrensen på 10^3 celler/ml for *B. cereus* i melk. Dette indikerer at real-time PCR metoden ved FFI kan benyttes for å identifisere infeksjøs dose av *B. cereus*.

Blaser og Newman (1982) rapporterte en gjennomsnittlig infeksjøs dose av *Salmonella* spp. til totalt 10^6 bakterier. Hvis dette antallet av bakterieceller opptrer i et egg (ca 60 ml), vil konsentrasjonen bli $1,6 \times 10^4$ celler/ml egg. FFI oppnådde en deteksjonsgrense på 10^4 celler/ml for *S. typhimurium*. Også her kan real-time PCR-metoden benyttes for identifikasjon av infeksjøs dose av *S. typhimurium*. FFI har benyttet melk og egg som to mulige scenarier hvor inntak av infisert mat vil kunne føre til infeksjoner. I dette arbeidet har resultatene vist at påvisning med real-time PCR i forkant av sykdomsutbrudd er mulig i disse to tilfellene. I tilfeller der bakterieinnholdet i maten er lavt, vil analysearbeidet bli mer krevende. Der hvor *E. coli* O157:H7 fører til infeksjon vil det ofte være behov for anriking av prøven (Benediktsson og John 2006) før PCR analysen kan gi noen kvalitative svar. Slike stammer kan gi alvorlige infeksjoner selv ved doser under 50 celler (Tilden et al., 1996).

¹¹ *B. cereus* gruppen består av *B. cereus*, *B. thuringiensis*, *B. anthracis*, *B. mycoides* og *B. weihenstephanensis*.

Det eksisterer et betydelig antall kommersielle DNA isolerings kit på markedet. De fleste er beregnet på isolering av DNA fra kliniske prøvematrikser. Noen kit er beregnet på næringsmidler slik som High Pure GMO Sample Preparation kit (Roche), NucleoSpin® Food Purification Kit (Clontech) og Invisorb® Spin Food Kits (Invitek). Til tross for at næringsmiddellaboratoriene har utført analyse av sykdomsfremkallende mikrober i næringsmidler i mange tiår, er isolering av DNA direkte fra den mikrobielle flora uten anriking en relativ ny metode. Innledningsvis ble kitet Bugs'n Beads™ fra Genpoint testet. FFI har tidligere forsøkt å bruke dette kitet for isolering av bakterier fra jord. Forsøkene med melk i denne studien resulterte i redusert DNA-utbytte fra ekstraksjonen. Kitene fra Qiagen og NucliSens ble derfor benyttet videre. Det ble vist at Qiagen kitet førte til lavere DNA konsentrasjon etter ekstraksjon sammenlignet med den opprinnelige prøven (fig 4.2). Dette er ikke akseptabelt da slike kit skal oppkonsentrere DNA i tillegg til å fjerne inhibitorer fra prøven. Basert på erfaringer med isoleringskitet fra NucliSens for isolering av *B. cereus* DNA i melk burde dette kitet vært benyttet for ekstraksjon av *Salmonella* DNA fra egg. Det anbefales å teste flere kit for å evaluere videre og verifisere valg av kit.

Det er betydelig fokus på teknologiutviklingen av analyseinstrumenter til feltbruk (Blatny et al., 2006), men dessverre vesentlig mindre på prøveopparbeidelsen som er en viktig forutsetning for en rekke slike analyser. Denne studien har vist at det er ofte nødvendig med DNA isolering i forkant av PCR analyser for ulike næringsmidler. Slik prøveopparbeidelse krever at feltlaboratoriene har tilstrekkelig plass, utstyr og apparatur for å gjøre denne typen arbeid. Feltinstrumenter gjøres mer praktiske i bruk ved anvendelse av forbruksvarer i plast og ferdigblandede frysetørkede reagenser. På samme måte bør også opparbeidelsesmetodene gjøres feltvennlige gjennom enkle og effektive isoleringskit eller rensekit.

Ved en eventuell videreføring av arbeidet i denne rapporten bør minimum to PCR primersett optimaliseres for hvert patogen, samt at analysene inkluderer bruk av spesifikke hybridiseringsprober. Slike prober er korte enkeltrådig DNA-biter som binder spesifikt til PCR-produkter og gir et fluorescenssignal. Signalet kan avleses i PCR-instrumentet og på den måten verifiserer PCR-produktet. Implementering av hybridiseringsprober i PCR-analysene vil ikke medføre forlengelse av analysetiden. Etablering av metoder for DNA isolering i overflate- og drikkevannsprøver vil også være av interesse i forbindelse med næringsmiddelkontroll. FFI har blant annet jobbet med påvisning av ulike næringsmiddelpatogener fra drikkevannsreservoar (Thomassen 2006).

Validerte PCR-analyser med definerte deteksjonsgrenser og analyseforløp (form på smeltepunktssignalet) må benyttes for å minimere faren for feiltolking av PCR-resultatene. Personell med generell forståelse av molekylære metoder er derfor viktig. Vurdering av doble smeltepunktssignal og primerdimer, som ble demonstrert i optimaliseringsarbeidet i denne studien (fig 4.1), kan være vanskelig. Slike hendelser kan opptre ved konsentrasjoner nær deteksjonsgrensen, ved inhibering pga forurensinger i prøvematriksen eller når mindre optimale primere benyttes.

6 Konklusjon

Denne rapporten beskriver en studie for bruk av real-time PCR for påvisning av utvalgte sykdomsfremkallende bakterier i næringsmidler. Rapporten beskriver isolering av nukleinsyrer fra matpatogenene *B. cereus* og *S. typhimurium* i hhv melk og egg. Analysene er utført ved hjelp av et SmartCycler® PCR instrument. Deteksjonsgrensen for identifisering av *B. cereus* i melk (H- og lett melk) og *S. typhimurium* i egg (hvite og plomme) ble bestemt til henholdsvis 10^3 og 10^4 celler/ml. Betingelser for real-time PCR-reaksjoner optimalisert og klargjort for påvisning av *V. cholerae*, *E. coli* O157 og *C. perfringens*. Metodene som fremkommer i studien kan vurderes som supplement til eksisterende mikrobiologiske analyser som allerede er implementert i Forsvarets feltlaboratorier.

Primerene *invA*-f/r og *stn*-f/r er velegnede primere for analyse av *S. typhimurium*. *VCet-1/2* (*V. cholerae*) og *cpa-1/2* (*C. perfringens*) har god spesifisitet, men smeltepunktssignalene er ikke optimale. Primerne for påvisning av *E. coli* (*ECO157per*-f/r og *ECO157eae*-f/r), *V. cholerae* (*Vctx-3/5*) og *B. cereus* (*BCgnheA*-f/r) har veldefinerte smeltepunktssignaler, men er kun testet mot et mindre antall stammer. Disse bør evalueres ytterligere. Primeren *hbID*-f/r (*B. cereus*) har lav spesifisitet og tvetydig smeltepunktssignal. Denne markøren bør erstattes.

Det bør gjennomføres en mer omfattende evaluering av prøveopparbeidelsen av næringsmidler. Tilgjengelige DNA isolerings- og rensekit bør testes mot hverandre for aktuelle næringsmidler og eventuelt miljøprøver. I forbindelse med disse testene bør utstyrs- og plassbehov vektlegges slik at prosedyrene er praktisk mulig å implementere i feltlaboratorier. Flere primere og hybridiseringsprober bør også konstrueres og testes.

7 Acknowledgements

Mesteparten av det praktiske arbeidet ble utført av de vernepliktige akademiske befalene (VAB) Jostein Sjaastad og Svein Stueland (mai 2005 - mai 2006), samt studentene Sunil John og Cecilie Bendiksson (februar 2006- mai 2006). En stor takk rettes til Bjørg Langseth for veiledning av befal og studenter.

Referanser

Benediktsson C, John S (2006): Påvisning av patogene bakterier i matvarer ved bruk av real-time PCR. Prosjektoppgave, Høgskolen i Oslo.

Blaser M J, Newman L S (1982): A review of human salmonellosis: I. Infective dose. *Rev Infect Dis*, **4** (6), 1096-1106.

Blatny J M, Fykse E M, Olsen J S (2006): Påvisning av biologiske trusselstoffer – teknologispill til FS 07. FFI/RAPPORT-2006/01483.

Brenner F W, Villar R G, Angulo F J, Tauxe R, Swaminathan B (2000): *Salmonella* nomenclature. *J Clin Microbiol.* **38** (7), 2465-2467.

Fach P and Popoff M R (1997): Detection of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in food and fecal samples with a duplex PCR and the slide latex agglutination test. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**, 4232-4236.

Fields P I, Popovic T, Wachsmuth K, Olsvik O (1992): Use of polymerase chain reaction for detection of toxigenic *Vibrio cholerae* O1 strains from the Latin American cholera epidemic. *J Clin Microbiol.* **30** (8), 2118-2121.

Fykse E M, Olsen, J S, Skogan G (2004): Påvisning av biologiske stridsmidler ved bruk av real-time PCR. FFI/RAPPORT-2004/04247.

Fykse E M, Skogan G, Davies W, Olsen J S, Blatny J M (2006): Detection of *Vibrio cholerae* by Real-Time Nucleic Acid Sequence –Based Amplification. *Appl Environ Microbiol.* (in prep).

Granum, P E (1999). Smittsomme sykdommer fra mat. Næringsmiddelbårne infeksjoner og intoksinasjoner. 2 utgave. Granum P E (Red). Høyskoleforlaget AS.

Hansen B M, Hendriksen N B (2001): Detection of enterotoxic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis, *Appl Environ Microbiol.* **67** (1), 185-189.

Helgason E, Okstad O A, Caugant D A, Johansen H A, Fouet A, Mock M, Hegna I, Kolsto A B (2000): *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* –one species on the basis of genetic evidence. *Appl Environ Microbiol.* **66** (6), 2627-2630.

Hernandez E, Ramisse F, Ducoureau J P, Cruel T, Cavallo J D (1998): *Bacillus thuringiensis* subsp. konkukian (serotype H34) superinfection: case report and experimental evidence of pathogenicity in immunosuppressed mice. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2138-2139.

- Jackson S G, Goodbrand R B, Ahmed R, Kasatiya S (1995): *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation. *Lett Appl Microbiol.* **21** (2), 103-105.
- Kolavic S, Kimura A, Simons S, Slutsker L, Barth S, Haley C (1997): An outbreak of *Shigella dysenteriae* Type 2 among laboratory workers due to intentional contamination, *JAMA* **278**, 396-398.
- Makino S, Kurazono H, Chongsanguam M, Hayashi H, Cheun H, Suzuki S, Shirahata T.(1999): Establishment of the PCR system specific to *Salmonella* spp. and its application for the inspection of food and fecal samples. *J Vet Med Sci.* **61** (11), 1245-1247.
- Nasjonalt folkehelseinstitutt (2006 b): Utbrudd av infeksjoner med *Salmonella Kedougou*: sluttrapport for etterforskningen. Rapport til Mattilsynet og Sosial- og helsedirektoratet. SMAO 21.06.06.
- Nasjonalt Folkehelseinstitutt, Veterinærinstituttet, Norges Veterinærhøgskole (2006 a): *E. COLI* O103 - UTBRUDET 2006 OPPSUMMERING AV SPEKEPØLSESPORET. Arbeidsrapport 09-06-2006
- O'Hanlon K A, Catarama T M, Duffy G, Blair I S, McDowell D A (2004): RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *J Appl Microbiol.* **96** (5), 1013-1023.
- Rahn K, De Grandis S A, Clarke R C, McEwen S A, Galan J E, Ginocchio C, Curtiss R 3rd, Gyles C L (1992): Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. *Mol Cell Probes* **6** (4), 271-279.
- Ramisse V, Patra G, Garrigue H, Guesdon J L, Mock M (1996): Identification and characterization of *Bacillus anthracis* by multiplex PCR analysis of sequences on plasmids pXO1 and pXO2 and chromosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **145** (1), 9-16.
- Saiki R K, Scharf S, Faloona F, Mullis K B, Horn G T, Erlich H A, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* **20** 230 (4732), 1350-1354.
- Sharma V K, Dean-Nystrom E A, Casey T A (1999): Semi-automated fluorogenic PCR assays (TaqMan) for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and other shiga toxigenic *E. coli*. *Mol Cell Probes.* **13** (4), 291-302.

Thomassen G M B (2006): Påvisning av biologiske agens i vannprøver. Masteroppgave i teknologi, Norges teknisk-vitenskapelige universitet.

Tilden J, Young W Jr, McNamara A M, Custer C, Boesel B, Lambert-Fair M A, Majkowski J, Vugia D, Werner S B, Hollingsworth J, Morris J G Jr (1996): A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. *Am J Public Health*. **86** (8 Pt 1), 1142–1145.

Török T, Tauxe R, Wise R, Livengood J, Sokolow R (1997): A large community outbreak of salmonellosis caused by intentional contamination of restaurant salad bars. *JAMA* **278**, 389-395.

Wang R F, Cao W W, Cerniglia C E (1997): A universal protocol for PCR detection of 13 species of foodborne pathogens in foods. *J Appl Microbiol*. **83** (6), 727-736.

Appendix A

Protokoll for: QIAamp® DNA Stool Mini kit

1. Weigh 180–220 mg stool in a 2 ml microcentrifuge tube (not provided) and place the tube on ice.
If the sample is liquid, pipet 200 µl into the microcentrifuge tube. Cut the end of the pipet tip to make pipetting easier.
If the sample is frozen, use a scalpel or spatula to scrape bits of stool into a 2 ml microcentrifuge tube on ice.
Note: When using frozen stool samples, take care that the samples do not thaw until Buffer ASL is added in step 2 to lyse the sample; otherwise the DNA in the sample may degrade. After addition of Buffer ASL, all following steps can be performed at room temperature.
2. Add 1.4 ml Buffer ASL to each stool sample. Vortex continuously for 1 min or until the stool sample is thoroughly homogenized.
Note: It is important to vortex the samples thoroughly. This helps ensure maximum DNA concentration in the final eluate.
3. Heat the suspension for 5 min at 70°C.
This heating step increases total DNA yield 3- to 5-fold and helps to lyse bacteria and other parasites. The lysis temperature can be increased to 95°C for cells that are difficult to lyse (such as Gram-positive bacteria).
4. Vortex for 15 s and centrifuge sample at full speed for 1 min to pellet stool particles.
5. Pipet 1.2 ml of the supernatant into a new 2 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the pellet.
Note: The 2 ml tubes used should be wide enough to accommodate an InhibitEX tablet (e.g., Eppendorf Safe-Lock, cat. no. 0030120.094 or Sarstedt Safe-Seal, cat. no. 72.695).
Transfer of small quantities of pellet material will not affect the procedure.
6. Add 1 InhibitEX tablet to each sample and vortex immediately and continuously for 1 min or until the tablet is completely suspended. Incubate suspension for 1 min at room temperature to allow inhibitors to adsorb to the InhibitEX matrix.
7. Centrifuge sample at full speed for 3 min to pellet inhibitors bound to InhibitEX.
8. Pipet all the supernatant into a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and discard the pellet. Centrifuge the sample at full speed for 3 min.
Transfer of small quantities of pellet material from step 7 will not affect the procedure.
9. Pipet 15 µl Proteinase K into a new 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided).
10. Pipet 200 µl supernatant from step 8 into the 1.5 ml microcentrifuge tube containing Proteinase K.
11. Add 200 µl Buffer AL and vortex for 15 s.
Note: Do not add Proteinase K directly to Buffer AL.
It is essential that the sample and Buffer AL are thoroughly mixed to form a homogeneous solution.
12. Incubate at 70°C for 10 min.
Optional: Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.
13. Add 200 µl of ethanol (96–100%) to the lysate, and mix by vortexing.
Optional: Centrifuge briefly to remove drops from the inside of the tube lid.
14. Label the lid of a new QIAamp spin column placed in a 2 ml collection tube.
Carefully apply the complete lysate from step 13 to the QIAamp spin column without moistening the rim. Close the cap and centrifuge at full speed for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the tube containing the filtrate.
Close each spin column in order to avoid aerosol formation during centrifugation. If the lysate has not completely passed through the column after centrifugation,

- centrifuge again until the QIAamp spin column is empty.
- Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW1. Centrifuge at full speed for 1 min. Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube, and discard the collection tube containing the filtrate.

- Carefully open the QIAamp spin column and add 500 µl Buffer AW2. Centrifuge at full speed for 3 min. Discard the collection tube containing the filtrate.

Note: Residual Buffer AW2 in the eluate may cause problems in downstream applications. Some centrifuge rotors may vibrate upon deceleration, resulting in the flow-through, which contains Buffer AW2, contacting the QIAamp spin column. Removing the QIAamp spin column and collection tube from the rotor may also cause flow-through to come into contact with the QIAamp spin column. In these cases, the optional step below should be performed.

Optional: Place the QIAamp spin column in a new 2 ml collection tube (not provided). Centrifuge at full speed for 1 min. Discard the collection tube containing the filtrate.

- Transfer the QIAamp spin column into a new, labeled 1.5 ml microcentrifuge tube (not provided) and pipet 200 µl Buffer AE directly onto the QIAamp membrane. Incubate for 1 min at room temperature, then centrifuge at full speed for 1 min to elute DNA.

Note: When using eluates in PCR, for maximum PCR robustness we highly recommend adding BSA to a final concentration of 0.1 µg/µl to the PCR mixture. For maximum PCR specificity we recommend using QIAGEN HotStarTaq DNA Polymerase (see ordering information on page 38). For best results in downstream PCR, use the minimum amount of eluate possible in PCR; the volume of eluate used as template should not exceed 10% of the final volume of the PCR mixture. Also, note that high amounts of template DNA may inhibit the PCR.

DNA yield is typically 15–60 µg but, depending on the individual stool sample and the way it was stored, may range from 5 to 100 µg. DNA concentration is typically 75–300 ng/µl.

For more information about elution and how to determine DNA yield, purity, and length, see page 11.

For long-term storage, keeping the eluate at –20°C is recommended.

Appendix B

Protokoll for: NucliSens Basic Kit procedure

1. Spin Lysis Buffer tubes containing sample at a speed and time required to spin all fluid down to the bottom of the tubes, e.g.:
 - 0.9ml tubes for 30 sec at 10000g
 - 9 ml tubes for 2 min at 2000g

Note: Before spinning, frozen Lysis buffer tubes should be thawed at room temperature. Mix thoroughly and make sure that any crystals have dissolved.
2. For the PC Lysis Buffer tube:
 - Spin the PC Lysis Buffer tube (see step 1).
 - Add 100µl or 1000 µl of the appropriate amount of the applicable matrix (eg. plasma) to a 0.9ml Lysis Buffer tube or 9ml Lysis Buffer tube, respectively.
 - Spin the PC Lysis Buffer tube (see step 1).
 - Add 20µl PC RNA (undiluted or 100-fold diluted).
 - Vortex (0.9ml tube) or repeatedly invert (9ml tube).
 - Spin the Lysis Buffer tube (see step 1).
3. For each target RNA and the PC Lysis Buffer tube:
 - Vortex the silica suspension until an opaque solution has formed.
 - Add 50µl silica suspension.
 - Vortex (0.9ml tubes) or repeatedly invert (9ml tubes).
4. Leave Lysis Buffer tubes for 10+/- 1 min at room temperature (15 to 30°C).

Note: Vortex or invert Lysis Buffer tubes regularly, e.g. every two minutes, to prevent silica from settling on the bottom.
5. Spin Lysis Buffer tubes (see step 1).

Note: Use two different pipettes (1000µl disposable tips) in steps 6 and 7; use one of these exclusively to remove supernatant (steps 6 and 7) and the other one exclusively for the addition of wash fluids (step7). Use new sterile tips for every pipetting steps.
6. Remove the supernatant from the Lysis Buffer tubes:
 - For each 0.9ml Lysis Buffer tube:
 - Remove the supernatant with the first 1000µl disposable tip pipette, using a new sterile tip: avoid disturbing the pellet.
 - For each 9ml Lysis Buffer tube:
 - Carefully decant all supernatant from the Lysis Buffer tube into a fresh disposable 10ml tube with screw cap. Make sure not to lose any of the silica pellet!
 - Close disposable 10ml tube and discard.
7. Wash the silica pellet in the Lysis Buffer tube according to the following procedure:
 - Add 1 ml of Wash Buffer to each tube with the second 1000µl disposable tip pipette.

Note: If 9ml Lysis Buffer tubes are used, after the first addition of wash Buffer and subsequent resuspension by vortexing, transfer the contents of each 9ml Lysis Buffer tube to a fresh 1.5ml tube. For transfer, use a disposable pipette for each Lysis Buffer tube. No transfer is required for 0.9ml Lysis Buffer tubes.

 - Vortex tubes until the pellets have resuspended completely.
 - Spin tubes (see step 1).
 - Remove the supernatant with the first 1000µl disposable tip pipette, using a new sterile tip for each tube.
 - Repeat this wash procedure:
 - once with Wash Buffer
 - twice with 70% ethanol
 - once with acetone

Note: If any wash fluid is spilled, replace the tube rack by a clean one.

- After the final wash step, carefully remove any residual acetone with a 100µl pipette, using a new tip for each tube.
 - Both 0.9ml Lysis Buffer tubes and 1.5ml tubes are referred to as tubes in the following.
8. Dry the silica pellets in open tubes at 56 +/- 1°C for 10 +/- 1 min in a heating block.
Note: Cover the tubes with a tissue to avoid contamination.
 9. Check if silica pellets are dry (i.e. the tube should contain a white silica pellet which crumbles when the tube is flicked with the finger).
Note: Residual acetone may influence the test results.
 10. When dry, add 50µl Elution Buffer to each tube.
 11. Vortex the tubes until the pellets have resuspended completely.
 12. Leave the resuspended silica for 10 +/- 1 min at 56 +/- 1°C to elute the nucleic acid.
Note: Vortex the tubes after five minutes of incubation to prevent silica from settling on the bottom.
 13. Centrifuge the tubes 2 min at 10000g.
 14. Transfer 5µl of each of the nucleic acid supernatants to a fresh tube and use in an amplification procedure within 1 hour.
Note: If any resuspension of silica is suspected, spin the tube again before transfer of supernatant.
Remaining supernatant and nucleic acid extracts that cannot be used for amplification within 1 hour after preparation can be stored without removing the silica pellet (as a back-up) at -70°C for up to one month.
Storage of smaller quantities of nucleic acid supernatant (i.e. 5µl) is not recommended.
 15. Transfer the tubes containing the 5µl aliquots of the nucleic acid extracts in a clean tube rack to the amplification laboratory area.