

Nová metoda pro rychlou detekci *Listeria monocytogenes* v potravinách*

KAMILA ZDEŇKOVÁ, GABRIELA JENÍKOVÁ, JARMILA PAZLAROVÁ a KATEŘINA DEMNEROVÁ

*Institute of Chemical Technology – Department of Biochemistry and Microbiology, Prague,
Czech Republic*

Abstract

ZDEŇKOVÁ K., DEMNEROVÁ K., JENÍKOVÁ G., PAZLAROVÁ J. (2000): A new method for rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food. Czech J. Food Sci., 18: 103–109.

Listeria monocytogenes represents serious danger for human health. Thus detection of this pathogen in food, which represents its main means of entry into the organism, is a topic of special importance. The original classic methods for the determination of *Listeria monocytogenes* are in general laborious and time-consuming procedures. In order to address this issue we developed a new rapid method for specific detection of *Listeria monocytogenes* in food samples. The method consists of three steps: i) enrichment of food microflora (16 h), ii) selective isolation of *Listeria* sp. exploiting immunomagnetic separation (2–3 h) followed by iii) precise identification of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* using duplex PCR. PCR primers specific to part of 16S rRNA were used in order to identify the members of *Listeria* genus. The specific identification of *Listeria monocytogenes* was accomplished exploiting a pair of primers specific to gene encoding invasion-associated protein – *iap* (4–5 h). Amplification products, 1003 bp and 593 bp respectively, were separated by electrophoresis and visualized by UV detection. The optimized IMS-PCR method was used to test the presence of *Listeria* sp. and *Listeria monocytogenes* in food samples (ground meat, low-fat milk and cheese [olomoucké tvarůžky]). A comparison of the efficiency of the bacteria enrichment step by IMS and centrifugation was also performed. The analysis time including enrichment is less than 24 h. The detection limit for *Listeria monocytogenes* was found between 10^1 – 10^2 cfu per 25 g of food sample.

Key words: *Listeria monocytogenes*, food sample, immunomagnetic separation (IMS), polymerase chain reaction (PCR)

Souhrn

ZDEŇKOVÁ K., DEMNEROVÁ K., JENÍKOVÁ G., PAZLAROVÁ J. (2000): Nová metoda pro rychlou detekci *Listeria monocytogenes* v potravinách. Czech J. Food Sci., 18: 103–109.

Listeria monocytogenes patří mezi nejobávanější patogeny v potravinářském průmyslu. Protože standardní normativní metoda důkazu *Listeria monocytogenes* v potravinách je pracná a časově náročná, je kladen velký důraz na vývoj rychlé specifické metody na jeho detekci. Proto jsme vyvíjeli nový detekční systém – magnetickou imuno-polymerasovou reakci. Prvním krokem nově vyvíjené metody je nabohacení potravinové mikroflóry spojené s filtrací potravinového vzorku (16 h). Poté následuje selektivní separace bakterií rodu *Listeria* pomocí imunomagnetické separace (2–3 h). Identifikace bakterií rodu *Listeria* a druhu *Listeria monocytogenes* byla provedena metodou duplex PCR. K identifikaci *Listeria monocytogenes* byly použity primery komplementární k sekvenci genu kódujícího *iap* (invasion associated protein). K identifikaci příslušníků rodu *Listeria* byly použity primery komplementární k části 16S rRNA těchto bakterií. Produkty amplifikace (593 bp a 1003 bp) byly separovány pomocí agarosové elektroforézy a vizualizovány UV detekcí. Po optimalizaci byly navržená metoda aplikována na mleté maso, nízkotučné mléko a olomoucké tvarůžky. Pro zjištění účinnosti IMS byl stejný vzorek zpracován centrifugací a PCR. Popsanou metodou bylo dosaženo zkrácení doby stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách ze 3–6 dní na méně než 24 hodin. Dosažená citlivost vyvíjené metody je 10^1 – 10^2 cílového mikroorganismu ve 25 g potravinového vzorku.

Klíčová slova: *L. monocytogenes*; potravinové vzorky; imunomagnetická separace (IMS); polymerasová řetězová reakce (PCR)

*Práce byla sponzorována z prostředků grantu INCO/COPERNICUS ERBICI15CT961013 a MŠMT OK 293.

Onemocnění vyvolané bakteriální kontaminací potravin bakteriemi *Listeria monocytogenes* jsou velmi závažná a zasahují specifické skupiny populace – staré lidi, děti, těhotné ženy a osoby se sníženou imunitou (BEDNÁŘ *et al.* 1996). Pro vysokou mortalitu (okolo 30 %) je listerióza považována za jedno z nejtěžších potravinami se šířících onemocnění.

V současnosti je rod *Listeria* členěn do sedmi druhů (MILLER 1990): *L. monocytogenes*, *L. gray*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. ivanovii*, *L. muray* a *L. welshimeri*. Pro člověka je patogenní pouze *Listeria monocytogenes*, která snáší široké rozmezí pH (od 5,5 do 9,0), roste i v prostředí 10% NaCl a pro své rozmnožování potřebuje vodní aktivitu nad 0,95. Roste v širokém rozmezí teplot (0–45 °C, optimální teplota růstu je 30–37 °C), ale teploty nad 70 °C ji ničí během několika minut. Mrazírenské teploty listerie konzervují a proto představují zvláštní hrozbu pro potravinářský průmysl (WAITES & ARBUTHNOTT 1991).

Listerie jsou rozšířené v přírodě a často se nacházejí v půdě, rostlinách, v pokožce živočichů a v odpadních vodách (DONACHIE, LEW 1997). Přenos listeriosy je v podstatě možný třemi způsoby: přímým kontaktem s nemocným zvířetem, sekundární infekcí u novorozenců, převážně však konzumací kontaminované potravy. Zdrojem listerií bývá nepasterizované mléko a mléčné výrobky (olomoucké tvarůžky, bryza), maso (čajovka), zelenina a ryby. Přestože potraviny způsobující onemocnění jsou poměrně různorodé, lze říci, že většina z nich patří do kategorie určené ke spotřebě bez další úpravy (ready-to-eat).

Problematika *Listeria monocytogenes* se stala v humaní medicíně aktuální především koncem sedmdesátých let, kdy se ve světě v poměrně krátké době objevila řada epidemií. Výskyt onemocnění vyvolal potřebu testování přítomnosti *L. monocytogenes* v potravinách. V současné době platná Česká státní norma důkazu *L. monocytogenes* (ČSN ISO 10560) popisuje metodu průkazu *L. monocytogenes* v mléce a mléčných výrobcích. Normativní metoda je založena na tvorbě typických kolonií narostlých na tuhých selektivních médiích, které vykazují určité morfologické a metabolické charakteristiky. Tato metoda je pracná a časově náročná. Pro urychlení detekce jsou užívány komerčně dostupné testy, imunochemické nebo molekulárněgenetické metody.

V předkládané práci je popsán nový detekční systém – magnetická imuno-polymerasová reakce – pro detekci *Listeria monocytogenes* v potravinách (FLUID *et al.* 1993). Prvním krokem tohoto systému je nabohacení potravinové mikroflóry spojené s filtrací vzorku (16 h), následovaná selektivní separací bakterií rodu *Listeria* pomocí imunomagnetické separace – IMS (2–3 h) (SKJERVE *et al.* 1990). Identifikace bakterií rodu *Listeria* a druhu *L. monocytogenes* byla provedena pomocí metody duplex PCR (BEDNÁŘ 1997; BANSAL *et al.* 1996; BESSESN *et al.* 1990; BORDER *et al.* 1990; NEIDERHAUSER *et al.* 1992). K identifikaci příslušníků rodu *Listeria* byly použity primery komplementární k části 16S rRNA těchto

bakterií (HERMAN *et al.* 1995). K identifikaci *L. monocytogenes* byly použity primery komplementární k sekvenci genu kódujícího invasion associated protein – *iap* (HERMAN *et al.* 1995). Produkty amplifikace (593 a 1003 bp) byly separovány pomocí agarosové elektroforesy a vizualizovány UV detekcí (RUMML 1997). Pro zjištění účinnosti IMS byl stejný vzorek zpracován centrifugací a podroben PCR.

MATERIÁL A METODY

Použité kmeny: *Listeria monocytogenes* 4b (O V,VI; H A,B,C); *Staphylococcus aureus* a *Rhodococcus equi* (ze sbírky Katedry biologických věd Univerzity Pardubice); *Escherichia coli* a *Lactobacillus rhamnosus* (ze sbírky VŠCHT, Praha); *Salmonella enteritidis*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri* (izoláty z potravin).

Uchovávání bakteriálních kmenů: Pracovní kmeny byly udržovány na miskách s BHA (Brain heart agar, OXOID) při 4 °C. Přeočkování bylo prováděno nejméně jedenkrát měsíčně. Zásobní kultury byly udržovány ve 25% glycerolu při –80 °C.

Standardní normativní metoda: Tato metoda byla použita jako referenční pro zjišťování přítomnosti listerií v potravinách podrobených nově vyvíjené metodě. 25 g nastrouhaného potravinového vzorku bylo vloženo do 225 ml tekuté selektivní půdy (Buffered Listeria Enrichment Broth, OXOID). Takto upravený vzorek byl inkubován při 30 °C po dobu 48 h. Kulturou narostlou v tekuté selektivní půdě byla naočkována izolační půda Palcam (OXOID), která byla inkubována 48 h při 37 °C. Poté byla zjišťována přítomnost kolonií, které vykazovaly makroskopické znaky bakterií rodu *Listeria*. Tyto kolonie byly vyočkovány na pevnou neselektivní půdu a podrobeny barvení podle Grama, API Listeria (bioMérieux) a CAMP testu (ČSN ISO 10560, 1996).

Testování průchodu mikroorganismů filtrační přepážkou: Potravinový vzorek (25 g) s 225 ml tekutého média bylo za třepání o frekvenci 100 RPM inkubováno při 37 °C. V závislosti na čase byl sledován průchod mikroorganismů filtrační přepážkou. Počty mikroorganismů za filtrační přepážkou byly detekovány po 24hodinové kultivaci na NA (Nutrien agar, OXOID) při 37 °C. V kontrolním pokusu byla kultivace prováděna bez filtrační přepážky.

Imunomagnetická separace pomocí magnetických částic Dynabeads s kovalentně imobilizovanými protilátkami specifickými proti rodu *Listeria*: Do magnetického separátoru byly vloženy mikrozskumavky s 20 µl suspenze magnetických částic, Dynabeads anti-*Listeria* (firmy DYNAL, Norsko) a přidán 1 ml suspenze buněk. Obsah každé mikrozskumavky byl míchán 10 min. Po uplynutí této doby byl do magnetického separátoru vložen magnetický pás a imunomagnetické částice byly 3 min zachycovány. Tím byl komplex imunomagnetických částic a navázaných mikroorganismů separován na stěně mi-

krozkumavek, z nichž byl odsát supernatant. Poté byl do každé mikrozkušavky přidán 1 ml promývacího pufru (PBS-Tween: 5,4 g Tris HCl, 2,75 g kyseliny borité, 0,037 g EDTA a 50 ml destilované vody, pH 8,0) a celý proces promývání byl třikrát opakován. Po promytí bylo přidáno 100 µl pufru.

Metodou imunomagnetické separace byl testován zachyt mikroorganismů *L. monocytogenes*, *S. enteritidis*, *E. coli* a *L. rhamnosus*. Dále byly testovány křížové reakce *L. monocytogenes* s uvedenými mikroorganismy. Inokulum i vzorek podrobený IMS byly vysety na agarové půdy BHA a Palcam agar (OXOID) a v přítomnosti *Lactobacillus lactis* také na MRS (OXIOD). Při testování křížových reakcí *L. monocytogenes* s *E. coli* a *L. monocytogenes* se *S. enteritidis* byl zjištěn celkový počet mikroorganismů z kolonií narostlých na BHA. Počet *L. monocytogenes* byl zjištěn z kolonií narostlých na půdě Palcam. Počet kolonií *E. coli* a *S. enteritidis* byl vypočten odečtením kolonií *L. monocytogenes* od celkového počtu kolonií narostlých na BHA. Při testování křížových reakcí *L. monocytogenes* a *L. rhamnosus* se množství kolonií *L. monocytogenes* rovnalo počtu kolonií narostlému na půdě Palcam. Množství *L. rhamnosus* bylo rovno počtu kolonií narostlému na MRS.

Centrifugace: Nabohacené vzorky byly podrobeny 10minutové centrifugaci při 13 000 RPM. Po odsátí supernatantu byla peleta resuspendována ve 100 µl pufru.

PCR: Pokud byla výchozím materiálem kultura uchovávaná na plotnách, začínalo stanovení aseptickým odběrem vyšetřované kolonie do mikrozkušavky s 1 ml redestilované vody. Vzorek byl rozmíchán a 10 min centrifugován při 13 000 RPM. Po odsátí supernatantu bylo k peletě přidáno 100 µl lyzačního roztoku obsahujícího 0,125% SDS a 0,2% NaOH a inkubace probíhala 25 min při 95 °C. Pokud byl výchozím materiálem vzorek získaný IMS, v posledním kroku IMS byl místo 100 µl roztoku pufru přidán stejný objem lyzačního roztoku. 50 µl reakční směsi obsahovalo 1 µl buněčného lyzátu, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl, pH 9,0, 200 µM každého dNTP (Promega, USA), 0,25 µ každého primeru (GENERI BIOTECH s. r. o., ČR), 1 U Tag DNA polymerasy a 0,5% Tween 20 (Lachema, ČR). Polymerasová reakce probíhala v teplotním cycleru (Techne, Velká Británie) a byl použit následující teplotní program: úvodní denaturace 1 min při 95 °C, 35 cyklů (denaturace 15 s při 95 °C, annealing 15 s při 50 °C, polymerace 30 s při 72 °C) a závěrečná polymerace 8 min při 72 °C. Produkty amplifikace byly analyzovány horizontální elektroforesou v 1% (w/v) agarosovém gelu barveném ethidium bromidem. Elektroforetické dělení probíhalo po dobu 60 min při 100 V. Gel byl vizualizován pomocí UV světla.

Byly používány dva páry primerů. První pár primerů (A, B) je komplementární k *iap* genu nacházejícímu se v genomu *L. monocytogenes*. Produkt amplifikace pomocí PCR má velikost 593 bp (HERMAN *et al.* 1995). Primery C a D jsou komplementární k části 16S rRNA *Listeria sp.*

Produkt amplifikace má velikost 1003 bp (HERMAN *et al.* 1995). Sekvence primerů jsou následující:

Primer A	5'-ACA AGC TGC ACC TGT TGC AG-3'
Primer B	5'-GAA CCT TGA TTA GCA TTC GT-3'
Primer C	5'-AGG TTG ACC CTA CCG ACT TC-3'
Primer D	5'-CAA GGA TAA GAG TAA CTG C-3'

Stanovení *Listeria monocytogenes* v potravinách: Vzorek 25g potravin s přidavkem 225ml vhodného média byl inokulován různým množstvím buněk *L. monocytogenes*, počty inokulovaných buněk byly určeny výsevem na BHA a Palcam agar. Vzorky byly kultivovány 16 h při 37 °C a 100 RPM.

Po inkubaci byl odebrán 1 ml vzorku a provedena imunomagnetická separace pomocí Dynabeads (Dynal, Norsko). Pro porovnání účinnosti separace bylo místo IMS použito 10min odstředění při 13 000 RPM. Negativní kontrolu tvořil vzorek bez přidání *L. monocytogenes*. Vzorek byl zároveň podroben klasické normativní metodě detekce *Listeria sp.*

VÝSLEDKY A DISKUSE

Úprava potravinového vzorku = neselektivní nabohacení spojené s filtrací

Protože manipulace s nabohaceným vzorkem potravin je často obtížná vzhledem k rozptýleným zbytkům potravin, bylo prvním krokem vyvíjené metody spojení nabohacení s filtrací. Filtrační přepážka umožňuje průchod mikroorganismů do média, zabraňuje však průniku částic potravin.

Byly testovány dva filtrační materiály, prvním byl papír s polyethylenem používaný při výrobě čajových sáčků (Schöller&Hosch, Německo) a druhým materiál používaný k výrobě komerčních sáčků s filtrační přepážkou s póry většími než 100 µl (A.E.S. Laboratoire, Francie). Oba testované materiály jsou vhodné pro filtraci potravinových vzorků. Předností papíru s polyethylenem je jeho nízká cena. Nevýhodou je příprava sáčků svařováním za nesterilních podmínek. Pro další práci byl vybrán komerčně dodávaný filtrační sáček s póry většími než 100 µm. Přestože je finančně nákladnější, jeho výhodou je to, že výrobce provádí sterilizaci pomocí γ-záření.

Nejdříve byla zjišťována doba potřebná k dosažení rovnováhy koncentrace mikroorganismů na obou stranách filtrační přepážky. V závislosti na čase byl sledován průchod mikroorganismů filtrační přepážkou. Z tab. 1 je patrné, že již po 7hodinové kultivaci při 37 °C a 100 RPM je přítomen stejný počet mikroorganismů za filtrační přepážkou vzorku jako v kontrolním pokusu bez filtrační přepážky.

Imunomagnetická separace

Byl testováno množství zachycených mikroorganismů *L. monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *E. coli* a *Lactobacillus rhamnosus* prostřednictvím imunomagnetických částic. Z výsledků uvedených v tab. 2 je patrné, že

Tab. 1. Počty mikroorganismů po průchodu filtrem – Microorganism counts after filter passage

	Kultivační doba ¹ [h]				
	3	5	7	9	24
Kontrolní pokus ² [KTJ/ml]	3,5×10 ⁵	1,9×10 ⁶	1,1×10 ⁸	1,9×10 ⁸	1,2×10 ⁹
Čajový sáček ³ [KTJ/ml]	9,0×10 ⁴	1,5×10 ⁶	1,3×10 ⁸	3,0×10 ⁸	1,2×10 ⁹
Čajový sáček – kontrolní pokus ⁴ [%]	26	79	100	100	100
Filtrační sáček ⁵ [KTJ/ml]	1,3×10 ⁵	1,2×10 ⁶	1,0×10 ⁸	1,6×10 ⁸	1,1×10 ⁹
Filtrační sáček – kontrolní pokus ⁶ [%]	37	63	91	84	92

KTJ = počet kolonií v jednotce objemu nebo hmotnosti – number of colonies per unit volume of weight

¹culture time; ²control experiment; ³tea bag; ⁴tea bag – control experiment; ⁵filter bag; ⁶filter bag – control experiment

Tab. 2. Počty mikroorganismů zachycených IMS – Microorganism counts detected by IMS

Mikroorganismus ¹	Před ² IMS [KTJ/ml]	Po ³ IMS [KTJ/100 µl]
<i>L. monocytogenes</i>	1,5×10 ⁸	5,6×10 ⁶
	2,4×10 ⁴	1,0×10 ⁴
	6 000	3 000
	240	100
<i>E. coli</i>	5,0×10 ⁸	2,0×10 ⁶
	5,0×10 ⁴	5000
	500	70
	30	2
<i>Salmonella enteritidis</i>	3,0×10 ⁸	9,0×10 ⁴
	5,0×10 ⁷	6×10 ⁵
	1,8×10 ⁵	500
	1800	10
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	2,7×10 ⁸	8,0×10 ⁵
	4,6×10 ⁶	1,4×10 ⁵
	4,6×10 ⁴	2300
	460	8

KTJ – počet kolonií v jednotce objemu nebo hmotnosti – number of colonies per unit volume of weight

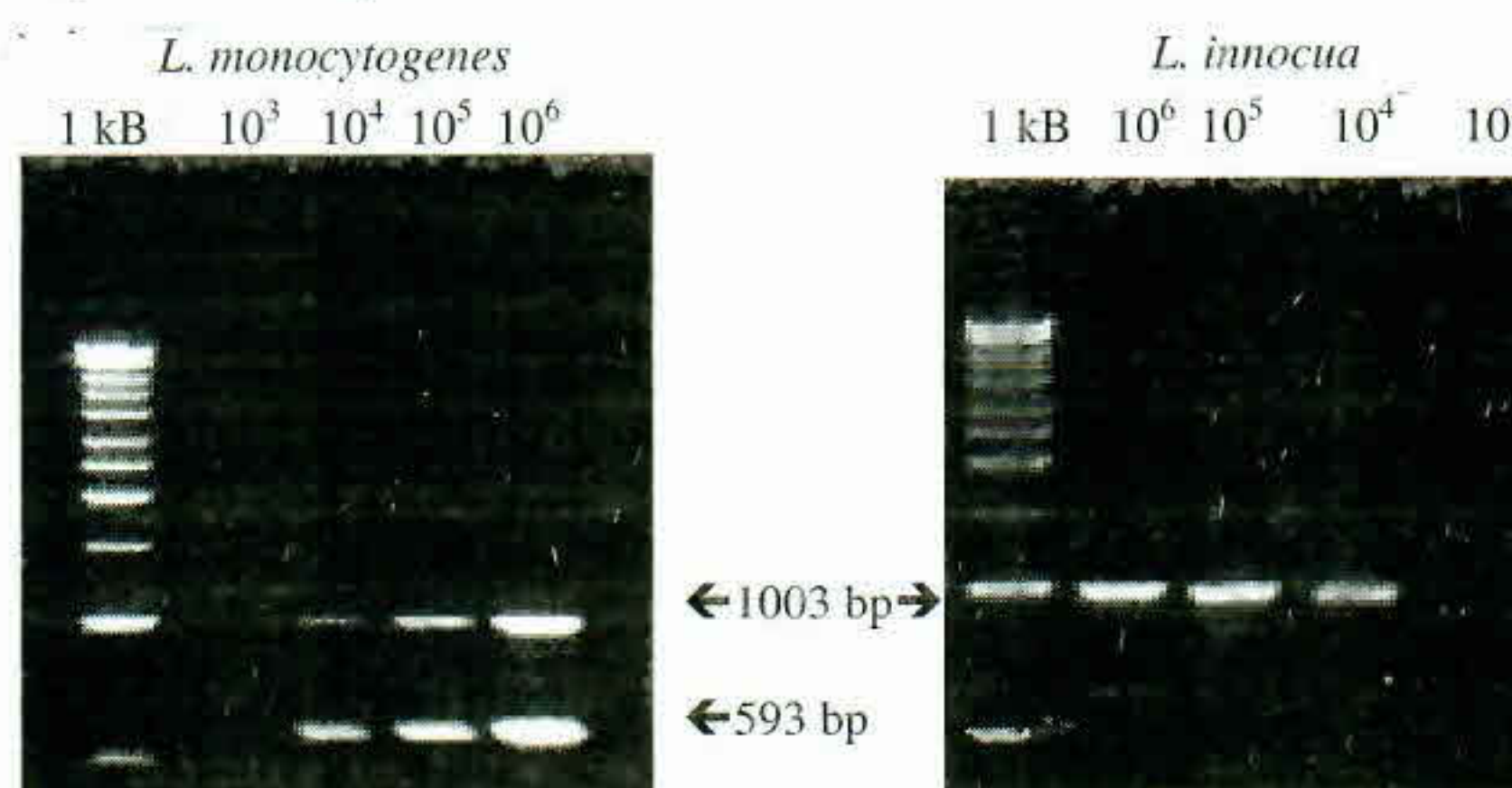
¹microorganism species; ²before; ³after

při koncentraci vyšší než cca 10⁶ mikroorganismů v 1 ml je překročena vazebná kapacita magnetických částic. Při nižších koncentracích jsou buňky *L. monocytogenes* imunomagnetickými částicemi zachycovány ve velmi velkém počtu, buňky *E. coli* jsou pouze zachycovány, množství zachycených *S. enteritidis* a *L. rhamnosus* je jen velmi nízké. Dále byly testovány křížové reakce *L. monocytogenes* s uvedenými mikroorganismy. Nejvyšší křížové reakce při IMS vykazuje *E. coli*, která je imunomagnetickými částicemi zachycována řádově stejně jako *L. monocytogenes*. *S. enteritidis* a *L. rhamnosus* byly zachyceny v mnohem menší míře.

Po IMS bývá vzorek nejčastěji zpracováván PCR nebo výsevem na agarové půdy selektivní pro rod *Listeria*. Tyto média obsahují látky potlačující růst doprovodné mikroflóry, nejvíce inhibují růstu gram-negativních mikroorganismů. Pokud by byl testovaný potravinový vzorek podroben IMS a takto upravený by byl vyset na selektivní půdu, na této půdě by vyrostly kolonie rodu *Listeria*. Tyto kolonie mohou být dále podrobeny testům umožňujícím druhové rozlišení bakterií rodu *Listeria*. To znamená, že zachycené buňky *E. coli* neinterferují při dalším zpracování vzorku v průběhu metod detekujících *L. monocytogenes* v potravinách.

Optimalizace detekce *Listeria* sp. a *L. monocytogenes* prostřednictvím duplex PCR (stanovení citlivosti reakcí)

Citlivost metody duplex PCR je 10⁴ buněk *L. monocytogenes* a 10⁴ buněk *L. innocua* při lyzi v přítomnosti lyzačního roztoku (obr. 1). Z obrázku je patrné, že aplikací PCR na inokulum buněk *L. monocytogenes* preferenčně vzniká výrazně více produktu o velikosti 593 bp než 1003 bp. Tento jev byl pozorován také při metodě duplex PCR z potravinových vzorků.



Obr. 1. Stanovení citlivosti PCR reakce – Determination of PCR sensitivity

Testování specifity PCR

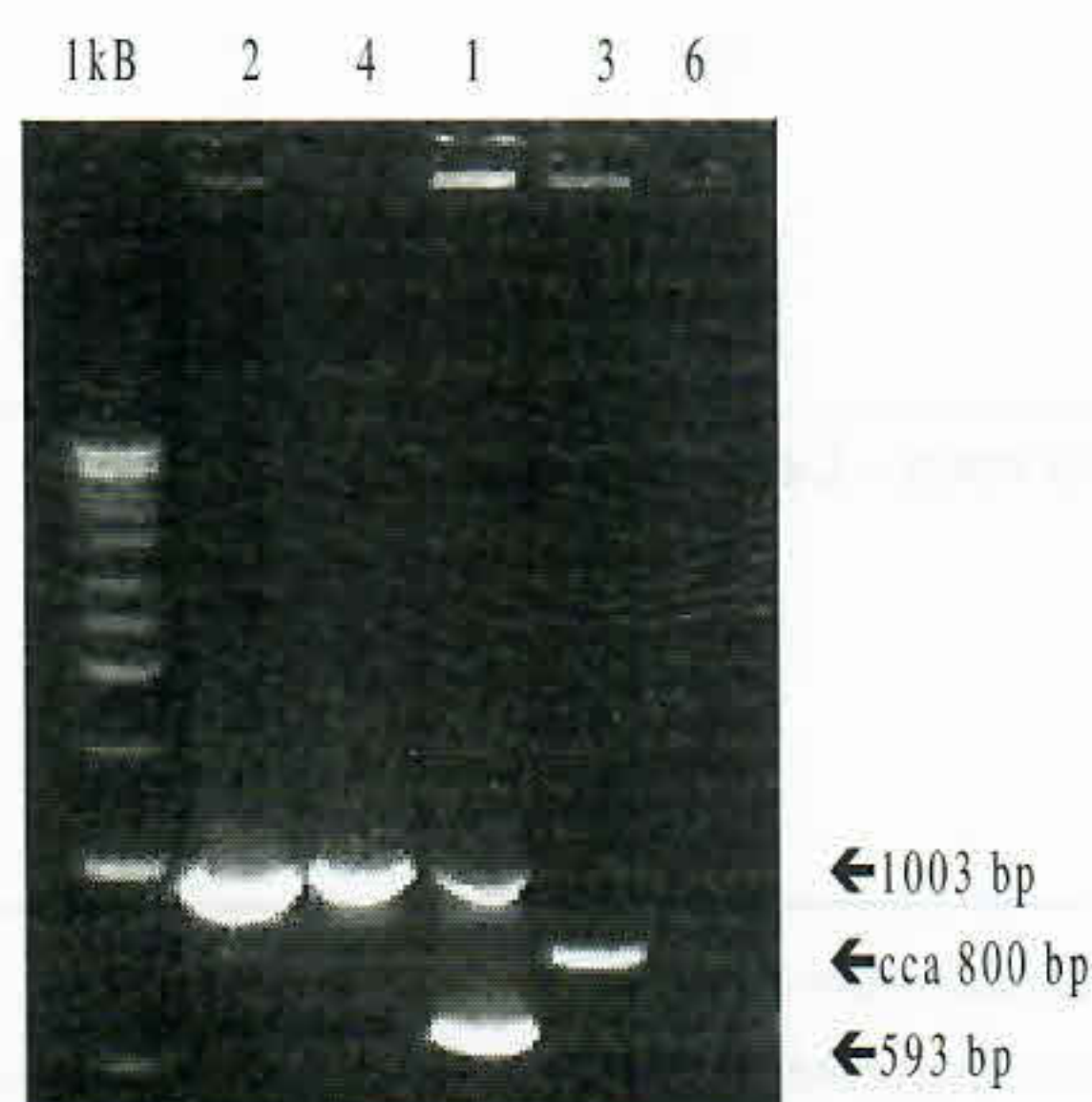
V tab. 3 jsou uvedeny mikroorganismy, které byly podrobeny duplex PCR. Použitím uvedených primerů dochází ke vzniku PCR produktů pouze z bakterií rodu *Listeria* (obr. 2). Při PCR vzniká produkt 1003 bp ze všech *Liste-*

Tab. 3. Druhy mikroorganismů podrobené PCR a velikosti produktů – Microorganism species subject to PCR and size of products

Mikroorganismus ¹	Vzorek číslo ²	Produkty PCR ³
<i>L. monocytogenes</i>	1	593 bp + 1003 bp
<i>L. innocua</i>	2	1003 bp
<i>L. welchimeri</i>	3	cca 800 bp + 1003 bp
<i>L. seeligeri</i>	4	1003 bp
<i>L. ivanovii</i>	5	1003 bp
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	6	–
<i>Salmonella enteritidis</i>	–	–

¹microorganism, ²sample no., ³PCR products

ria sp., navíc vznikají produkty o velikosti 593 bp z inokula *L. monocytogenes* a cca 800 bp z inokula *L. welshimeri*. V databázi GeneBank byla nalezena sekvence genu *L. welshimeri* kódujícího extracelulární protein podobný *iap* genu *L. monocytogenes*. Primery A a B jsou z 95 % komplementární k tomuto genu (určeno pomocí programu DNAsis, Pharmacia Biotech, USA). Produkt PCR *L. welshimeri* je tedy výsledkem amplifikace tohoto genu.



Obr. 2. Specifita PCR – PCR specificity

Aplikace metody na reálné vzorky potravin

Celý postup (nabohacení spojené s filtrací, IMS a PCR) byl ověřen na reálných vzorcích potravin: mleté maso, olomoucké tvarůžky a nízkotučné mléko. Všechny testované potraviny byly zakoupeny v prodejní síti. Potraviny byly současně podrobeny standardní normativní metodě ČSN ISO 10560.

Aplikace metody na vzorky mletého masa

Při nabohacení vzorků mletého masa v peptonové vodě byl detekční limit metody IMS spojené s PCR stanoven na 10² KTJ/25 g a detekční limit pro odstředění a PCR cca 9 KTJ/25 g. Z výsledků uvedených v tab. 4 je zřejmé, že v případě mletého masa bylo dosaženo lepší meze detekce metodou PCR v kombinaci s odstředováním, což

Tab. 4. Aplikace metody na vzorky mletého masa – Method application to ground meat samples

Číslo vzorku ¹	<i>L. monocytogenes</i>	
	počet přidanych ²	potvrzení přítomnosti ³
Peptonová voda ⁴ – IMS a PCR		
1	0	–
2	13×10 ⁷	++
3	1,5×10 ⁵	++
4	1 300	+
5	130	+
6	9	–
Peptonová voda ⁴ – Centrifugace a PCR ⁵		
1	0	–
2	13×10 ⁷	++
3	1,5×10 ⁵	++
4	1300	++
5	130	++
6	9	+

++ = velmi intenzivně viditelný produkt – very intensively visible product; + = viditelný produkt – visible product; – = nedetekovaný produkt – undetected product

¹sample no.; ²number of added *L. monocytogenes*; ³proof of *L. monocytogenes* presence; ⁴peptone water; ⁵centrifugation and PCR

je výhodnější především z ekonomického hlediska (finanční nákladnost metody IMS). Tento způsob však nelze použít na všechny testované potraviny vzhledem k přítomnosti inhibitorů PCR, které nelze centrifugací odstranit.

Aplikace metody na vzorky olomouckých tvarůžků

Při nabohacení vzorku ve FRASER broth (OXOID) a IMS spojené s PCR byl stanoven detekční limit 2×10² inokulovaných *L. monocytogenes* po 16 h nabohacení, po 48 h nabohacení nebyl detekován žádný produkt ani při přidání 4×10⁴ *L. monocytogenes*. Aplikací centrifugace a PCR bylo dosaženo detekčního limitu 4×10⁴ inokulovaných *L. monocytogenes* (tab. 5).

Aplikací IMS a PCR na vzorek nabohacovaný 16 h v BLEB byl detekční limit 400 inokulovaných *L. monocytogenes*, po 48h nabohacování 4×10⁴. Aplikací centrifugace a PCR na vzorek nabohacený v BLEB, byl detekční limit po 16 i 48h kultivaci 4×10⁴ inokulovaných *L. monocytogenes* (tab. 5).

Standardní normativní metodou byla v testovaných vzorcích Olomouckých tvarůžků potvrzena přítomnost *Listeria* sp. Při zjišťování přítomnosti *Listeria* sp. v olomouckých tvarůžkách pomocí PCR byl dobře detekovatelný produkt o velikosti 593 bp svědčící o přítomnosti *L. monocytogenes* v testovaném vzorku. Nevzniklo však detekovatelné množství produktu o velikosti 1003 bp, které by potvrdilo přítomnost *Listeria* sp. Stejně výsledky byly obdrženy také aplikací PCR na směs čistých kultur mikroorganismů, avšak pouze v případě velmi rozdílné

Tab. 5. Aplikace metody na vzorky Olomouckých tvarůžků – Method application to samples of the cheese Olomoucké tvarůžky

Číslo vzorku ¹	Počet přidanych <i>L. monocytogenes</i> ³	16 h		48 h	
		<i>L. m.</i>	<i>L. sp.</i>	<i>L. m.</i>	<i>L. sp.</i>
BLEB – IMS a PCR					
1	0	–	–	n	n
2	800 000	+	–	n	n
3	40 000	+	–	+	–
4	400	+	–	–	–
5	40	–	–	n	n
BLEB – Centrifugace a PCR ⁴					
3	40 000	+	–	+	–
4	400	–	–	–	–
FRASER – IMS a PCR					
1	0	–	–	–	–
2	40 000	++	–	–	–
3	2 100	+	–	n	n
4	400	+	–	–	–
5	210	+	–	n	n
6	40	–	–	–	–
FRASER – Centrifugace a PCR					
1	0	–	–	–	–
2	40 000	+	–	+	–
4	400	–	–	–	–
6	40	–	–	–	–

n = nestanovené – not determined

++ = velmi intenzivně viditelný produkt – very intensively visible product; + = viditelný produkt – visible product; – = nedetekovaný produkt – undetected product

¹sample no.; ²dilution after enrichment; ³number of added *L. monocytogenes*; ⁴centrifugation and PCR

ných koncentrací druhů *Listeria* před reakcí. Tento fakt nelze potvrdit prostřednictvím standardní normativní metody, protože jejím prvním krokem je nabohacení, které znemožňuje zjištění počtu původně přítomné mikroflóry.

Pro detekci pro člověka nepatogenních bakterií rodu *Listeria* je tedy potřeba podrobit vzorek potravin 48h kultivaci v selektivním médiu a vyočkovat na selektivní agarovou půdu PALCAM nebo OXFORD.

Aplikace metody na vzorky nízkotučného mléka

Detekční limit *L. monocytogenes* ve vzorku nízkotučného mléka nabohaceného v BLEB (tab. 6) je řádově 9 KTJ/25 g po 16 i 48 h při použití IMS a PCR. Při kombinaci centrifugace a PCR je detekční limit 50 KTJ na 25 g vzorku po 16h a 9 KTJ/25 g po 48h nabohacení.

Ve vzorku nízkotučného mléka nabohaceného v peptonové vodě bylo detekováno 9 KTJ/25 g vzorku prostřednictvím obou popisovaných metod, a to po 16 i 48h kultivaci (tab. 6).

Tab. 6. Aplikace metody na vzorky nízkotučného mléka – Method application to samples of low-fat milk

Číslo vzorku ¹	Počet přidanych <i>L. monocytogenes</i> ³	16h		48 h	
		<i>L. m.</i>	<i>L. sp.</i>	<i>L. m.</i>	<i>L. sp.</i>
BLEB – IMS a PCR					
1	0	–	–	–	–
2	50 000	+	–	n	n
3	500	+	–	n	n
4	90	+	–	+	–
5	50	+	–	n	n
6	23	n	n	+	–
7	9	+	–	+	–
BLEB – Centrifugace a PCR ³					
1	0	–	–	–	–
2	50 000	+	–	n	n
3	500	+	–	n	n
4	90	+	–	+	–
5	50	+	–	n	n
6	23	n	n	+	–
7	9	–	–	+	–
Peptonová voda ⁴ – IMS a PCR					
1	90	+	–	–	–
3	23	n	n	+	–
2	9	+	–	–	–
4	2	n	n	+	–
Peptonová voda – Centrifugace a PCR					
1	90	+	–	+	–
3	23	n	n	+	–
2	9	+	–	+	–
4	2	n	n	+	–

n = nestanovené – not determined

++ = velmi intenzivně viditelný produkt – very intensively visible product; + = viditelný produkt – visible product; – = nedetekovaný produkt – undetected product

¹methods; ²number of added *L. monocytogenes*; ³centrifugation and PCR; ⁴peptone water

Závěr

Standardní normativní metoda je specifická, citlivá, ale časově náročná (vyšetření probíhá 4–6 dní). Metoda má relativně nízkou citlivost, která je do jisté míry závislá na „lidském faktoru“ a správnost výsledků je ovlivněna zkušeností experimentátora. Často vykazuje vysoké procento (kolem 7 %) falešně negativních výsledků (UYTTENDAELE *et al.* 1995). Naopak kladem je jejich relativně nízká finanční náročnost spolu s minimálními požadavky na vybavení laboratoře.

Použitím kombinované metody stanovení IMS a PCR lze zkrátit dobu stanovení *Listeria monocytogenes* v reálných vzorcích potravin na méně než 24 hodin. Dosažená

citlivost vyvíjené kombinované metody je 10^0 – 10^2 cílového mikroorganismu ve vzorku. Detekce *Listeria monocytogenes* pomocí metody duplex PCR závisí na typu použitého vzorku.

Literatura

- BANSAL N. S., DONELL F. H. Y., SMITH A., ARNOLD G., IBRAHIM G. F. (1996): Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *Int. J. Food Microbiol.*, **33**: 293–300.
- BEDNÁŘ M. (1997): In: Molekulárně genetické metody v rutinní mikrobiologické diagnostice. Remedix Klin. Mikrobiol., Praha.
- BEDNÁŘ M., FRAŇKOVÁ V., SCHINDLER J., SOUČEK A., VÁVRA J. (1996): In: Lékařská mikrobiologie. Marvil, Praha: 221–224.
- BESSESSE M. T., LUO QIAN, ROTBART H. A., BLASTER M. J., ELLISON III. R. T. (1990): Detection of *Listeria monocytogenes* by using Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 2930–2932.
- BORDER P. M., HOWARD J. J., PLASTOW G. S., SIGGERS K. W. (1990): Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. *J. Appl. Microbiol.*, **11**: 158–162.
- DONACHIE W., LOW J. C. (1997): A Review of *Listeria monocytogenes* and *Listeriosis*. *Vet. J.*, **153**: 9–29.
- FLUID A. C., TORENSMA R., ISSER M. J. C., AARSMAN C. J. M., POPPELIER M. J. J. G., KELLER B. H. I., KLAPWIJK P., VERHOEF J. (1993): Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the Magnetic Immuno-Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 1342–1346.
- HERMAN L. M. F., DE RIDDER H. F. M., VLAEMYNCK G. M. M. (1995): A multiplex PCR method for identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. *J. Food Protect.*, **58**: 867–872.
- MILLER A. L. (1990): In: SMITH J. L., SOMKUTI G. A. (Eds.): Foodborne Listeriosis. Elsevier, Amsterdam, New York.
- NEIDERHAUSER C., CANDRIAN U., HÖFELEIN C., JERMINI M., BÜHLER H. P., LÜTHY J. (1992): Use of Polymerase Chain Reaction of *Listeria monocytogenes* in food. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**: 1564–1568.
- RUML T. (1997): Laboratoře z genového inženýrství. VŠCHT, Praha.
- SKJERVE E., RORVIK L. M., OLSVIK O. (1990): Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**: 3478–3481.
- UYTTENDAELE M., SCHUKKINK R., GEMEN VAN B., DEBEVERE J. (1995): Development of NASBA, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA methods. *Int. J. Food Microbiol.*, **27**: 77–89.
- WAITES W. M., ARBUTHNOTT J. P. (1991): A Lancet review: Food Born Illnesses, Edwards Arnold, London.

Došlo 30. 11. 1999

Přijato k publikaci 10. 12. 1999

Kontaktní adresa:

Ing. KAMILA ZDENKOVÁ, Vysoká škola chemicko-technologická, Ústav biochemie a mikrobiologie, Technická 5, 166 28 Praha 6, Česká republika, tel.: + 420 2 24 35 51 31, fax: + 420 2 24 35 51 67, e-mail: Kamila.Zdenkova@vscht.cz
