

Dôkaz listérií v potravinách metódami založenými na polymerázovej reťazovej reakcii

HANA DRAHOVSKÁ - DOMENICO PANGALLO - TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. Použitím polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) je možné urýchliť a zefektívniť dôkaz listérií v potravinách. Pred vlastnou PCR sa používa kultivačné rozmnoženie listérií. Z pripravených kultúr sa DNA extrahuje lýzou buniek. Viacerí autori opísali primery umožňujúce selektívny dôkaz druhu *Listeria monocytogenes* alebo rodu *Listeria*. Amplifikovaná DNA sa analyzuje elektroforézou v agarózovom géli, opísané boli tiež hybridizačné postupy umožňujúce automatizáciu celej metódy. Súčasnou úlohou pre výskum je vývoj rýchlejšej a spoľahlivejšej metódy na princípe PCR, ktorá by poskytovala rovnaké výsledky ako štandardná kultivačná metóda pri analýze prirodzene kontaminovaných vzoriek potravín.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Listeria*; polymerázová reťazová reakcia

Listérie sú baktérie, ktoré sa pomerne bežne vyskytujú v životnom prostredí a ktoré pri nedodržaní hygieny môžu kontaminovať potraviny. Z rodu *Listeria* je pre človeka patogénny druh *L. monocytogenes*. Ochorenie, ktoré patogénne listérie spôsobujú, sa nazýva listerióza. Táto väčšinou postihuje deti, tehotné ženy, starších ľudí a imunodeficitných jedincov [1-3]. Jej najčastejšou príčinou je konzumácia kontaminovaných potravín, najmä mäkkých syrov a lahôdkárskych výrobkov, ktoré boli dlhšiu dobu skladované pri chladniarskych teplotách a ktoré sa konzumujú bez tepelnej úpravy. Listérie sú totiž psychrotrofné a chladniarske teploty ich zvýhodňujú voči sprievodnej mezofilnej mikroflóre. Pasterizácia listérie účinne devitalizuje, z čoho vyplýva, že kontaminácia konečných výrobkov je často výsledkom popasterizačnej kontaminácie zo zdrojov prostredia prevádzok [1,3,4].

Výskyt listeriózy vyvolal potrebu skúšania potravín na prítomnosť patogénnych listérií a vývoj nových analytických metód na ich dôkaz.

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

Dr. Domenico PANGALLO, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava.

V súčasnosti platná štandardná metóda, ISO 11290 [5], má detekčný limit 10^0 KTJ / 25 g, avšak je časovo a metodicky náročná. Jednou z možností na jej urýchlenie a zefektívnenie je využitie polymerázovej reťazovej reakcie (PCR). Princípom PCR je enzýmová amplifikácia úsekov DNA, špecifikovaných oligonukleotidmi - primermi [6,7]. Aby však bolo možné využiť túto progresívnu metódu pri analýze potravín, je potrebné skĺbiť ju s efektívnymi postupmi prípravy DNA. V nasledujúcom texte sa zaoberáme doteraz vyvinutými metodikami a ich aplikáciou na dôkaz listérií v potravinách.

Rozmnoženie listérií pred prípravou templátovej DNA

Hoci boli opísané metódy na izoláciu DNA pre dôkaz listérií pomocou PCR priamo z potravín [8,9], vzhľadom na prácnosť, riziko falošne negatívnych výsledkov a vzhľadom na potrebu odlíšiť živé bunky od mŕtvych sa vo všeobecnosti uprednostňuje kultivačné rozmnoženie listérií pred prípravou templátovej DNA pre PCR. Najspoľahlivejšie je použitie PCR na identifikáciu podozrivých kolónií, izolovaných klasickými kultivačnými postupmi [10-13]. Týmto spôsobom je možné získať výsledky, ktoré sú identické s kultivačnou metódou, avšak časová úspora je v tomto prípade nevýrazná. Metódu dôkazu možno výraznejšie urýchliť aplikáciou PCR na kultúry rozmnožené v kvapalných médiách. Kultivácia v neselektívnom médiu neumožňuje rýchlo detegovať listérie v potravinách s dostatočnou citlivosťou [14]. Rozmnoženie listérií je možné efektívnejšie dosiahnuť použitím selektívnych médií, analogických ako v kultivačných metódach na dôkaz listérií v potravinách, avšak publikované metódy majú problémy s dosiahnutím detekčného limitu 10^0 KTJ na vzorku [15-19]. Využitie imunomagnetickej separácie na selektívnu koncentráciu listérií je zatiaľ problematické vzhľadom na nízku selektivitu separačných systémov (Herman, osobné oznámenie).

Príprava templátovej DNA

Na amplifikáciu fragmentov DNA pomocou PCR sa v molekulárno-biologickom výskume spravidla používa purifikovaná, resp. izolovaná DNA. Hoci sú na tento účel k dispozícii viaceré typy purifikačných súprav od viacerých výrobcov, tento postup je časovo náročný, prácný a drahý, čo sa obzvlášť negatívne prejavuje, ak je potrebné spracovať naraz väčšie množstvo vzoriek. Preto sa pri aplikácii PCR na dôkaz mikroorganizmov v potra-

vinách ako zdroj templátovej DNA najčastejšie používajú lyzáty bakteriálnych kultúr. Pri ich príprave je potrebné splniť niekoľko podmienok:

- lýza buniek musí byť kvantitatívna,
- nesmie dochádzať k degradácii DNA (napr. vplyvom nukleáz),
- lyzáty nesmie obsahovať látky, ktoré inhibujú PCR; inhibítory môžu pochádzať z kultivačných médií, lyzačných roztokov alebo baktérií [20].

V prípade listérií sa prejavuje pomerne vysoká odolnosť buniek týchto grampozitívnych baktérií voči lýze. Pri použití najjednoduchšieho spôsobu prípravy templátovej DNA, suspendovaní buniek v reakčnej zmesi pre PCR, nie je možné dosiahnuť vysokú citlivosť detekcie [12]. Vyššiu citlivosť je možné dosiahnuť použitím lýzy vo vode alebo tlmivých roztokoch pri 100 °C [10,15,21] alebo pri 110 °C [22]. Niektorí autori uvádzajú ako účinnejšiu lýzu varom v prostredí detergentov [23-25] alebo v zmesi NaOH a dodecylsulfátu sodného [26]. Na zvýšenie účinnosti lýzy je možné použiť opracovanie proteolytickými enzýmami [8,19], prípadne vzorku prečistiť a zakonzentrovat' zrážaním etanolom [11] alebo DNA purifikovať [18].

Agersborg a kol. [14] porovnávali tri spôsoby rýchlej prípravy DNA templátu. V ich podmienkach sa nepodarilo uvoľniť DNA z buniek varom v destilovanej vode ani počas 30 min. Lýza pôsobením lyzozýmu a proteínázy K bola nereprodukovateľná a závisela od kvality enzýmových preparátov. Najlepšie výsledky dosiahli inkubáciou buniek v 1 % Triton X-100 po dobu 10 min pri 100 °C.

Výber primerov

Pri výbere primerov na dôkaz listérií je možné orientovať sa na druh *Listeria monocytogenes*, alebo detegovať celý rod *Listeria*. Dôkaz prítomnosti nepatogénnych listérií v potravinách je tiež dôležitý, keďže tieto sú indikátorom možnej prítomnosti *L. monocytogenes*. Prítomnosť nepatogénnych listérií môže tiež potláčať rast *L. monocytogenes* a tým spôsobovať falošne negatívne výsledky pri analýze pomocou kultivačných metód. Preto niektorí autori používajú v PCR dva páry primerov - rodovo špecifický pre rod *Listeria* a druhovo špecifický pre *L. monocytogenes* [10,16,17,22,26].

Primery používané na dôkaz listérií sú orientované na niekoľko génov (tab. 1). Často sú to gény pre syntézu ribozomálnych RNA, v rámci ktorých existujú oblasti konzervatívne pre všetky baktérie, ako aj rodovo a druhovo konzervatívne oblasti. Primery odvodené od sekvencií týchto génov boli použité na špecifický dôkaz *L. monocytogenes* [26], na dôkaz všetkých listérií

TABUĽKA 1. Cieľové sekvencie použité na dôkaz listérií metódami založenými na PCR.
TABLE 1. Target sequences used for a PCR-based detection of *Listeria* spp.

Cieľová sekvencia ¹	Detegované organizmy ²	Veľkosť produktu ³ [bp]	Počet skúmaných kmeňov ⁴	Detekčný limit, poznamka k metóde ⁵	Citácia ⁶
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>			0,1 KTJ / 30 ml	9
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	417	203 LM, 5 LO, 14 NL	50–500 KTJ / reakcia	15
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	niekoľko, napr. 520	72 LM, 24 LO, 47 NL	0,1 pg / reakcia	11
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	520	79 LM, 34 LO, 4 NL	50 KTJ / reakcia; IMS + hybridizácia	24
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	234	9 LM, 8 LO, 6 NL	10 KTJ / reakcia; Southern blot	8
<i>hlyA</i> (rDNA)	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp.	750, 938	40 LM, 20 LO, 18 NL	100 KTJ / ml	17
<i>hlyA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	857	8 LM, 9 LO	2 KTJ / reakcia; nested PCR + reverzná hybridizácia	21
<i>hlyA</i> , 16S rRNA	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp., všetky baktérie	702	2 LM, 6 LO, 18 NL		10
<i>dth</i>	<i>L. monocytogenes</i>	300		LM sérovar 4a negatívny	24
<i>prfA</i>	<i>L. monocytogenes</i>	1060	325 LM, 186 LO	hybridizácia	30
<i>iap</i>	<i>L. monocytogenes</i>	130		50 KTJ / reakcia; LM sérovar 4a negatívny	8
<i>iap</i>	<i>L. monocytogenes</i>	453	28 NL	1–10 KTJ / reakcia	19, 28
<i>iap</i>	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp.	rôzna okolo 400	14 LM, 5 LO		22
<i>iap</i>	<i>L. monocytogenes</i>	131	1 LM, 1 LO, 4 NL	100 KTJ / reakcia; kvantitatívna PCR + ELISA	29
<i>iap</i> rRNA	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp.	593, 1003	10 LM, 17 LO, 27 NL		16
cell surface protein	<i>L. monocytogenes</i>	160	28 LM, 8 LO, 11 NL	4–10 KTJ / reakcia	23
<i>flaA</i>	<i>Listeria</i> spp.	448	62 LM, 20 NL		12
rRNA	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Listeria</i> spp.		39 LM, 61 LO, 40 NL	reverzná dot blot hybridizácia	26
16S rRNA	<i>L. monocytogenes</i>	553		1–100 KTJ / g	18
aminopeptidáza	<i>L. monocytogenes</i>	90	21 LM, 11 LO, 9 NL	potvrdenie kolónií	25

LM - *L. monocytogenes*, LO - ostatné druhy rodu *Listeria*, NL - iné baktérie.

1 - target sequence, 2 - detected organisms, 3 - product size, 4 - number of strains tested (LM - *L. monocytogenes*, LO - other species of the genus *Listeria*, NL - other bacteria), 5 - detection limit, comment to the method, 6 - reference.

[10,17,26], a aj na dôkaz všetkých prítomných baktérií, ktorý slúži ako vnútorný štandard na kontrolu amplifikačnej reakcie [10].

Iným prístupom je detegovanie génov zodpovedných za patogénny prejav, tzv. virulentných faktorov. Chromozóm *L. monocytogenes* obsahuje oblasť veľkosti 10 kb, ktorá kóduje niekoľko takýchto génov (*hlyA*, *prfA*, *plcA*, *plcB*, *actA*, *mpl*). Z nich sa v diagnostike najčastejšie používa gén *hlyA*, kódujúci špecifický hemolýzín, lysteriolýzín O. Tento gén je špecifický pre *L. monocytogenes*, je prítomný vo všetkých sérotypoch a nenachádza sa u ostatných druhov rodu *Listeria*. Jeho sekvenciu určili Mengaud et al. [27] a na jej základe bolo navrhnutých niekoľko primerov na dôkaz *L. monocytogenes* [8-11,15,17,21].

Gén *iap*, kódujúci tzv. „invasion associated protein“, je prítomný vo všetkých listériách, pričom obsahuje úseky konzervatívne pre všetky listérie, ako aj úseky špecifické pre *L. monocytogenes*. Primery orientované na tento gén boli použité pre druhovo [19,22,28,29] aj rodovo [22] špecifickú dôkazovú reakciu. Ďalším génom, na ktorý sa orientuje diagnostická PCR je *dth* (delayed hypersensitivity factor) [24]. Nevýhodou týchto dvoch génov je, že pomocou nich nie je možné detegovať *L. monocytogenes* sérotyp 4a.

Na dôkaz *L. monocytogenes* boli použité tiež primery orientované na gén pre regulačný proteín *prfA* [30], nachádzajúci sa v blízkosti *hlyA*, gén kódujúci aminopeptidázu [25] a proteín bunkového povrchu [23]. Rod *Listeria* bol detegovaný aj na základe prítomnosti génu *flaA* kódujúceho syntézu flagelárneho proteínu [12].

Pre použitie určitých primerov na dôkaz listérií je dôležitá najmä ich selektivita a citlivosť, ktoré musia byť empiricky overené na dostatočne širokom spektre pozitívnych, ako aj negatívnych kmeňov.

Detekcia produktu PCR

Najčastejšie používanou metódou na detekciu produktu PCR je elektroforéza v agarózovom géli, ktorá na základe molekulovej hmotnosti umožňuje identifikáciu amplifikovaného fragmentu DNA. Okrem toho poskytuje semikvantitatívne údaje o množstve DNA. Táto metóda je aj najlacnejšia, čo sa týka chemikálií aj prístrojového vybavenia. Identitu produktu PCR je možné potvrdiť štiepením restričnou endonukleázou a elektroforézou získaných fragmentov [15].

Alternatívne metódy detekcie produktu PCR sú prevažne založené na hybridizácii so špecifickou oligonukleotidovou sondou, na ktorú nadvä-

zuje detekcia vytvoreného komplexu. Výhodou hybridizácie je vysoká selektivita detekcie, zvýšenie citlivosti a možnosť automatizácie.

Základnou metódou je Southernova hybridizácia [8], prípadne dot-blot. Tieto metódy sú ovšem prácne a podstatne predlžujú čas potrebný na detekciu. Inou možnosťou je reverzný dot-blot, keď sa na membránu pevne viaže oligonukleotidová sonda, s ktorou reaguje produkt PCR označený najčastejšie nerádioaktívnou značkou. Touto metódou bolo možné rozlíšiť *L. monocytogenes* od ostatných druhov rodu *Listeria* na základe hybridizácie génov pre rRNA amplifikovaných pomocou spoločných konzervatívnych primerov [26]. Bsat a Batt [21] použili reverznú dot-hybridizáciu na zvýšenie citlivosti stanovenia z 10^4 KTJ na reakciu (elektroforézou) na 10^0 KTJ na reakciu. Kvantitatívne stanovenie *L. monocytogenes* bolo dosiahnuté spojením amplifikácie s použitím vnútorného štandardu, hybridizácie produktu PCR a detekcie pomocou ELISA [29].

Detekčný limit metódy

Metóda PCR je v princípe veľmi citlivá - teoreticky je možné detegovať už jednu molekulu templátu. V praxi závisia výsledky amplifikácie od mnohých faktorov, ktoré je potrebné optimalizovať, najčastejšie empiricky. Vysokú citlivosť pri PCR je možné dosiahnuť zvýšením počtu amplifikačných cyklov na 35–40 [8,14,18,23,25], alebo dvojstupňovým „nested“ usporiadaním PCR [21]. So zvyšovaním citlivosti sa však v týchto prípadoch zvyšuje aj riziko kontaminácie amplifikačnými produktami, a tým aj možnosť falošne pozitívnych výsledkov. Preto je pre diagnostiku v praxi výhodnejšie kombinovať dostatočné rozmnoženie listérií a PCR s menším počtom cyklov.

Detekčný limit PCR sa najčastejšie udáva v KTJ na reakciu alebo KTJ na vzorku potravy, kvantifikovanú hmotnosťou alebo objemom. Pri dôkaze *L. monocytogenes* boli dosiahnuté detekčné limity 1–500 KTJ na reakciu (tab. 1).

Niektoré druhy potravín (napr. syry) obsahujú inhibítory PCR, ktoré môžu spôsobovať falošne negatívne výsledky. Efektívnym spôsobom na ich vylúčenie je použitie vnútorného štandardu, čo môže byť napríklad templát, ktorý sa pridáva do reakčnej zmesi a amplifikuje sa s rovnakými primermi ako cieľová DNA, pričom poskytuje produkt odlišnej veľkosti [17,29].

Komerčné súpravy

Na dôkaz *L. monocytogenes* v potravinách je komerčne dostupných niekoľko diagnostických súprav založených na PCR. Sú to Probelia (Sanofi-Pasteur, Marnes-la-Coquette, Francúzsko), BAX for Screening (Qualicon, Wilmington, DE, USA) a TaqMan (Pelkin-Elmer Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). O analytických parametroch uvedených systémov je k dispozícii málo objektívnych informácií.

Záver

Pomocou PCR je možné citlivo a selektívne detegovať listérie v potravinách. Praktický význam má podstatné skrátenie postupu dôkazu z 4–5 dní na 2–3 dni. Napriek značnému výskumnému úsiliu venovanému danej problematike však dosiaľ stále nie je k dispozícii spoľahlivá metóda na rýchly dôkaz listérií v potravinách. Kým otázka primerov je uspokojivo vyriešená, doriešiť treba predovšetkým postupy rozmnoženia listérií pred PCR.

Literatúra

1. LOVETT, J.: *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne bacterial pathogens. Ed. Doyle, M. P. New York : Marcel Dekker, 1989, s. 283-310.
2. FARBER, J. M. - PETERKIN, P. I.: *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiological Reviews, 55, 1991, s. 476-511.
3. McLAUCHLIN, J.: The relationship between *Listeria* and listeriosis. Food Control, 7, 1996, s. 187-193.
4. ANTAL, M. - GÖRNER, F.: Listeriôza z hľadiska mliekarenskej technológie. Bulletin potravinárskeho výskumu, 29, 1990, s. 35-38.
5. ISO 11290 : 1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. 1996.
6. SAIKI, R. K. - GELFAND, D. H. - STOFFEL, S. - SCHARF, S. J. - HIGUCHI, R. - HORN, G. T. - MULLIS, K. B. - ERLICH, H. A.: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, 239, 1988, s. 487-491.
7. ZIGOVÁ, M. - JURÍKOVÁ, K. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A.: Polymerázová refazová reakcia, princíp a využitie na detekciu mikroorganizmov. Bulletin potravinárskeho výskumu, 33, 1994, s. 57-68.
8. FURRER, B. - CANDRIAN, U. - HOEFELIN, CH. - LUETHY, J.: Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments. Journal of Applied Bacteriology, 70, 1991, s. 372-379.
9. STARBUCK, M. A. B. - HILL, P. J. - STEWARD, G. S. A. B.: Ultrasensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). Letters in Applied Microbiology, 15, 1992, s. 248-252.

10. BORDER, P. M. - HOWARD, J. J. - PLASTOW, G. S. - SIGGENS, K. W.: Detection of *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* using polymerase chain reaction. Letters in Applied Microbiology, 11, 1990, s. 158-162.
11. GOLSTEYN-THOMAS, E. J. - KING, R. K. - BURCHAK, J. - GANNON, V. P. J.: Sensitive and specific detection of *Listeria monocytogenes* in milk and ground beef with the polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 57, 1991, s. 2576-2580.
12. GRAY, D. I. - KROLL, R. G.: Polymerase chain reaction amplification of the *flaA* gene for the rapid identification of *Listeria* spp. Letters in Applied Microbiology, 20, 1995, s. 65-68.
13. KACLÍKOVÁ, E. - KOLENČÍKOVÁ, B. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUČHTA, T.: Urýchlenie dôkazu listérií v syroch použitím imunomagnetickej separácie a polymerázovej reťazovej reakcie. Bulletin potravinárskeho výskumu, 37, 1998, s. 229-236.
14. AGERSBORG, A. - DAHL, R. - MARTINEZ, I.: Sample preparation and DNA extraction procedures for polymerase chain reaction of *Listeria monocytogenes* in seafoods. International Journal of Food Microbiology, 35, 1997, s. 275-280.
15. FITTER, S. - HEUZENROEDER, M. - THOMAS, C. J.: A combined PCR and selective enrichment method for rapid detection of *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Bacteriology, 73, 1992, s. 53-59.
16. HERMAN, L. M. F. - DERIDDER, H. F. M. - VLAEMYNCK, G. M. M.: A multiplex PCR method for the identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in dairy samples. Journal of Food Protection, 58, 1995, s. 867-872.
17. BANSAL, N. S.: Development of a polymerase chain reaction assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in foods. Letters in Applied Microbiology, 22, 1996, s. 353-356.
18. ERICSSON, H. - STALHANDSKE, P.: PCR detection of *Listeria monocytogenes* in gravad rainbow trout. International Journal of Food Microbiology, 35, 1997, s. 281-285.
19. MANZANO, M. - COCOLIN, L. - FERRONI, P. - CANTONI, C. - COMI, G.: A simple and fast PCR protocol to detect *Listeria monocytogenes* from meat. Journal of Science of Food and Agriculture, 74, 1997, s. 25-30.
20. ROSSEN, L. - NORSKOV, P. - HOLMSTROM, K. - RASMUSSEN, O. F.: Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA extraction solutions. International Journal of Food Microbiology, 17, 1992, s. 37-45.
21. BSAT, N. - BATT, C. A.: A combined modified reverse dot-blot and nested PCR assay for the specific non-radioactive detection of *Listeria monocytogenes*. Molecular and Cellular Probes, 7, 1993, s. 199-207.
22. BUBERT, A. - KOHLER, S. - GOEBEL, W.: The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus- and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. Applied and Environmental Microbiology, 58, 1992, s. 2625-2632.
23. WANG, R.-F. - CAO, W.-W. - JOHNSON, M. G.: Development of cell surface protein associated gene probe specific for *Listeria monocytogenes* and detection of the bacteria in food by PCR. Molecular and Cellular Probes, 6, 1992, s. 119-129.
24. FLUIT, A. C. - TORENSMA, R. - VISSER, M. J. C. - AARSMAN, C. J. M. - POPPELIER, M. J. J. G. - KELLER, B. H. I. - KLAUWIJK, P. - VERHOEF, J.: Detection of *Listeria monocytogenes* in cheese with the magnetic immuno polymerase chain reaction assay. Applied and Environmental Microbiology, 59, 1993, s. 1289-1293.
25. WINTERS, D. K. - MALONEY, T. P. - JOHNSON, M. G.: Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by a PCR assay specific for an aminopeptidase. Molecular and Cellular Probes, 13, 1999, s. 127-131.
26. RIJPEHS, N. P. - JANNES, G. - VAN ASBROECK, M. - HERMAN, L. M. F. - ROSSAU, R.: Simultaneous detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by reverse hybridisation with 16S - 23S rRNA spacer probes. Molecular and Cellular Probes, 9, 1995, s. 423-432.

27. MENGAUD, J. - VICENTE, M. F. - CHENEVERT, J. - PEREIRA, J. M. - GEOFFROY, C. - GIZQUEL-SANZEY, B. - BAQUERO, F. - PEREZ-DIAZ, J. C. - COSSART, P.: Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes*. *Infection and Immunity*, 56, 1988, s. 766-772.
28. MANZANO, M. - COCOLIN, L. - CANTONI, C. - COMI, G.: Detection and identification of *Listeria monocytogenes* from milk and cheese by a single step PCR. *Molecular Microbiology*, 7, 1997, s. 85-88.
29. WANG, C. - HONG, C.: Quantitative PCR for *Listeria monocytogenes* with colorimetric detection. *Journal of Food Protection*, 62, 1999, s. 35-39.
30. WERNARS, K. - HEUVELMAN, K. - NOTERMANS, S. - DOMANN, E. - LEIMEISTER-WACHTER, M. - CHAKRABORTY, T.: Suitability of the *prfA* gene, which encodes a regulator of virulence genes in *Listeria monocytogenes*, in the identification of pathogenic *Listeria* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 1992, s. 765-768.

Do redakcie došlo 13.7.1999.

Detection of *Listeria* spp. in food using methods based on the polymerase chain reaction

DRAHOVSKÁ, H. - PANGALLO, D. - KUČHTA, T.: *Bull. potrav. Výsk.*, 38, 1999, p. 223-231.

SUMMARY. Using the polymerase chain reaction (PCR), it is possible to detect *Listeria* spp. in food quickly and effectively. PCR is usually preceded by enrichment of *Listeria* spp. DNA is extracted from the cultures prepared using cell lysis. Primers for a selective detection of *Listeria monocytogenes* or *Listeria* spp. have been described by several authors. The amplified DNA is usually analysed by agarose gel electrophoresis, however, hybridization methods allowing the automation of the entire method have been described as well. Development of a rapid and reliable PCR-based method, which would produce identical results as the standard culture method at the analysis of naturally-contaminated food samples, is a goal of the current research.

KEYWORDS: *Listeria*, polymerase chain reaction