

Urýchlenie dôkazu listérií v syroch použitím imunomagnetickej separácie a polymerázovej reťazovej reakcie

EVA KACLÍKOVÁ – BARBORA KOLENČÍKOVÁ
– ALENA ŠTEFANOVIČOVÁ – TOMÁŠ KUČHTA

SÚHRN. V predkladanej práci sa opisuje využitie imunomagnetickej separácie (IMS) a polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) na urýchlenie dôkazu listérií v syroch. Nahradenie selektívnej kultivácie vo Fraserovom médiu použitím IMS pomocou Dynabeads® anti-*Listeria* a použitie duplex PCR na odlíšenie *L. monocytogenes* od ostatných *Listeria* spp. umožnilo získať výsledky analýzy za 78 h. Uvedená metóda sa aplikovala na umelo kontaminované vzorky tvarohu a neúdenej parenice, pričom poskytovala zhodné výsledky s referenčnou metódou a detekčný limit bol 10^0 KTJ/25 g.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Listeria*, syr, imunomagnetická separácia, polymerázová reťazová reakcia

Listérie sú grampozitívne baktérie vyskytujúce sa v životnom prostredí a za určitých okolností schopné infikovať zvieratá alebo človeka. Z rodu *Listeria* je pre človeka patogénny druh *L. monocytogenes*, ktorý spôsobuje ochorenie listeriózu. Listeriózou sú najčastejšie postihnuté deti, starší ľudia a imunodeficitní jedinci. Ochorenie sa prejavuje v ľahších prípadoch chrípkovými príznakmi, v ťažších prípadoch dochádza k infekcii krvi alebo centrálnaj nervovej sústavy, najmä k meningitíde. Vplyv infekcie na gravidné ženy sa prejavuje potratmi, narodením mŕtvych detí, resp. meningitídou narodených detí. Úmrtnosť na listeriózu je 27 – 30 %, v neliečených prípadoch až 90 % [1-4].

Najčastejšou príčinou listerióz je konzumácia potravín kontaminovaných patogénnymi listériami. Väčšinou sú to potraviny, ktoré boli dlhšiu dobu skladované pri chladiarenských teplotách a ktoré sa konzumujú bez ďalšej tepelnej úpravy. Napríklad sú to mäkké syry a lahôdkárske výrobky. Listérie sa totiž dobre rozmnožujú pri chladiarenských teplotách, ktoré ich zvýhodňujú voči sprievodnej mezofilnej mikróflóre, pričom znášajú široký rozsah

Ing. Eva KACLÍKOVÁ, CSc., Mgr. Barbora KOLENČÍKOVÁ, Ing. Alena ŠTEFANOVIČOVÁ, RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 824 75 Bratislava.

pH a koncentrácie solí. Pasterizácia listérie účinne devitalizuje, z čoho vyplýva, že kontaminácia hotových výrobkov je často výsledkom popasterizačnej kontaminácie zo zdrojov prostredia prevádzok [1,3,5,6].

Výskyt listerióz vyvolal potrebu skúšania potravín na prítomnosť patogénnych listérií. V súčasnosti platná metóda na dôkaz *L. monocytogenes* podľa ISO 11290-1:1996 [7] je založená na tvorbe typických kolónií na tuhých selektívnych médiach po predchádzajúcej 72-hodinovej kultivácii v tekutých médiach, ktoré vykazujú určité morfológické a metabolické charakteristiky. Uvedená metóda je prácná a časovo náročná, preto je veľký záujem o jej urýchlenie. V predkladanej práci sa použila imunomagnetická separácia (IMS) na urýchlenie nakoncentrovania listérií a polymerázová reťazová reakcia (PCR) na urýchlenie odlíšenia kolónií *L. monocytogenes* od iných *Listeria* spp. IMS je metóda, pomocou ktorej je možná rýchla koncentrácia listérií na základe väzby na guľôčky pokryté protilátkou a následnej separácie guľôčok pomocou magnetu [8,9]. PCR je metóda, ktorá umožňuje enzýmovú amplifikáciu fragmentu charakteristického génu *iap* v prípade *L. monocytogenes* a fragmentu sekvencie 16S rRNA v prípade všetkých *Listeria* spp. [10]. Kombináciou IMS a PCR sa podarilo dosiahnuť urýchlenie dôkazu listérií v syroch pri zachovaní požadovaného detekčného limitu a selektivity.

Materiál a metódy

Mikroorganizmy

Listeria monocytogenes CAPM 5580 pochádzala z Výskumného ústavu veterinárneho lekárstva, Brno, ČR; *L. ivanovii* CCM 5884 a *L. innocua* CCM 4030 pochádzali z Českej zbierky mikroorganizmov, Brno, ČR; *L. monocytogenes* NCTC 11994 pochádzala z Robert Gordon University, Aberdeen, Veľká Británia; *L. innocua* B1, *L. ivanovii* B2, *L. seeligeri* B3, *L. grayi* B4, *L. murrayi* B5, *L. welshimeri* B6 a *L. monocytogenes* B7 pochádzali z Ústavu mikrobiológie a imunológie VFU Brno, ČR; *L. monocytogenes* ALM 92 pochádzala z SVM RIVM, Bilthoven, Holandsko; *L. innocua* 205, *L. welshimeri* 206, *L. welshimeri* 207 a *L. ivanovii* 208 pochádzali z VŠCHT, Praha, ČR; *L. innocua* K1 a *L. welshimeri* K2 pochádzali zo Štátneho zdravotného ústavu, Košice. Referenčný materiál *L. monocytogenes* 5 (ALM 92) pochádzal z SVM RIVM, Bilthoven, Holandsko. Druhové zaradenie použitých kmeňov sa overilo pomocou testu API *Listeria* (BioMérieux, Marcy l'Étoile, Francúzsko).

Vzorky syrov

Tvaroh a neúdená parenica pochádzali z maloobchodnej siete. Na ich umelú kontamináciu sa použili desiatkové riedenia kultúry *L. monocytogenes* NCTC 11994 pripravenej v médiu Brain heart infusion (Oxoid, Basingstoke, Veľká Británia) kultiváciou pri 30 °C počas 18 h za miešania, pričom sa pridával 1 ml príslušného riedenia kultúry k 25 g syra homogenizovaného v 225 ml Fraserovho média s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla (Merck, Darmstadt, Nemecko). V prípade umelej kontaminácie pomocou referenčného materiálu sa kapsula rozpustila v 25 ml Fraserovho média s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla pri 37 °C počas 1 h za miešania a pridala sa k 25 g syra homogenizovaného v 200 ml uvedeného selektívneho média.

Referenčná metóda

Referenčná metóda vychádzala z normy ISO 11290-1:1996 [7]. 25 g vzorky sa homogenizovalo v 225 ml Fraserovho média s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla (Merck) v homogenizátore Stomacher 400 (Seward, London, Veľká Británia) počas 60 s pri najnižšej intenzite. Homogenizovaná vzorka sa inkubovala 24 h pri 30 °C. 0,1 ml získanej kultúry sa použilo na očkovanie 10 ml Fraserovho média (Merck), ktoré sa ďalej inkubovalo 24 h pri 37 °C. Po 0,2 ml získanej kultúry sa použilo na očkovanie selektívnych tuhých médií PALCAM a Oxford (Merck), ktoré sa ďalej inkubovali 24 - 48 h pri 37 °C.

Imunomagnetická separácia

1 ml kultúry vo Fraserovom médiu s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla, alebo jej filtrátu získaného filtráciou cez filtračný papier Filtrak 388 (Spezialpapierfabrik, Niederschlag, Nemecko), sa premiešal s 20 µl suspenzie Dynabeads® anti-*Listeria* (Dynal, Oslo, Nórsko) v mikroskúmavke a inkuboval 10 min za mierneho miešania. Guľôčky sa separovali v stojane MPC®-M (Dynal) po zasunutí magnetu počas 3 min. Supernatant sa odstránil a guľôčky sa suspendovali v 1 ml premývacieho tlmivého roztoku PBS, obsahujúceho 0,01 mol.l⁻¹ fosforečnanový tlmivý roztok, pH 7,4, 0,15 mol.l⁻¹ NaCl a 0,05 % Tween 20 (Merck). Po separácii a odstránení supernatantu sa guľôčky suspendovali v 100 µl premývacieho tlmivého roztoku. Po 50 µl zo suspenzie sa očkovalo na povrch tuhých selektívnych médií PALCAM a Oxford, ktoré sa inkubovali 24 - 48 h pri 37 °C.

Polymerázová reťazová reakcia

Jedno očko odobraté z kolónie na tuhej pôde sa suspendovalo v 100 μ l lyzačného roztoku, obsahujúceho 0,05 mol.l⁻¹ NaOH a 0,125 % dodecylsulfónanu sodného, a inkubovalo sa 15 min pri 95 °C. 50 μ l reakčnej zmesi obsahovalo 1 μ l bunkového lyzátu, 50 mmol.l⁻¹ KCl, 1,5 mmol.l⁻¹ MgCl₂, 10 mmol.l⁻¹ Tris.HCl, pH 9,0, 200 μ mol.l⁻¹ každého dNTP (Pharmacia, Uppsala, Švédsko), 25 pmol každého primeru ([10]; Genset, Paris, Francúzsko):

LiF: 5' CAAggATAAgAgTAACTgC 3',

LiR: 5' AggTT/gACCCTACCgACTTC 3',

AD03: 5' ACAAgCTgCACCTgTTgCAg 3',

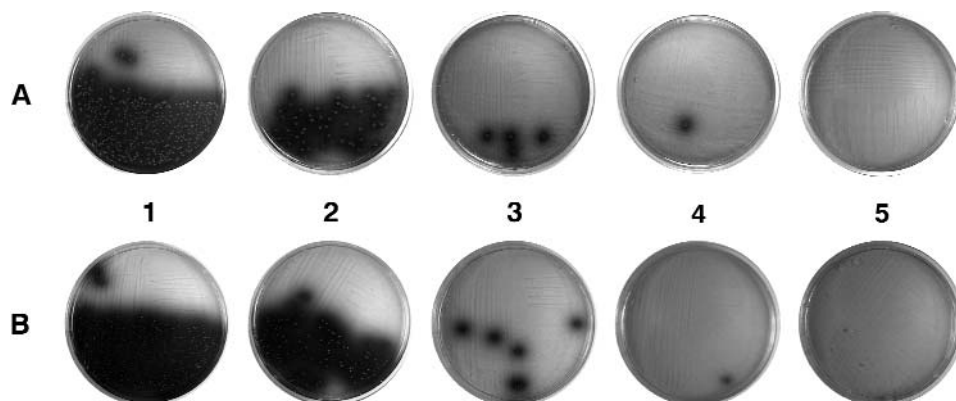
LM3: 5' gAACCTTgATTAgCATTCgT 3',

1 U r*Taq* DNA polymerázy (Pharmacia) a 0,5 % Tween 20 (Merck). Reakčná zmes sa prevrstvila 50 μ l parafínového oleja. Amplifikácia sa realizovala v termálnom cykléri PHC-3 (Techne, Cambridge, Veľká Británia) a použil sa teplotný program: úvodná denaturácia 1 min pri 95 °C, 30 cyklov (denaturácia 15 s pri 95 °C, annealing 15 s pri 50 °C, polymerizácia 30 s pri 72 °C) a záverečná polymerizácia 8 min pri 72 °C. Produkty amplifikácie sa analyzovali elektroforézou v agarózovom géli (1 %; Serva, Heidelberg, Nemecko) pri 10 V.cm⁻¹ počas 1 h a vizualizovali UV-transilumináciou po vyfarbení etídiumbromidom [11].

Výsledky a diskusia

Moderné separačné a detekčné metódy, akými sú IMS a PCR, majú potenciál urýchliť dôkaz listérií v syroch. IMS umožňuje nahradiť zdĺhavú selektívnu kultiváciu vo Fraserovom médiu [8]. PCR umožňuje nahradiť práce a metodicky náročné testy, pomocou ktorých sa odlišuje *L. monocytogenes* od iných *Listeria* spp. [10]. PCR má pritom vyššiu selektivitu a jednoznačnejšiu interpretáciu výsledkov ako iné rýchle testy, napr. API *Listeria* [12]. Podmienkou praktickej aplikovateľnosti však je, aby uvedené urýchlenie nebolo na úkor analytických parametrov, čiže aby urýchlená metóda mala požadovaný detekčný limit 10⁰ KTJ/25 g a 100-percentnú selektivitu. Preto sme navrhovanú urýchlenú metódu hodnotili z tohoto hľadiska.

Aby sa stanovil detekčný limit IMS pri použití Dynabeads® anti-*Listeria* v čistej kultúre, pripravil sa desiatkový rad riedení kultúry *L. monocytogenes* NCTC 11994 vo Fraserovom médiu s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla. S jednotlivými riedeniami sa vykonala IMS a suspendované guľôčky sa očkovali na povrch tuhých médií PALCAM a Oxford. Ak pova-



OBR. 1. Rast kolónií *L. monocytogenes* NCTC 11994 po separácii pomocou IMS.

Rast na tuhých selektívnych médiach: A - PALCAM, B - Oxford.

1 - 10^4 KTJ.ml⁻¹, 2 - 10^3 KTJ.ml⁻¹, 3 - 10^2 KTJ.ml⁻¹, 4 - 10^1 KTJ.ml⁻¹, 5 - 10^0 KTJ.ml⁻¹.

FIG. 1. Growth of colonies of *L. monocytogenes* NCTC 11994 after the separation by IMS.

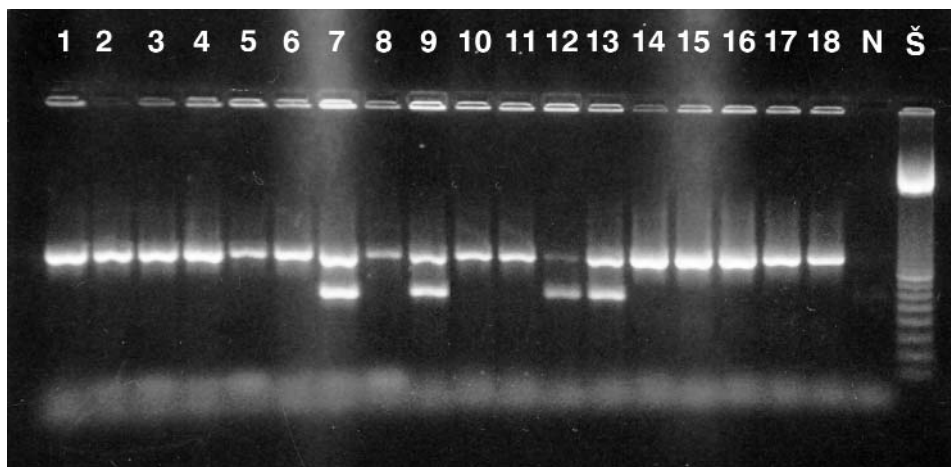
Growth on selective agars: A - PALCAM, B - Oxford.

1 - 10^4 CFU.ml⁻¹, 2 - 10^3 CFU.ml⁻¹, 3 - 10^2 CFU.ml⁻¹, 4 - 10^1 CFU.ml⁻¹, 5 - 10^0 CFU.ml⁻¹.

žujeme za pozitívny výsledok rast aspoň 3 charakteristických kolónií na jednej miske, detekčný limit IMS pri hodnotení čistej kultúry v selektívnom médiu bol 10^2 KTJ.ml⁻¹ (obr. 1).

Aby sa stanovila selektivita PCR, analyzoval sa súbor 18 kmeňov listérií metódou duplex PCR. V prípade všetkých *Listeria* spp. sa amplifikoval fragment veľkosti 1003 bp, v prípade všetkých *L. monocytogenes* sa amplifikoval tiež fragment veľkosti 593 bp (obr. 2).

Aby sa stanovil detekčný limit celej metódy, pozostávajúcej z rozmnoženia vo Fraserovom médiu s polovičnou koncentráciou selektívneho činidla, IMS a kultivácie na tuhých selektívnych médiach, pripravili sa vzorky tvarohu a neúdenej parenice, ktoré sa umelo kontaminovali desiatkovými riedeniami kultúry *L. monocytogenes* NCTC 11994. Predchádzajúcou analýzou pomocou referenčnej metódy sa overilo, že použité vzorky potravín neobsahujú listérie. Umelo kontaminované vzorky sa súbežne analyzovali metódou IMS a referenčnou metódou, pričom v prípade IMS sa paralelne hodnotili varianty s filtráciou a bez filtrácie. V prípade referenčnej metódy, ako aj v prípade IMS s filtráciou i bez filtrácie, sa v siedmich nezávislých experimentoch získali zhodné výsledky a stanovil sa detekčný limit 10^0 KTJ/25 g. Z týchto výsledkov vyplýva, že pri analýze syrov metódou IMS nie je nevyhnutná filtrácia.

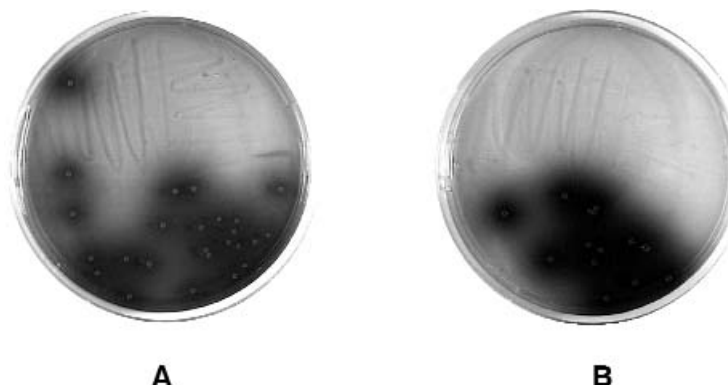


OBR. 2. Analýza kmeňov listérií metódou duplex PCR.

FIG. 2. Analysis of *Listeria* strains by duplex PCR.

1 - *L. innocua* B1, 2 - *L. ivanovii* B2, 3 - *L. seeligeri* B3, 4 - *L. grayi* B4, 5 - *L. murrayi* B5, 6 - *L. welshimeri* B6, 7 - *L. monocytogenes* B7, 8 - *L. ivanovii* CCM 5884, 9 - *L. monocytogenes* CAPM 5580, 10 - *L. innocua* CCM 4030, 11 - *L. welshimeri* 207, 12 - *L. monocytogenes* NCTC 11994, 13 - *L. monocytogenes* ALM 92, 14 - *L. innocua* 205, 15 - *L. welshimeri* 206, 16 - *L. ivanovii* 208, 17 - *L. innocua* K1, 18 - *L. welshimeri* K2, N - negatívna kontrola, Š - štandard molekulových hmotností n.100 bp.

N - negative control, Š - molecular weight standard n.100 bp.



OBR. 3. Dôkaz listérií metódou IMS vo vzorke tvarohu, ktorá sa umelo kontaminovala referenčným materiálom obsahujúcim v priemere 5 buniek *L. monocytogenes*.

Rast kolónií na médiách: A - PALCAM, B - Oxford.

FIG. 3. Detection of listeriae by IMS in a sample of quark artificially contaminated with a reference material containing on an average 5 cells of *L. monocytogenes*.

Growth of colonies on media: A - PALCAM, B - Oxford.

Aby sa overil detekčný limit 10^0 KTJ/25 g, analyzovalo sa metódou IMS a referenčnou metódou päť vzoriek tvarohu umelo kontaminovaných pomocou referenčného materiálu obsahujúceho v priemere 5 buniek *L. monocytogenes*. Obidvoma metódami sa získali zhodné výsledky, a to 4 pozitívne vzorky a 1 negatívna. Pozitívny výsledok bol v prípade metódy IMS jasne odčítateľný (obr. 3). Zistený jeden negatívny výsledok bol spôsobený neprítomnosťou listérií v použitej kapsuli referenčného materiálu, ako sa potvrdilo referenčnou metódou.

Použitie IMS a PCR v opísanej metóde na dôkaz listérií v syroch umožnilo skrátenie doby analýzy na 78 h. Oproti referenčnej metóde to predstavuje časovú úsporu dvoch dní v prípade negatívneho výsledku a troch dní v prípade pozitívneho výsledku. Ako ukázali výsledky hodnotenia metódy na umelo kontaminovaných vzorkách tvarohu a neúdenej parenice, uvedené urýchlenie nebolo na úkor detekčného limitu metódy. Pre definitívne praktické overenie analytických parametrov je však potrebné porovnať navrhnutú urýchlenú metódu s referenčnou pri analýze prirodzene kontaminovaných vzoriek potravín.

Podakovanie

Autori ďakujú Dr. L. Herman a Dr. N. Rijpens, Rijkszuivelstation, Melle, Belgicko, za metodickú pomoc týkajúcu sa polymerázovej reťazovej reakcie a Dr. N. Strachan, Dr. I. Millar a Dr. D. Gray, Robert Gordon University, Aberdeen, Veľká Británia, za podnety týkajúce sa hodnotenia imunomagnetickú separácie.

Literatúra

1. LOVETT, J.: *Listeria monocytogenes*. In: Foodborne bacterial pathogens. Ed. M. P. Doyle. 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. CALDER, J. A. M.: *Listeria* meningitis in adults. Lancet, 350, 1997, s. 307-308.
5. ANTAL, M. - GÖRNER, F.: Listerióza z hľadiska mliekárenskej technológie. Bulletin potravinárskeho výskumu, 29, 1990, s. 35-38.
6. KOZAK, J. - BALMER, T. - BYRNE, R. - FISHER, K.: Prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods: Incidence in dairy products. Food Control, 7, 1996, s. 215-221.
7. ISO 11290-1:1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method. 1996.
8. DYNAL, Oslo: Dynabeads® biomagnetic separation. 1997. 64 s.

9. AVOYNE, C. – BUTIN, M. – DELAVAL, J. – BIND, J. L.: Detection of *Listeria* spp. in food samples by immunomagnetic capture: ListerScreen method. Journal of Food Protection, 60, 1997, s. 377-384.
10. HERMAN, L. M. F. - DE RIDDER, 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.
11. ZIGOVÁ, M. - JURÍKOVÁ, K. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A.: Polymerázová reťazová reakcia, princíp a využitie na detekciu mikroorganizmov. Bulletin potravinárskeho výskumu, 33, 1994, s. 57-68.
12. McLAUCHLIN, J.: The identification of *Listeria* species. International Journal of Food Microbiology, 38, 1997, s. 77-81.

Do redakcie došlo 16.11.1998.

Rapid detection of *Listeria* in cheese using immunomagnetic separation and polymerase chain reaction

KACLÍKOVÁ, E. - KOLENČÍKOVÁ, B. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - KUCHTA, T.:
Bull. potrav. Výsk., 37, 1998, p. 229-236.

SUMMARY. Application of the immunomagnetic separation (IMS) and the polymerase chain reaction (PCR) to a rapid detection of *Listeria* spp. in cheese is described. Use of IMS with Dynabeads® anti-*Listeria* instead of the selective enrichment in Fraser broth, and using duplex PCR to distinguish between *L. monocytogenes* and other *Listeria* spp., reduced the time of analysis to 78 h. The method was applied to artificially contaminated samples of quark and Slovak cheese „parenica“, producing equal results as the reference method with the detection limit of 10⁰ CFU/25 g.

KEYWORDS: *Listeria*, cheese, immunomagnetic separation, polymerase chain reaction