

Molekularne metody wykrywania *Listeria monocytogenes* w żywności

BEATA LACHTARA, KINGA WIECZOREK, JACEK OSEK

Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego, Państwowy Instytut Weterynaryjny
– Państwowy Instytut Badawczy w Puławach, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Otrzymano 16.06.2014

Zaakceptowano 18.11.2014

Lachtara B., Wieczorek K., Osek J.

Molecular methods for the detection of *Listeria monocytogenes* in food

Summary

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen that causes a disease known as listeriosis, which is especially dangerous for pregnant women. Infection with *L. monocytogenes* may also result in stillbirths, abortions and premature deliveries, as well as meningitis, septicaemia, encephalitis, and meningococcal meningitis. Conventional detection methods of these bacteria are time-consuming; therefore, rapid alternative methods, including those based on molecular tests are needed. PCR is sensitive and specific; however, it requires the use of an agarose gel, which increases the time of analysis. A technique that allows the elimination of this step is real-time PCR, which enables the quantitative determination of *L. monocytogenes* in foods. A modification of PCR is multiplex PCR that allows detection of several genes at the same time and distinguishes between different species of microorganisms. Techniques such as RT-PCR or NASBA, where the target molecule is RNA, are used to detect viable cells and also allow quantitative analyses to be performed. Another rapid and specific method is LAMP, which can be performed in one hour in a water bath or heating block, without the use of a thermocycler. Biosensors and microarrays are examples of new technologies that due to the possibility to use anywhere and immediate interpretation of the results can be routinely used in the future for identification of *L. monocytogenes* in food.

Keywords: *L. monocytogenes*, food, molecular detection methods, PCR

Listeria monocytogenes jest Gram-dodatnią, niesporującą, względnie beztlenową bakterią, wykazującą ruch w temperaturze 10-25°C. Do rodzaju *Listeria* należy obecnie dziesięć gatunków: *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtiaae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* i *L. welshimeri*, spośród których drobnoustrojem patogenym dla ludzi jest *L. monocytogenes* (12, 45, 46). *Listeria* izolowana jest z różnych środowisk, w tym ze ścieków, wody, gleby, wielu produktów spożywczych (mięso, owoce morza, produkty mleczne czy warzywa), a także odchodów ludzkich i zwierzęcych. Zakażenia ludzi powodowane przez te drobnoustroje określane są nazwą listeriozy, a do ich najczęstszych objawów klinicznych należą: posocznica, zapalenie opon mózgowych i poronienia (46, 47). W 2012 r., w państwach członkowskich Unii Europejskiej zanotowano 1642 przypadki listeriozy (nieznacznie więcej niż w 2011 r.), z których 198 było śmiertelnych (najwyższa liczba od 2006 r.) (13).

Według Rozporządzenia Komisji (WE) nr 2073/2005 wymagane jest, aby w produktach gotowych do spożycia przeznaczonych dla niemowląt i do specjalnych

celów medycznych *L. monocytogenes* była nieobecna w 25 g (38). W przypadku innej żywności gotowej do spożycia liczba drobnoustrojów w ciągu całego okresu przydatności nie może przekraczać 100 jtk/g, zaś w żywności, w której możliwy jest wzrost *L. monocytogenes*, drobnoustroje te nie mogą być obecne w 25 g w chwili wprowadzenia tego produktu na rynek (38). Według raportów Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), limit ten najczęściej przekraczany był w rybach i produktach rybnych. W 2012 r. *L. monocytogenes* wykryto w 12,0% z 10 831 przebadanych produktów rybnych gotowych do spożycia. Większość badanych próbek (8538) pochodziła z jednego państwa członkowskiego – Polski (13).

Tradycyjne metody identyfikacji *L. monocytogenes* bazują na badaniach bakteriologicznych z użyciem pożywki wzbogacającej (zwykle Fräsera) i selektywnych podłoży stałych, gdzie ostateczny wynik otrzymuje się po 6-10 dniach (2, 27). Oprócz długiego czasu niezbędnego do wykonania tego typu badania, wadą jest również konieczność stosowania wielu odczynników i pożywek oraz wpływ mikroflory towarzyszącej maskującej organizm docelowy, która może wpływać

Tab. 1. Porównanie molekularnych metod wykrywania *L. monocytogenes*

Metoda	Charakterystyka metody				Piśmiennictwo	
	Wykrywany gen	Czas wstępnego namnażania (h)	Czas wykrywania <i>L. monocytogenes</i> (h)	Minimalna liczba wykrytych komórek		Matryca
PCR	actA	16	18	10 ¹ jtk/25 g/25 ml	wieprzowina, mleko, woda	51
	inlAB	16	24	10 jtk/25 g	wędlina	22
	hlyA	24	30	1 jtk/ml	mięso	2
Multiplex PCR	iap	20-24	30	13 jtk/25 g	mięso	49
	hly	24	30	10-100 jtk/ml	mięso	25
	hly	24	30	10 jtk/próbka	mięso, ryby, ser, warzywa	50
Real-time PCR	–*	24	30	10 ² -10 ³ jtk/ml	warzywa	4
	hlyA	24	30	100 jtk/g	wędlina	35
	hlyA	–	3	6-60 jtk/reakcja	odtłuszczone mleko, niepasteryzowane pełne mleko	30

Objaśnienia: * Brak informacji na temat wykrywanego genu

na czaso- i pracochłonność analiz (18). Ze względu na to, iż metody konwencjonalne wymagają dużo czasu, wprowadzane są nowe testy wykrywania *L. monocytogenes* w żywności, oparte na analizach molekularnych (np. PCR), które są szybsze, bardziej czułe i specyficzne (2, 23). Charakterystykę metod molekularnych, używanych do wykrywania obecności *L. monocytogenes* przedstawia tab. 1, zaś zestawienie genów docelowych, wybieranych do identyfikacji tych drobnoustrojów zebrano w tab. 2.

Metody oparte na amplifikacji DNA

PCR. Wszystkie metody amplifikacji bakteryjnego DNA, w tym *L. monocytogenes*, opierają się na syntezie wielu kopii docelowego fragmentu genu przy pomocy termostabilnej polimerazy. Najczęściej stosowaną techniką jest PCR, pozwalająca na szybkie powielenie odcinka DNA, który jest następnie uwidoczniany za pomocą dostępnych technik detekcji (20). Do genów wybieranych do identyfikacji *L. monocytogenes* należą: hlyA, iap, actA, inlAB, gen białka lmo0733 (regulatora transkrypcji) (tab. 2). Amplifikowane są również regiony międzygenowe oraz 16S i 23S RNA, a także markery kodujące białka p60, aminopeptydazę C, fosfolipazę C, białko wiążące fibronektynę i Dth18 (2, 18, 20, 22, 26, 40, 51). Konwencjonalny PCR nie pozwala jednak na odróżnianie martwych komórek *L. monocytogenes* od żywych (18). Dodatkową trudność w przypadku użycia go do identyfikacji tych drobnoustrojów w żywności sprawia występujący zwykle niski poziom zanieczyszczenia bakteryjnego, a także obecność mikroflory towarzyszącej, np. *Listeria innocua*. Ujemny wynik PCR może być też spowodowany występowaniem inhibitorów, takich jak cząsteczki fenolowe, nukleazy bądź substancji hamujących wzrost drobnoustrojów, stosowanych przy produkcji żywności. Problem ten rozwiązywany jest m.in. poprzez dodawanie do reakcji PCR kontroli wewnętrznej – IAC (internal amplification control). W przypadku powielenia fragmentu IAC i jednocześnie braku specyficznej amplifikacji DNA *L. monocytogenes* badanej próbki przyjmuje się, że nie zawierała ona docelowego DNA. Jeśli zaś nie odnotowano powielenia DNA badanej próbki i jednocześnie

Tab. 2. Geny docelowe najczęściej wykorzystywane do wykrywania *L. monocytogenes*

Metoda	Wykrywany gen	Piśmiennictwo
PCR	hly	2, 40
	iap	40
	actA	51
	gen białka lmo0733	26
	inlAB	22
Multiplex PCR	hlyA	25, 29, 50
	iap	6, 29, 49
	prfA	21, 29
	plc	29
Real-time PCR	hlyA	3, 30, 34, 35, 39
	iap	3, 16, 34
	prfA	34, 37
	actA	34
	plcA	34
	prs	3

kontroli wewnętrznej, uznaje się, że w próbce mogły być obecne inhibitory reakcji PCR (18).

W przypadku zanieczyszczenia badanej próbki niską liczbą komórek *L. monocytogenes* istotne jest określenie przybliżonego poziomu kontaminacji oraz rozróżnienie komórek martwych i żywych. W tym celu do amplifikacji zamiast DNA wykorzystywany jest mRNA, w którym przy pomocy odwrotnej transkryptazy (RT-PCR) identyfikowane są geny, np. hly, prfA i iap (18).

Badania wykonane przez Aznar i Alarcón (2) wykazały, że spośród genów docelowych hlyA, iap oraz kodujących białka Dth18 lub 16S RNA, najlepsze rezultaty amplifikacji uzyskano dla genu hlyA, gdzie po 24 h inkubacji próbek czułość reakcji wynosiła 1 jtk/ml. Metodę PCR do identyfikacji *L. monocytogenes* wykorzystano również dla 60 naturalnie zanieczyszczonych próbek żywności, porównując różne warunki inkubacji w pożywkach wzbogacających. Najwięcej wyników dodatnich zanotowano po 24 h hodowli w 37°C (14 próbek). Następnie, po wyborze optymalnego etapu przednamnażania, przebadano 217 próbek mikrobiologiczną metodą horyzontalną opartą na normie ISO

11290-1 i porównano z rezultatami PCR. Pierwszą techniką *L. monocytogenes* wykryto w 17 próbkach, drugą natomiast w 56, co wskazuje na znacznie wyższą czułość PCR od techniki konwencjonalnej (2).

Zhou i Jiao (51) wykazali, że startery dla genu actA są wysoce specyficzne dla *L. monocytogenes* (100% identyfikacja), podczas gdy dla innych gatunków *Listeria* i drobnoustrojów nie należących do tego rodzaju produkt PCR nie został wykryty w żadnej z badanych próbek. Identyfikację metodą PCR poprzedzała wstępna 16 h inkubacja w 30°C, a całkowity czas analizy wynosił 18 h.

Jung i wsp. (22) do wykrywania *L. monocytogenes* techniką PCR używali starterów dla genu inLAB i stwierdzili, że minimalna liczba wykrytych komórek bakteryjnych w czystych kulturach wynosiła 10⁵ w 1 ml hodowli. Gdy próbki w postaci wędliny poddano inkubacji wstępnej przez 16 h w 30°C w pożywce namnażającej, test zdolny był do identyfikacji 10 jtk/25 g *L. monocytogenes*.

Multiplex PCR. Multiplex PCR jest odmianą PCR, w której wykorzystuje się kilka par starterów, dzięki czemu możliwa jest amplifikacja wielu odcinków DNA jednocześnie, analizowanych w żelu agarozowym. W przypadku identyfikacji *L. monocytogenes* wykorzystywane są zwykle startery komplementarne do regionów wysoce konserwatywnych *Listeria* sp. (gen 23S rRNA) i *L. monocytogenes* (gen hlyA) (8). Bubert i wsp. (6) opracowali test PCR oparty na amplifikacji gatunkowo specyficznych fragmentów genu iap, co umożliwia identyfikację sześciu gatunków *Listeria* podczas jednej reakcji. Uzyskane fragmenty miały różne wielkości, co pozwoliło na ich łatwe rozróżnienie w żelu agarozowym.

Zarei i wsp. (49) przebadali metodą multiplex PCR z przednamnażaniem 210 próbek mięsa i stwierdzili, że od 2,8% do 4,3% z nich było zanieczyszczonych *L. monocytogenes*. Oznaczając granicę wykrywalności metody wykazano, że wynosiła ona 13 komórek w 25 g próbki.

Lei i wsp. (25) opracowali multiplex PCR, również wykorzystujący wstępne namnażanie próbek, o czułości 1-100 jtk/ml w zależności od drobnoustroju, pozwalający na jednoczesne wykrywanie sześciu patogenów, które mogą być obecne w żywności: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, *V. parahaemolyticus* i *Staphylococcus aureus*. Dla *L. monocytogenes* jako sekwencję docelową wybrano gen hly.

Bardzo czuły test multiplex PCR opracowali Zhang i wsp. (50), pozwalający na wykrycie 10 jtk/próbkę. Jako sekwencje docelowe służyły geny: hly dla *L. monocytogenes*, nuc dla *S. aureus*, invA dla *S. enterica*, stx i eae dla *E. coli* O157:H7. Badania przeprowadzono z użyciem wołowiny, wieprzowiny, krewetek, ryb, sera i warzyw. Zanieczyszczenie próbek na poziomie 1 jtk/ml każdego z patogenów i 24 h inkubacja pozwoliła na jednoczesne wykrycie drobnoustrojów w 87,5% przypadków.

Alarcón i wsp. (1) wykorzystali multiplex PCR do jednoczesnego wykrywania *S. aureus*, *Salmonella* i *L. monocytogenes*. Metoda ta, po 6 h wstępnym namnażaniu, umożliwiła wykrycie, odpowiednio, 2,6 × 10³ jtk/ml, 7,9 × 10² jtk/ml i 5,7 × 10² jtk/ml drobnoustrojów docelowych.

PCR w czasie rzeczywistym (real-time PCR). Technika real-time PCR oparta na klasycznej metodzie PCR posiada dwie ważne zalety: pozwala na monitorowanie ilości produktów PCR w każdym cyklu amplifikacji oraz cechuje się wysoką czułością reakcji. Ilościowa ocena uzyskanych produktów możliwa jest dzięki wykorzystaniu związków fluorescencyjnych, takich jak SYBR Green (interkalujących do dwuniciowego DNA) oraz sond molekularnych znakowanych fluorochromami: TaqMan Molecular Beacons, Hybridization Probes, a także sondy typu Skorpion (komplementarne do powielanej sekwencji kwasu nukleinowego). Zastosowanie w badaniu fluorochromów emitujących różne długości fali światła, pozwala na jednoczesne wykrywanie kilku sekwencji w próbce (36, 41). Kolejną zaletą tej metody jest eliminacja konieczności elektroforetycznej analizy produktów PCR. Celem oznaczania obecności *L. monocytogenes* próbkę żywności inkubuje się w pożywce namnażającej, a następnie powiela się bakteryjne DNA, z użyciem starterów specyficznych dla określonych genów. Amplifikacja DNA i idący za nią wzrost fluorescencji świadczy o obecności zidentyfikowanych drobnoustrojów. W technice tej mogą być na przykład użyte startery pozwalające na jednoczesne wykrywanie zarówno *Listeria* sp., jak i *L. monocytogenes*, poprzez powielenie genu 23S rRNA (konserwatywnego dla *Listeria* sp.) oraz markera hlyA, typowego dla *L. monocytogenes* (8). Metoda real-time PCR wykorzystywana jest do identyfikacji, jak również do ilościowego oznaczania *L. monocytogenes* w żywności i w próbkach klinicznych, co jest bardzo istotne w badaniach epidemiologicznych (15).

Dostępne są obecnie zestawy do real-time PCR, które ułatwiają wykorzystanie tej metody w laboratoriach diagnostycznych. Jest to m.in. system BAX[®] (DuPont-Qualicon), stosowany do wykrywania *L. monocytogenes* w produktach mlecznych, owocach morza, surowym i przetworzonym mięsie, a także owocach i warzywach. Technika ta umożliwia uzyskanie wyniku w ciągu 24 h w przypadku próbek nie zawierających *L. monocytogenes* (8, 19). Innym dostępnym zestawem jest Probelia[®] (Bio-Rad), którego specyficzność jest porównywalna z wykrywaniem *L. monocytogenes* w żywności metodą referencyjną ISO 11291-1. Kolejnymi zestawami do identyfikacji tego drobnoustroju są: LightCycler[®] *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Roche/Biotecon), GeneVision[®] Rapid Pathogen Detection System for *Listeria monocytogenes* (Warnex), a także TaqMan[®] *Listeria monocytogenes* Detection Kit (Applied Biosystems). Większość z tych testów zapewnia gotowe do użytku sondy, startery, odczynniki do amplifikacji, jak też kontrole wewnętrzne,

które pozwalają dokonywać prawidłowej interpretacji wyników fałszywie ujemnych, będących skutkiem hamowania reakcji poprzez różne czynniki znajdujące się w żywności (19).

Stwierdzono, że wykorzystując metodę real-time PCR, możliwa była jednoczesna identyfikacja w żywności *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* i *E. coli* O157:H7 (4). Całkowity czas badania wynosił ok. 30 h, włączając w to niezbędny etap wstępnego namnażania drobnoustrojów. W badaniach tych granice wykrywalności wynosiły, odpowiednio, (komórek/ml) 1-10 dla *E. coli* O157:H7 i *Salmonella* oraz 10^2 - 10^3 dla *L. monocytogenes* (4). Rodríguez-Lázaro i wsp. (35) uzyskali natomiast wynik 100 jtk/g *L. monocytogenes* podczas wykrywania drobnoustroju w kontaminowanej wędlinie, zaś przy oznaczaniu liczby (matryca – sztucznie zanieczyszczone surowe mięso i wędlina) najmniejszą liczbę, jaką metoda była zdolna zidentyfikować – 1000 jtk/g. Nogva i wsp. (30), powielając sekwencje genu *hlyA*, określili granicę wykrywalności na 6-60 jtk/reakcję w przypadku użycia do badania odtłuszczonego mleka i niepasteryzowanego pełnego mleka, a czas badania wynosił 3 h.

Pochop i wsp. (32) przeprowadzili badania żywności w kierunku obecności *L. monocytogenes* metodą real-time PCR, bez wcześniejszego etapu namnażania, stwierdzając wynik dodatni w 15 spośród 24 próbek. Równocześnie przeprowadzono badania klasyczną metodą mikrobiologiczną, uzyskując porównywalne wyniki.

RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Obecność specyficznych sekwencji RNA jest wskaźnikiem żywych komórek bakteryjnych w próbce (mRNA posiada krótszy okres półtrwania w stosunku do DNA, przez co szybciej degraduje po śmierci komórkowej), dlatego metoda RT-PCR jest wykorzystywana do molekularnej identyfikacji *L. monocytogenes* w żywności. W odczynie tym odwrotna transkryptaza, w obecności startera, tworzy komplementarny DNA (cDNA), służący następnie jako matryca w PCR (8, 18).

Klein i Juneja (24) porównali amplifikację trzech genów *L. monocytogenes* (*iap*, *hly*, *prfA*) metodą RT-PCR i stwierdzili największą wydajność dla markera *iap*. Po godzinnej inkubacji próbki w pożywce namnażającej granica wykrywalności wynosiła 10-15 jtk/ml dla czystej kultury. Czulość metody RT-PCR dla genu *hly* była 4 tys. razy mniejsza niż markera *iap*, zaś dla genu białka regulatorowego *prfA* nie zaobserwowano powielenia docelowego fragmentu po 5 godzinach inkubacji.

NASBA (Nucleic Acid Sequence-Based Amplification). NASBA jest metodą izotermalną opartą na amplifikacji RNA, w której wykorzystywane są: odwrotna transkryptaza, rybonukleaza H, polimeraza RNA T7, oraz dwa specyficzne oligonukleotydowe startery DNA. Pierwszym etapem jest synteza, przez odwrotną transkryptazę, nici cDNA komplementarnej do matrycowego RNA. Następnie RNA degradowane jest z kompleksu

RNA-DNA z użyciem rybonukleazy H. W dalszej kolejności komplementarna do cDNA nić DNA jest syntetyzowana z wykorzystaniem odpowiedniego startera i odwrotnej transkryptazy. Powstałe cząsteczki cDNA zawierają funkcjonalne miejsca rozpoznawane przez polimerazę RNA faga T7, która syntetyzuje liczne kopie anty-sensownego RNA, będącego matrycą w kolejnych etapach procedury. Powtarzające się cykle pozwalają na nagromadzenie jednoniciowych specyficznych cząsteczek RNA, które mogą być wykrywane w żelu agarozowym lub techniką hybrydyzacji (8, 10, 11).

Zaletą techniki NASBA jest możliwość detekcji żywych komórek *L. monocytogenes* i brak potrzeby użycia kosztowych termocyklerów, natomiast trudnością – konieczność izolacji matrycowego RNA (5, 8). Wadą metody są również ograniczenia co do wielkości powielanej sekwencji docelowej, która optymalnie powinna być w zakresie 120-250 nukleotydów (14).

Uyttendaele i wsp. (44) opracowali procedurę wykrywania *L. monocytogenes*, wykorzystując technikę NASBA z użyciem sekwencji 16S rRNA. Granica wykrywalności dla tego testu wynosiła 10^6 jtk/ml, jednak czulość metody była znacznie lepsza, jeśli próbki poddano namnażaniu wstępnemu. Przebadano próbki różnej żywności o masie 25 g, które zanieczyszczano *L. monocytogenes* w granicach 1-100 jtk. Metoda pozwoliła na wykrycie poziomu poniżej 10 jtk/25 g w ciągu 3 dni.

Blais i wsp. (5) do badań techniką NASBA wybrali sekwencję genu *hlyA*. Metoda ta zdolna była do wykrycia niewielkiej liczby komórek *L. monocytogenes* (< 10 jtk/g), którymi zanieczyszczone były różne produkty mleczarskie i proszek jajeczny, inkubowane wstępnie przez 48 h.

LAMP (loop mediated isothermal amplification). Metoda LAMP, w odróżnieniu od PCR, polega na cyklicznej izotermicznej amplifikacji docelowego DNA, która może być przeprowadzona w ciągu jednej godziny w łaźni wodnej lub bloku grzejnym, bez konieczności zastosowania termocyklera. Wykorzystywane startery są komplementarne do 6-8 miejsc docelowego DNA (18). Tang i wsp. (43) opracowali bardzo specyficzną i czułą procedurę LAMP, umożliwiającą identyfikację genu *hlyA* *L. monocytogenes*, w której w etapie detekcji produktów wykorzystano kalceinę lub mangan. Próbki inkubowano w pożywce BHI (Brain Heart Infusion) w 37°C. Granica wykrywalności testu LAMP w wykrywaniu *L. monocytogenes* w czystych hodowlach wynosiła 2 jtk/reakcję. Test LAMP wykazywał ok. 100-krotnie większą czulość w porównaniu do zastosowanej przez autorów PCR.

Wang i wsp. (48) przeprowadzili badanie techniką LAMP 182 izolatów *L. monocytogenes* pochodzących z próbek żywności i określili granicę wykrywalności na 100 jtk/reakcję. Specyficzność metody LAMP wynosiła 96,7% (176/182 próbek), zaś dla konwencjonalnej reakcji PCR 91,2% (166/182 analizy).

Wykrywanie polimorfizmu pojedynczych nici DNA. Metoda opiera się na założeniu, że nawet pojedyncza zmiana w sekwencji nukleotydowej fragmentu DNA może mieć wpływ na konformację cząsteczki, a co za tym idzie – różnicę w szybkości jej migracji w żelu z gradientem czynnika denaturującego. Czynnikiem denaturującym może być związek chemiczny, np. mocznik (DGGE-denaturing gradient gel electrophoresis) lub temperatura (TGGE-temperature gradient gel electrophoresis). W technice SSCP (single strand conformation polymorphism) denaturacja przeprowadzana jest przed dodaniem próbki do niedenaturującego żelu poliakryamidowego. Metoda ta stosowana jest do separacji fragmentów DNA o takiej samej długości, ale różnej sekwencji nukleotydów. Technika ta może być wykorzystywana do wykrywania różnych gatunków *Listeria*, które po amplifikacji wybranych genów (wspólnych dla tych gatunków) dają produkty trudne lub niemożliwe do rozróżnienia w żelu agarowym (18).

Cocolin i wsp. (9) wykazali, że technika DGGE pozwala na szybką identyfikację i różnicowanie *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. welshimeri*, *L. seeligeri* i *L. ivanovii*. Metoda ta może być stosowana jako szybki test przesiewowy w kierunku oznaczania obecności oraz różnicowania *Listeria* spp. i *L. monocytogenes* w żywności.

Hybrydyzacja DNA

W metodzie tej obecność sekwencji docelowej wykrywana jest przy pomocy komplementarnej sondy oligonukleotydowej, posiadającej znacznik niezbędny do dalszej detekcji. Początkowo sekwencje te znakowano izotopami promieniotwórczymi, a uzyskiwany sygnał był wykrywany autoradiograficznie. Obecnie stosuje się sondy biotynylowane, sondy zawierające digoksygeninę lub znacznik fluorescencyjny, pozwalające na detekcję z taką samą czułością, jak sondy zawierające izotopy promieniotwórcze. Technika hybrydyzacji wykorzystuje istniejące pomiędzy gatunkami *Listeria* różnice w sekwencji DNA i jest bardziej specyficzna niż metody biochemiczne i serologiczne oparte na badaniach fenotypowych. Z uwagi na to, że metoda ta nie obejmuje amplifikacji kwasu nukleinowego, ma ograniczoną czułość, bowiem wymaga co najmniej 10^4 kopii sekwencji docelowej w 1 μ l. Od momentu wprowadzenia do praktyki laboratoryjnej techniki opartej na PCR, hybrydyzacja DNA do identyfikacji drobnoustrojów w żywności jest stosowana wyjątkowo, w handlu dostępne są jednak rutynowe testy, np. Accuprobe (GenProbe Inc) i GeneTrak DNA hybridization kit (Neogen Corporation). Pierwszy oparty jest na hybrydyzacji znakowanych sond DNA do specyficznych sekwencji mRNA, dzięki czemu możliwa jest detekcja żywych komórek, natomiast drugi bazuje na hybrydyzacji ze znakowanymi fluorescencyjnie sondami oligonukleotydowymi, komplementarnymi do wewnątrzkomórkowych fragmentów docelowego RNA (15, 28).

Mikromacierze i biosensory jako techniki przyszłości

Zasada działania mikromacierzy bazuje na metodzie hybrydyzacji, w której sondy DNA umieszczane są na stałym podłożu, na które następnie nakłada się próbkę badanego DNA, wcześniej wyznakowanego fluorescencyjnie. Mikromacierze występują w dwóch odmianach – oligonukleotydowe (chipy DNA) oraz cDNA (33). Suo i wsp. (42) opracowali mikromacierz z wykorzystaniem 70 oligonukleotydów specyficznych dla czterech patogenów: *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. enterica* i *Campylobacter jejuni*. W celu zmniejszenia kosztów chip zawierał 12 zespołów dających możliwość badania 12 próbek jednocześnie. Granicę wykrywalności określono badając 10-krotne rozcieńczenia DNA; wyniosła ona 1×10^4 ng (ok. 20 kopii) DNA każdego z badanych drobnoustrojów.

Technika mikromacierzy DNA pozwala na równoległe wykrywanie i analizę w stosunkowo krótkim czasie tysięcy genów jednocześnie. Metoda ta może w przyszłości umożliwić szybką i dokładną analizę próbek żywnościowych pod kątem obecności chorobotwórczych drobnoustrojów, w tym *L. monocytogenes* (7, 19).

Większość testów mikrobiologicznych wykonywanych jest w laboratoriach stacjonarnych, gdzie wymagany jest wykwalifikowany personel i specjalistyczny sprzęt. W ostatnich latach trwają intensywne badania nad możliwością przeprowadzenia takich oznaczeń w praktycznie dowolnym miejscu, w warunkach polowych, stąd rozwój szybkich, czułych i przenośnych nowych technologii – czujników biologicznych zwanych biosensorymi, pozwalających na natychmiastową interpretację wyników (17). Biosensory są to cząsteczki pochodzenia biologicznego przyłączone do materiału rozpoznającego sygnał. Kiedy dochodzi do kontaktu próbki z biosensorem, zachodzi reakcja inicjująca sygnał, który następnie jest rozpoznawany przez urządzenie rejestrujące. Najczęściej stosowane są sygnały elektrochemiczne i optyczne (19).

Ohk i wsp. (31) jako aptamer w biosensorze wykorzystującym włókna optyczne zastosowali gen kodujący wytwarzanie białka internaliny A, używany do wykrywania *L. monocytogenes* w żywności. Granica wykrywalności biosensora zarówno w czystej kulturze, jak i w mieszaninie zawierającej inne bakterie wynosiła 10^3 jtk/ml. Metoda ta była zdolna wykryć *L. monocytogenes* w produktach mięsnych gotowych do spożycia, kontaminowanych na poziomie 10^2 jtk/25 g i inkubowanych wstępnie przez 18 h w 37°C , wykorzystanie tego typu techniki w kierunku obecności *L. monocytogenes* w żywności wymaga jednak dalszych badań.

Piśmiennictwo

- Alarcón B., García-Cañas V., Cifuentes A., González R., Aznar R.: Simultaneous and sensitive detection of three foodborne pathogens by multiplex PCR, capillary gel electrophoresis, and laser-induced fluorescence. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 7180-7186.
- Aznar R., Alarcón B.: PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. *J. Appl. Microbiol.* 2003, 95, 958-966.

3. Barbau-Piednoir E., Botteldoorn N., Yde M., Mahillon J., Roosens N. H.: Development and validation of qualitative SYBR®Green Real-Time PCR for detection and discrimination of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2013, 97, 4021-4037.
4. Bhagwat A. A.: Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *Int. J. Food Microbiol.* 2003, 84, 217-224.
5. Blais B. W., Turner G., Sooknanan R., Malek L. T.: A nucleic acid sequence-based amplification system for detection of *Listeria monocytogenes* hlyA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 310-313.
6. Bubert A., Hein I., Rauch M., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M.: Detection and differentiation of *Listeria* spp. by a single reaction based multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1999, 65, 4688-4692.
7. Call D. R., Borucki M. K., Loge F. J.: Detection of bacterial pathogens in environmental samples using DNA microarrays. *J. Microbiol. Methods* 2003, 53, 235-243.
8. Churchill R. L. T., Lee H., Hall J. C.: Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. *J. Microbiol. Methods* 2006, 64, 141-170.
9. Cocolin L., Rantsiou K., Iacumin L., Cantoni C., Comi G.: Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 6273-6282.
10. Collins R. A., Ko L.-S., So K.-L., Ellis T., Lau L.-T., Cheung Hoi Yu A.: Detection of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza subtype H5 (Eurasian lineage) using NASBA. *J. Virol. Methods* 2002, 103, 213-225.
11. Cook N.: The use of NASBA for the detection of microbial pathogens in food and environmental samples. *J. Microbiol. Methods* 2003, 53, 165-174.
12. EFSA Panel on EFSA Biological Hazards (BIOHAZ): Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). *EFSA J.* 2013, 11, 3502.
13. European Food Safety Authority: The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA J.* 2014, 12, 3547.
14. Fakruddin M. D., Mazumdar R. M., Chowdhury A., Bin Mannan K. S.: Nucleic acid sequence based amplification (NASBA) – prospects and applications. *Int. J. Pharm. Life Sci.* 2012, 2, 106-121.
15. Gasanov U., Hughes D., Hansbro P. M.: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. *FEMS Microbiol. Rev.* 2005, 29, 851-875.
16. Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M.: Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Res. Microbiol.* 2001, 152, 37-46.
17. Ivnitski D., Abdel-Hamid I., Atanasov P., Wilkins E.: Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 599-624.
18. Jadhav S., Bhawe M., Palombo E. A.: Methods used for the detection and subtyping of *Listeria monocytogenes*. *J. Microbiol. Methods* 2012, 88, 327-341.
19. Janzten M. M., Navas J., Corujo A., Moreno R., López V., Martínez-Suárez J. V.: Review. Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span. J. Agric. Res.* 2006, 4, 235-247.
20. Jeyaletchumi P., Tunung R., Margaret S. P., Son R., Farinazleen M. G., Cheah Y. K.: Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. Food Res. J.* 2010, 17, 1-11.
21. Jofré A., Martin B., Garriga M., Hugas M., Pla M., Rodríguez-Lázaro D., Aymerich T.: Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiol.* 2005, 22, 109-115.
22. Jung Y. S., Frank J. F., Brackett R. E., Chen J.: Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* in frankfurters using oligonucleotide primers targeting the genes encoding internalin AB. *J. Food Prot.* 2003, 66, 237-241.
23. Keer J. T., Birch L.: Molecular methods for the assessment of bacterial viability. *J. Microbiol. Methods* 2003, 53, 175-183.
24. Klein P. G., Juneja V. K.: Sensitive detection of viable *Listeria monocytogenes* by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997, 63, 4441-4448.
25. Lei I. F., Roffey P., Blanchard C., Gu K.: Development of a multiplex PCR method for the detection of six common foodborne pathogens. *J. Food Drug Anal.* 2008, 16, 37-43.
26. Liu D.: Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. *J. Med. Microbiol.* 2006, 55, 645-659.
27. Liu D., Ainsworth A. J., Austin F. W., Lawrence M. L.: Identification of *Listeria innocua* by PCR targeting a putative transcriptional regulator gene. *FEMS Microbiol. Lett.* 2003, 223, 205-210.
28. Liu D., Ainsworth A. J., Austin F. W., Lawrence M. L.: Use of PCR primers derived from a putative transcriptional regulator gene for species-specific determination of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 2004, 91, 297-304.
29. Momtaz H., Yadollahi S.: Molecular characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from fresh seafood samples in Iran. *Diagn. Pathol.* 2013, 8, 149.
30. Nogva H. K., Rudi K., Naterstad K., Holck A., Lillehaug D.: Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk, and unpasteurized whole milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 2000, 66, 4266-4271.
31. Ohk S. H., Koo O. K., Sen T., Yamamoto C. M., Bhunia A. K.: Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *J. Appl. Microbiol.* 2010, 109, 808-817.
32. Pochop J., Kačániová M., Hleba L., Petrová J., Lopašovský L., Pavelková A., Bobková A.: Real-time PCR Detection of *Listeria monocytogenes* in food samples of animal origin. *J. Microb. Biotech. Food Sci.* 2013, Special issue 1, 1550-1558.
33. Raszka A., Ziembińska A., Wiechetek A.: Metody i techniki biologii molekularnej w biologii środowiskowej. *Czasopismo Techniczne* 2-Ś 2009, 2, 101-114.
34. Rawool D. B., Malik S. V. S., Shakuntala I., Sahare A. M., Barbudde S. B.: Detection of multiple virulence-associated genes in *Listeria monocytogenes* isolated from bovine mastitis cases. *Int. J. Food Microbiol.* 2007, 113, 201-207.
35. Rodríguez-Lázaro D., Jofré A., Aymerich T., Hugas M., Pla M.: Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70, 6299-6301.
36. Romanek J.: Real-time PCR – nowoczesna technika analizy ekspresji genów na poziomie transkryptu. *Wiad. Zoot.* 2011, 1, 125-129.
37. Rossmannith P., Krassnig M., Wagner M., Hein I.: Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. *Res. Microbiol.* 2006, 157, 763-771.
38. Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. *Dz. Urz. UE L* 338 z dnia 22 grudnia 2005 r., 1-26.
39. Singh J., Batish V. K., Grover S.: Molecular beacon based real-time PCR assay for simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in dairy products. *Dairy Sci. Technol.* 2011, 91, 373-382.
40. Strom M. S.: Phenotypic and genetic characterization of a non-hemolytic variant of *Listeria monocytogenes* from cold-smoked salmon. *Food Microbiol.* 1998, 15, 329-337.
41. Studzińska A., Tyburski J., Dąca P., Tretyn A.: PCR w czasie rzeczywistym. Istota metody i strategii monitorowania przebiegu reakcji. *Biotechnologia* 2008, 80, 71-85.
42. Suo B., He Y., Paoli G., Gehring A., Tu S.-I., Shi X.: Development of an oligonucleotide-based microarray to detect multiple foodborne pathogens. *Mol. Cell. Probes* 2010, 24, 77-86.
43. Tang M. J., Zhou S., Zhang X. Y., Pu J. H., Ge Q. L., Tang X. J., Gao Y. S.: Rapid and sensitive detection of *Listeria monocytogenes* by loop-mediated-isothermal amplification. *Curr. Microbiol.* 2011, 63, 511-516.
44. Uyttendaele M., Schukink R., van Gemen B., Debevere J.: Development of NASBA®, a nucleic acid amplification system, for identification of *Listeria monocytogenes* and comparison to ELISA and a modified FDA method. *Int. J. Food Microbiol.* 1995, 27, 77-89.
45. Vasconcelos R. M. de, de Almeida A. E. C. C., Hofer E., da Silva N. M. M., Marin V. A.: Multiplex-PCR serotyping of *Listeria monocytogenes* isolated from human clinical specimens. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 2008, 103, 836-838.
46. Vázquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J.: *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clin. Microbiol. Rev.* 2008, 14, 584-640.
47. Wang C., Hong C.: A rapid PCR-based hybridization assay for the detection of *Listeria monocytogenes* in channel catfish. *Food Microbiol.* 1999, 16, 291-297.
48. Wang L., Li Y., Chu J., Xu Z., Zhong Q.: Development and application of a simple loop-mediated isothermal amplification method on rapid detection of *Listeria monocytogenes* strains. *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39, 445-449.
49. Zarei M., Basiri N., Jamnejad A., Eskandari M. H.: Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* spp. in beef, buffalo and lamb using multiplex PCR. *Jundishapur J. Microbiol.* 2013, 6, 7244.
50. Zhang D., Zhang H., Yang L., Guo J., Li X., Feng Y.: Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in food samples using multiplex PCR method. *J. Food Safety* 2009, 29, 348-363.
51. Zhou X., Jiao X.: Polymerase chain reaction detection of *Listeria monocytogenes* using oligonucleotide primers targeting *actA* gene. *Food Control* 2005, 16, 125-130.