

TARTU ÜLIKOOL  
LOODUS- JA TEHNOLOOGIATEADUSKOND  
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT  
GENEETIKA ÕPPETOOL

Merlin Soopere

**PCR-meetodi optimeerimine ja valideerimine *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks  
toidu- ja hügieeniproovidest**

Magistritöö

Juhendajad: MSc Ene Talpsep,  
dotsent Tiina Alamäe, bioloogiakandidaat

TARTU 2014

# SISUKORD

<b>SISUKORD</b> .....	2
<b>KASUTATUD LÜHENDID</b> .....	4
<b>SISSEJUHATUS</b> .....	5
<b>1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE</b> .....	6
1.1.    Perekond <i>Listeria</i> ja <i>Listeria monocytogenes</i> iseloomustus.....	6
1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e virulentsus.....	7
1.3. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e levik keskkonnas.....	10
1.3.1. <i>Listeria monocytogenes</i> kalatoodetes.....	12
1.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i> piimatoodetes.....	12
1.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> keskkonnas.....	13
1.4. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e põhjustatud haigusvormid.....	13
1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine standardmeetodil.....	15
1.6.    Alternatiivsed meetodid <i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamiseks.....	16
1.7.    PCR-meetodi valideerimine.....	18
<b>2. EKSPERIMENTAALOSA</b> .....	20
2.1.    Töö eesmärgid.....	20
2.2.    Materjal ja meetodika.....	20
2.2.1. Töös kasutatud bakteritüved.....	20
2.2.2. Töös kasutatud toidumaatriksid ja keskkonnaproovid.....	22
2.2.3. Bakterite kasvatamine.....	22
2.2.4. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamist kinnitavad mikrobioloogilised testid.....	23
2.2.5. Referent- ja alternatiivmeetodi võrdlev katseskeem.....	24
2.2.6. Toidumaatriksite ja hügieeniproovide kunstlik nakatamine.....	25
2.2.6.1. <i>Listeria monocytogenes</i> 'e inokulaadi valmistamine.....	25
2.2.6.2. Mitte-sihtmärktüvede inokulaadi valmistamine.....	25
2.2.6.3. Toidu- ja hügieeniproovide kunstliku nakatamise etapid.....	25
2.2.6.4. Hügieeniproovide kategooria.....	26
2.2.6.5. Lihatoodete kategooria.....	26
2.2.6.6. Piimatoodete kategooria.....	27
2.2.6.7. Kalatoodete kategooria.....	28
2.2.6.8. Naturaalsete maatriksite ettevalmistuskeem.....	28
2.2.7. PCR-meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramiseks kasutatud bakteritüvede ettevalmistamine.....	29
2.2.8. Bakteriaalse DNA eraldamine.....	29
2.2.9. PCR-metodika <i>hlyA</i> geenisaaduste amplifitseerimiseks.....	29
2.2.9.1. PCR-metodika valideerimisel kasutatud plasmiidid ja DNA.....	29
2.2.9.2. PCR- metodika valideerimisel kasutatud reaktiivid.....	29
2.2.10. PCR-produktide visualiseerimine ja hindamine.....	30
2.2.11. Töös kasutatud praimerid ja PCR-produktide suurused.....	30
2.2.12. Valideerimisel kasutatud parameetrite leidmine.....	31
2.2.13. Töös kasutatud arvutiprogrammid ja veebilehed.....	31
2.3.    Tulemused.....	32
2.3.1. Kujundatud praimerite LM_F2 ja LM_R2 spetsiifilisuse analüüs ning PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustus.....	32
2.3.1.1. Kasutatavate praimerite spetsiifilisuse bioinformaatiline analüüs.....	32
2.3.1.2. Praimerite LM_F2 ja LM_R2 PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustus.....	33
2.3.2. PCR-meetodi optimeerimine.....	35
2.3.2.1. Sisemise amplifikatsiooni kontrolli (IAC) ja kontrollplasmidi koopiaarvu määramine.....	35

2.3.2.2.	Praimerite seondumisaja optimeerimine.....	36
2.3.2.3.	Praimerite kontsentratsiooni optimeerimine.....	37
2.3.2.4.	MgCl <sub>2</sub> kontsentratsiooni optimeerimine.....	38
2.3.2.5.	Bakteriaalse DNA mahu optimeerimine.....	39
2.3.2.6.	Positiivse kontrolli ( <i>L. monocytogenes</i> 'e 4b genoomne DNA) mahu optimeerimine.....	40
2.3.2.7.	Optimeeritud PCR-reaktsioon <i>L. monocytogenes</i> 'e geeni <i>hlyA</i> saaduse amplifitseerimiseks.....	41
2.3.3.	Eubakteritele universaalse 16S rRNA tuvastamise meetodika optimeerimine..	42
2.3.4.	Optimeeritud PCR-metoodika 16S rRNA amplifitseerimiseks.....	43
2.3.5.	Referentmeetodi katsetulemused.....	43
2.3.6.	PCR-meetodi katsetulemused.....	43
2.3.7.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine PCR-meetodil.....	44
2.3.7.1.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine hügieeniproovides.....	44
2.3.7.2.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine lihatoodetest.....	46
2.3.7.3.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine piimatoodetest.....	48
2.3.7.4.	<i>Listeria monocytogenes</i> 'e tuvastamine kalatoodetest.....	49
2.3.8.	Bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni amplifikatsiooniga PCR-meetodiga.....	51
2.3.9.	Referent- ja PCR-meetodi võrdluse kokkuvõte.....	52
2.3.10.	Valideerimisel kasutatud parameetrid.....	56
2.3.11.	PCR-meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramine.....	56
2.3.12.	Suhtelise tuvastamispiiri määramine referent- ja PCR-meetodiga.....	58
2.4.	Arutelu.....	60
<b>KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED.....</b>		<b>64</b>
<b>SUMMARY.....</b>		<b>66</b>
<b>TÄNUAVALDUSED.....</b>		<b>67</b>
<b>KASUTATUD KIRJANDUS.....</b>		<b>68</b>
<b>KASUTATUD VEEBIAADRESSID.....</b>		<b>73</b>
<b>LISAD.....</b>		<b>74</b>
<b>LISA 1.....</b>		<b>74</b>
<b>LISA 2.....</b>		<b>74</b>
<b>LISA 3.....</b>		<b>75</b>
<b>LISA 4.....</b>		<b>86</b>
<b>LISA 5.....</b>		<b>87</b>
<b>LISA 6.....</b>		<b>80</b>
<b>LISA 7.....</b>		<b>85</b>
<b>LIHTLITSENTS</b>		

## KASUTATUD LÜHENDID

ALOA- *Agar Listeria acc. to Ottaviani and Agosti* (agar *Listeria* Ottaviani ja Agosti järgi)

bp- *base pair* (aluspaar)

BSA- *Bovine Serum Albumine* (Veise seerumi albumiin)

CAMP – *Christie Atkins Munch–Petersen*

CELMS – *Collection of Environmental and Laboratory Microbial Strain* (Keskkonna ja laboratoorse mikroobitüvede kollektsioon)

*cfu* – *colony-forming unit* (kolooni moodustav ühik)

EC- *Epidemic Clone* (Epidemiline kloon)

*hlyA*- LLO-d kodeeriv geen

hnRNP- *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M* (Heterogeenne tuuma ribonukleoproteiin)

IAC- *Internal Amplification Control* (sisemine amplifikatsiooni kontroll)

ISO- *International Organization for Standardization* (Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni)

kb- *kilo base* (kiloaluspaari)

krk- koopiat reaktsiooni kohta

L- *Listeria monocytogenes*

LLO- listeriolüsiin O

LM- *Listeria monocytogenes*

MQ- kahekordselt destilleeritud vesi (ddH<sub>2</sub>O)

T<sub>m</sub>- sulamistemperatuur

TSA – *Tryptone Soy Agar* (Trüpton Soja Agar)

TSYEB – *Tryptone Soy Yeast Extract Broth* (Trüpton Soja puljong pärmiekstraktiga)

VTL- Veterinaar- ja Toidulaboratoorium

## SISSEJUHATUS

*Listeria monocytogenes* on oportunistlik rakusisene patogeen, mis põhjustab inimestel tõsist, kuid harvaesinevat kõrge suremusega (20-30%) haigust listerioosi, mille riskigruppi kuuluvad nõrgenenud immuunsüsteemiga inimesed. *L. monocytogenes*'e infektsioonis osalevad mitmed virulentsusfaktorid, kõige olulisem neist on *hlyA* geeniga kodeeritud toksiin listeriolüsiin O (LLO). Seetõttu on *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks molekulaarsetel meetoditega enamasti valitud sihtmärkjärjestuseks just *hlyA* geenijärjestus.

*L. monocytogenes*'e levikupiirkond on lai, patogeeni leidub mitmekesistes keskkonnatingimustes, nii toidus kui ka mullas. Kõige enam on seda patogeeni isoleeritud piima- ja kalatoodetest, samuti toorest lihast ja valmistoitudest, mida enne tarbimist täiendavalt ei töödelda. *L. monocytogenes*'e ulatuslik levik ning hea kohastumisvõime on probleemiks paljudele toidu tootmise ja töötlemisega tegelevatele ettevõtetele.

Traditsiooniliselt kasutatakse *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks toidust ja hügieeniproovidest mikrobioloogilist meetodit, mis on aja- ja töömahukas. Kultuurimeetodil saab negatiivsed tulemused enamasti 5 päevaga, kuid positiivsed tulemused tavaliselt 7-10 päevaga. Pikk analüüsiaeg on probleemiks toiduainetööstustele, kuna lühikese säilivusajaga valmisoiote ei ole võimalik hoida nii kaua enne müügile saatmist. Seega vajavad toiduainetööstused kiiremaid meetodeid *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks. Üheks võimaluseks on molekulaarsed meetodid, millest levinuim on PCR-meetod, mis on paljutõotav alternatiivne meetod kiireks *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks ning millel on suurepärane analüütiline tundlikkus bakteriaalsete patogeenide tuvastamiseks. Alternatiivse meetodi kasutuselevõtmine rutiinseks analüüsiks eeldab ranget normatiivide järgimist ning alternatiivse metoodika valideerimist vastavalt Euroopa Liidus kehtivatele standarditele.

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli optimeerida ja valideerida PCR-metoodika *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks toidu- ja hügieeniproovidest, järgides standardis EVS-EN ISO 16140:2003 kehtestatud nõudmisi. Valideerimise eesmärgiks oli akrediteerida PCR-meetod *L. monocytogenes*'e rutiinseks analüüsimiseks Icosagen AS Mikrobioloogia laboris.

Töö teostati Icosagen AS Mikrobioloogia laboris.

Märksõnad: *Listeria monocytogenes*, toit, PCR, valideerimine, ISO standard.

# 1. KIRJANDUSE ÜLEVAADE

## 1.1 Perekond *Listeria* ja *Listeria monocytogenes*'e iseloomustus

Perekonda *Listeria* kuuluvad Gram-positiivsed, fakultatiivselt anaeroobsed, asporogeensed pulkbakterid, kelle genoom on madala G+C sisaldusega (Jeyaletchumi jt., 2010). *Listeria* perekond hõlmab tänaseks 10 liiki (EFSA<sup>b</sup>): *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. monocytogenes*, *L. rocourtae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis* ja *L. welshimeri* (EFSA<sup>c</sup>). Liike *L. marthii* ja *L. rocourtae* kirjeldati esmakordselt aastal 2009 (den Bakker jt., 2010b) ning *L. weihenstephanensis* ja *L. fleischmannii* alles aastal 2012 (EFSA<sup>a</sup>). Arvatakse, et *L. grayi* on ainult osaliselt seotud teiste *Listeria* liikidega ning ta võiks kuuluda eraldi perekonda (den Bakker jt., 2010a; den Bakker jt., 2010b; Orsi jt., 2011). Perekond *Listeria* liike eristatakse üksteisest biokeemiliste omaduste alusel: nagu näiteks nitraatide ja nitritite redutseerimine,  $\beta$ -hemolüüs, mannitoolist happe tootmine, karbamiidi hüdrolüüsimine ja indooli produktsioon (Rocourt jt., 2007).

*L. marthii*, *L. innocua* ja *L. seeligeri* on mitte-patogeensed (den Bakker jt., 2010b; EFSA<sup>a</sup>). *L. monocytogenes* on inimeste patogeen, kuid põhjustab invasiivseid infektsioone ka paljudel teistel soojaverelistel peremeesliikidel, eriti mäletsejatel. *L. ivanovii* põhjustab nakkusi põhiliselt mäletsejatel, kuid teda on harvadel juhtudel seostatud ka nakkustega inimestel (den Bakker jt., 2010b).

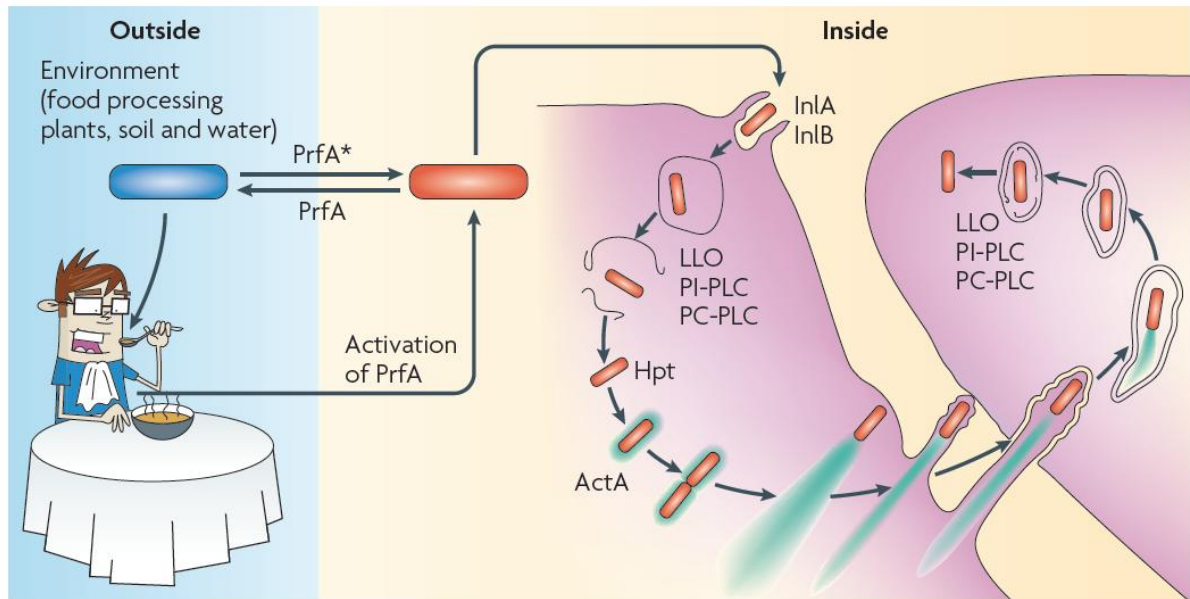
*Listeria* perekonna tüved jaotatakse serotüüpidesse unikaalsete termostabiilsete somaatiliste (O) ning termolabiilsete flagellaarsete (H) antigeenide kombinatsioonide alusel (Ragon jt., 2008). *Listeria*'l on 15 somaatilist (O) antigeeni alamtüüpi (I-XV), flagellaarsed (H) antigeenid jagunevad 4 alamtüüpi (A-D). *L. monocytogenes*'el esineb vähemalt 13 serotüüpi: 1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e ja 7 (Shen jt., 2013). Uurimused näitavad, et 95-98% dokumenteeritud listerioosidest inimestel on põhjustatud serotüüpide 1/2a, 1/2b ja 4b poolt (Pontello jt., 2012; Kramarenko jt., 2002). Serotüübid 4a ja 4c on harva seotud listerioosipuhangutega, kuigi on isoleeritud erinevatest toidu- ja keskkonnaproovidest (Morobe jt., 2012).

*L. monocytogenes*'e tüved saab serotüüpide põhjal klassifitseerida vähemalt nelja evolutsioonilisse liini (I, II, III ja IV), millel on erinevad, kuid osaliselt kattuvad ökoloogilised nišid (Orsi jt., 2010; Shen jt., 2012; Morobe jt., 2012). Enamus listerioosi kliiniliste juhtumitega seotud isolaate kuuluvad liinidesse I ja II, hõlmates serotüüpe 1/2a (liin II), 1/2b ja 4b (liin I). Liini II tüved (serotüübid 1/2a, 1/2c, 3a) on enam esindatud toiduainetes ja laialt levinud loodus- ja põllumajandus keskkondades ning neid on tihti isoleeritud loomade listerioosi puhul ning inimeste sporaadilistelt haigusjuhtumidel. Liinide III ja IV tüved

(serotüübid 4a, 4b, 4c) on harvaesinevad ja enamasti loomset päritolu (Shen jt., 2012). Liinidesse jagatakse genotüübilisi meetodeid kasutades (Orsi jt., 2012). Shen jt., (2013) näitasid oma uurimuses, et enamus inimeste listerioosidest põhjustavad vähesed *L. monocytogenes*'e tüved, nn. epideemilised kloonid (EC). Epideemilisi kloone defineeritakse kui *L. monocytogenes*'e isolaate, mis pärinevad eeldatavasti ühisest esivanemast, on seega geneetiliselt seotud ning põhjustavad erinevaid ajaliselt ja geograafiliselt mitteseotud listerioosi puhanguid (Lomonaco jt., 2013; Shen jt., 2013). Identifitseeritud on neli *L. monocytogenes*'e EC-d. ECI, ECII, ECIV kuuluvad serotüüpi 4b (liin I) ja ECIII serotüüpi 1/2a (liin II) (Shen jt., 2013). *L. monocytogenes*'e EC tüvedele on iseloomulik *comK* profaagi ühenduskoha fragmendi (*Junction fragment-JF*) järjestus. *ComK* profaag võib esindada genoomset saart, mis annab *L. monocytogenes*'ele võime kiirelt keskkonnatingimustega kohaneda ja moodustada biofilme (Verghese jt., 2011; Lomonaco jt., 2013). *L. monocytogenes* on laialdaselt kasutusel ka olulise mudelmikroobina, millel uuritakse kaasasündinud ja omandatud immuunsust ning peremees-patogeen interaktsioone (Luo jt., 2012).

## **1.2 *Listeria monocytogenes* virulentsus**

Peamine *Listeria* virulentsusgeenide rühm, tuntud ka kui *prfA* virulentsusklaster ja *Listeria* patogeensusesaar (LiPI), kodeerib arvukalt virulentsusvalke. *L. monocytogenes*'e virulentsus on multifaktoriaalne, tal on 6 virulentsusgeeni- *prfA*, *plcA*, *hlyA*, *mpl*, *actA* ja *plcB*, mis paiknevad koos ühes virulentsusgeenide klastris (9,6 kb) koduhoidja geenide *idh* ja *prs* vahel (Morobe jt., 2012). PrfA aktiveerib mitmete *L. monocytogenes*'e virulentsusega seotud geenide transkriptsiooni (Joonis 1) (Liu, 2006; den Bakker jt., 2010a) ning on seotud peaaegu kõikide geeni produktidega, mis toetavad bakteriaalset invasiooni, tsütosooli sisenemist ja kasvu, raku-sisest liikumist ja levikut naaberrakkudesse (Freitag jt., 2009; den Bakker jt., 2010a). *actA* geeni produkt on pinnavalk, mis on vajalik rakusiseseks liikumiseks ja rakust-rakku levimiseks tänu aktiini polümerisatsioonile (Joonis 1) (Morobe jt., 2012; den Bakker jt., 2010b).



**Joonis 1. Saprofüüdist rakusiseseks patogeeniks.** *L. monocytogenes* on võimeline elama erinevates keskkondades, nii mullas ja vees, kui ka toidutöötlemise keskkondades. Peamine faktor rakus sees ja väljas elamise reguleerimiseks on transkriptsiooni aktivaatorvalk PrfA. Väljaspool peremeesrakku on PrfA madalaaktiivsusega. Peremeesrakku jõudnuna PrfA aktiveerub (PrfA\*) ning indutseerib geeniproduktide ekspressiooni, mis on vajalikud invasiooniks peremeesrakku (internaliinid InlA ja InlB), fagosoomide lüüsiks (listeriolüsiin O; LLO), fosfatidüülinoositol-spetsiifiline fosfolipaas C (PI-PLC) ja fosfatidüülkoliin (PC-PLC), rakusiseseks kasvuks heksoos-6-fosfaadi transporter (HPT) ning rakust rakku liikumiseks (ActA; atiiini polümeerisatsioon on näidatud roheliselt). Kasutatud on joonist artiklist Freitag jt., (2009).

Olulised virulentsusfaktorid *L. monocytogenes*'el on internaliinid (*InlA*, *InlB*, *InlC*) (Shen jt., 2013; den Bakker jt., 2010a). Internaliine kodeerivad geene on kirjeldatud nii patogeensetel kui mitte-patogeensetel *Listeria* liikidel, kuid otseselt on virulentsusega seotud ainult mõned internaliinid (den Bakker jt., 2010b). Internaliin A (*inlA*) on vajalik sissetungiks mitte-fagotsütootilistesse rakkudesse (nt. epiteeli rakud) (Hamon jt., 2006) ja sellega seotud valk internaliin B (*inlB*) on oluline invasioonis maksa hepatotsüütidesse (Joonis 1) (Doyle, 2001). Internaliin A paikneb *Listeria* raku pinnal, seondub peremehe epiteelirakkude pinnavalgu E-kaderiiniiga ja stimuleerib patogeeni fagotsüteerimist (Doyle, 2001). Mutatsioonid, mis tekitavad varajase stopp-koodoni *inlA* järjestusse vähendavad oluliselt tüve invasiooni inimese epiteeli rakkudesse (Shen jt., 2013). Internaliin C (*InlC*) toetab patogeeni soolestikujärgset invasiooni, internaliin J (*InlJ*) on otseselt seotud soolestiku barjääri läbimise ja hilisemate infektsioonifaasidega (Shen jt., 2013). Peremeesraku tsütoplasmas kasvab *L. monocytogenes* selle toitainete toel, milles on näiteks heksoosfosfaat, mida patogeen omastab tänu spetsiaalsele heksoosfosfaadi transportelile- Hpt, samuti kasutatakse peremeesorganismi lipohapet ja peptiide (Freitag jt., 2009).

Kõige tuntum *L. monocytogenes*'e virulentsusfaktor on *hlyA* geeniga kodeeritud valk listeriolüsiin O (LLO) (Luo jt., 2012; Slama jt., 2013; Liu, 2006). LLO (Joonis 1) on poore tekitav ja tsütolüütilise toimega kolesteroolsõltuva tsütolüsiini perekonna eksotoksiin (Luo jt.,

2012; Morobe jt., 2012), mida kontrollitakse *prfA* geeniga. Listeriolüsiin on vajalik fagotsütootiliste vakuoolide lüüsimiseks, mis on oluline *L. monocytogenes*'e vabanemiseks peremeesraku tsütoplasmasse (Swetha jt., 2012). Kolesteroolsõltuva tsütolüsiini toksiinide perekonna valgud on järjestuselt 40-60% sarnased ning neil on sarnane struktuur ja toimemehhanism. Katsed põrna rakkudega näitasid, et LLO hemolüütiline aktiivsus tuleneb valgu domäänist 4, aga IFN- $\gamma$  induktsioon ei ole selle domääniga seotud. Sellest tulenevalt arvatakse, et LLO toksiinil on erineva funktsiooniga domääne (Lou jt., 2012).

*L. monocytogenes*'e infektsioon peremeesrakus aktiveerib tuumafaktori  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), mis on mitmete immuun-seotud geenide ekspressiooni transkriptsiooni regulaatoriks. *L. monocytogenes*'e infektsioon põhjustab erinevate rakutüüpide surma, näiteks apoptoosi T-lümfotsüütides ja püroptoosi makrofaagides, lisaks tekitab see põletikku, indutseerides endoteelirakkude ja neutrofiilide aktivatsiooni (Doyle, 2001). *L. monocytogenes*'e tüved, millel puudub LLO, ei suuda püroptoosi indutseerida (Luo jt., 2012). *L. monocytogenes* sekreteerib LLO peremeesraku tsütoplasmasse, kus LLO interakteerub peremeesraku hnRNP M-ga (*Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M*). hnRNP M on RNA-seonduv valk, mis kuulub tuuma ribonukleoproteiinide (hnRNP) perekonda ja on imetajatel evolutsiooniliselt ülimalt konserveerunud. Luo jt., (2012) uurimustöös leiti, et hnRNP M allareguleerimine inhibeerib oluliselt LLO-indutseeritud tüüp I interferoonide promootorite aktivatsiooni, kuid soodustab *L. monocytogenes*'e kasvu peremeesrakkudes.

Mitmed uurimustööd kinnitavad, et LLO on multifunktsionaalne valk, mille C-terminaalne osa on hädavajalik hemolüüsiks ning kasvõi ühe aminohappe vahetus selles regioonis võib põhjustada tsütolüütilise aktiivsuse vähenemise. LLO N-terminaalses regioonis on PEST-sarnane järjestus (proliin, glutamiinhape, seriin ja threoniin), mis on eukarüootide valkudes esinev signaaljärjestus ning mille asendamine LLO-s ei mõjuta LLO lagundamist. Pole teada kuidas LLO tsütoplasmas lagundatakse (Luo jt., 2012). Samas on selge, et pärast vakuolaarse membraani augustamist tuntakse LLO rakkude tsütoplasmas olevate ensüümide poolt ära ja lagundatakse enne kui ta jõuab raku membraani kahjustada (Doyle, 2001). LLO võib olla märgistatud ka mõnede raku valkudega ja see võib viia rakuvastuseni (Luo jt., 2012). Mutantsed *L. monocytogenes*'e tüved, mis ei produtseeri listeriolüsiini jäävad mõnda aega mitte-professionaalsete fagotsüütide vakuoolides ellu, kuid nad ei paljune ega levi edasi naaberrakkudesse, sest ei suuda vakuoolidest põgeneda (Doyle, 2001).

Lisaks listeriolüsiinile produtseerib *L. monocytogenes* kahte teist hemolüsiini - fosfatidüülinositol-spetsiifilist fosfolipaasi C (PI-PLC) ja fosfatidüülkoliin-spetsiifilist fosfolipaasi C (PC-PLC) (Joonis 1). Erinevalt LLO-st, mis lüüsib peremeesrakke poore moodustades, lagundavad need kaks valku membraanilipiide (Morobe jt., 2012).

Listeeriade invasiivsus mõjutab ka osaliselt seeditud toit soolestikus. Näiteks piimarasv alandab listeria võimet koloniseerida roti soolestikku ning rasvade lagundamisel tekivad rasvhapped ja monoglütseriidid inhibeerivad kõigi Gram-positiivsete bakterite kasvu (Doyle, 2001).

Keskkonna parameetritest alandavad *L. monocytogenes*'e virulentsust madal temperatuur, kõrge happesus ja madal rauasisaldus. Samas näiteks tõstab 2-tunnine inkubeerimine temperatuuril 37°C, LLO taseme taas normaalseni. Seepärast on võimalik, et külmkapi temperatuuril hoitavad listeriad suudavad oma infektiivsuse soojavereliste loomade soolestikku läbides taastada. Kuumastress (56 °C 20 minutit) vähendab *L. monocytogenes*'e patogeensust listeriolüsiini aktiivsuse languse tõttu. Kõrge kasvutemperatuur (42 °C) tõstab *Listeria* adhesioonvalkude ekspressiooni, kuid mitte virulentsust, kuna ainult vähesed adhesioonid on vajalikud kinnitumiseks ja infektsiooniks (Doyle, 2001). Madalal pH-l (4,5-4,9) listeriolüsiini produktsioon väheneb ning rauarikkal söötmel kasvamisel tõhustub *L. monocytogenes*'e invasiivsus, kuna internaliini geenide ekspressioon tõuseb. Raua olemasolu mõjutab ka ActA valgu produktsiooni (Doyle, 2001).

Loomad ja inimesed kaitsevad end bakterite rünnaku eest kolmel viisil: mittespetsiifiliste resistentsusfaktorite, rakulise immuunsuse ja antikehadega vahendatud immuunsuse abil, kuid viimane ei näi mängivat olulist rolli listerioosi eest kaitsemisel. Mittespetsiifiline kaitseüsteem patogeenide vastu on mao happelisus, mis on paljudele toidutekkelistele patogeenidele surmav ja seedekulgla normaalne mikrofloora, mis hõivab vabad nišid soolestikus, tarbides vajalikud toitained ning seeläbi takistades patogeenide kinnitumist. Kuigi steriliseeriv immuunvastus (*sterilizing immunity*) *L. monocytogenes*'e infektsiooni vastu vajab CD8+ ja CD4+ T rakkude vastust, siis mitmed uurimused näitavad, et kaasasündinud immuunsuse rakud, nagu neutrofiilid (Ly6G+ rakud) ja monotsüüdid (Ly6C+ rakud) on olulised esmaseks *L. monocytogenes*'e infektsiooni kontrollimiseks (Arnett jt., 2014). Seega kõik kaasasündinud immuunsust vähendavad või rakulist immuunsust kahjustavad seisundid võivad viia *L. monocytogenes* infektsioonini (Allerberg, 2003).

### **1.3 *Listeria monocytogenes*'e levik keskkonnas**

Keskkonnas on *Listeria* liigid laialdaselt levinud, eriti taimses materjalis, loomasöödas (silos), pinnavees ja mullas (EFSA<sup>c</sup>). Samuti leidub *L. monocytogenes*'t paljudes toiduainetes (Janzten jt., 2006) ning toidu töötlemiseks ja tootmiseks kasutatavatel seadmetel ja pindadel (Göksoy jt., 2006; Dalmaso jt., 2014). Patogeeniga võivad olla saastunud nii toored toiduained, näiteks veise-, sea-, kana- ja kalaliha, juur-, puu- ja köögiviljad ja mereannid, aga ka kuumutatud toiduained nagu pastöriseeritud piim ja piimatooted (juustud, jogurtid) ning

külmutatud ja töödeldud toidud (kuum- ja külmsuitsu tooted, valmistoidud, salatid ja võileivad). Valmistoidud, sh pastöriseeritud piimatooted, on enamasti saastunud töötlemise ajal ja/või pärast (Slama jt., 2013; EFSA<sup>c</sup>; Göksoy jt., 2006).

*L. monocytogenes* on võimeline ellu jääma ja paljunema enamike bakterite jaoks väga ebasoodsates keskkonnatingimustes (Dalmasso jt., 2014; Slama jt., 2013). Ta võib püsida ja paljuneda toiduainetes ning tootmiskeskkondades pikka aega, kuna ta on võimeline kasvama laias temperatuuri- ja pH-vahemikus: 0,4 °C kuni 45 °C, optimum 37 °C; pH 4,4 kuni 9,4; optimum pH 7,0 (EFSA<sup>c</sup>; Roasto, 2011). Eelnevalt stressiga kohanenud rakud (seda põhjustab näiteks subletaalsete temperatuuride rakendamine enne tööstuslikku kuumtöötlemist) taluvad stressi paremini. Näiteks desinfitseerijate alakontsentratsioonidel võivad tekkida desinfektantidele resistentsed *L. monocytogenes*'e tüved, mis sageli on ettevõttespetsiifilised („house flora“) ja põhjustavad korduvaid probleeme ettevõtte tootmishügieenis (Lou ja Youself, 1999).

Biofilmi moodustamine soodustab *L. monocytogenes* püsimist toidu töötlemise keskkondades (EFSA<sup>c</sup>) ja põhjustab seetõttu toodete saastumisi (Dalmasso jt., 2014). Seega on toidu valmistamiseks kasutatavate pindade järjepidev mikrobioloogiline kontroll väga oluline ning efektiivne viis hügieeni tagamiseks ja korduvate saastumiste ennetamiseks (Dalmasso jt., 2014). Kuna kõik *Listeria* liigid on potentsiaalsed toidu saastajad, siis mitte-patogeensete *Listeria* liikide esinemist toidutöötlemise pindadel võib pidada indikaatoriks võimalikust *L. monocytogenes*'e esinemisest (Göksoy jt., 2006; Lakicevic jt., 2010).

Vastupidiselt teistele toidutekkelistele nakkustele, nagu salmonelloos, mis harva lõppevad surmaga, on listerioosi suremus väga kõrge (umbes 30% juhtumistest) (Liu, 2004; Gouws ja Liedemann, 2005). Seetõttu on näiteks Ameerika Ühendriikides, Itaalias ja Austrias (EC, 1999), kehtestatud null-tolerantsi strateegia – valmistoitudes ei tohi esineda *L. monocytogenes*'t >1 cfu/25 grammi toiduproovis. Paljude Euroopa Liidu normatiivide kohaselt on *L. monocytogenes*'e tolerantsustasemeks 100 cfu/g toidu kohta. Kanadas ja Taanis kehtib osadele toiduklassidele „null-tolerants“, osades toitudes on *L. monocytogenes* bakteri esinemise piirnormiks 100 cfu/g toidu kohta (EC, 1999.09; Orsi jt., 2011; FDA, 2003.09).

Mikrobioloogilisi toiduohutuskaasid *L. monocytogenes*'e esinemise kohta rakendatakse kolmele valmistoidu kategooriale:

1. väikelastele ja spetsiaalsed raviotstarbelised valmistoidud, milles *L. monocytogenes*'t ei tohi esineda 25 g toidu kõlblikkusaja jooksul.
2. Teistele valmistoitule kehtib piirnorm 100 cfu/g toote kohta kogu kõlblikkusaja jooksul.

3. *L. monocytogenes*’e kasvu soodustavatel valmistoitudes ei tohi patogeeni esineda 25 g valmistootes. Lõpptootest võetakse proov tootmisettevõttes või laos. Erandi moodustavad juhud, kus tootja suudab pädevale asutusele tõestada, et kogu säilivusaja jooksul ei ületata kriteeriumi 100 cfu/g toote kohta (Roasto, 2011).

Selliste normide seadmine mõjutab toiduainetööstust majanduslikult, põhjustades saastunud toidu tagasikutsumist edasimüüjatelt ja ajutisi toiduainetööstuste sulgemisi, kuni saastusprobleem saab lahenduse.

### **1.3.1 *Listeria monocytogenes* kalatoodetes**

Kalatooted, millel on potentsiaalne *L. monocytogenes*’e kontaminatsiooni risk, hõlmavad peamiselt külmsuitsu ja toores kala (tarbitakse töötlemata) ning marineeritud kalatooted (Gambarin jt., 2012). Kalast valmistoodetega (näiteks külmsuitsu ja külmsoolatud kala) seonduv oht seisneb nende toodete pikas säilivusajas, sest kui kala pärast töötlemist sisaldab mingilgi määral *L. monocytogenes*’e rakke, võivad nad säilitamise jooksul saavutada sellise arvukuse, mis põhjustab inimeste nakatumise (Gambarin jt., 2012, Roasto, 2011). Seega on väga oluline, et hoitaks ära külm- ja kuumsuitsu kalatoodete töötlemisjärgne kontaminatsioon (Roasto, 2011). Gambarin uurimisgrupi (2012) poolt läbi viidud teadustöös kinnitati, et suitsutatud ja toores lõhe on potentsiaalsed *L. monocytogenes*’e nakkusallikad. Marineeritud ja kuumtöödeldud kalatoodete saastumine *L. monocytogenes*’ega toimub peaaegu alati töötlemisjärgselt (Gambarin jt., 2012).

### **1.3.2 *Listeria monocytogenes* piimatoodetes**

Paljud suured listerioosi puhangud on olnud seotud saastunud piimatoodetega, mille üheks põhjuseks saab olla *L. monocytogenes*’e võime paljuneda madalal temperatuuril (Slama jt., 2013). Potentsiaalsed *L. monocytogenes*’e nakkusallikad on pehmed juustud, pastöriseerimata joogipiimast ja kuumtöötlemata piimast valmistatud toidud (USDA, 2001; FSAI, 2005; Roasto, 2011). Toiduainete kuumutamine kõrgetel temperatuuridel ei pruugi tagada *L. monocytogenes*’e hävimist -näiteks laboritingimustes pastöriseerimise temperatuuril 71,1 °C, võib *L. monocytogenes* püsida eluvõimelisena kuni 16 sekundit (Roasto, 2011). Seega on oluline pastöriseerimisseadmete kasutamise, hooldamise ja sanitatsiooniga kontroll (Roasto, 2011). Juustu keskkonna pH >4,2 (tüüpiliselt pH >5,6) soodustab *L. monocytogenes*’e paljunemist. Suure veesisaldusega juustudest on sagedamini listeeriatega saastunud Brie, Camembert, Ricotta ja pehmed Hispaania ja Mehhiko tüüpi juustud. Teised juustusordid ei pruugi sobida listeeribakterite paljunemiseks, kuid võimaldavad nende säilumist (Roasto, 2011). *L. monocytogenes* on toorpiimast sageli leitav patogeen (Kasalica jt., 2011). Kui

lüpsihügieeni nõuded on täidetud, siis peaks olema välistatud bakteri sattumine udara ja nisade pinnalt toorpiima. Kord juba väliskeskkonnast toorpiima sattunud *L. monocytogenes* on võimeline kiiresti paljunema piima tootmise keskkonnas ning püsima pikka aega eluvõimelisena piimaga kokkupuutuvatel seadmetel (Miettinen jt., 1999, Kasalica jt., 2011).

### **1.3.3 *Listeria monocytogenes* lihatoodetes**

*L. monocytogenes* esineb sageli toores lihas, kuigi saastusallikas on tihti ebaselge (Thévenot jt., 2006). Tapamajades võib *L. monocytogenes* olla endeemiline, eriti heitveektorustikes ja põrandatel (Roasto, 2011). *L. monocytogenes* esineb enamike loomade seedetraktis, keelel ja mandlitel ning kandub ebapiisava käitlemishügieeni tõttu ka lihale (Thévenot jt., 2006). Ka lindude seedetraktis on *L. monocytogenes* esindatud ja väljaheidete sattumine rümbale sisikonna eemaldamise vigadest tingituna, põhjustab ka linnuliha saastumise. Hakitud ja peenestatud liha sisaldavad RTE lihatooded – viinerid, keeduvorstid, salaami, pasteedid, pirukad, pihvid jt tooted, eeldavad valmistamisel intensiivset töötlemist ja käitlemist, mis omakorda suurendab saastumise riski. Patogeeni paljunemise ja eluvõimet saab oluliselt vähendada lihatoodete kuumtöötlemise, kuivatamise või soolamisega (Roasto, 2011).

### **1.3.4 *Listeria monocytogenes* keskkonnaproovides**

Toidu tootmise ja töötlemisega tegelevatele ettevõtetele on *L. monocytogenes*'e saastus tõsiseks probleemiks. Toiduainete käitlemisettevõtetes on *L. monocytogenes*'e reservuaarideks jahutusruumide põrandad, külmikud, tootmisruumid ja nendesse sisenemise kohad, kastid ja kastide pesuruumid, jalanõude desinfitseerimise vannid, paberihoidjate alused, konveierite lindid, viilutajate terad jne. Toomisettevõtetes esinev kõrge niiskustase ja toitainete olemasolu soodustab *L. monocytogenes*'e kasvu (Roasto, 2011). Biokile vältimise ainus võimalus on regulaarne seadmete desinfitseerimine ja korrashoid ning kummidetailide ja tihendite korrapärane vahetus (Gudbjórnsdóttir jt., 2004).

## **1.4 *Listeria monocytogenes*'e põhjustatud haigusvormid**

*L. monocytogenes*'e laia leviku tõttu looduses puutuvad inimesed patogeeni sageli kokku, kuid sellega ei kaasne ilmtingimata infektsiooni (Roasto, 2011). Samuti ei ole kõik *L. monocytogenes*'e tüved võrdselt virulentsed keskkonnas esinevad listeriad võivad olla ka avirulentsed (Janzten jt., 2006; Doyle, 2001). Ainult kolm *L. monocytogenes*'e 13 serotüübist (1/2a, 1/2b ja 4b) põhjustavad enamiku listerioosi juhtumitest (Janzten jt., 2006; Shen jt., 2013). Terve immuunsüsteemiga inimestel tekib invasiivne listerioos väga harva, enamasti kujuneb listerioosahaigus välja inimestel, kellel on immuunsüsteem nõrgenenud- näiteks

rasedatel, vanuritel, vastsündinutel (Schlech, 2000; Orsi jt., 2011), madala maohappesusega inimestel (Morobe jt., 2012) ja HIV patsientidel (Orsi jt., 2011), vähihaigetel, alkohoolikutel, narkomaanidel, diabeetikutel, hormoon- ja antimetaboliitset (Roasto, 2011) ravi saavatel inimestel (Morobe jt., 2012). Vanus on listerioosi puhul väga oluline roll, haigestunute seas on suurem suurim üle 60-aastaste inimeste hulgas (63%), alla 40-aastaste patsientide suurem on see ligikaudu 11% (Roasto, 2011).

Kõige tõsisemad inimese invasiivse listerioosi kliinilisteks tunnusteks on septitseemia, entsefaliit, meningiit, iseeneselik abort (Orsi jt., 2011), emakasisesed või emakakaela infektsioonid rasedatel (Morobe jt., 2012) ning surm (Göksoy jt., 2006). Kui listerioos omandatakse varajases raseduse staadiumis, võib see põhjustada aborti, surnult sündi või enneagset sünnitust. Kui listerioos omandatakse hilises rasedusfaasis võib see kanduda transplatsentaarselt ja põhjustada vastsündinu listerioosi (Morobe jt., 2012). Rasked haigused nagu meningiit ja entsefaliit tulenevad sellest, et *L. monocytogenes* on võimeline ületama vere-aju barjääri (Temple jt., 2000; Janakiraman, 2008; Hamon jt., 2006).

Sporaadiline haigestumine listerioosi esineb aastaringset, kuid haigestumise sagedus tõuseb suveperioodil

(<http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/nakkused/Listerioos.pdf>).

Subkliinilised avaldumisvormid terve immuunsüsteemiga inimestel on kerge gripilaadne haigus, palavik, iiveldus, oksendamine, väsimus ja kõhulahtisus (Morobe jt., 2012; Göksoy jt., 2006), mis on mõnikord kombineeritud gastroenteriidiga, aga ka silma ja naha listerioosiga (McLauchlin jt., 2004). Nahavormi võib inimene nakatuda kontaktnakkusena nahavigastuste kaudu. Naha listerioosi puhul esineb lööve või pustulaarne nahakahjustus kätel või kehal (<http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/nakkused/Listerioos.pdf>).

Listerioosiga seonduvad lisaks ka keskkõrvapõletik, sarkoidoos, astma, haavandiline käärsoolepõletik, aplastiline aneemia jmt haigused (Roasto, 2011).

Erinevalt teistest tuntud toidutekkelistest haigustest, võib listerioosi inkubatsiooniperiood olla pikk. Inkubatsiooniperioodi kindlaks määramine on keeruline, kuna *L. monocytogenes* kontamineerib paljusid toiduaineid (Gambarin jt., 2012). Tavaliselt kahtlustatakse toiduaineid, mida on viimase 30 päeva jooksul tarbitud, kuna nakkusallikaks olevaid toiduaineid säilitatakse mõned päevad või nädalad ja tarbitakse korduvalt (Goulet jt., 2013). Tõsisemad listerioosi vormid tekivad tavaliselt mõne päeva kuni 3 nädala pärast, samas gastrointestinaalse haiguse sümptomid avalduvad juba vähem kui 12 tunni pärast peale nakkuse saamist (Morobe jt., 2012). Kõige pikem peiteaeg on rasedusega seotud juhtudel (keskmiselt 27,5 päeva) (Goulet jt., 2013). Peiteaja varieeruvus võib tuleneda toidu saastuse

tasemest, *L. monocytogenes*'e tüve virulentsusest või inimese immuun staatusest (Goulet jt., 2013).

Kuna *L. monocytogenes* võib olla tavapärane elanik inimeste soolestikus, ei ole *L. monocytogenes*'e esinemine kliiniliselt tervete kandjate väljaheidetes infektsiooni tunnuseks. Kliiniliselt kinnitatakse listerioosi, kui bakterid isoleeritakse verest, tserebrospinaalvedelikust ja ka platsentast ning lootest, kui on tegemist abordiga (Morobe jt., 2012).

Listerioosi raviks kasutatakse antibiootikume, kõige enam ampitsilliini ja penitsilliini G, mida võib kombineerida aminoglükosiididega (Morobe jt., 2012).

### ***Listeria monocytogenes*'e levimus Eestis**

Listerioosi haigestumus ei ole kõrge, 100000 elaniku kohta on haigestumus EL keskmiselt 0,4 (Pontello jt., 2012). Eestis registreeritakse listerioosi igal aastal, kuid haigestumus on õnneks väike (Tabel 1).

**Tabel 1. Listerioosi esinemine Eestis aastatel 2009-2013\*. Esitatud on registreeritud haigestunute arv ja haigestumus 100000 elaniku kohta.**

Patogeen/aasta	2009	2010	2011	2012	2013
<i>Listeria monocytogenes</i>	3/0,2	5/0,4	3/0,2	3/0,2	2/0,1

\*(<http://www.terviseamet.ee/nakkushaigused/nakkushaigustesse-haigestumine.html>)

### **1.5 *Listeria monocytogenes*'e tuvastamine standardmeetodil**

EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004 on Eestis kehtiv standardne horisontaalne meetod *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks toiduainetest ja loomasöödadest. See põhineb 25 grammi toidumaatriksi kaheetapilisel rikastamisel spetsiaalses söötmes ning tehakse väljakülvid *L. monocytogenes*'e kolooniate tuvastamiseks agarsöötme tassidele. Kõige enam kasutatakse väljakülvideks selektiivset ja kromogeenset ALOA söödet (Serraino jt., 2011). Teine levinud selektiivsööde *L. monocytogenes*'e eristamiseks on Oxfordi agar. Kinnitavateks testideks isoleeritakse selektiivagarilt vähemalt 5 (kui on võimalik) eeldatavat *L. monocytogenes*'e kolooniat (ALOA agaril sinakas rohelised opaakse tsooniga, Oxford agaril rohekas-mustad musta tsooniga) ning nendele tehakse biokeemilised testid. Kahjuks on klassikaline meetod aja- ja töömahukas ning usaldusväärseid tulemusi pole võimalik saada kiiremini kui 5 päevaga (Dalmaso jt., 2014; Aznar ja Solis 2006). Klassikalised diagnostikameetodid *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks on suuresti fenotüübipõhised ja iseloomustavad patogeeni geeniprodukte biokeemiliste omaduste kaudu. Kuna need omadused võivad varieeruda (spontaansed geneetilised mutatsioonid) keskkonnatingimuste muutudes, siis ei ole fenotüübilised testid alati usaldusväärsed (Jeyaletchumi jt., 2010).

## 1.6 Alternatiivsed meetodid *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks

Tänapäevased toitumisharjumused ja listerioosi haigestumise sagenemine on tekitanud vajaduse töötada välja ja valideerida patogeenide tuvastamiseks kiirteste (Aznar ja Àlarcon, 2003). Lisaks kiirusele on oluline, et patogeen oleks tuvastatav ka madalatel ja sporaadilistel kontsentratsioonidel (<100 cfu/g) ning arvuka taustmikrofloora ja konkurentsete organismide esinemisel (Amagliani jt., 2006). Uudseid meetodeid arendatakse tulemuste kiiremaks saamiseks ja tundlikkuse tõstmiseks. Innovaatilised meetodid saab jagada kolme rühma: 1. klassikaliste meetodite edasiarendused, milles kasutatakse kromogeenseid substraate sihtmärkbakterite kolooniate konkreetsemaks tuvastamiseks 2. immuunoloogilised meetodid, nagu ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*). 3. molekulaarsed meetodid nagu proovide hübridiseerimine või PCR, kas traditsiooniline või real-time. PCR-meetod on enim kasutatud uudne diagnoosimeetodika (Jeyaletchumi jt., 2010), sest see on kiire võimalus amplifitseerida spetsiifilisi järjestusi sihtmärkbakteri DNA-st (Jeyaletchumi jt., 2010; Amagliani jt., 2006; Göksoy jt., 2006). Samas on PCR-meetodika rakendatav vaid juhul, kui proov valmistatakse ette õigesti (Göksoy jt., 2006) ning DNA on amplifitseeritav (Amagliani jt., 2006).

PCR-meetodi inhibiitorite esinemine toiduproovides on üheks PCR-meetodi tundlikkuse languse põhjuseks. Siis ei pruugi amplifikatsioon õnnestuda ning saadakse valenegatiivsed tulemused (Amagliani jt., 2006). PCR-meetodika tundlikkuse tõstmiseks tuleks DNA enne amplifitseerimist puhastada või kasutada proovide rikastusmeetodit (Aznar ja Àlarcon, 2003). Peamised katseproovis leiduvad PCR-inhibiitorid on kaltsiumi ioonid, polüsahhariidid ja rasvad (Amagliani jt., 2006). Kaltsiumi inhibitoorset mõju PCR-reaktsioonile vähendab magneesiumi lisamine. Magneesium on vajalik komponent ka *Taq* DNA polümeraasile. Jasson jt., (2010) näitasid, et klassikalise PCR-meetodi tundlikkuseks on üldjuhul  $10^2$ – $10^3$  cfu/ml.

PCR-meetodi üheks puuduseks on suutmatus eristada elusaid rakke surnutest (Ingianni jt., 2007; O'Connor, 2003). Üheks lahenduseks on toiduproovi rikastamine patogeeni arvukuse tõstmiseks. Rikastamise tulemusena tõuseb sihtmärk-DNA kontsentratsioon, mitte-sihtmärk mikroobide DNA ja PCR-reaktsiooni häirivad komponendid lahjenevad ning positiivne tulemus saadakse eeldatavalt elusatest rakkudest (Amagliani jt., 2006). *L. monocytogenes*'e kvantitatiivne määramine PCR-meetodil toiduproovidest on vajalik, et seirata saastunud toidu tarbimisest põhjustatud reaalselt haigestumisohtu (Ingianni jt., 2007). *L. monocytogenes*'e eristamiseks mitte-patogeensetest listeriatest saaks tuvastada patogeeni virulentsusfaktoreid, näiteks spetsiifilist toksiooni (Churchill jt., 2006). Kõige sagedamini valitud märklaudgeeniks on Listeriolüsiini O kodeeriv *hlyA*, kasutatakse ka *iap* (*invasion-associated protein*), Dth-18

(*Delayed type hypersensitivity*), aminopeptidaasi kodeerivat geeni ja *inIA* (*internalin A*) (Aznar ja Àlarcon, 2003; Ingianni jt., 2007).

PCR-diagnostika usaldusväärsuse tagamiseks on oluline kasutada amplifikatsiooni sisekontrolli (*Internal Amplification Control-IAC*), mis aitab vältida vale-negatiivseid tulemusi (D'Agostino jt., 2004). Vastupidiselt positiivsele kontrollile, on IAC samas proovituubis esinev mittesihtmärk järjestus, mida amplifitseeritakse samaaegselt sihtmärkjärjestusega. PCR-reaktsioon võib olla inhibeeritud näiteks DNA polümeraasi aktiivsus võib olla mittepiisav (Hoorfar jt., 2004; D'Agostino jt., 2004). PCR-reaktsioonis peaks IAC spetsiifiline bänd esinema ka juhul, kui sihtmärkjärjestust proovis ei ole. Diagnostilises PCR-analüüsis on võimalik kasutada konkureerivat ja mittekonkureerivat IAC-d. Konkureeriva IAC puhul kasutatakse nii IAC kui ka sihtmärkjärjestuse amplifitseerimiseks sama praimeripaari (D'Agostino jt., 2004; Hoorfar jt., 2004) ja PCR-meetodi tingimusi ning reaktsioon viiakse läbi samas PCR-tuubis. Kuna IAC ja sihtmärkjärjestus konkureerivad praimerite pärast, siis juhul, kui sihtmärkjärjestus on amplifitseeritud ja IAC mitte, siis sihtmärk DNA on reaktsioonisegus suuresti ülehulgas ja tulemus loetakse positiivseks, sest sellisel juhul ei ole IAC esinemine tingimata vajalik. Kui ei amplifitseeru ei sihtmärk ega mitte-sihtmärk järjestust, siis oli reaktsioon inhibeeritud ning seda tulemust ei arvestata. Mittekonkureeriva IAC puhul amplifitseeritakse sihtmärk DNA ja IAC samas reaktsioonisegus, kuid erinevate praimeripaaridega. Kõige levinum moodus on IAC puhul amplifitseerimiseks kasutada primereid, mis seostuvad spetsiifiliselt sünteetilisele DNA-le (nt plasmiidne DNA) või mõnele kõigis mikroorganismides esinevale konserveerunud järjestusele, näiteks 16S või 23S ribosomaalsele DNA-le. IAC konstrueerimise üks lihtsam moodus on sisestada modifitseeritud sihtmärkjärjestus plasmidi. Näiteks D'Agostino jt., (2004) kasutasid oma uurimustöös sisemise kontrollina plasmiidvektorit pGEM-T, millesse kloneeriti vajalik mittesihtmärk järjestus.

Maatriksitest DNA eraldamise edukuse kontrolliks amplifitseeritakse reeglina spetsiifilisi järjestusi koduhoidja geenidest või 16S rRNA geenist.

Toidu- ja keskkonnaproovide analüüsimiseks on väljatöötatud ka kommertsiaalseid PCR-teste. Näiteks Probelia® *L. monocytogenes*'e (Sano ☉ Diagnostic Pasteur, Marnes La Coquette, France) on litsenseeritud meetod *L. monocytogenes*'e DNA tuvastamiseks toiduainetest. Lisaks BAX® Screening System (Qualicon, Wilmington, DE, USA) kasutab PCR-meetodit, et analüüsida toidu- ja hügieeniproove *Listeria* perekonna ja *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks (Allerberger, 2003).

## 1.7 PCR-metoodika valideerimine

Ühes laboris arendatud PCR-metoodikaga saadud tulemusi võib olla keeruline reprodutseerida teistes laborites. Tulemuste reproduktsioon on kohustuslik uue PCR-metoodika kasutuselevõtmiseks diagnostilise vahendina. Seetõttu eelneb meetodi kasutuselevõtmisele selle valideerimine (D'Agostino jt., 2004). See on protsess, mida kasutatakse meetodi usaldusväärsuse hindamiseks ja kinnitamiseks (Kalra jt., i.a.). Korrektnel moodus meetodi valideerimiseks on läbi viia paralleelkatsed erinevates laborites. Need katsed peaksid näitama kui täpselt suudetakse tulemusi korrata laborisisest ja kuidas on nad korratavad erinevates laborites (D'Agostino jt., 2004).

Kogu valideerimine teostatakse akrediteeritud laborite kvaliteedistandardi EVS-EN ISO 17025:2006 nõudel puhaste ja kalibreeritud mõõtevahenditega tulemused dokumenteeritakse ja säilitatakse kogu meetodi kasutusaja jooksul. Euroopa ja Rahvusvaheline Standard (European and International Standard), EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ on väljatöötatud eesmärgiga sätestada ühtne võrdlussüsteem alternatiivmeetodi valideerimiseks, ning et määrata kindlad reeglid võimalike edasiste sertifitseerimiste jaoks. Standardis on kokkuvõtvalt kirjas tööprotokoll nii kvalitatiivse kui kvantitatiivse meetodi valideerimiseks. Valideerimisel on kaks põhi etappi: 1) võrdlev uuringu referentmeetodiga ja 2) laboritevaheline võrdlev uuring (Vencia jt., 2014; Lombard ja Leclercq, 2010). Referentmeetodid toiduainete mikrobioloogias on standardiseeritud Rahvusvahelise Standardiorganisatsiooni (*International Organization for Standardization*- ISO) ja Euroopa Standardimiskomitee (*European Committee for Standardization*-CEN) poolt.

Valideerimisprotokollis nõutakse toidumaatriksite nakatamist mitme erineva mikroobikontsentratsiooniga. Analüüside tulemuste põhjal arvutatakse alternatiivmeetodi suhteline täpsus, suhteline tundlikkus ja suhteline spetsiifilisus. Lisaks määratakse suhteline tuvastamispiir ning alternatiivmeetodi selektiivsus.

**Suhteline täpsus** (*relative accuracy*) on referent- ja alternatiivmeetodil saadud tulemuste kokkulangevus. **Suhteline tundlikkus** (*relative sensitivity*) iseloomustab alternatiivmeetodi võimet tuvastada testitavat märklaudmikroobi kui see tuvastati ka referentmeetodil. **Suhteline spetsiifilisus** (*relative specificity*) on alternatiivmeetodi võime testitavat sihtmärkmikroobi mitte tuvastada kui seda ei tuvastataud ka referentmeetodil (EVS-EN ISO 16140:2003). **Positiivne hälve** (*positive deviation*) näitab, et alternatiivse meetodiga saadud positiivne tulemus on valepositiivne tulemus, kui standardmeetodil saadi negatiivne tulemus. **Negatiivne hälve** (*negative deviation*) saadakse kui referentmeetod annab positiivse, kuid alternatiivmeetod negatiivse tulemuse. **Tuvastamispiiriks** nimetatakse vähimat analüüdi

sisaldust proovis, mida on valitud meetodikaga võimalik usaldusväärselt detekteerida ja identifitseerida (Thompson jt., 2002). **Selektiivsuseks** nimetatakse meetodi võimet mõõta vaid analüüdi sisaldust ning seejuures mitte olla mõjutatud teiste ainete sisaldumisest proovis (EVS-EN ISO 16140:2003). Spetsiifilisus on 100% selektiivsus. Selektiivsuse määramine näitab alternatiivmeetodi kasutatavust *L. monocytogenes*'e eri serotüüpide tuvastamiseks PCR-meetodi abil ja mitte-sihtmärbakterite tuvastamatust (Thompson jt., 2002). **Inklusiivsus** on alternatiivmeetodi võime tunda ära märklaudorganismi erinevad tüved (Feldsine jt., 2002 ;Vencia jt., 2014). **Eksklusiivsus** näitab alternatiivmeetodi võimet välistada mitte-sihtmärb tüvede tuvastamist (Feldsine jt., 2002;Vencia jt., 2014) ning näidata, et toidus esinevad mitte-sihtmärbakterid ei anna valideeritava meetodiga positiivset tulemust.

Alternatiivmeetodit võib kirjeldada kui meetodit, mis analüüsib antud ulatuses sama sihtmärb analüüti, mida on mõõdetud vastava referentmeetodiga ja mis vastab järgmistele nõuetele: 1) kiire analüüs ja/või vastus, 2) lihtne teostada ja/või on automatiseeritud, 3) analüütiline tulemuslikkus on vähemalt sama hea kui referentmeetodil.

## **2. EKSPERIMENTAALOSA**

### **2.1 Töö eesmärgid**

Käesoleva magistritöö eesmärgiks oli *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks sobiliku PCR meetodi valideerimine vastavalt standardile EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ kehtestatud nõudmistele. Alternatiivseks meetodiks oli PCR-meetod *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks spetsiifilise PCR-reaktsiooniga.

*L. monocytogenes*'e tuvastamiseks kasutatava PCR-meetodi valideerimine hõlmas:

- 1) alternatiiv- ehk PCR-meetodi tingimuste optimeerimist *L. monocytogenes*'ele spetsiifilise *hlyA* geenijärjestuse PCR-meetodiga amplifitseerimiseks toidu- ja hügieeniproovidest eraldatud totaalsest DNA-st;
- 2) kolme toidukategooria (kala-, liha- ja piimatooted) ning hügieeniproovide kategooria maatriksite kunstlikku nakatamist ja analüüsimist ning naturaalselt nakatunud maatriksite analüüsi PCR-meetodi ja referentmeetodiga;
- 3) alternatiiv- (standard- EVS-EN ISO 16140:2003) ja referentmeetodi (standard- EVS-EN ISO 11290-1:200/A1:2004) tulemuste võrdlevat analüüsi;
- 4) alternatiivmeetodi suhtelise tuvastamiskiiri, selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramist ning suhtelise täpsuse, tundlikkuse ning positiivse ja negatiivse hälbe arvutamist.

### **2.2 Materjal ja meetodika**

#### **2.2.1 Töös kasutatud bakteritüved**

Töös kasutatud bakteritüved on valitud vastavalt normatiividele, mis on kirjeldatud standardi EVS-EN ISO 16140:1999 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“, lisas G. Sihtmärk- ja mitte-sihtmärktüvede valimi suurus tugines standardile EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“, mille kohaselt alternatiivmeetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramisel testitakse vähemalt 50 sihtmärktüve ja 30 mitte-sihtmärktüve (Tabel 2). Sihtmärktüved ehk *L. monocytogenes*'e tüved on kas välismaistes kolleksioonides hoiustatavad referenttüved (ostetud firmast Microbiologics Inc), Icosagen AS mikrobioloogia laboris toidust isoleeritud tüved või pärinevad Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi (VTL-i) mikroobikolleksioonist (Tabel 2). Ka VTL-i kolleksioonist pärinevad *L. monocytogenes*'e tüved on eraldatud toidust. Mitte-sihtmärktüved saadi valdavalt kahest mikroobikolleksioonist, kas Icosagen AS-i kolleksioonist või Tartu Ülikooli

Molekulaar- ja rakubioloogia instituudi looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioonist CELMS (Tabel 2).

**Tabel 2. Töös kasutatud sihtmärktüvede ja mitte-sihtmärk tüvede loend.**

<b>Sihtmärktüved: <i>L. monocytogenes</i>'e tüved</b>	<b>Isolaadi number</b>	<b>Mitte-sihtmärktüved</b>	<b>Isolaadi number/ päritolu</b>
1. <i>L. monocytogenes</i>	IL099	1. <i>Bacillus mycoides</i>	CELMS
2. <i>L. monocytogenes</i>	VL007	2. <i>Bacillus circulans</i>	CELMS
3. <i>L. monocytogenes</i>	IL021-1	3. <i>Bacillus megaterium</i>	CELMS
4. <i>L. monocytogenes</i>	IL021-2	4. <i>Bacillus simplex</i>	CELMS
5. <i>L. monocytogenes</i>	IL021-3	5. <i>Bacillus sphaericus</i>	CELMS
6. <i>L. monocytogenes</i>	IL021-4	6. <i>Bacillus subtilis</i>	IC002
7. <i>L. monocytogenes</i>	IL021-5	7. <i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 11774
8. <i>L. monocytogenes</i>	IL032	8. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 33862
9. <i>L. monocytogenes</i>	IL036-1	9. <i>Bacillus licheniformis</i>	ATCC 12759
10. <i>L. monocytogenes</i>	IL036-2	10. <i>Bacillus licheniformis</i>	IC001
11. <i>L. monocytogenes</i>	IL036-3	11. <i>Bacillus licheniformis</i>	CELMS
12. <i>L. monocytogenes</i>	IL102	12. <i>Bacillus pumilus</i>	ATCC 700814
13. <i>L. monocytogenes</i>	IL103	13. <i>Bacillus pumilus</i>	CELMS
14. <i>L. monocytogenes</i>	IL101	14. <i>Bacillus cereus</i>	ATCC 11778
15. <i>L. monocytogenes</i>	IL106	15. <i>Bacillus cereus</i>	CELMS
16. <i>L. monocytogenes</i>	IL107	16. <i>Paenibacillus macerans</i>	CELMS
17. <i>L. monocytogenes</i>	IL108	17. <i>L. innocua</i>	NCTC 11288
18. <i>L. monocytogenes</i>	IL109	18. <i>L. innocua</i>	ATCC 33090
19. <i>L. monocytogenes</i>	IL104	19. <i>L. greyii</i>	ATCC 700545
20. <i>L. monocytogenes</i>	IL100	20. <i>L. greyii</i>	ATCC 25401
21. <i>L. monocytogenes</i>	IL067	21. <i>L. ivanovii</i>	ATCC 19119
22. <i>L. monocytogenes</i>	IL074	22. <i>L. ivanovii</i>	ATCC 139
23. <i>L. monocytogenes</i>	IL077	23. <i>L. seeligeri</i>	ATCC 35967
24. <i>L. monocytogenes</i>	IL078	24. <i>L. welshimeri</i>	ATCC 35897
25. <i>L. monocytogenes</i>	IL070	25. <i>Streptococcus bovis</i>	CELMS
26. <i>L. monocytogenes</i>	IL068	26. <i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 6538
27. <i>L. monocytogenes</i>	IL069	27. <i>Staphylococcus epidermidis</i>	ATCC 12228
28. <i>L. monocytogenes</i>	IL064	28. <i>Lactococcus lactis</i>	ATCC 19435
29. <i>L. monocytogenes</i>	IL042	29. <i>Lactobacillus sakei</i>	IC012
30. <i>L. monocytogenes</i>	IL098	30. <i>Rhodococcus equi</i>	ATCC 6939
31. <i>L. monocytogenes</i>	VL002	31. <i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC 29212
32. <i>L. monocytogenes</i>	VL003	<b>Tähistused:</b> <b>IL ja IC-</b> Icosagen AS mikroobitüvede kollektsioon <b>ATCC-</b> mikroobitüvede kollektsioon <i>American Type Culture Collection</i> <b>VL-</b> Veterinaar- ja Toidulaboratooriumi (VTL) mikroobitüvede kollektsioon <b>CELMS-</b> Tartu Ülikooli Molekulaar- ja Rakubioloogia instituudi juures asuv mitemeditsiinilise päritoluga looduslike ja laboratoorsete mikroobitüvede kollektsioon <b>NCTC-</b> mikroobikollektsioon <i>National Collection of Type Cultures</i>	
33. <i>L. monocytogenes</i>	VL011		
34. <i>L. monocytogenes</i>	VL004		
35. <i>L. monocytogenes</i>	VL008		
36. <i>L. monocytogenes</i>	VL001		
37. <i>L. monocytogenes</i>	VL010		
38. <i>L. monocytogenes</i>	VL017		
39. <i>L. monocytogenes</i>	VL013		
40. <i>L. monocytogenes</i>	VL009		
41. <i>L. monocytogenes</i>	VL006		
42. <i>L. monocytogenes</i>	VL023		
43. <i>L. monocytogenes</i>	VL005		
44. <i>L. monocytogenes</i>	IL064		
45. <i>L. monocytogenes</i>	IL056		
46. <i>L. monocytogenes</i>	IL065		
47. <i>L. monocytogenes</i> , 4b	ATCC 13932		
48. <i>L. monocytogenes</i> , 4e	ATCC 19118		
49. <i>L. monocytogenes</i>	IL083		
50. <i>L. monocytogenes</i>	IL075		

### 2.2.2 Töös kasutatud toidumaatriksid ja keskkonnaproovid

Uurimustöös kasutatud toidumaatriksite kategooriad valiti lähtuvalt standardis EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ lisa B toodud nimistust. Kasutatud maatriksid jaotusid 4 kategooriasse ja hõlmasid järgnevaid tooteid ja keskkonnaproove:

#### Lihatooted

- keeduvorst (VO); õllepunnid juustuga (SAR); kanaliha (NKA); singivõie (NSK); grillvorstid (NGVO)

#### Kalatooted

- lõhefilee (NLH); pangassiuse filee (PG); roogitud lõhe (RLÕ); kuumsuitsu heik (HE); külmsuitsu lõhefilee (NKL); kalatooted (NKT)- külmsuitsulõhefilee, lõhefileetükid, külmsuitsu paltus, graavilõhe tilliga.

#### Piimatooted

- maitsestatamata jogurt (MJ); toorpiim (TRP); hapupiim (HP); kakaopuding (NKP); piimatooted (NPT)- 2,5% piim, vahukoor, ahjuõunajogurt, kohupiimakreem.

#### Keskkonnaproovid

- uhteproovid (UH); nakatamata uhteproovid (NUH); positiivsed uhteproovid (NUP)

Kasutatud maatriksid saadi Icosagen AS Mikrobioloogia labori proovide hulgast või osteti toidupoe mugavusvalimi alusel. Kõik kasutatavad maatriksid olid *L. monocytogenes*'e esinemise suhtes enne kunstlikku nakatamist laboris eelnevate analüüside käigus kontrollitud. Toidu- ja hügieeniproovid nakatati kunstlikult või kasutati naturaalselt *L. monocytogenes*'e tüvedega nakatunud maatrikseid. Maatrikseid säilitati temperatuuril -20°C, kuni tulemuste selgumiseni.

### 2.2.3 Bakterite kasvatamine

Bakteritüvede säilitamiseks ja kasvatamiseks vajalikud söötmed valmistati valdavalt dehüdreeritud valmissegudest vastavalt tootjafirma juhenditele.

*L. monocytogenes*'e tuvastamisel kasutati kasvatamiseks järgmisi söötmeid:

- 1) 1/2 Fraseri puljong (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Suurbritannia) toidumaatriksi eelrikastamiseks temperatuuril 30 °C 24±2 tundi.
- 2) Fraseri puljong (Oxoid™, Thermo Fisher Scientific, Suurbritannia) selektiivseks rikastamiseks temperatuuril 37 °C 48±2 tundi.
- 3) Selektiivsöötmed ALOA ja Oxford (Conda, Hispaania) *L. monocytogenes*'e

kasvatamiseks temperatuuril 37 °C 48±2 tundi.

4) Söödet TSA *L. monocytogenes*'e inokulaatide arvukuse määramiseks; inkubeerimine temperatuuril 37 °C 24 tundi.

5) Puljong TSYEB meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramisel tüvede puhaskultuuride (k.a. *L. monocytogenes*'e puhaskultuuri) kasvatamiseks.

6) Süsivesikute kasutamise põhisööde ramnoosi puljong (Fluka™, Sigma-Aldrich, US), millele oli lisatud vastavalt ramnoosi või ksüloosi filtersteriliseeritud (0,2 µm poorisuurusega filtriga) lahust (AppliChem, Saksamaa), selliselt, et lõppkontsentratsioon oli 5%; kasvatati temperatuuril 37 °C kuni 5 päeva.

7) Lamba vereagar (telliti firmast Quattromed HTI, Eesti) hemolüüsi testimiseks, inkubeerimine temperatuuril 37 °C 24 tundi.

#### **2.2.4 *Listeria monocytogenes*'e tuvastamist kinnitavad mikrobioloogilised testid**

Referentmeetodi puhul kasutati *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks standardile EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004 „Toidu- ja loomasöödade mikrobioloogia – horisontaalmeetod *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks ja loendamiseks” vastavaid kinnitavaid teste. Kinnitavate testide kvaliteedi kontrolliks kasutati paralleelselt negatiivset ja positiivset kontrollkultuuri.

- Mikroskopeerimise abil määrati uuritava mikroobi Gram-reaktiivsus ja iseloomustati rakumorfoloogiat, selleks tehti preparaati, mis värviti Grami-meetodil. *L. monocytogenes* on grampositiivne, sale ja lühike pulkbakter.
- Katalaastestiks suspendeeriti uuritavad kolooniad 3% vesinikperoksiidi (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) tilgas ning vaadeldi hapnikumullide teket. *L. monocytogenes* on katalaaspositiivne.
- Liikuvustestiks kasutati üleöö TSYEB puljongis kasvatatud kultuurisuspensiooni mikroskopeerimist. *L. monocytogenes*'ele on iseloomulik “kukerpallitav” liikumine.
- Süsivesikute kasutamise hindamiseks kasvatati eeldatavat *Listeria spp.* kultuuri ramnoosi ning ksüloosi puljongis. *L. monocytogenes* on ramnoos positiivne ja ksüloos negatiivne.
- Hemolüüsi testimiseks külvati uuritavad kolooniad lambavere agarile, tehes samaaegselt ka torkekülvi. *L. monocytogenes* tekitab veriagaril β-hemolüüsi.
- CAMP – testiks (LISA 1) külvati Petri tassi kahte serva paralleelsed joonkülvid *Staphylococcus aureus*'e ja *Rhodococcus equi* kultuuridega lambavere agarile. Joonkülvidest 1-2 mm kaugusele külvati horisontaalselt *L. monocytogenes*, *L. innocua*, *L. ivanovii* ja eeldatava *Listeria spp.* kolooniate külvijooned ning tasse inkubeeriti 37 °C, 18–24 tundi. Positiivseks reaktsiooniks loeti *L. monocytogenes*'e võimendunud hemolüüsitsooni testtüve *S. aureus*'e külvijoonel läheduses.

## 2.2.5 Referent- ja alternatiivmeetodite võrdlev katseskeem

Üldine katseskeem on esitatud tabelis 3.

**Tabel 3. Referent- ja alternatiivmeetodi katseskeem.**

<b>Referentmeetod</b> <b>EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004</b>	<b>Alternatiivmeetod</b> <b>EVS-EN ISO 16140:2003</b> <b>PCR-meetod <i>in house</i></b>
<p><b>Eelrikastus:</b></p> <p><b>Selektiivrikastus:</b></p>	<p>1 osa (25 g) katseproovi + 9 osa (225 g) ½ Fraser puljongit            Inkubeerimine: 30 °C 24 tundi</p> <p>10 ml Fraseri puljongile lisatakse 0,1 ml eelrikastuspuljongit            Inkubeerimine: 37 °C 48 tundi</p>
<p><b>Väljakülvid:</b></p> <p>a) ALOA-tardsöötmele            b) Oxford-tardsöötmele            Inkubeerimine: 37 °C 48h</p>	<p><b>DNA eraldamine:</b></p> <p>1 ml selektiivrikastuse puljongist eraldatakse totaalse DNA komplektiga RTP Bacteria DNA Mini Kit (STRATEC Molecular, Saksamaa)</p>
<p><b>Tulemuste kinnitamine:</b></p> <p>Mõlemalt söötmetelt valitakse 5 tüüpilist kolooniat kinnitavateks testideks:</p> <p>a) biokeemilised testid            b) mikroskoopia</p>	<p><b>PCR-reaktsioonid:</b></p> <p>a) praimeripaariga LM_F2/LM_R2 amplifitseeritakse <i>L. monocytogenes</i>'e DNA ja IAC plasmidi DNA,            b) bakteriaalse DNA amplifitseerimise kontrolliks amplifitseeritakse eubakteritele universaalse praimeripaariga PCR1/PCR2 16S rRNA geeni fragment</p> <p><b>PCR-produktide tuvastamine agaros - geelelektroforeesil:</b></p> <p>a) 1% agarosgeel 1 x TAE puhvis (<i>L. monocytogenes</i>'e DNA produkt + produkt IAC plasmiidilt)            b) 1% agarosgeel 1 x TAE puhvis (16S rRNA produkt)</p> <p><b>Saaduste visualiseerimine UV-valguses ja DNA suurusmarkeri abil saaduste suuruse hindamine:</b></p> <p>a) <i>L. monocytogenes</i>'e spetsiifilise saaduse suurus on 679 bp, IAC plasmidi saaduse suurus on 376 bp            b) 16S rRNA geeni saaduse suurus on 1500 bp</p> <p>Test loetakse <i>L. monocytogenes</i>'e tuvastamise suhtes positiivseks, kui tuvastatakse <i>L. monocytogenes</i>'e DNA, IAC-plasmidi ja 16S rRNA geeni amplifitseerimise saadused.</p> <p>Testi tulemus on negatiivne juhul kui <i>L. monocytogenes</i>'e DNA puudub, kuid IAC plasmidi saadus on olemas.</p> <p>IAC-plasmidi saaduse puudumisel loetakse test tehniliselt ebaõnnestunuks (valenegatiivne).</p>

## **2.2.6 Toidumaatriksite ja hügieeniproovide kunstlik nakatamine**

### **2.2.6.1 *Listeria monocytogenes*'e inokulaadi valmistamine**

Suhtelise täpsuse, suhtelise spetsiifilisuse, suhtelise tundlikkuse ning meetodi tuvastamispiiri määramiseks nakatati valitud toidumaatrikseid *L. monocytogenes*'e serotüübiga 4e (ATCC 19118) või 4b (ATCC 13932). Üleöö kasvanud bakterisuspensioonist valmistati kümnendlahjenduste rida ning arvukuse määramiseks tehti lahjendustest  $10^{-4}$ - $10^{-6}$  väljakülvid TSA agarsöötmele, külvimääraga 100 µl. Bakterisuspensioon säilitati üleöö (maatriksi nakatamiseni) temperatuuril 2-4 °C. Loendamistulemustest lähtuvalt valmistati uued sobiva arvukusega inokulaadid toidu- ja hügieeniproovide nakatamiseks.

### **2.2.6.2 Mitte-sihtmärktüvede inokulaadi valmistamine**

TSA-agarsöötmele kasvatatud mitte-sihtmärktüvede kolooniaid suspendeeriti 2 ml vedelsöötmes TSYEB ning inkubeeriti 24±2 tundi. Kõiki *Listeria spp.* tüvesid inkubeeriti temperatuuril 37 °C, *Bacillus spp.* ja teisi mitte-sihtmärktüvesid temperatuuril 30 °C. Pärast inkubeerimist külvati söötmetest TSYEB 100 µl inokulaati 10 ml 1/2-Fraser puljongisse ning inkubeeriti täiendavalt 24±2 tundi temperatuuril 30 °C. Inokuleerimiseks kasutati minimaalsest tuvastamispiirist kuni 100 korda kõrgemat arvukust, mis vastab ligikaudu arvukusele  $10^2$  cfu/ml. Kõikidest bakterisuspensioonidest tehti pärast inkubeerimist väljakülvid Oxford ja ALOA söötmetassidele ning 1 ml selektiivrikastuse puljongist eraldati DNA.

### **2.2.6.3 Toidu- ja hügieeniproovide kunstliku nakatamise etapid:**

#### Eelrikastus:

1. kindla arvukusega *L. monocytogenes*'e inokulaadi valmistamine;
2. toidumaatriksi kaalumise Stomacheri kilekotti- 25 grammi (1 osa) toidumaatriksit, hügieeniproovide puhul proovivõtukäsna kaalumise;
3. 1/2 Fraser puljongi lisamine- 9 osa (224 grammi) toidumaatriksitele või hügieeniproovidele.
4. 1 ml soovitud arvukusega inokulaadi lisamine katseproovile;
5. segamine Stomacheri homogenisaatoris 30 sekundit;
6. katseproovide inkubeerimine temperatuuril 30 °C, 24 tundi;
7. pärast inkubatsiooni väljakülvid ALOA ja Oxford tardsöötmetele *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks.

#### Selektiivrikastus:

1. 10 ml Fraser puljongisse lisatakse 0,1 ml eelrikastuspuljongit

2. katsutite inkubeerimine temperatuuril 37 °C 48 ± 2 tundi
3. pärast inkubeerimist väljakülvid ALOA ja Oxford tardsöötmetele *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks.

Kirjeldatud skeemi rakendati kõikide toidumaatriksite ja hügieeniproovide jaoks samamoodi. Nakatusannused valiti vastavalt standardi EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ nõudele kasutada vähemalt kolme erinevat patogeeni arvukuse taset 25 g toote kohta. Nakatamiseks kasutatud inokulaatidest tehti arvukuse kontrollimiseks väljakülvid TSA agarsöötmele ning tase inkubeeriti temperatuuril 37 °C 24 tundi. Inokuleerimise õnnestumise kontrollimiseks tehti 24 tunni möödudes eelrikastuspuljongist väljakülvid ALOA söötmetassidele *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks.

#### 2.2.6.4 Hügieeniproovide kategooria

Hügieeniproovide kategoorias kasutati kunstlikuks nakatamiseks abrassiivseid käsnu (3M Microbiology, USA). Uhteproovide (UH) käsnaid asetati antiseptilistes tingimustes Stomacheri steriilsetesse filtrita kottidesse, lisati 1 ml *L. monocytogenes* 4e inokulaati ja eelrikastuspuljongit. Eelrikastuspuljongis nakatati uhteproove kaheksas korduses, kasutades tuvastamispiiri lähedase (TP1, 1–4 cfu/10 g), madala (MA, 10–20 cfu/10 g) ja kõrge arvukusega (KA, 100–400 cfu/10 g) inokulaati. Lisaks valmistati 26 korduses negatiivsed uhteproovid, millesse *L. monocytogenes*'e inokulaati ei lisatud. Kokku valmistati ja analüüsiti 50 katseproovi. *L. monocytogenes*'e arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja katseproovis (cfu/10 g) on esitatud alltoodud tabelis 4.

**Tabel 4. Arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja nakatusannus katseproovis (cfu/10g) (MA – madal arvukus, KA – kõrge arvukus, TP – tuvastamispiir)**

Inokulaat (eeldatav arvukus)	Nakatusannus ehk <i>L. monocytogenes</i> 'e kolooniate arv cfu/10 g uuritavas proovis	Proovide arv
<b>Inokulaat: <i>L. monocytogenes</i>'e ATCC 19118, serotüüp 4e</b>		
KA (100–400 cfu/ml)	201 cfu	8 x UH= 8
MA (10–20 cfu/ml)	20 cfu	8 x UH= 8
TP1 (1–4 cfu/ml)	2 cfu	8 x UH= 8
NK ( 0 cfu/ml)	Nakatamata	26 x UH= 26

#### 2.2.6.5 Lihatoodete kategooria

Maatriksitena kasutati kunstlikult nakatatud keeduvorsti (VO) ja õllepunne juustuga (SAR). Eelrikastuspuljongis nakatati katseproove *L. monocytogenes*'e 4b inokulaadiga kuues korduses, kasutades kahte erinevat tuvastamispiiri lähedase arvukusega (TP4, 4-10 cfu/25 g; TP1, 1–4 cfu/25 g), madala (MA, 10–20 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 100–400 cfu/25

g) inokulaati. Tuvastamiskiiri lähedase arvukusega inokulaatidega (TP1 ja TP4) nakatati keeduvorsti (VO) proove, SAR-matriksit nakatati madala (MA) ja kõrge (KA) arvukusega inokulaadiga. Lisaks valmistati 12 korduses negatiivsed lihamaatriksite proovid, millesse *L. monocytogenes*'e inokulaati ei lisatud. Kokku analüüsiti 48 katseproovi. *L. monocytogenes*'e arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja katseproovis (cfu/25 g) on esitatud alltoodud tabelis 5.

**Tabel 5. Arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja nakatusannus katseproovis (cfu/25g) (MA – madal arvukus, KA – kõrge arvukus, TP – tuvastamiskiiri)**

Inokulaat (eeldatav arvukus)	Nakatusannus ehk <i>L. monocytogenes</i> 'e kolooniate arv cfu/25 g uuritavas proovis	Nakatamisskeem ja proovide arv
<b>Inokulaat: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932, serotüüp 4b</b>		
KA (100–400 cfu/ml)	370 cfu	6 x VO + 6 x SAR = 12
MA (10–20 cfu/ml)	20 cfu	6 x VO + 6 x SAR = 12
TP4 (4-10 cfu/ml)	7 cfu	6 x VO = 6
TP1 (1–4 cfu/ml)	1 cfu	6 x VO = 6
NK ( 0 cfu/ml)	Nakatamata	6 x VO + 6 x SAR =12

#### 2.2.6.6 Piimatoodete kategooria

Maatriksitena kasutati kunstlikult nakatatud maitsestatamata jogurtit (MJ), toorpiima (TRP) ja hapupiima (HP). Eelrikastuspuljongis nakatati piimamaatriksite proove *L. monocytogenes*'e 4b inokulaadiga kuues korduses, kasutades kahte erinevat tuvastamiskiiri lähedase arvukusega inokulaatidega (TP4, 4-10 cfu/25 g; TP1, 1–4 cfu/25 g), madala (MA, 10–20 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 100–400 cfu/25 g) inokulaati. Tuvastamiskiiri lähedase arvukusega (TP1 ja TP4) nakatati hapupiima (HP) proove, teisi matrikseid (TRP ja MJ) nakatati madala (MA) ja kõrge (KA) arvukusega inokulaadiga. Lisaks valmistati 18 korduses negatiivsed piimamaatriksite proovid, millesse *L. monocytogenes*'e inokulaati ei lisatud. Kokku analüüsiti 66 katseproovi. *L. monocytogenes*'e arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja katseproovis (cfu/25 g) on esitatud alltoodud tabelis 6.

**Tabel 6. Arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja nakatusannus katseproovis (cfu/25g) (MA – madal arvukus, KA – kõrge arvukus, TP – tuvastamiskiiri)**

Inokulaat (eeldatav arvukus)	Nakatusannus ehk <i>L. monocytogenes</i> 'e kolooniate arv cfu/25 g uuritavas proovis	Nakatamine ja proovide arv
<b>Inokulaat: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932, serotüüp 4b</b>		
KA (100–400 cfu/ml)	200 cfu	6 x MJ + 6xTRP+6 x HP = 18
MA (10–20 cfu/ml)	15 cfu	6 x MJ + 6xTRP+6 x HP = 18
TP4 (4-10 cfu/ml)	5 cfu	6 x HP = 6
TP1 (1–4 cfu/ml)	1 cfu	6 x HP = 6
NK ( 0 cfu/ml)	Nakatamata	6 x MJ+6xTRP+6 x HP =18

### 2.2.6.7 Kalatoodete kategooria

Maatriksitena kasutati kunstlikult nakatatud roogitud lõhet (RLÕ) ja kuumsuitsu heiki (HE). Eelrikastuspuljongis nakatati kalamaatriksite proove *L. monocytogenes*'e 4b inokulaadiga kuues korduses, kasutades kahte erinevat tuvastamispääri lähedase arvukusega (TP4, 4-10 cfu/25 g; TP1, 1-4 cfu/25 g), madala (MA, 10-20 cfu/25 g) ja kõrge arvukusega (KA, 100-400 cfu/25 g) inokulaati. Tuvastamispääri lähedase arvukusega inokulaatidega (TP1 ja TP4) nakatati kuumsuitsuheiki (HE) proove, teist maatriksit nakatati madala (MA) ja kõrge (KA) arvukusega inokulaadiga. Lisaks valmistati 12 korduses negatiivsed kalamaatriksite proovid, millesse *L. monocytogenes*'e inokulaati ei lisatud. Kokku analüüsiti 48 katseproovi. *L. monocytogenes*'e arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja katseproovis (cfu/25 g) on esitatud alltoodud tabelis 7.

**Tabel 7. Arvukus inokulaadis (cfu/ml) ja nakatusannus katseproovis (cfu/25g) (MA – madal arvukus, KA – kõrge arvukus, TP – tuvastamispääri)**

Inokulaat (eeldatav arvukus)	Nakatusannus ehk <i>L. monocytogenes</i> 'e kolooniate arv cfu/25 g uuritavas proovis	Nakatamine ja proovide arv
<b>Inokulaat: <i>L. monocytogenes</i> ATCC 13932, serotüüp 4b</b>		
KA (100-400 cfu/ml)	150 cfu	6 x RLÕ + 6 x HE = 12
MA (10-20 cfu/ml)	15 cfu	6 x RLÕ + 6 x HE = 12
TP4 (4-10 cfu/ml)	4 cfu	6 x HE = 6
TP1 (1-4 cfu/ml)	1 cfu	6 x HE = 6
NK (0 cfu/ml)	Nakatamata	6 x RLÕ + 6 x HE = 12

### 2.2.6.8 Naturaalsete maatriksite ettevalmistusskeem

Naturaalsete ehk kunstlikult nakatamata maatriksitena kasutati:

- kanaliha (NKA); singivõiet (NSK); grillvorste (NGVO); külmsuitsu lõhefileed (NKL); lõhefileed (NLH); kalatooteid (NKT)- külmsuitsulõhefileed, lõhefileetükke, külmsuitsu paltust, Graavilõhe tilliga; kakaopudingut (NKP); piimatooteid (NPT)- 2,5% piima, vahukoort, ahjuõunajogurtit, kohupiimakreemi; uhteproove (NUH); positiivseid uhteproove (NUP).

Naturaalsed proovid saadi Icosagen AS Mikrobioloogia labori toidu- ja hügieeniproovide hulgast. Osadest katseproovidest oli referentmeetodiga tuvastatud *L. monocytogenes*. Katseproovi ettevalmistus toimus sarnaselt eelpool kirjeldatud kunstliku nakatamise skeemiga, kuid *L. monocytogenes*'e inokulaati juurde ei lisatud. Katsekäik oli sarnane nakatatud proovide analüüsimisele. Kõiki naturaalseid maatrikseid analüüsiti 6 korduses.

## **2.2.7 PCR-meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramiseks kasutatud bakteritüvede ettevalmistamine**

Selektiivsuse määramisel nakatati TSYEB puljongit *L. monocytogenes*'e 50 erineva tüvega ning 31 erineva mitte-sihtmärgtüvega (loetletud tabelis 2). Inokuleerimiseks kasutati minimaalsest tuvastamispiirist 10 kuni 100 korda kõrgemat arvukust.

## **2.2.8 Bakteriaalse DNA eraldamine**

Bakteriaalne DNA eraldati 1 ml selektiivrikastuse puljongist. Bakteriaalse DNA eraldamiseks kasutati komplekti *RTP Bacteria® DNA Mini Kit*, (STRATEC Molecular, Saksamaa) kasutades valmistaja pakutavat eeskirja (LISA 2). Komplekt võimaldab *L. monocytogenes*'e DNA eraldamist toidumaterjalist, milles esineb kuni  $10^9$  cfu/ml mikroobi. DNA eraldamise käigus kasutati tsentrifuugi *Eppendorf Centrifuge 5424* ning termomiksereid *Eppendorf Thermomixer compact* ja *Eppendorf ThermoStat plus*.

## **2.2.9 PCR-metoodika *hlyA* geenisaaduste amplifitseerimiseks**

### **2.2.9.1 PCR-metoodika valideerimisel kasutatud plasmiidid ja totaalne DNA**

Käesolevas töös kasutatud IAC plasmiid valmistamiseks kasutati *L. monocytogenes*'e sihtmärk geenist *hlyA*, praimeripaariga LM1/LM2 amplifitseeritud DNA fragmenti, mille pikkuseks on 702 bp. See PCR-produkt sisestati vektorisse pGEM-T-Easy ning saadi amplifitseeritavat järjestust sisaldav plasmiid pGEM-T-Easy-LM1/2 #2. Seejärel tehti praimeripaariga LM1/LM2 amplifitseeritavasse alasse 303 aluspaari pikkune deletsioon, kasutades restriksioon/ligatsioon metoodikat. Saadud plasmiidid paljundati ja eraldati *E. coli* tüvest DH5 $\alpha$  kasutades selleks komplekti EndoFree Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Saksamaa).

IAC-plasmidi lahuse DNA kontsentratsioon mõõdeti spektrofotomeetriliselt, kasutades NanoDrop 2000c aparatuuri ning vastavat DNA kontsentratsiooni määramise tarkvara. Eraldatud kasutati sihtmärk-DNA koopiaarvu määramiseks ning tööks vajalike DNA lahjenduste tegemiseks. pGEM-T-Easy-LM1/2 #2 ja IAC-plasmiid konstrueeriti Icosagen AS töötaja (Gaily Kivi) poolt.

Lisaks kasutati positiivse kontrollina *L. monocytogenes*'e 4b (ATCC 13932) puhaskultuurist eraldatud genoomset DNA-d. DNA eraldati komplektiga *RTP Bacteria® DNA Mini Kit* (STRATEC) (eraldamise protokoll vt LISA 2). Genoomse DNA lahjendust vees (1:50) kasutati PCR-reaktsiooni segus samas mahus, mis uuritavaid DNA-sid (5  $\mu$ l).

### **2.2.9.2 PCR- metoodika valideerimisel kasutatud reaktiivid**

- *L. monocytogenes*'e DNA amplifitseerimiseks kasutati praimeripaare LM1/LM2 või

LM\_F2/LM\_R2 (Microsynth AG, Šveits), praimerite nukleotiidilised järjestused on toodud tabelis 8. Kasutatud PCR valmissegud olid järgmised:

- 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 7.5 mM MgCl<sub>2</sub> ;
- 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 10 mM MgCl<sub>2</sub> ;
- 5 x HOT FIREPol® Blend Master Mix RTL(-) with BSA and 12.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Solis BioDyne, Eesti) (LISA 3).

Lisaks kasutati veel

- MQ vett
- 25 mM MgCl<sub>2</sub> (Fermentas, Leedu)
- kontrollplasmidi pGEM-T-Easy-LM1/2 #2 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ vees
- IAC-plasmidi pGEM-T-Easy-LM1/2 del #3 erineva kontsentratsiooniga lahused MQ vees
- positiivset kontrolli ehk *L. monocytogenes*'e 4b genoomset DNA-d
- maatriksite selektiivrikastustest eraldatud bakteriaalset DNA-d

### 2.2.10 PCR-produktide visualiseerimine ja hindamine

Saadud PCR-produkte analüüsiti elektroforeesiga 1 % agarosgeelis. Saaduste võrdlemisel kasutati markereid *GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder* (Fermentas, Leedu) või *GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder* (Fermentas, Leedu). Agarosgeel sisaldas TAE puhvrit (40 mM Tris - 20 mM atsetaat; 0,5 M EDTA, pH 8,0) ja etiidiumbromiidi 10 mg/ml. Elektroforees toimus 80-89 V juures ning DNA fragmendid ja geelid pildistati UV-valguses.

### 2.2.11 Töös kasutatud praimerid ja PCR-produktide suurused

Praimerid ja produktide suurused on esitatud tabelis 8-

**Tabel 8. Töös kasutatud praimerid ja PCR-saaduste suurused**

Sihimärk geen	Nimetus	5'→3' järjestus	t°C *	Saaduse suurus	Viide
<i>hlyA</i>	LM1 LM2	5'-CCTAAGACGCCAATCGAA-3' 5'-AACGGCTTGCAACTGCTC-3'	58 63	702 bp	Bickley jt., 1996
<i>hlyA</i>	LM_F2 LM_R2	5'-GAAACACGCGGATGAAATCG-3' 5'-CGCTTGCAACTGCTCTTTAG-3'	62 61	679 bp	Käesolev töö
16S rRNA	PCR I PCR II	5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3' 5'-TACGGTTACCTTGTACGACT-3'	59 60	1500 bp	Weisburg jt., 1990

\*t°C, praimerite seondumistemperatuur arvutati programmiga Clone Manager 9.3 Professional Edition

### 2.2.12 Valideerimisel kasutatud parameetrite leidmine

Valideerimisel kasutatud parameetrite leidmine põhineb tabelis 9 toodud illustratiivsel kokkuvõttel hindamismeetodist.

**Tabel 9. Referent- ja alternatiivmeetodil saadud katsetulemuste kokkulangevus selektiivrikastusest (EVS-EN ISO 16140:2003).**

<b>SELEKTIIVRIKASTUS</b>	Referentmeetod positiivne (R+)	Referentmeetod negatiivne (R-)
Alternatiivmeetod (A+)	R+/A+ Positiivsete tulemuste kokkulangevus	R-/A+ Positiivne hälve (PD)
Alternatiivmeetod (A-)	R+/A- Negatiivne hälve (ND)	R-/A- Negatiivsete tulemuste kokkulangevus (NA)

**Suhteline täpsus**,  $AC = 100 \times (PA + NA)/N$ , kus N on analüüsitud katseproovide arv, PA positiivsete tulemuste kokkulangevus, NA negatiivsete tulemuste kokkulangevus.

**Suhteline tundlikkus**,  $SE = 100 \times PA/NA+$ , kus N+ tähistab positiivsete tulemuste kokkulangevuse ja negatiivse hälbe summat (PA + ND).

**Suhteline spetsiifilisus**,  $SP = 100 \times NA/N-$ , kus N- tähistab negatiivsete tulemuste kokkulangevuste ja positiivse hälbe summat (NA + PD).

Alternatiivmeetodi selektiivrikastuse suhtelised täpsused, tundlikkused ja spetsiifilisused on toodud tabelis 11.

### 2.2.13 Töös kasutatud arvutiprogrammid ja veebilehed

Praimerite analüüsimiseks kasutati programmi Clone Manager versioon 9.3 ([http://www.scied.com/pr\\_cmpro.htm](http://www.scied.com/pr_cmpro.htm)) ning praimerite seondumise analüüsimiseks kasutati BLAST-analüüsi, mis on kättesaadav veebilehel <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

## 2.3 TULEMUSED

### 2.3.1 Kujundatud praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 spetsiifilisuse analüüs ning PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustus

PCR-meetodi optimeerimise algjärgus kasutati praimeripaari LM1/LM2 (Tabel 8), mille järjestus pärines kirjandusest (Bickley jt., 1996). Siiski, analüüsides nende praimerite PCR-reaktsiooniks olulisi omadusi (nt sulamistemperatuure, homo- ja heterodimeeride moodustumist, seondumise stabiilsust), selgus, et need ei ole PCR-reaktsiooniks optimaalsed. Esinesid sulamistemperatuuride erinevused, homodimeeride moodustumine ning ebapiisav GC-klamber. Seetõttu kasutati bioinformaatilist meetodit optimaalsema praimeripaari [LM\_F2 ja LM\_R2 (Tabel 8)] kujundamiseks. PCR-meetodi optimeerimise etapid viidi läbi praimeritega LM1 ja LM2, kui ei ole märgitud teisiti. Eelnevalt optimeeritud PCR-tingimused sobisid ka uute praimeritega LM\_F2/LM\_R2, mis amplifitseerisid peaaegu sama geenijärjestust.

*L. monocytogenes*'e määramiseks koostati praimerid LM\_F2 ja LM\_R2 (Tabel 8). Praimerid koostati kohe algselt optimaalse paarina, kasutades matriitsina *L. monocytogenes*'e geeni *hlyA* (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ABH11351> järjestust ja molekulaarbioloogia valdkonnas rakendatavat tarkvara Clone Manager 9.3. Professional Edition. PCR-praimerite jaoks kasutati programmi vaikeväärtusi. Praimerid LM\_F2 ja LM\_R2 koostas Icosagen AS töötaja Andres Männik.

#### 2.3.1.1 Kasutatavate praimerite spetsiifilisuse bioinformaatiline analüüs

Praimerite spetsiifilisust analüüsiti, kasutades algoritmi Basic Local Alignment Search Tool (BLAST), mis on kättesaadav organisatsiooni National Center for Biotechnology Information (NCBI) vörgulehel [http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome). BLAST abil leitakse lokaalne sarnasus järjestuste vahel. Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 järjestusi analüüsiti võrreldes eubakterite (*Eubacteria*) järjestustega andmebaasides (Nucleotide collection (nr/nt) = GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+RefSeq, välja arvatud EST, STS, GSS, WGS, TSA, patenteeritud järjestused). Spetsiifilisuse analüüsimiseks jäeti andmebaasidest välja *L. monocytogenes*'e järjestused (LISA 5a).

## **LM\_F2 praimeri analüüs**

Analüüs näitas praimeri võimet kogu järjestuse ulatuses seonduda erinevate *L. monocytogenes*'e tüvede DNA-ga. Samuti on analüüsi tulemuste kohaselt see praimer võimeline seonduma *L. ivanovii* tüve Lm47 *hlyA* geenijärjestusele ja erinevate *L. innocua* serotüüpide listeriolüsiini geenile (LISA 5b). Samas on positiivse vastuse andnud *L. ivanovii* ja *L. innocua* järjestused sedavõrd sarnased vastavate *L. monocytogenes*'e järjestustega, et nende järjestustega mitteseonduvate, kuid *L. monocytogenes*'ega seonduvate praimerite koostamine pole võimalik. Ka ei saa välistada, et tegemist on valemäärangutega ning antud *L. ivanovii* ja *L. innocua* järjestused pärinevad tegelikult *L. monocytogenes*'est. Antud võimalust toetab kaudselt ka valideerimisel läbi viidud spetsiifilisuse katse tulemus, mille kohaselt kasutatav praimeripaar teistest *Listeria* perekonna isolaatidelt saadusi ei amplifitseerinud (Joonis 26, rajad 20-27).

## **LM\_R2 praimeri analüüs**

LM\_R2 järjestuse analüüs näitas praimeri võimet kogu järjestuse ulatuses seonduda erinevate *L. monocytogenes*'e isolaatidega. Samuti on analüüsi tulemuste kohaselt see praimer võimeline seonduma ka *L. ivanovii* tüve Lm47 *hlyA* geenijärjestusele (LISA 5c). Vastava seondumise asjakohasuse kohta kehtib praimeri LM\_F2 puhul toodud arutelu (vt ülal).

### **2.3.1.2 Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustus**

Praimerite PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustamiseks kasutati tarkvara Clone Manager 9.3, Professional Edition. PCR-praimerite jaoks kasutati programmi vaikeväärtusi. Analüüsiti praimerite GC-sisaldust (GC%), sulamistemperatuuri ( $T_m$ ; °C), dimeriseerumist (*dimers*), 5' vs. 3' otsa seondumist (*stability*, *GC Clamp*) ning ühe nukleotiidi korduste (*runs*), korduvmotiivide (*repeats*) ja juuksenõel-struktuuride (*hairpins*) esinemist (LISA 5d).

1. GC sisaldus (% GC) mõjutab praimerite sulamistemperatuuri ja hübridisatsiooni. GC sisalduse efekt praimeri sulamistemperatuurile seisneb selles, et G (guaniini) ja C (tsütosiini) vaheline side DNA kaksikahelas on tugevam (3 vesiniksidet), kui A (adeniini) ja T (tümiini) vaheline (2 vesiniksidet). See tagab praimerite stabiilsema seondumise matriitsahelaga. Soovituslik on kujundada praimerid nii, et 3' otsas oleksid GC nukleotiidid matriits-DNA-ga seondumise tugevdamiseks, nagu töös kujundatud praimeritelgi. Suuremal GC sisaldusega praimeril on ka kõrgem

- sulamistemperatuur. GC sisaldus peaks praimeris olema 40-60%. Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 GC sisaldus on 50% ning vastab nõudmistele (LISA 5d).
2. Praimeri sulamistemperatuur ( $T_m$ ) on oluline faktor hübridisatsiooni efektiivsuse määramisel. PCR-amplifikatsiooni jaoks võiks  $T_m$  jääda vahemikku 55 kuni 80 °C. Samas on praimerite stabiilsus olulisem, kui  $T_m$  absoluutne väärtus. PCR-reaktsiooni temperatuure on lihtsam optimeerida, kui praimerid omavad sarnast sulamistemperatuuri. Praimerite  $T_m$ -i arvutamine on sõltuv oligonukleotiidide ja soolade kontsentratsioonist. Praimerite LM\_F2/LM\_R2  $T_m$ -id on arvutatud kasutades lähima naabri termodünaamiliste parameetritele tuginevat meetodit (SantaLucia, 1998) järgnevate tingimustega: oligo kontsentratsioon 100 nM, 50 mM Na/K iooni kontsentratsioon ning vaba Mg 1,5 mM. Praimeri LM\_F2  $T_m$  on 62 °C ja LM\_R2  $T_m$  on 61 °C ning need vastavad nõudmistele (LISA 5d).
  3. Dimeerid (*dimers*) on homologid praimerite vahel, need võivad tekkida kahe sama praimeriga koopia või praimeripaari vahel. 3' dimeerid on eriti ebasoovitavad, kuna põhjustavad signaale, mida nimetatakse praimer-dimeerideks. Selle tulemuseks võib olla soovitava amplifikatsiooni produkti vähenemine. Ka praimerite muudes piirkondades tekkivad dimeerid vähendavad praimerite kättesaadavust ning seetõttu praimerite efektiivne kontsentratsioon PCR-reaktsiooniseisus langeb. Dimeeri negatiivne mõju on otseselt seotud selle pikkusega ja sulamistemperatuuriga. Praimerites LM\_F2 ja LM\_R2 esineb mõlemas 2 lühikest, mitteolulist dimeeri (LISA 5d).
  4. Stabiilsus 5' vs 3' (*stability*): kui praimeriga 3' ots omab kõrget termilist stabiilsust, siis see seondub matriits-ahelaga ning initsieerib sünteesi, isegi kui 5' ots ei paardu. Selle tulemuseks võib olla spetsiifilisuse vähenemine, praimer ei seondu kogu ulatuses. Stabiilsuse nõudeks on, et 5' ots on vähemalt 1.2 kcal stabiilsem [SantaLucia energeetilised parameetrid, (SantaLucia, 1998)], kui 3' ots või 2.0 kcal stabiilsem kui 3' ots [Breslaueri energeetilised parameetrid, (Breslauer jt., 1986)]. SantaLucia energeetiliste parameetrite järgi on praimeriga LM\_F2 stabiilsus on 2.9 kcal ja LM\_R2 stabiilsus on 2.7 kcal (LISA 5d).
  5. GC-klamber (*GC clamp*): G ja C nukleotiidide arv 3' otsa viie viimase aluspaari seas. Sellest sõltub 3' otsa seondumise efektiivsus, kuna G ja C nukleotiidide vaheline side on tugevam ning praimeriga seondumine matriitsahelaga seetõttu spetsiifilisem. Praimeriga 3' otsas võiks olla 1 või 2 G või C nukleotiidi, sest liigsed G ja C nukleotiidid 3' otsas võivad ebasoodsalt mõjutada 5' vs 3' stabiilsust. Praimeriga LM\_F2 on kaks G/C nukleotiidi 3' otsas ja LM\_R2 praimeriga on üks G nukleotiidi 3' otsas (LISA 5).

6. Ühe nukleotiidi kordused (*runs of bases*) praimerijärjestuses (nt. AGCGGGGATGGG), need võivad põhjustada valepaardumisi. Optimaalsetel PCR-tingimustel peaks aluspaari kordustega primereid vältima. Praimeritel LM\_F2 ja LM\_R2 on mõlemal 3 ühe nukleotiidi kordust (LISA 5d).
7. Korduvmotiivid (*repeats*) on mitmete di-nukleotiidide korduste leidumine praimerijärjestuses (nt. ATATATAT), neid peaks vältima kuna põhjustavad valepaardumisi. Maksimaalselt võib praimerijäejstuses olla 3 di-nukleotiidi. Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 järjestustel on mõlemal kaks di-nukleotiidi kordust (LISA 5d).
8. Juuksenõel-struktuurid (*hairpins*) on intramolekulaarsed interaktsioonid praimerites. Sekundaarsete struktuuride (juuksenõelade) moodustumine praimerite vahel võib põhjustada produktide mitte-amplifitseeritavust, kuna PCR-reaktsioonis väheneb "vaba" praimeris sisaldus. Praimerites LM\_F2 ja LM\_R2 55 °C juures juuksenõela struktuure ei moodustunud (LISA 5d).

Kokkuvõttes võib öelda, et analüüsi andmetel on praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 omadused PCR-analüüsiks sobivad.

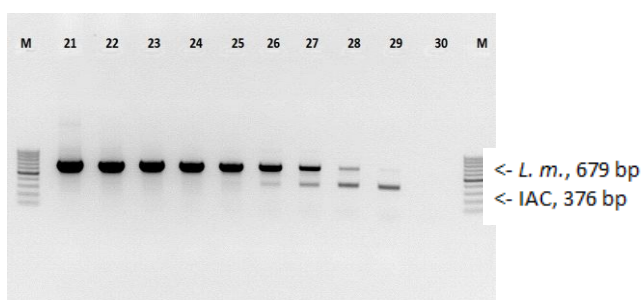
### **2.3.2 PCR-meetodi optimeerimine**

PCR-meetodi optimeerimisel lähtuti astmelisest PCR-programmist, mis oli kujundatud Icosagen AS töötajate poolt. Astmelise programmi eeliseks on praimerite spetsiifilisem seondumine ja seega on ebaspetsiifiliste produktide tekkimise võimalus väiksem (Wunderlichova jt., 2013; Hecker ja Roux, 1996). Praimerite seondumistemperatuurid valiti nii, et esimese astme temperatuur oleks praimerite  $T_m$ -st kõrgem, järgmise astme temperatuur oleks ligilähedane praimerite  $T_m$ -le ja kolmanda astme temperatuur oleks praimerite seondumiseks sobivaim temperatuur. Astmelises PCR-programmis esinevad kõrgete  $T_m$ -idega tsüklid tõstavad spetsiifilisust ning madalamate  $T_m$ -idega tsüklid tõhustavad PCR-analüüsi efektiivsust (Hecker ja Roux, 1996).

#### **2.3.2.1 Sisemise amplifikatsiooni kontrolli (IAC) ja kontrollplasmidi koopiaarvu määramine**

PCR-reaktsioon võib ebaõnnestuda, kuna sihtmärk DNA puudub (tõene negatiivne) või reaktsiooniseigus esineda võivate inhibeerivate komponentide tõttu (vale negatiivne tulemus). Selle vältimiseks kasutatakse PCR-reaktsiooniseigus sisemist amplifikatsiooni kontrollplasmidi (IAC- *Internal Amplification Control*). IAC kasutamine võimaldab kontrollida PCR-reaktsioonide reprodutseeritavust, PCR-aparatuuri töökorras olekut ning

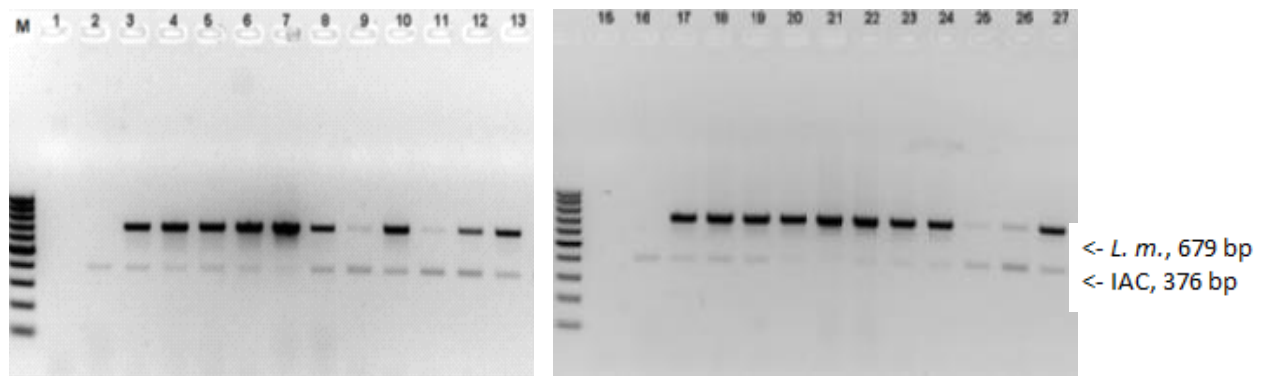
välja selgitada PCR-reaktsiooni mõjutavate inhibiitorite esinemist toidumaatriksist eraldatud analüüsitava DNA proovis. PCR-diagnostikas on väga oluline välistada vale-negatiivsete tulemuste tõeseks pidamine. Kuna IAC (pGEM-T-Easy-LM1/2 del #3) ja sihtmärk järjestus konkureerivad reaktsioonisegus praimerite pärast, siis ei tohiks IAC hulk olla reaktsioonisegus ülemäärane. PCR-meetodi usaldusväärsuse tagamiseks kasutatakse positiivset kontrolli. Antud uurimustöös kasutati nii plasmiidse DNA positiivset kontrolli (pGEM-T-Easy-LM1/2 #2), kui ka bakteriaalse DNA positiivset kontrolli (*L. monocytogenes*'e genoomne DNA), et näidata produktide amplifitseerimise edukust erinevates molekulides asuvatest sihtmärkjärjestustelt. Kontrollplasmidi ja sisemise kontrollplasmidi (IAC) optimaalse koopiaarvu määramiseks tehti kümnendlahjenduste read  $10^9$  kuni  $10^1$  koopiat reaktsiooni kohta (Joonis 2). Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati *L. monocytogenes*'e *hlyA* geeniproducti amplifitseerimisel PCR-reaktsioonisegus kasutada IAC kontsentratsioonil  $10^3$  molekuli/reaktsiooni kohta ja positiivset kontrollplasmidi kontsentratsioonil  $10^3$  molekuli/reaktsiooni kohta (Joonis 2, rada 27).



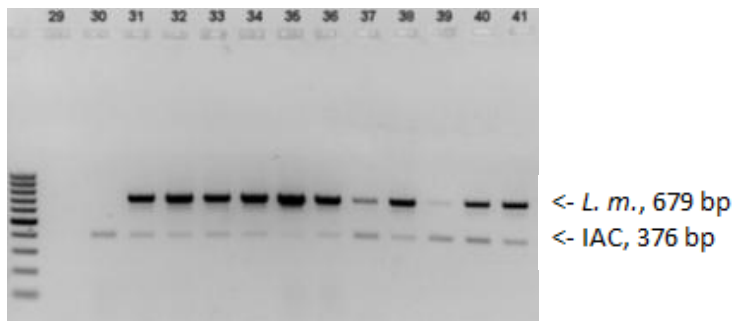
**Joonis 2. Kontrollplasmidi pGEM-T Easy LM1/2 #2 ja IAC plasmidi pGEM-T Easy LM1/2 del #3  $10^3$  molekuli kokkusobivuse määramine praimeritega LM\_F2/LM\_R2.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 21:  $10^9$  koopiat reaktsiooni kohta (krk); nr 22:  $10^8$  krk; nr 23:  $10^7$  krk; nr 24:  $10^6$  krk; nr 25:  $10^5$  krk; nr 26:  $10^4$  krk; nr 27:  $10^3$  krk; nr 28:  $10^2$  krk; nr 29:  $10^1$  krk; nr 30: MQ].

### 2.3.2.2 Praimerite seondumisaja optimeerimine

PCR-programmi optimeerimiseks katsetati praimerite seondumisaegadena 15, 20 ja 30 sekundit. Seondumistemperatuure ei muudetud. Programmis, milles seondumisaeg oli 15 sekundit, olid produktid nõrgad ja mõned amplifitseerimata (Joonis 3). 30 sekundit (Joonis 4) praimerite seondumiseks ei ole vajalik, kuna produktid on samaväärselt diskreetsed ja hästiloetavad ka siis, kui seondumisaeg on 20 sekundit (Joonis 3). Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati *L. monocytogenes*'e *hlyA* geeniproducti amplifitseerimiseks kasutada astmelist PCR-programmi, kus praimerite seondumisajaks on 20 sekundit (Joonis 3) ja praimerite seondumistemperatuurideks on vastavalt 70 °C, 60 °C ja 56 °C.



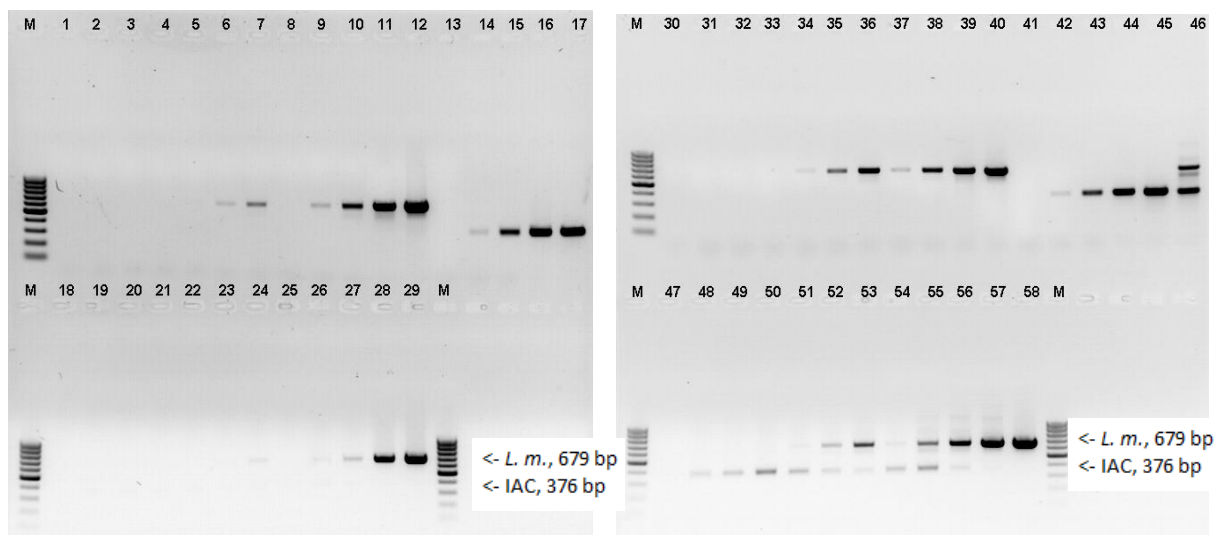
**Joonis 3. PCR-analüüs tulemused, kui kasutati programmi, milles praimerite seondumisaeg on 15 sekundit ja 20 sekundit.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2: *L. innocua*; nr 3 – 10: *L. monocytogenes* erinevatest toidumaatriksi proovidest isoleeritud; nr 11: pGEM-T Easy LM1/2  $10^2$  koopiat reaktsiooni kohta (krk); nr 12: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  krk; nr 13: PK *L. monocytogenes*; lahjendus  $10^{-3}$ ; nr 15: MQ; nr 16: *L. innocua*; nr 17 – 24: *L. monocytogenes* erinevatest toidumaatriksi proovidest isoleeritud; nr 25: pGEM-T Easy LM1/2  $10^2$  krk; nr 26: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  krk; nr 27: PK *L. monocytogenes*; lahjendus  $10^{-3}$ ].



**Joonis 4. PCR-analüüsi tulemused, kui kasutati programmi, milles praimerite seondumisaeg on 30 sekundit.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 29: MQ; nr 30: *L. innocua*; nr 31 – 38: *L. monocytogenes* erinevatest toidumaatriksi proovidest isoleeritud; nr 39: pGEM-T Easy LM1/2  $10^2$  krk; nr 40: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  krk; nr 41: PK *L. monocytogenes*; lahjendus  $10^{-3}$ ].

### 2.3.2.3 Praimerite kontsentratsiooni optimeerimine

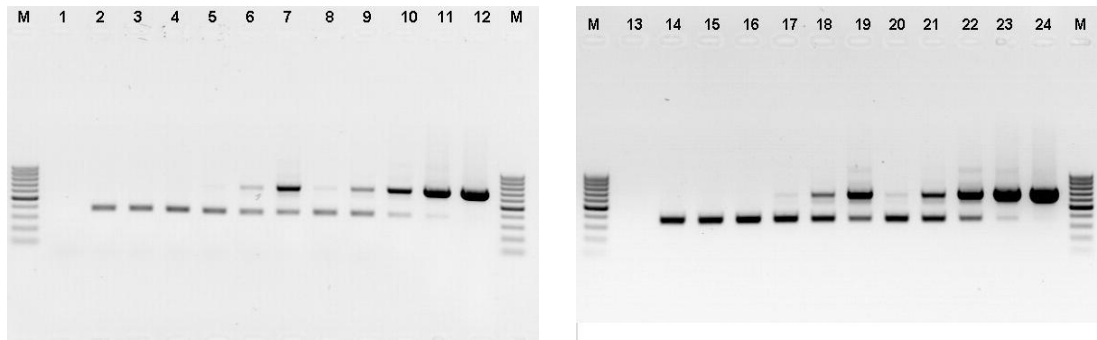
Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 optimaalse kontsentratsiooni leidmiseks viidi läbi reaktsioon, milles praimerite lõpp-kontsentratsioonideks oli kas 0,2 või 0,4  $\mu\text{M}$ . Praimerite kontsentratsioonil 0,2  $\mu\text{M}$  olid PCR-produktid nõrgad (Joonis 5). Kontsentratsioonil 0,4  $\mu\text{M}$  olid produktid diskreetsed ja amplifitseeritud produktid madalama kontsentratsiooniga DNAdest (Joonis 5), mida 0,2  $\mu\text{M}$  praimerite kontsentratsiooniga reaktsioonides ei amplifitseeritud. Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati *L. monocytogenes*'e *hlyA* geeniproducti amplifitseerimiseks kasutada 0,4  $\mu\text{M}$  kontsentratsiooniga praimereid LM\_F2/LM\_R2.



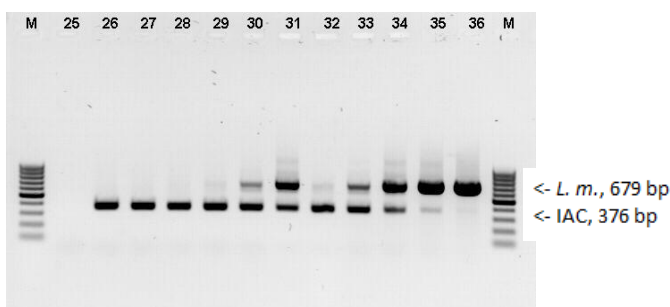
**Joonis 5. PCR-analüüs, kui praimerite LM\_F2/LM\_R2 kontsentratsioon lahuses 0,2  $\mu$ M või 0,4  $\mu$ M.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2: *L. welshimerii*; nr 3: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 4: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 5: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 6: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 7: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; nr 8 – 12: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  koopiat reaktsiooni kohta (krk); nr 13 – 17: pGEM-T Easy LM1/2 del #3  $10^1$ - $10^5$  krk; nr 18: MQ; nr 19: *L. welshimerii*; nr 20: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 21: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 22: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 23: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 24: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; ; nr 25 – 29: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  krk; nr 30: MQ; nr 31: *L. welshimerii*; nr 32: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 33: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 34: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 35: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 36: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; nr 37 – 41: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  molekuli reaktsiooni kohta; nr 42 – 46: pGEM-T Easy LM1/2 del #3  $10^1$ - $10^5$  krk; nr 47: MQ; nr 48: *L. welshimerii*; nr 49: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 50: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 51: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 52: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 53: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; ; nr 54 – 58: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  krk. NB! Proovidele nr 18-29 ja 47-58 on lisatud IAC,  $10^3$  krk].

#### 2.3.2.4 MgCl<sub>2</sub> kontsentratsiooni optimeerimine

PCR-reaktsioonisegus kasutatava MgCl<sub>2</sub> suhtelise sisalduse optimeerimiseks katsetati lõppkontsentratsioone: 1,5 mM, 2,0 mM ja 2,5 mM. Reaktsioonis kasutatud 2,0 mM (Joonis 6) ja 2,5 mM (Joonis 7) MgCl<sub>2</sub> kontsentratsioonidel saadi hajusamad PCR-produktid ja esines ebaspetsiifilisi produkte. Katseliselt on näidatud, et liigne magneesiumi kontsentratsioon võib viia mittespetsiifilise reaktsiooni tekkele (Bickley jt., 1996). 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> kontsentratsiooni (Joonis 6) kasutamisel saadi diskreetsed ja hästi tuvastatavad PCR-produktid, ühtlasi võimaldab madalama MgCl<sub>2</sub> kontsentratsiooni kasutamine spetsiifilisema reaktsiooni. Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati *L. monocytogenes*'e *hlyA* geeniproducti amplifitseerimiseks kasutada PCR-reaktsioonisegus 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>.



**Joonis 6. PCR-analüüsi tulemused, kui  $MgCl_2$  kontsentratsioon oli 1,5 mM või 2,0 mM.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2: *L. welshimerii*; nr 3: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 4: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 5: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 6: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 7: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; nr 8 – 12: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  koopiat reaktsiooni kohta (krk); nr 13: MQ; nr 14: *L. welshimerii*; nr 15: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 16: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 17: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 18: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 19: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; nr 20 – 24: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  krk, kõigile proovidele on lisatud IAC,  $10^3$  krk].

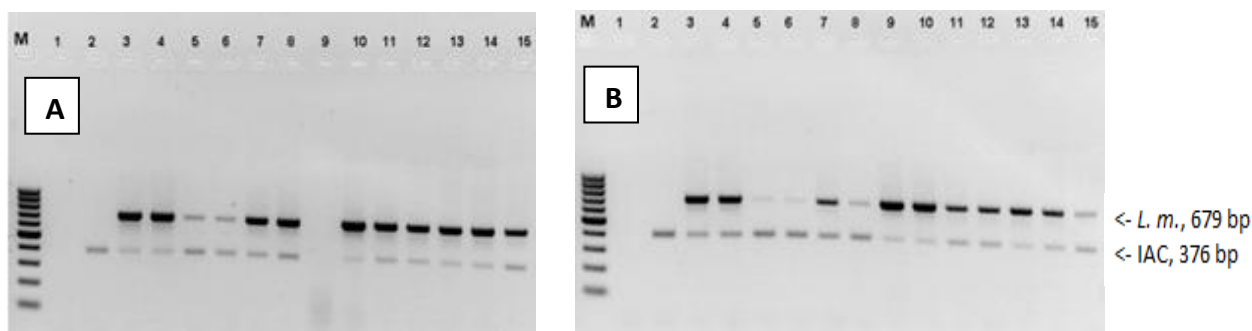


**Joonis 7. PCR-analüüsi tulemused, kui  $MgCl_2$  kontsentratsioon oli 2,5 mM.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; lisa 4); nr 25: MQ; nr 26: *L. welshimerii*; nr 27: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 28: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 29: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 30: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 31: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50; nr 32 – 36: pGEM-T Easy LM1/2 #2  $10^1$ - $10^5$  krk].

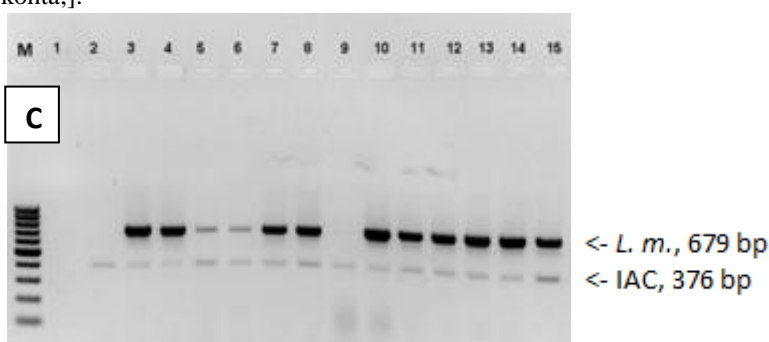
### 2.3.2.5 Bakteriaalse DNA mahu optimeerimine

Toidu- ja hügieeniproovide selektiivrikastusest eraldati totaalne bakteriaalne DNA kasutades kommertsiaalset bakteriaalse DNA eraldamise komplekti (LISA 2). Selliste komplektide kasutamisel võib proovist või eraldamiseks kasutatavatest reaktiividest tulla kaasa ka teisi mittesoovitavaid komponente, näiteks kandja-molekule („carriers“ DNA/RNA) või toidumaatriksites leiduvad aineid nagu soolad/maitseained, valgud ja rasvad (Rossen jt., 1992), mis võivad PCR-reaktsiooni inhibeerida. Samuti võib reaktsiooni inhibeerida genoomse DNA suur kogus. Seetõttu testiti eraldatud bakteriaalse DNA koguseid 1, 5 ja 10  $\mu$ l ühe PCR-reaktsiooni kohta.

PCR-produktid olid nõrgad või tuvastamatud, kui reaktsioonisegus oli DNA ruumalaks 1  $\mu$ l (Joonis 8) või 10  $\mu$ l (Joonis 9). Diskreetne PCR-saadus saadi 5  $\mu$ l DNAGA reaktsioonisegus (Joonis 8). Tulemused näitavad, et 1  $\mu$ l sisaldab optimaalseks amplifitseerimiseks liiga vähe matriits-DNA-d (Joonis 8). 10  $\mu$ l DNA-d põhjustab PCR-reaktsiooni inhibeerimist (Joonis 9), kuigi matriits-DNA kogus suureneb. Optimeerimise tulemustest lähtuvalt kasutatakse *L. monocytogenes hlyA* geenifragmendi amplifitseerimiseks PCR-reaktsioonisegus 5  $\mu$ l DNA-proovi lahust (Joonis 8).



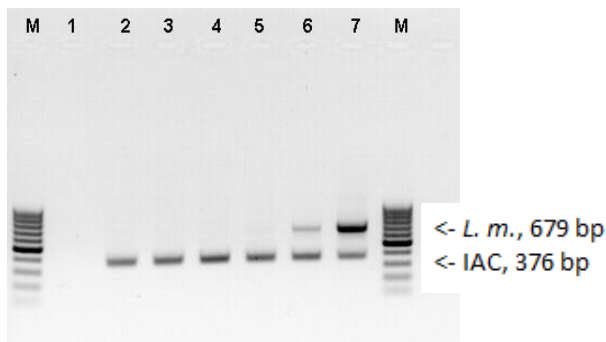
**Joonis 8. PCR-analüüsi tulemused, kui amplifitseeritava DNA kogus ühe reaktsiooni kohta oli 1 µl (A) või 5 µl (B).** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); Paneel A: nr 1: MQ; nr 2: *L. innocua*; nr 3 – 14: *L. monocytogenes* isoleeritud erinevatest toidumatriksi proovidest isoleeritud; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> koopiat reaktsiooni kohta; Paneel B: nr 1: MQ; nr 2: *L. innocua*; nr 3 – 14: *L. monocytogenes* isoleeritud erinevatest toidumatriksi proovidest isoleeritud (rajas nr . 9 on ilmselt toimunud inhibitsioon mõne toidumatriksis leiduva ühendi poolt); nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> koopiat reaktsiooni kohta;].



**Joonis 9. PCR-analüüsi tulemused, kui amplifitseeritava DNA kogus ühe reaktsiooni kohta oli 10 µl (C).** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2: *L. innocua*; nr 3 – 14: *L. monocytogenes* isoleeritud erinevatest toidumatriksi proovidest isoleeritud; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> koopiat reaktsiooni kohta].

### 2.3.2.6 Positiivse kontrolli (*L. monocytogenes*'e 4b genoomne DNA) mahu optimeerimine

Positiivse kontrolli kasutamine tõstab PCR-analüüsis saadud negatiivsete tulemuste usaldusväärsust, kuna aitab tuvastada reaktsiooni ebaõnnestumist. Positiivse kontrolli saaduse amplifitseerimine välistab PCR-reaktsiooni inhibeerimise tulenevalt PCR-reaktsioonisegu kokkusegamise ebaõnnestumisest või PCR-seadme (termotsükleri) mittetöötamisest. Töös kasutatava PCR-meetodi bakteriaalse positiivse kontrolli (PK) ehk *L. monocytogenes*'e 4b genoomse DNA hulga optimeerimiseks kasutati DNA lahjendusi 1:50, 1:500, 1:5000, 1:50000, 1:500000. PCR-produkt tuvastati lahjendustega 1:50 ja 1:500 (Joonis 10, rajad 6 ja 7), kuid PCR-analüüsi edukuse tagamiseks oleks otstarbekam kasutada lahjendust 1:50. Optimeerimise tulemustest lähtuvalt otsustati edaspidistes PCR-analüüsidest positiivse kontrollina kasutada *L. monocytogenes*'e 4b genoomse DNA 50-kordset lahjendust.



**Joonis 10. Positiivse kontrolli *L. monocytogenes* 4b genoomne DNA koguse optimeerimine praimeritega LM\_F2/LM\_R2.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2: *L. welshimerii*; nr 3: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500000; nr 4: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50000; nr 5: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:5000; nr 6: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:500; nr 7: *L. monocytogenes*, lahjendus 1:50].

### 2.3.2.7 Optimeeritud PCR-reaktsioon *L. monocytogenes*'e geeni *hlyA* saaduse amplifitseerimiseks

PCR-reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl, sisaldas valmissegu 5x Solis HOT FIREPol® Blend PCR Master Mix +7,5 mM MgCl<sub>2</sub> Ready to Load (-) (Solis Biodyne, Eesti), 1,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl<sub>2</sub>, 10 µM praimerid LM\_F2 ja LM\_R2 lõppkontsentratsiooniga 0,4 µM (Tabel 8). Reaktsioonisegusse lisati ka IAC plasmiid kontsentratsiooniga 10<sup>3</sup> koopiat reaktsiooni kohta, välja arvatud negatiivsetesse kontrollproovidesse.

Katseproovi DNA-d, lisati reaktsioonisegusse 5 µl. PCR-reaktsioonid viidi läbi, kasutades seadet *Eppendorf Mastercycler* (Eppendorf, Saksamaa) või *Biometra Tpersonal* (Biometra, Saksamaa).

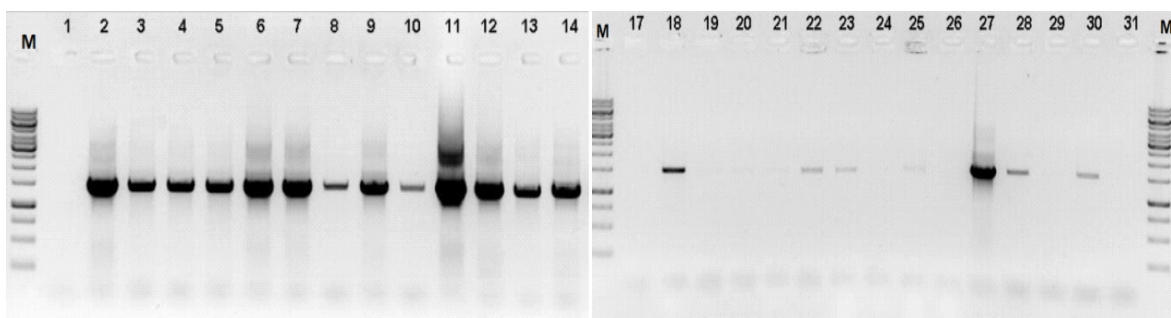
Koostatud PCR-programm „LISTASTM“:

1. PCR masina kaane kuumutus – kuni 99 °C
2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon temperatuuril 95 °C 15 minutit.  
Järgnevat 3 etappi korratakse 5 tsüklit:
3. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 30 sekundit, 95°C.
4. Praimerite seondumine DNA-ga 20 sekundit, 70 °C.
5. Uue DNA ahela süntees 35 sekundit, 72 °C.  
Järgnevat 3 etappi korratakse 5 tsüklit:
6. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 30 sekundit, 95°C.
7. Praimerite seondumine DNA-ga 20 sekundit, 60 °C.
8. Uue DNA ahela süntees 35 sekundit, 72 °C.  
Järgnevat 3 etappi korratakse 24 tsüklit:
9. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 30 sekundit, 95°C.
10. Praimerite seondumine DNA-ga 20 sekundit, 56 °C.
11. Uue DNA ahela süntees 35 sekundit, 72 °C.
12. DNA sünteesi katkete lõpetamiseks lisaetapp 5 minutit, 72 °C.
13. PCR-saaduste sünteesijärgne hoidmine 10 °C.

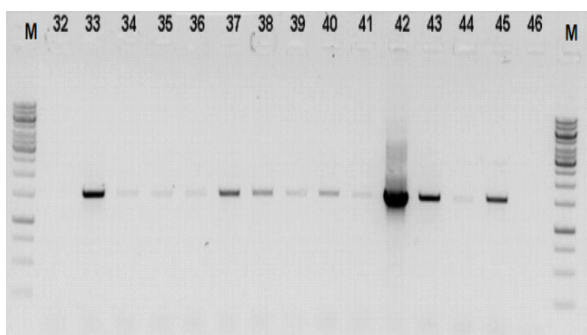
Programmis on kokku 35 tsüklit ning see kestab ligikaudu 1,5 tundi.

### 2.3.3 Eubakteritele universaalse 16S rRNA geeni tuvastamise meetodika optimeerimine

Bakteriaalse DNA eraldamise ja eraldatud DNA-lt PCR-reaktsiooniga amplifitseermiseks sobilikkuse kontrolliks teostatakse PCR-analüüs 16S rRNA geenile spetsiifiliste praimeritega. 16S rRNA esineb kõikides prokarüootsete organismide ribosoomides ning on kasutatav indikaatorina bakteriaalse DNA eraldamise kontrolliks. Kasutatavad praimerid amplifitseerivad fragmendi sisuliselt kõigi eubakterite 16S rRNA geenist. Senini kasutusel olnud 16S rRNA programm oli pikk, seega optimeerimise parameetriteks valiti programmi tsüklite arv ja DNA sünteesiks ettenähtud aeg. Analüüsid viidi läbi kolme erineva programmiga, mis nimetati: “Vana programm”, “Nr.1 uus programm”, “Nr. 2 uus programm” (LISA 4). “Vanas programmis” oli tsükleid 35 ning DNA sünteesiaeg 3 minutit (LISA 4). “Nr. 1 uues programmis” valiti DNA süntessi ajaks 1 minut ning pikkuseks 26 tsüklit (LISA 4) ja “Nr. 2 uues programmis” DNA sünteesi aeg 1 minut ning tsükleid 28 (LISA 4). “Vana programmiga” saadud produktid olid üleamplifitseeritud (Joonis 11). “Nr. 1 uus programm” polnud samuti sobiv, kuna saadused olid nõrgad ja mõned amplifitseerimata (Joonis 11). “Nr. 2 uus programm” valiti edaspidiseks tööks, kuna saadused olid selged ning kõik proovid olid amplifitseeritud (Joonis 12). Uus programm lühendas oluliselt 16S rRNA PCR-analüüsiks kuluvat aega.



**Joonis 11. 16S rRNA PCR-analüüs “vana programmiga” või “nr 1 uue programmiga”.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 13 bakteriaalne DNA; nr 14: PK *L. monocytogenes*; nr 17: MQ; nr 18 – 29 bakteriaalne DNA; nr 30: PK *L. monocytogenes*; nr 31: MQ].



**Joonis 12. 16S rRNA PCR-analüüs “nr 2 uue programmiga”.** [M –suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 32: MQ; nr 33 – 44 bakteriaalne DNA; nr 45: PK *L. monocytogenes*; nr 46: MQ].

### 2.2.3.1 Optimeeritud PCR-metoodika 16S rRNA amplifitseerimiseks

PCR-reaktsioonisegu lõppmahuga 25 µl, sisaldas valmisseguga 5x Solis HOT FIREPol® Blend PCR Master Mix +7,5 mM MgCl<sub>2</sub> Ready to Load (-) (Solis Biodyne, Eesti), 2,5 mM lõppkontsentratsiooniga MgCl<sub>2</sub>, 10 µM praimerid PCRI ja PCRII lõppkontsentratsiooniga 0,4 µM (Tabel 8). Koosluse DNA-d, mis oli eraldatud komplektiga *RTP Bacteria® DNA Mini Kit*, lisati reaktsioonisegusse 1 µl. PCR-reaktsioon teostati seadmega *Eppendorf Mastercycler* või *Biometra TPersonal* kasutades järgnevat programmi „16S rRNA“:

1. PCR-masina kaane kuumutus – kuni 99 °C
2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon temperatuuril 95 °C 15 minutit.

Järgnevat 3 etappi korratakse 28 tsüklit:

3. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 1 minut, 95°C.
4. Praimerite seondumine DNA-ga 1 minut, 53 °C.
5. Uue DNA ahela süntees 1 minut, 72 °C.
6. DNA sünteesijärgne lisaetapp 10 minutit, 72 °C.
7. PCR-saadusi sünteesijärgne hoidmine 10 °C.

PCR-programmi pikkus on 2 tundi ja 10 minutit.

### 2.3.4 Referentmeetodi katsetulemused

Standardis EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia – horisontaalmeetod *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks ja loendamiseks“ määratletud eeskirjade kohaselt teostati kõikidele toidu- ja hügieeniproovide rikastustele mikrobioloogilised analüüsid *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks. Kokku analüüsiti referentmeetodiga 309 toidu- ja hügieeniproovi. Eel- ja selektiivrikastuse proovidest tehtud väljakülvide tulemused ALOA ja Oxford söötmetassidele dokumenteeriti. Eelrikastuspuljongist tehtud väljakülvidele oli iseloomulik rohke taustmikrofloora kasv - erinevad *Bacillus* perekonna esindajad ja teised *Listeria* perekonna bakterid. Selektiivrikastuspuljongist tehtud väljakülvidel enamasti taustmikrofloorasse kuuluvate bakterite kolooniaid ei esinenud. Referentmeetodi puhul loeti positiivseks kõik selektiivsöötmele ALOA ja Oxford kasvanud *L. monocytogenes*'e morfoloogiaga kolooniad, mis andsid positiivse tulemuse ka kinnitavatel testidel. Referentmeetodiga valmistatud selektiivrikastust kasutati, et eraldada genoomne DNA, mida rakendati matriitsina valideeritavas PCR-meetodis.

### 2.3.5 PCR-meetodi katsetulemused

Kuna uurimustöö peamiseks eesmärgiks oli PCR-meetodi valideerimine, siis *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks sobilikult PCR-meetodi arendamisel järgiti standardit EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004, mille kohaselt tuleb alternatiivmeetodi (antud töös PCR-

meetodi) valideerimiseks teostada referent- ja PCR-meetodi võrdlev analüüs, kasutades paralleelkatsetes samasuguseid katsetingimusi:

- samasugust toidu- või hügieeniproovi maatriksit
- samasugust keskkonda s.t rikastamine viiakse läbi samasuguses rikastuspuljongis
- nakatamiseks kasutatakse samasuguseid *L. monocytogenes*'e arvukusi katseproovi kohta ja ühes katseseerias samasugust *L. monocytogenes*'e tüve.

Uurimustöös kasutati 3 toidurühma: liha-, kala- ja piimatoodete ning keskkonnaproovide kategooriat. Kategooriate valikul lähtuti standardis EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ lisa B esitatud nõuetest. Olulised standardis kehtestatud nõuded on:

- minimaalne proovide arv ühe kategooria piires on 60 katseanalüüsi, millest 50% võivad olla negatiivsete tulemustega.
- iga kategooria piires valida võimalusel naturaalselt nakatunud maatriksid. Nende puudumisel valida vähemalt kolm nakatamisannuse astet.

PCR-meetodiga analüüsiti 309 katseproovi, millest 185 olid *L. monocytogenes*'e esinemise suhtes positiivsed ning 124 analüüti negatiivsed. PCR-analüüsid viidi läbi praimeritega LM\_F2 ja LM\_R2, mis amplifitseerivad spetsiifilise produkti *L. monocytogenes*'e geenist *hlyA* ning mille saaduse pikkuseks on 679 bp. PCR-analüüsil kasutati positiivsete kontrollidena *L. monocytogenes*'e 4b (ATCC 13932) genoomset DNA-d ja pGEM-T Easy LM1/2 #2 plasmiidset DNA-d. Sisemise amplifikatsioonikontrollina (IAC) kasutati plasmidi pGEM-T Easy LM1/2 del #3, mille PCR-produkti suurus on 376 bp.

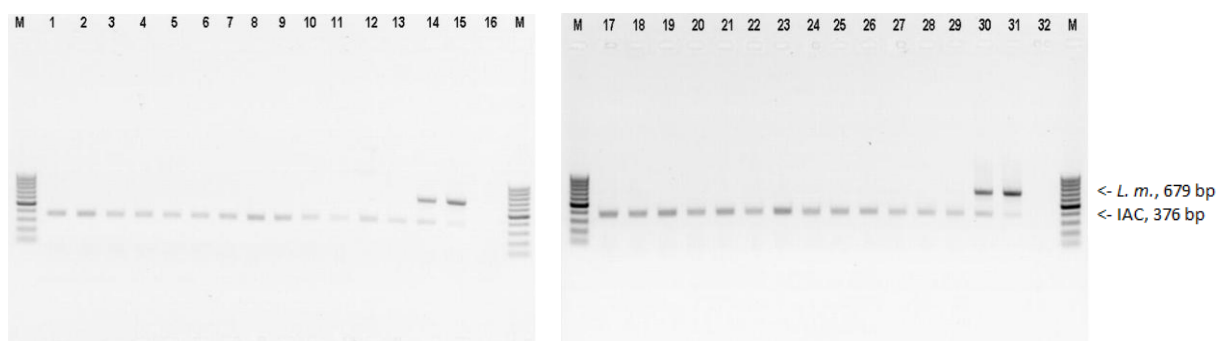
### **2.3.6 *Listeria monocytogenes*'e tuvastamine PCR-meetodil**

#### **2.3.6.1 *Listeria monocytogenes*'e tuvastamine hügieeniproovides**

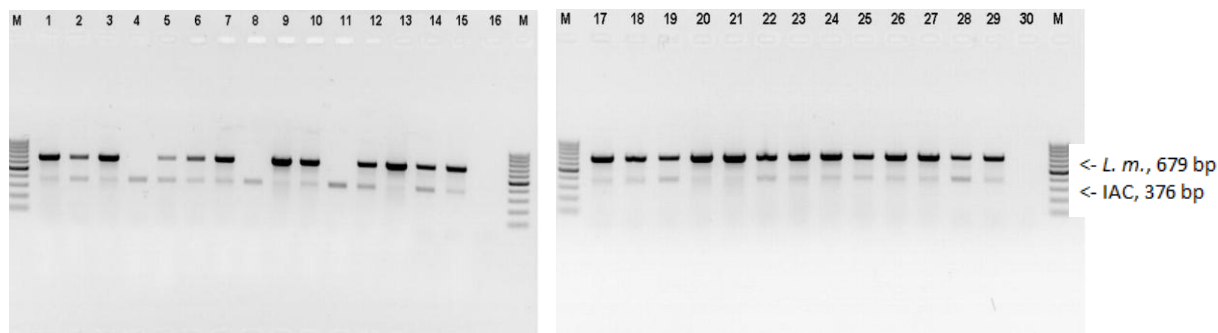
Hügieeniproovide kategoorias nakatati 24 ja nakatamata jäeti 26 abrassiivset proovivõtu käsna. *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks kasutati kolme erinevat nakatamisannust (Tabelid 4 ja 10). Naturaalsete maatriksitena analüüsiti 18 uhteproovi, millest üheksas oli *L. monocytogenes* mikrobioloogilisel meetodil varem tuvastatud (NUP). Kokku analüüsiti hügieeniproovide kategoorias 68 proovi, millest negatiivseid proove oli 38 ja positiivseid 30. Uhteproovidest PCR-meetodiga *L. monocytogenes*'e tuvastamise tulemustest on näited toodud joonistel 13 ja 14.

Joonisel 13 ja LISA 6a on näidatud nakatamata uhteproovide PCR-analüüs, tulemused on tõesed negatiivsed, kuna IAC ja positiivsete kontrollide DNA on amplifitseeritud ning

produktid tuvastatavad. *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseteks jäänud proovide puhul tuli välistada DNA eraldamise ebaõnnestumine, neid proove analüüsiti, kasutades 16S rRNA geenile spetsiifilisi praimereid. Kõigil oli saadus olemas, seega on negatiivsed tulemused tõesed negatiivsed (Joonis 22; LISA 7a). Tuvastamispiiri lähedase arvukusega (2 cfu/10 g) nakatatud proovide PCR-analüüsil registreeriti kaks negatiivset tulemust (Joonis 14, rajad 4 ja 8), mis olid negatiivsed ka mikrobioloogilistel analüüsidel, samas IAC produkt oli amplifitseeritud. Seega oli tegemist tõesete negatiivsete tulemustega. Madala arvukusega inokulumiga (20 cfu/10 g) nakatatud proovide hulgas leidis üks tõene negatiivne tulemus (Joonis 14, rada 11), lisaks IAC saaduse esinemisele kinnitasid seda tulemust ka mikrobioloogilised testid. Kõrge arvukusega inokulumiga (201 cfu/10 g) nakatatud proovid olid nii PCR- kui referentmeetodil *L. monocytogenes*'e suhtes positiivsed (Joonis 14). Naturaalsete positiivsete uhteproovide PCR-produktide analüüsimisel oli näha, et *L. monocytogenes*'e DNA-d esines nendes proovides arvukalt, kuna produktide bändid agarosgeeli pildil on intensiivsemad (LISA 6b), kui kõrge arvukusega inokulumiga nakatatud proovide PCR-pildil. Kolooniite arvulist määramist nendele proovidele ei teostatud, kuid eeldatavalt esines enne rikastamisetappe nendes uhteproovides rohkem kui 200 cfu/10 grammi abrasiivse käsna kohta. IAC saaduse bändi puudumine tugevalt positiivsete proovide puhul on aktsepteeritav, kuna praimerite seondumine proovist pärineva DNA-ga ja IAC-ga on konkurentne ning uuritavast proovist pärineva sihtmärk-DNA suurte koguste puhul muutub praimer limiteerivaks ja IAC produkti amplifitseerimine väheneb. Referent- ja PCR-meetodi katsetulemused uhteproovide kategoorias olid kokkulangevad.



**Joonis 13. Nakatamata uhteproovide (UH) PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 13: UH-L-II-NK; nr 14: PK *L. monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli reaktsiooni kohta; nr 16: MQ; nr 17 – 29: UH-L-II-NK; nr 30: PK *L. monocytogenes*; nr 31: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli reaktsiooni kohta; nr 32: MQ].



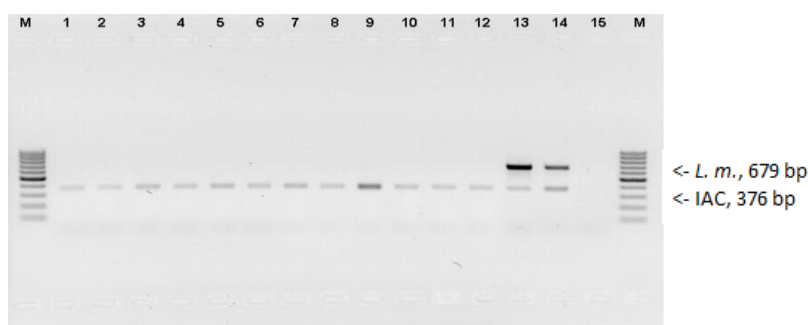
**Joonis 14. *L. monocytogenes* inokulumidega 1-4 cfu/25g; 10-20 cfu/25g; 100-400 cfu/25g nakatatud uhteproovide (UH) PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 8: UH-L-II-MP1; nr 9 – 13: UH-L-II-MA10; nr 14: PK *monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 16: MQ; nr 17 – 19: UH-L-II-MA10; nr 20 – 27: UH-L-II-KA100; nr 28: PK *L. monocytogenes*; nr 29: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 30: MQ].

### 2.3.6.2 *L. monocytogenes*'e tuvastamine lihatoodetest

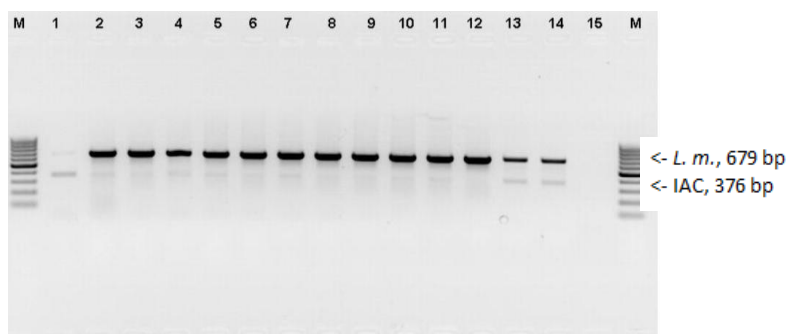
Lihatoodete kategooria maatriksite valikul püüti eelistada *L. monocytogenes* bakteriga naturaalselt nakatunud tooteid. Kunstlikuks nakatamiseks kasutati lihatoodete kategoorias kahte maatriksit: keeduvorst (VO) ja õllepunne juustuga (SAR). Keeduvorsti nakatati nelja nakatusannusega, õllepunne kahe nakatusannusega (Tabelid 5 ja 10). Naturaalsete maatriksitena analüüsiti kanaliha (NKA), grillvorste (NGVO) ja singikreemi (NSK), milles varasemalt oli referentmeetodiga tuvastatud *L. monocytogenes*'e esinemine. Kokku analüüsiti lihatoodete kategoorias 66 proovi, millest referentmeetodi põhjal 12 olid negatiivsed ja 54 positiivsed. Joonisel 15 on näidatud nakatamata proovide PCR-tulemused, mis on tõesed negatiivsed, kuna IAC ja positiivsete kontrollide saadused on amplifitseeritud. *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseteks jäänud proovide puhul tuli välistada DNA eraldamise ebaõnnestumine, neid proove analüüsiti, kasutades 16S rRNA geenile spetsiifilisi praimereid. Kõigil oli saadus olemas, seega on negatiivsed tulemused tõesed negatiivsed (Joonis 23; LISA 7b). Tuvastamiskiiri lähedase arvukusega (1 cfu/25 g) inokulumiga nakatatud keeduvorsti proovide hulgas esines üks nõrgalt positiivne PCR-tulemus (Joonis 16, rada 1), mille puhul esinesid mikrobioloogistel väljakülvidel arvukalt taustamikrofloorasse kuuluvate bakterite kolooniaid. Selle tulemuse tõttu eeldatakse, et tegemist on tõese positiivse tulemusega ning PCR-reaktsioonis võis esineda inhibitsioon või oli *L. monocytogenes*'e bakteriaalset DNA-d väga vähe. Kõrge arvukusega inokulumiga (370 cfu/25 g) nakatatud proovide PCR-produktid (Joonis 17) olid nõrgemad, kui madala arvukusega inokulumiga (20 cfu/25 g) nakatatud proovide PCR-saadused (Joonis 17). Selline tulemus võib viidata sellele, et keeduvorstis esinevad konkureerivad mikroorganismid võisid pärssida *L. monocytogenes* bakterite kasvu või tõusis bakterite arvukus selektiivrikastuse etapiks nii kõrgeks, et surnud rakkude ainevahetusproduktide kogunemine takistas edasist paljunemist ja kasvamist ehk

katseproovides saavutati mikroorganismide ülempiir. Õllepunnide proovide PCR-tulemused ei erinenud (LISA 6c). Seega võib arvata, et *L. monocytogenes*'e rakkude arvukus saavutas kõikides katseproovides enam-vähem samasuure taseme. Samuti nagu hügieeniproovide puhul, nii oli ka lihatoodete kategoorias naturaalselt nakatunud proovide PCR-produktid intensiivsemad ja vähem-diskreetsed (LISA-d 6d ja 6e) kui kunstlikult nakatatud proovide produktid. Naturaalsetes toodetes esinevate *L. monocytogenes*'e rakkude arvukus pole teada, kuid kunstliku nakatamise tulemuste põhjal võib eeldada, et arvukus võis algses tootes olla >370 cfu/25 grammi kohta. Seega referent- ja alternatiivmeetodiga saadud tulemused olid kokkulangevad.

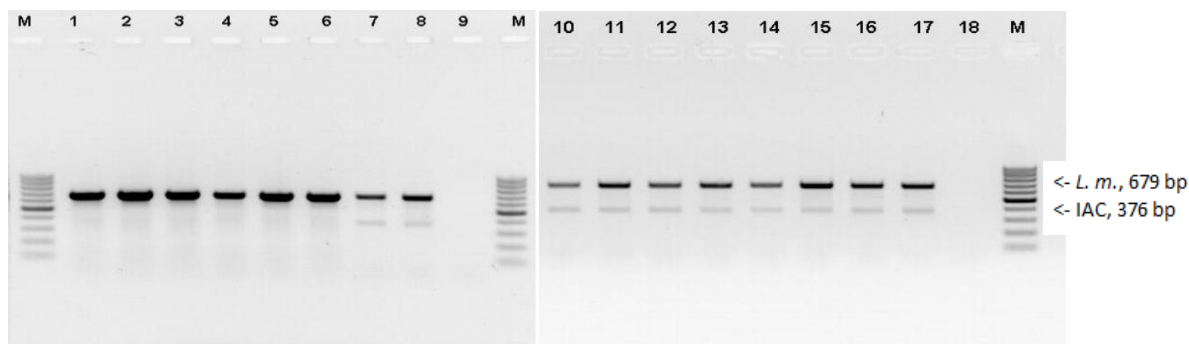
Lihatoodete kategoorias saadud PCR-meetodi tulemustest on näited toodud joonistel 15-17.



**Joonis 15. Nakatamata õllepunnid juustuga (SAR) ja keeduvorsti (VO) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: SAR-L-II-NK; nr 7-12: VO-L-II-NK; nr 13: PK *L. monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].



**Joonis 16. *L. monocytogenes* inokulumidega 1- 4 cfu/25g ja 4 - 10 cfu/25g nakatatud keeduvorsti (VO) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: VO-L-II-MP1; nr 7-12: VO-L-II-MP4; nr 13: PK *L. monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].

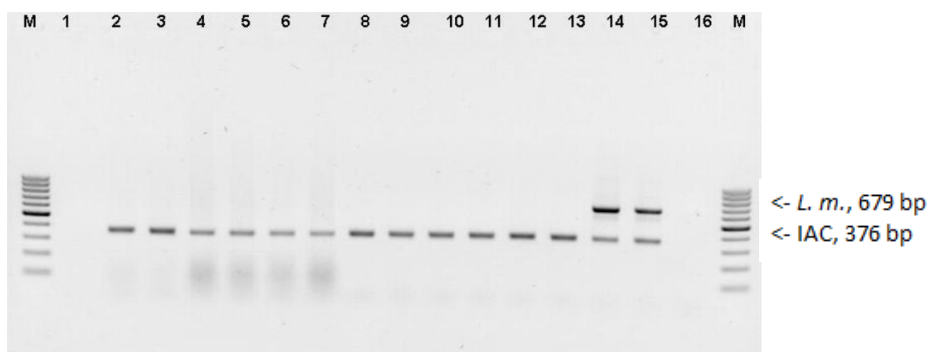


**Joonis 17. *L. monocytogenes* inokulumidega 10 - 20 cfu/25g ja 100 - 400 cfu/25g nakatatud keeduvorsti (VO) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; lisa 4); nr 1 – 6: VO-L-II-MA10; nr 7: PK *L. monocytogenes*; nr 8: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 9: MQ; nr 10 – 15: VO-L-II-KA100; nr 16: PK *L. monocytogenes*; nr 17: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 18: MQ].

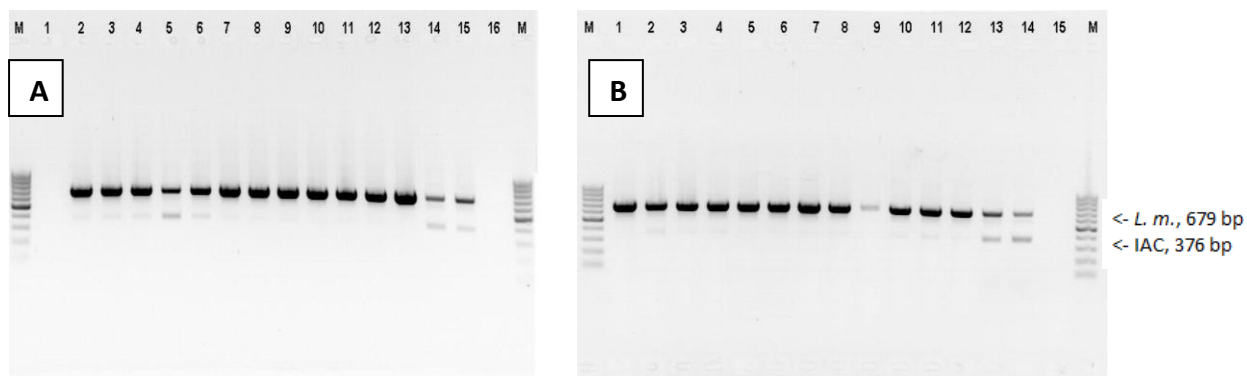
### 2.3.6.3 *L. monocytogenes*'e tuvastamine piimatoodetest

Piimatoodete kategoorias valiti maatriksiteks nii pastöriseeritud piimast tehtud tooted, kui ka toorpiim, mis on tuntud mitmete PCR-meetodit inhibeerivate komponentide sisalduse poolest. Kunstlikult nakatati kolm maatriksit: maitsestatamata jogurtit (MJ), hapupiima (HP) ja toorpiima (TRP). Hapupiima nakatati nelja erineva nakatamisannusega, toorpiima ja maitsestatamata jogurtit kahe erineva nakatamisannusega (Tabelid 6 ja 10). Naturaalsete maatriksitena analüüsiti kakaopudingut (NKP) ja piimatooteid (NPT), mis hõlmas 2,5% pastöörpiima, vahukoort, ahjuõunajogurti ja kohupiimakreemi. Kakaopudingust (NKP) oli referentmeetodiga tuvastatud *L. monocytogenes*. Kokku analüüsiti piimatoodete kategoorias 91 toiduproovi, nendest 38 proovi olid negatiivsed ning 53 positiivsed. Piimatoodete kategoorias saadud PCR-meetodi tulemustest on näited toodud joonistel 18 ja 19. Joonisel 18 on näidatud negatiivsete toiduproovide PCR-analüüsi tulemused. Kõik *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivsed analüüsid võib lugeda tõseteks negatiivseteks tulemusteks, kuna IAC ja positiivsete kontrollide DNA-d olid PCR-meetodiga amplifitseeritud. *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseteks jäänud proovide puhul tuli välistada DNA eraldamise ebaõnnestumine, neid proove analüüsiti, kasutades 16S rRNA geenile spetsiifilisi praimereid. Kõigil oli saadus olemas, seega on negatiivsed tulemused tõesed negatiivsed (Joonis 24; LISA 7c, 7d ja 7e). Kunstlikult nakatatud piimatoodete proovide PCR-analüüsimisel negatiivseid analüüte ei registreeritud (Joonis 19). Erinevate nakatusannustega nakatatud proovidest amplifitseeritud PCR-produktide intensiivsuses erinevusi ei esinenud. Võib oletada, et *L. monocytogenes*'e arvukus tõusis kõikides piimatoodete rikastustes ühtlase tasemeni. Bakterite paljunemine keskkonnas ei toimu lõpmatuseni ehk logaritmiline kasvufaas asendub statsionaarse faasiga, kus hakkavad oma toimet avaldama tegurid, mis piiravad bakterite edasist kasvu, näiteks toksiliste ainevahetusproduktide teke ja kogunemine keskkonda, pH muutus keskkonnas,

toitainete vähesus ning maksimaalne bakterite arv, mis on võimalik teatud substraadi ruumalas. *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivsete katseproovide puhul on IAC-produkti signaal intensiivsem, sest konkureerivat sihtmärk DNA-d proovis ei esine ning praimeritel on võimalus seonduda vaid sisemise kontrollplasmiidil esinevale spetsiifilisele järjestusele (Joonis 18). Naturaalsetest piimatoodetest *L. monocytogenes* bakterit ei tuvastatud (LISA 6i ja 6j), kuid kakaopudingu 5 proovi olid PCR-analüüsil *L. monocytogenes*'e suhtes positiivsed (LISA 6k). Piimatoodete kategoorias saadud tulemused olid kokkulangevad referent- ja PCR-meetodil.



**Joonis 18. Nakatamata toorpiima (TRP) ja hapupiima (HP) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 7: TRP-L-II-NK; nr 8-13: HP-L-II-NK; nr 14: PK *L. monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 16: MQ]

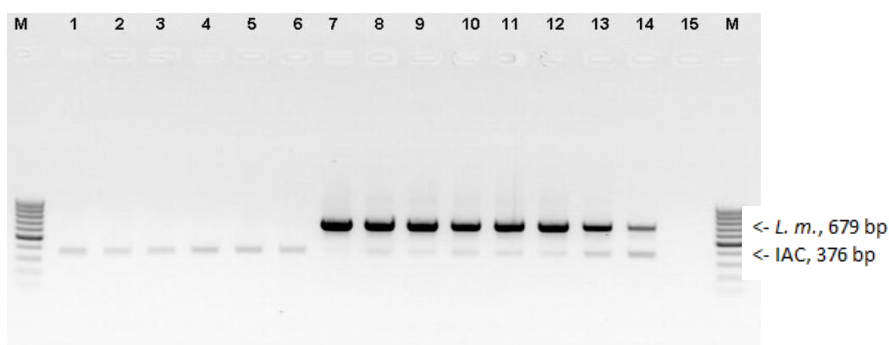


**Joonis 19. *L. monocytogenes* inokulumidega 1-4 cfu/25g, 4-10 cfu/25g (Pilt A), 10-20 cfu/25g ja 100-400 cfu/25g (Pilt B) nakatatud hapupiima (HP) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); Pilt A: nr 1: MQ; nr 2 – 7: HP-L-II-MP1; nr 8-13: HP-L-II-MP4; nr 14: PK *L. monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 16: MQ; Pilt B: nr 1 – 6: HP-L-II-MA10; nr 7-12: HP-L-II-KA100; nr 13: PK *L. monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].

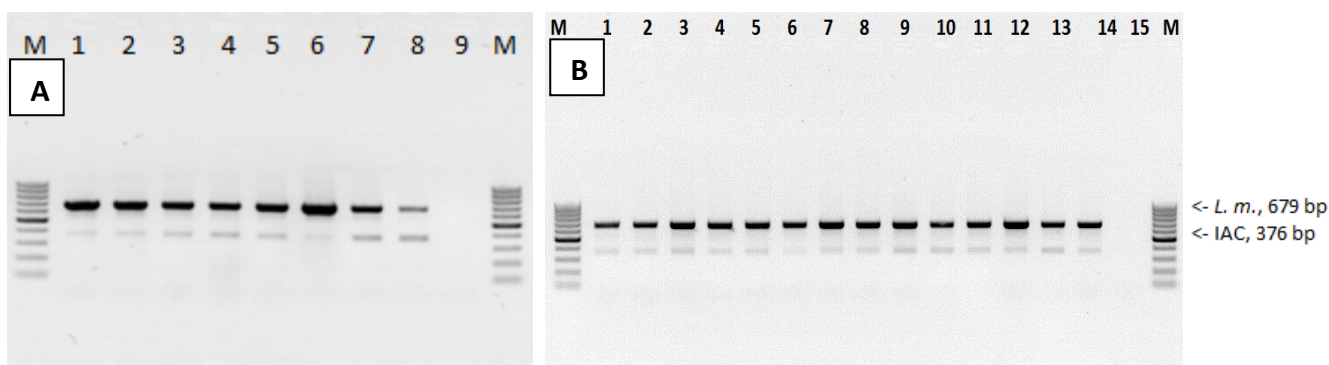
#### 2.3.6.4 *L. monocytogenes*'e tuvastamine kalatoodetest

Kalatoodete kategoorias kasutati nakatamiseks toorest ja suitsutatud kalamaatriksit, kuna mõlemad on potentsiaalsed *L. monocytogenes*'ega nakatumise allikad. Kunstlikult nakatati roogitud lõhe (RLÕ) ja kuumsuitsu heik (HE). Kuumsuitsu heiki nakatati nelja

nakatamisannusega ja roogitud lõhet kahe nakatamisannusega (Tabelid 7 ja 10). Naturaalsete maatriksitena analüüsiti pangassiuse fileed (PG), lõhefileed (NLH), külmsuitsu lõhefileed (NKL) ja kalatooteid (NKT), mis hõlmasid külmsuitsu lõhefileed, lõhefileetükke, külmsuitsu paltust ja graavilõhet tilliga. Naturaalsetest kalatoodetest oli varasemalt referentmeetodiga tuvastatud *L. monocytogenes*. Kokku analüüsiti kalatoodete kategoorias 84 toiduproovi, millest referentmeetodi põhjal olid 37 negatiivsed ja 47 positiivsed. PCR-meetodiga saadud tulemused on näidatud joonistel 20 ja 21. Joonisel 20 on toodud nakatamata proovide PCR-analüüsi tulemused, mis on tõesed negatiivsed, kuna IAC ja positiivsete kontrollide DNA-d on amplifitseeritud ning pildil selgesti nähtavad. *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseteks jäänud proovide puhul tuli välistada DNA eraldamise ebaõnnestumine, neid proove analüüsiti, kasutades 16S rRNA geenile spetsiifilisi praimereid. Kõigil oli saadus olemas, seega on negatiivsed tulemused tõesed negatiivsed (Joonis 25; LISA 7f ja 7h). Kuumsuitsu heigi nakatamine erinevate *L. monocytogenes*'e nakatusannustega on väga hästi õnnestunud, kuna PCR-produktid on diskreetsed ja hästi tuvastatavad (Joonised 20 ja 21). Roogitud lõhe proovide analüüsitulemused näitavad, et selles tootes esinevad PCR-i inhibeerivad ained (näiteks sool ja rasvad) on mõjutanud PCR-reaktsiooni tõhusust (LISA 6m). Mikrobioloogilistel väljakülvidel esines *L. monocytogenes*'e bakterirakke arvukalt ning nende tasside põhjal oleksime eeldanud tugevaid ja diskreetseid PCR-produkte. Eriti tugev inhibeeriv mõju on olnud kõrge arvukusega inokulumiga nakatatud proovidest amplifitseeritud DNA-de analüüsil (LISA 6m). Naturaalselt nakatunud proovide PCR-produktid olid pildil väga erineva intensiivsusega (LISA 6n, 6o ja 6p), mis annab tunnistust erineva arvukusega *L. monocytogenes*'e esinemisest kalatoodetes. Naturaalsetest lõhefilee proovidest *L. monocytogenes*'t PCR-analüüsil ei tuvastatud (LISA 6q). Kalatoodete kategoorias läbiviidud kunstlik nakatamine toimus koostöös Icosagen AS töötajaga (Annika Hurt). Referent- ja PCR-meetodiga saadud tulemused olid kalatoodete kategoorias kokkulangevad.



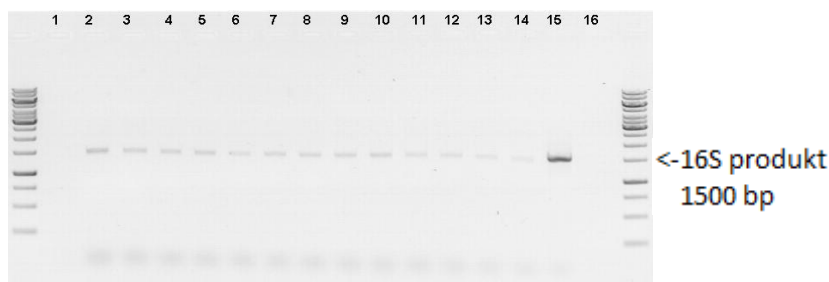
**Joonis 20. Nakatamata ja *L. monocytogenes* inokulumiga 1-4 cfu/25g nakatatud kuumsuitsu heigi (HE) proovide PCR-analüüs [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: HE-L-II-NK; nr 7-12: HE-L-II-MP1; nr 13: PK *L. monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].**



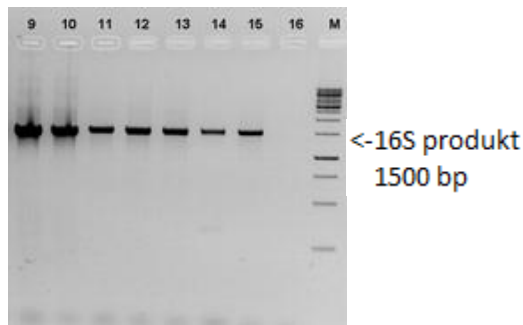
**Joonis 21.** *L. monocytogenes* inokulumiga 4-10 cfu/25g (Pilt A), 10-20 cfu/25g ja 100–400 cfu/25g (Pilt B) nakatatud kuumsuitsu heigi (HE) proovide PCR-analüüs [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); Pilt A: nr 1 – 6: HE-L-II-MP4; nr 7: PK *L. monocytogenes*; nr 8: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 9: MQ; Pilt B: nr 1 – 6: HE-L-II-MA10; nr 7-12: HE-L-II-KA100; nr 13: PK *L. monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].

### 2.3.7 Bakteriaalse DNA eraldamise kontroll 16S rRNA geeni amplifikatsiooniga PCR-meetodiga

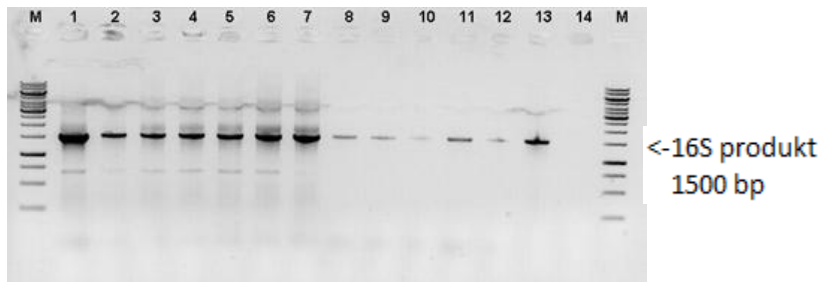
Bakteriaalse DNA eraldamist kontrolliti eubakteritele universaalse 16S rRNA geeniproducti amplifitseerimisega PCR-reaktsiooni abil. 16S rRNA analüüs teostati kõikidele eraldatud DNA-dele, kuid antud uurimustöös tuuakse ära vaid *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseteks jäänud proovide PCR-produktide geelelektroforeesi pildid (Joonised 22-25). *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivsete jäänud proovide puhul tuleb välistada DNA eraldamise ebaõnnestumine, st bakteriaalse DNA puudumine katseproovis. 16S rRNA geenile spetsiifiliste praimerite kasutamisel on amplifitseeritava produkti suurus 1500 bp. Kõikide katseproovide 16S rRNA PCR-meetodiga analüüsimise põhjal saadi positiivsed tulemused. Sellega kinnitati DNA eralduse õnnestumine ja bakteriaalse DNA esinemine eraldatud proovide elueerimispuhvrts.



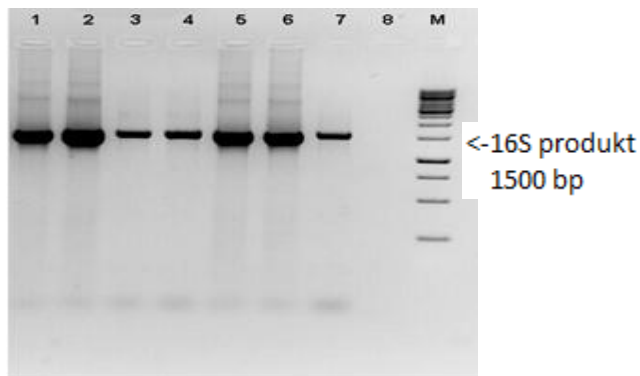
**Joonis 22.** Nakatamata uhteproovide (UH) 16S rRNA PCR-analüüs [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 14: UH-L-II-NK; nr 15: PK *L. monocytogenes*; nr 16: MQ].



**Joonised 23. Keeduvorsti (VO) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 9 - 14: SAR-L-II-NK; nr 15: PK *L.a monocytogenes*; nr 16: MQ].



**Joonis 24. Nakatamata toorpiima (TRP) ja hapupiima (HP) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 2 – 7: TRP-L-II-NK; nr 8-13: HP-L-II-NK; nr 14: MQ].



**Joonis 25. Nakatamata kuumsuitsu heigi (HE) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 6: HE-L-II-NK; nr 7: PK *L. monocytogenes*; nr 8: MQ].

### 2.3.8 Referent- ja PCR-meetodi võrdluse kokkuvõte

Referent- ja alternatiivmeetodiga analüüsiti kõigi kolme toidugrupi ja ühe hügieeniproovide grupi proove paralleelselt. Referentmeetodiga loeti positiivseteks kõik ALOA ja Oxford selektiivsöötmele kasvanud tüüpilised kolooniad, mis andsid positiivse tulemuse ka kinnitavate testidega. Kõik referent ja PCR-meetodiga positiivsed ja negatiivsed tulemused on maatriksite ja nakatusannuste kaupa välja toodud tabelis 10. PCR- ja referentmeetodiga saadud tulemused ühtisid 100 % (Tabel 10), välja arvatud lihatoodete kategoorias, kus tuvastati üks positiivne hälve. Kuna analüüsimiseks kasutati selektiivrikastusest eraldatud DNA-d, siis oli tulemuste ühilduvus suurepärane. Erinevates uurimustes on näidatud, et selektiivrikastuse etapis tõuseb *L. monocytogenes* bakterite arvukus oluliselt ning tuvastamine on efektiivsem ja lihtsam, kui eelrikastuse etapist eraldatud bakteriaalsest DNA-st. Võrdleva analüüsi põhjal võib väita, et

valideeritav PCR-meetod on *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks sama efektiivne ja usaldusväärne nagu referentmeetod, kuid suureks eeliseks on kiirus.

**Tabel 10. Referent- ja PCR-meetodil saadud tulemused (NEG- *L. monocytogenes* ei leitud, POS- *L. monocytogenes* leitud)**

Katseproovi valmistamine				TULEMUS (Selektiivrikastus)	
<u>Maatriks</u> ja <u>proovi tähis</u>	<u>Kordust</u> e arv	<u>Nakatusannus</u> cfu/25g <u>maatriksi</u> kohta	<u>Eerikastus</u>	<u>REF</u>	<u>PCR</u>
<b>HÜGIEENIPROOVIDE KATEGOORIA</b>					
Uhteproov UH-L-II-NK	26 tk	Nakatamata, negatiivne kontroll	10 g uhtekäsn + 90 g 1/2 Fraser	26 NEG	26 NEG
Uhteproov UH-L-II-MP1	8 tk	2 cfu/10 g	10 g uhtekäsn + 89 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	2 NEG 6 POS	2 NEG 6 POS
Uhteproov UH-L-II-MA10	8 tk	20 cfu/10 g	10 g uhtekäsn + 89 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	1 NEG 7 POS	1 NEG 7 POS
Uhteproov UH-L-II-KA100	8 tk	201 cfu/10 g	10 g uhtekäsn + 89 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	8 POS	8 POS
Uhteproov NUH-L-II	9 tk	Nakatamata ehk naturaalne	10 g uhtekäsn + 90 g 1/2 Fraser	9 NEG	9 NEG
Uhteproov NUP-L-II	9 tk	Nakatamata ehk naturaalne	10 g uhtekäsn + 90 g 1/2 Fraser	9 POS	9 POS
<b>KOKKU:</b>				<b>68 = 38 NEG 30 POS</b>	<b>68 = 38 NEG 30 POS</b>

**LIHATOODETE KATEGOORIA**

<u>Maatriks</u> ja <u>proovi tähis</u>	<u>Kordust</u> e arv	<u>Nakatusannus</u> cfu/25g <u>maatriksi</u> kohta	<u>Eerikastus</u>	<u>REF</u>	<u>PCR</u>
Keeduvorst VO-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, negatiivne kontroll	25 g keeduvorsti + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Keeduvorst VO-L-II-MP1	6 tk	1 cfu/25 g	25 g keeduvorsti + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	1 NEG 5 POS	6 POS
Keeduvorst VO-L-II-MP4	6 tk	7 cfu/25 g	25 g keeduvorsti + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Keeduvorst VO-L-II-MA10	6 tk	20 cfu/25 g	25 g keeduvorsti + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Keeduvorst VO-L-II-KA100	6 tk	370 cfu/25 g	25 g keeduvorsti + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Õllepunnid juustuga SAR-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, negatiivne kontroll	25 g õllepunne + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Õllepunnid juustuga SAR-L-II-MA10	6 tk	20 cfu/25 g	25 g õllepunne + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Õllepunnid juustuga SAR-L-II-KA100	6 tk	370 cfu/25 g	25 g õllepunne + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS

**Tabel 10. Referent- ja PCR-meetodil saadud tulemused (NEG- *L. monocytogenes* ei leitud, POS- *L. monocytogenes* leitud) (järg)**

Grillvorstid NGVO-L-II	6 tk	Nakatamata naturaalne	ehk	25 g grillvorste + 225 g 1/2 Fraser	6 POS	6 POS
Singikreem NSK-L-II	6 tk	Nakatamata naturaalne	ehk	25 g singikreemi + 225 g 1/2 Fraser	6 POS	6 POS
Kanaliha NKA-L-II	6 tk	Nakatamata naturaalne	ehk	25 g kanaliha + 225 g 1/2 Fraser	6 POS	6 POS
<b>KOKKU:</b>					<b>66 = 13 NEG 53 POS</b>	<b>66 = 12 NEG 54 POS</b>

**PIIMATOODETE KATEGOORIA**

<u>Maatriks ja proovi tähis</u>	<u>Korduste arv</u>	<u>Nakatusannus cfu/25g maatriksi kohta</u>		<u>Eerikastus</u>	<u>REF</u>	<u>PCR</u>
Hapupiim HP-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, kontroll	negatiivne	25 g hapupiima + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Hapupiim HP-L-II-MP1	6 tk	1 cfu/25 g		25 g hapupiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Hapupiim HP-L-II-MP4	6 tk	5 cfu/25 g		25 g hapupiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Hapupiim HP-L-II-MA10	6 tk	15 cfu/25 g		25 g hapupiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Hapupiim HP-L-II-KA100	6 tk	200 cfu/25 g		25 g hapupiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Toorpiim TP-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, kontroll	negatiivne	25 g toorpiima + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Toorpiim TP-L-II-MA10	6 tk	15 cfu/25 g		25 g toorpiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Toorpiim TP-L-II-KA100	6 tk	200 cfu/25 g		25 g toorpiim + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Maitsestatamata jogurt MJ-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, kontroll	negatiivne	25 g m. jogurtit + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Maitsestatamata jogurt MJ-L-II-MA10	6 tk	Nakatusannus: 15 cfu/25 g		25 g m. jogurt + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Maitsestatamata jogurt MJ-L-II-KA100	6 tk	200 cfu/25 g		25 g m. jogurtit + 224 g 1/2 Fraser + 1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Piimatooted NPT-L-II	20 tk	Nakatamata ehk naturaalne		25 g piimatootet + 225 g 1/2 Fraser	20 NEG	20 NEG
Kakaopuding NKP-L-II	5 tk	Nakatamata ehk naturaalne		25g kakaopudingut + 225 g 1/2 Fraser	5 POS	5 POS
<b>KOKKU:</b>					<b>91 = 38 NEG 53 POS</b>	<b>91 = 38 NEG 53 POS</b>

**Tabel 10. Referent- ja PCR-meetodil saadud tulemused (NEG- *L. monocytogenes* ei leitud, POS- *L. monocytogenes* leitud) (järg)**

**KALATOODETE KATEGOORIA**

<u>Maatriks ja proovi tähis</u>	<u>Korduste arv</u>	<u>Nakatusannus cfu/25g maatriksi kohta</u>	<u>Eerikastus</u>	<u>REF</u>	<u>PCR</u>
Kuumsuitsu heik HE-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, negatiivne kontroll	25 g heiki + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Kuumsuitsu heik HE-L-II-MP1	6 tk	1 cfu/25 g	25 g heiki + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	1 NEG 5 POS	1 NEG 5 POS
Kuumsuitsu heik HE-L-II-MP4	6 tk	4 cfu/25 g	25 g heiki + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	3 NEG 3 POS	3 NEG 3 POS
Kuumsuitsu heik HE-L-II-MA10	6 tk	15 cfu/25 g	25 g heiki + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Kuumsuitsu heik HE-L-II-KA10	6 tk	150 cfu/25 g	25 g heiki + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Roogitud lõhe RLÕ-L-II-NK	6 tk	Nakatamata, negatiivne kontroll	25 g lõhet + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Roogitud lõhe RLÕ-L-II-MA10	6 tk	15 cfu/25 g	25 g lõhet + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Roogitud lõhe RLÕ-L-II-KA100	6 tk	150 cfu/25 g	25 g heiki + 224 g 1/2 Fraser +1 ml inokulum	6 POS	6 POS
Pangassiuse filee PG-L-II	6 tk	Nakatamata ehk naturaalne	25 g pangassiuse fileed + 225 g 1/2 Fraser	6 NEG	6 NEG
Lõhefilee NLH-L-II	10 tk	Nakatamata ehk naturaalne	25 g lõhefileed + 225 g 1/2 Fraser	10 NEG	10 NEG
Kalatoodet NKT-L-II	14 tk	Nakatamata ehk naturaalne	25 g kalatoodet + 225 g 1/2 Fraser	4 NEG 10 POS	4 NEG 10 POS
Külmsuitsu lõhefilee NKL-L-II	6 tk	Nakatamata ehk naturaalne	25 g lõhefileed + 225 g 1/2 Fraser	6 POS	6 POS
<b>KOKKU:</b>				<b>84 = 36 NEG 48 POS</b>	<b>84 = 36 NEG 48 POS</b>

**Selgitused tabelis toodud nakatusannustele:**

1. *L. monocytogenes* suhtes negatiivsed katseproovid, mis on nakatamata
2. *L. monocytogenes*'e kõrge arvukusega (KA: 100-400 cfu) katseproovid, maksimaalne patogeeni sisaldus KA seerias 370 cfu/ 25 g katseproovi kohta, mis andis arvukuseks 14,8 cfu/g
3. *L. monocytogenes*'e madala arvukusega (MA: 10-20 cfu) katseproovid, maksimaalne patogeeni sisaldus MA seerias 20 cfu/25 g katseproovi kohta, mis andis arvukuseks 0,8 cfu/g
4. *L. monocytogenes*'e tuvastamispiiri arvukusega (TP4: 4-10), maksimaalne patogeeni sisaldus TP4 seerias 7 cfu/25 g katseproovi kohta, mis andis arvukuseks 0,28 cfu/g
5. *L. monocytogenes*'e tuvastamispiiri arvukusega (TP1: 1-4 cfu), maksimaalne patogeeni sisaldus TP1 seerias 2 cfu/ 25 g katseproovi kohta, mis andis arvukuseks ~0,08 cfu/g.

### 2.3.9 Valideerimisel kasutatud parameetrid

PCR- ja referentmeetodi võrdleva analüüsi käigus määrati alternatiivmeetodi suhteline täpsus, suhteline spetsiifilisus, suhteline tundlikkus ja suhteline tuvastamispiir ning selektiivsus.

Alternatiivmeetodi selektiivrikastuse suhtelised spetsiifilisused on toodud tabelis 11.

**Tabel 11. Referent- ja alternatiivmeetodiga saadud tulemuste kokkulangevus selektiivrikastusest (EVS-EN ISO 16140:2003)**

Maatriks	PA	NA	N D	P D	Su m	Suhteline täpsus AC (%)	N <sub>+</sub>	Suhteline tundlikkus SE(%)	N <sub>-</sub>	Suhteline spetsiifilisus SP (%)
					N	$100 \times (PA+NA)/N$	PA+ ND	$100 \times PA/N_+$	NA+ PD	$100 \times NA/N_-$
Hügieeni- proovid	30	38	0	0	68	$100 \times (30+38)/68 = 100\%$	30+0 = 30	$100 \times 30/30 = 100\%$	38+0 = 38	$100 \times 38/38 = 100\%$
Liha- tooted	53	12	0	1	66	$100 \times (53+12)/66 = 98,5\%$	53+0 = 53	$100 \times 53/53 = 100\%$	12+1 = 13	$100 \times 12/13 = 92,3\%$
Piima- tooted	53	38	0	0	91	$100 \times (53+38)/91 = 100\%$	53+0 = 53	$100 \times 53/53 = 100\%$	38+0 = 38	$100 \times 38/38 = 100\%$
Kala- tooted	48	36	0	0	84	$100 \times (48+36)/84 = 100\%$	48+0 = 48	$100 \times 48/48 = 100\%$	36+0 = 36	$100 \times 36/36 = 100\%$
<b>Kokku</b>	184	124	0	1	309	99,6%	184	100%	125	98,10%

**Tabel 12. Alternatiivmeetodi suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja suhtelise spetsiifilisuse tulemused.**

	Alternatiivmeetod
Suhteline täpsus (AC)	99,6%
Suhteline tundlikkus (SE)	100%
Suhteline spetsiifilisus (SP)	98,1%

Meetodite võrdleval analüüsimisel ei tuvastatud erinevusi 3 kategooria (piimatoodete, kalatoodete ja hügieeniproovide) suhtelise täpsuse, suhtelise tundlikkuse ja spetsiifilisuse osas (Tabelid 11 ja 12).

### 2.3.10 PCR-meetodi selektiivsuse ja spetsiifilisuse määramine

Alternatiiv ehk PCR-meetodi kasutatavuse hindamiseks kontrolliti:

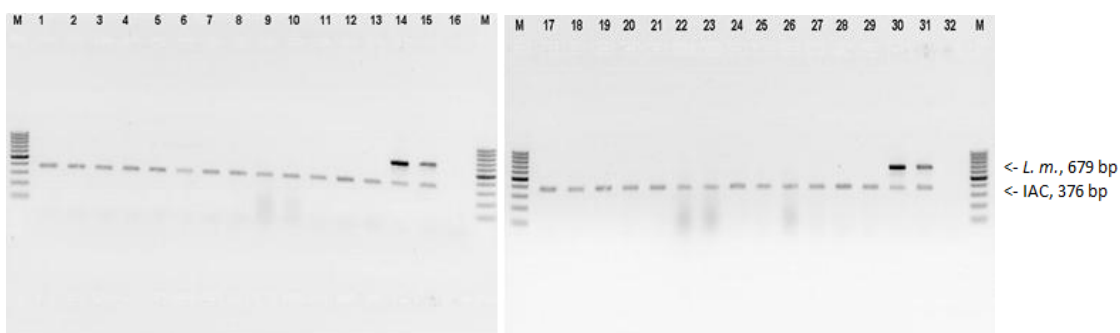
*L. monocytogenes*'e tüvede ehk sihtmärk bakterite tuvastatavust ehk selektiivsust (*inclusivity*),

- mitte-sihtmärbakterite tuvastamatust ehk spetsiifilisust (*exclusivity*) näitamaks, et toidus esinevad mitte-sihtmärbakterid ei anna valideeritava meetodiga positiivset tulemust.

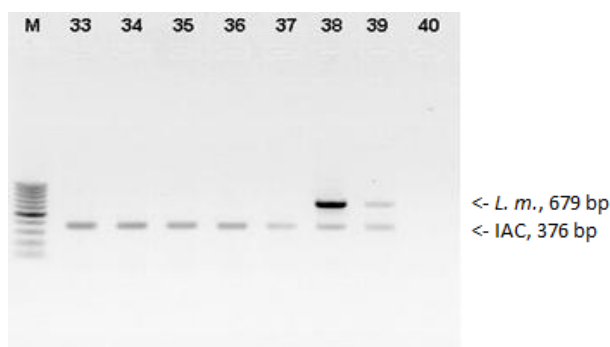
- spetsiifilisuse määramiseks analüüsiti praimeritega LM\_F2 ja LM\_R2 31 mitte-sihtmärkbakterit (Tabel 2) ja selektiivsuse kinnitamiseks 50 *L. monocytogenes*'e tüve (Tabel 2).

Mitte-sihtmärktüvede DNA-dest PCR-produkti ei amplifitseeritud, PCR-tulemused olid negatiivsed (Joonised 26 ja 27). Kõik *L. monocytogenes*'e tüved olid PCR-meetodiga tuvastatavad ja andsid positiivse tulemuse (Joonised 28 ja 29). Antud tulemused tõestavad, et praimeripaar (LM\_F2/LM\_R2) ja valideeritav PCR-meetod on spetsiifiline ja selektiivne ainult *L. monocytogenes*'e virulentsusgeeni *hlyA* suhtes ja ei anna signaali teiste katseproovis sisalduvate mitte-sihtmärgmikroobide puhul. Seega on PCR-meetod 100% inklusiivne ja 100% eksklusiivne. IAC produkti olemasolu kõigis *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivsetes proovides kinnitab tõesed negatiivsed tulemused, välistades PCR-produkti puudumise PCR-i inhibeerimise tõttu.

- **Alternatiivmeetodi selektiivsuse analüüsi tulemused:**

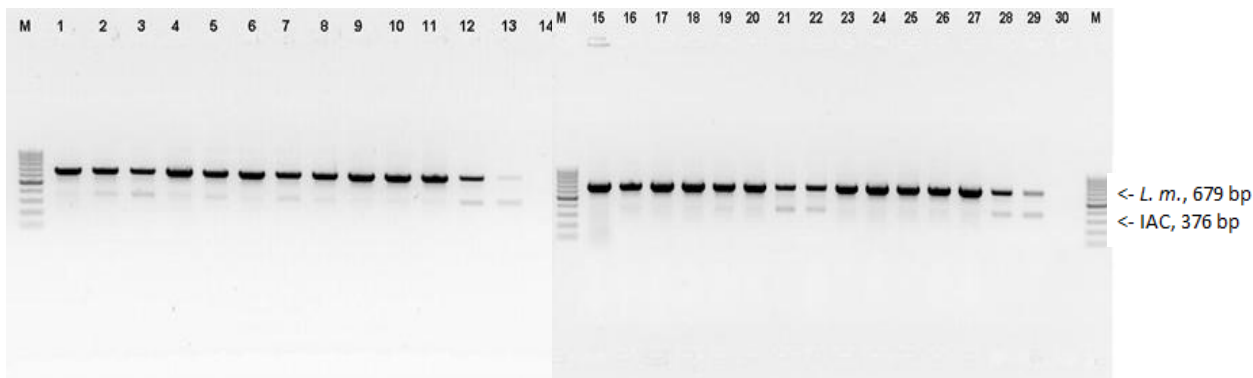


**Joonis 26. PCR-meetodi selektiivsuse tuvastamise analüüs.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: *B. mycooides*; nr 2: *B. circulans*; nr 3: *B. megaterium*; nr 4: *B. simplex*; nr 5: *B. sphaericus*; nr 6: *B. subtilis* IC002; nr 7: *B. subtilis* ATCC 11774; nr 8: *S. aureus* ATCC 33862; nr 9: *B. licheniformis* ATCC 12759; nr 10: *B. licheniformis* IC001; nr 11: *B. licheniformis*; nr 12: *B. pumilus* ATCC 700814; nr 13: *B. pumilus*; nr 14: PK- *L. monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli/reaktsiooni kohta; nr 16 MQ; nr 17: *B. cereus* ATCC11778; nr 18: *B. cereus*; nr 19: *P. macerans*; nr 20: *L. innocua* NCTC 11288; nr 21: *L. innocua* ATCC 33090; nr 22: *L. greyii* ATCC 700545; nr 23: *L. greyii* ATCC 25401; nr 24: *L. ivanovii* ATCC 19119; nr 25: *L. ivanovii* BAA-139; nr 26: *L. seeligeri* ATCC 35967; nr 27: *L. welshimeri* ATCC 35897; nr 28: *S. bovis*; nr 29: *S. aureus* ATCC 6538; nr 30: PK *L. monocytogenes*; nr 31: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 32: MQ].

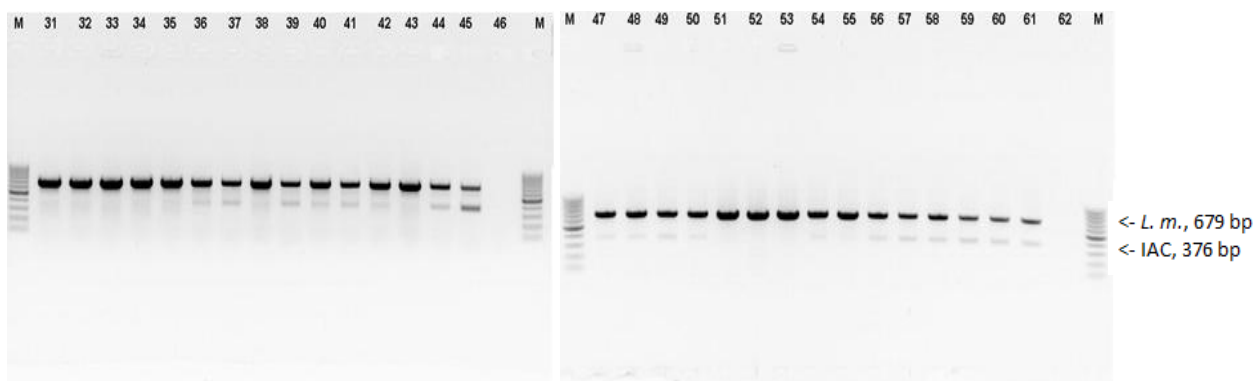


**Joonis 27. PCR-meetodi selektiivsuse tuvastamise analüüs.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder; lisa 4); nr 33: *S. epidermidis* ATCC 12228; nr 34: *L. lactis* ATCC 19435; nr 35: *L. sakei* IC012; nr 36: *R. equi* 6939; nr 37: *E. faecalis* ATCC 29212; nr 38: PK *L. monocytogenes*; nr 39: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 40: MQ].

- **PCR-meetodi spetsiifilisuse analüüsi tulemused:**



**Joonis 28. PCR-meetodi spetsiifilisuse tuvastamise analüüs.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 11 *L. monocytogenes* erinevad tüved (Tabel 2, nr 1-11); nr 12: PK *L. monocytogenes*; nr 13: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 14: MQ; nr 15 – 27 *L. monocytogenes* erinevad tüved (Tabel 2, nr. 12-24); nr 28: PK *L. monocytogenes*; nr 29: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 30: MQ].



**Joonis 29. PCR-meetodi spetsiifilisuse tuvastamise analüüs.** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 31 – 43 *L. monocytogenes* erinevad tüved (Tabel 2, nr 25-37) ; nr 44: PK *L. monocytogenes*; nr 45: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 46: MQ; nr 47 – 59 *L. monocytogenes* erinevad tüved (Tabel 2, nr 38-50); nr 60: PK *L. monocytogenes*; nr 61: pGEM-T Easy LM1/2 #2, 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 62: MQ].

### 2.3.11 Suhtelise tuvastamispiiri määramine referent- ja PCR-meetodiga

Standardi kohaselt on suhteliseks tuvastamispiiriks kultiveeritavate mikroorganismide väikseim arv, mida on katseproovist võimalik alternatiiv- ja referentmeetodiga tuvastada 50 % juhtudel. *L. monocytogenes*'e suhteline tuvastamispiir määrati kõigis neljas analüüsitud kategoorias. Igast katseproovist suhtelise tuvastamispiiri määramiseks kasutati mitmeidmaatrikseid. Uhteproovide puhul kasutati abrasiivsed käsnu, lihatoodetest keeduvorsti, piimatoodetest hapupiima ja kalatoodetest kuumsuitsuheiki.

Minimaalselt on suhtelise tuvastamispiiri määramiseks vaja katseproove analüüsida kolmes katseseerias: negatiivne kontroll, nakatamine tuvastamispiiri lähedase mikroobiarvuga katseproovides ja tuvastamispiirist kõrgema mikroobiarvuga katseproovides. Üleöö kasvatatud bakterikultuuri arvukused kontrolliti enne nakatamist väljakülvidega TSA agarile. Järgmisel päeval loendati kolooniad ning valmistati inokuleerimiseks vastavad lahjendused.

PCR- ja referentmeetodiga saadud *L. monocytogenes*'e suhtelised tuvastamispiirid on toodud tabelis 13.

**Tabel 13. Suhtelise tuvastamispiiri usaldusvärsuse piirid. (Usalduspiiride väljendamiseks kasutati ühte olulist komakohta).**

<i>L. monocytogenes</i> tüvi	Maatriks	LOD50 Spearman-Kärber meetod (cfu; sulgudes on usaldusvärsuse piirid)	
		Referentmeetod	PCR-meetod
<i>L. monocytogenes</i> 19118	Uhteproovid	2,7 [1,1 ; 7,1]	2,1 [1,1 ; 7,1]
<i>L. monocytogenes</i> 13932	Lihatooted (keeduvorst)	0,9 [0,5 ; 1,6]	0,7 [0,7 ; 0,7]
<i>L. monocytogenes</i> 13932	Piimatooted (hapupiim)	0,3 [0,3 ; 0,3]	0,3 [0,3 ; 0,3]
<i>L. monocytogenes</i> 13932	Kalatooted (kuumsuitsuheik)	1,7 [0,7 ; 4,2]	1,7 [0,7 ; 4,2]
Suhteline tuvastamispiir keskmiselt:		1,4	1,2

Kõiki analüüsitulemusi arvestades määrati suhteliseks tuvastamispiiriks:

1. toiduproovides 0,3 – 4,2 cfu/25 g kohta ja
2. keskkonnaproovides 1,1-7,1 cfu/katseproovi kohta.

*L. monocytogenes*'e suhteline tuvastamispiir PCR- ja referentmeetodiga oli keskkonnaproovide, piimatoodete ja kalatoodete puhul sarnane. Lihatoodetest tuvastati *L. monocytogenes*'e PCR-meetodiga ühest patogeeni nakatatud proovist, millest referentmeetodiga jäi *L. monocytogenes* tuvastamata. Seetõttu erines *L. monocytogenes*'e suhteline tuvastamispiir lihatoodetest referent-ja alternatiivmeetodiga, vastavalt 0,5-1,6 ja 0,7-1 cfu/katseproovi kohta. Uuritud toiduproovides ja keskkonnaproovides määrati *L. monocytogenes*'e suhteliseks tuvastamispiiriks vastavalt 1–4 cfu ja 1-7 cfu/katseproovi kohta. Katsetulemustest lähtuvalt on mõlema meetodiga võimalik *L. monocytogenes* tuvastada toidu- ja keskkonnaproovidest, milles patogeeni esineb madala arvukusega.

## 2.4 ARUTELU

Käesoleva uurimustöö eesmärgiks oli optimeerida ja valideerida PCR-meetod alternatiivmetodina *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks toidu- (liha-, kala- ja piimatooted) ja hügieeniproovide kategoorias. Alternatiivmeetodi valideerimiseks oli oluline järgida standardis EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia – alternatiivmeetodite valideerimisprotokoll“ sätestatud nõudeid. *L. monocytogenes*'e tuvastamine PCR-meetodiga on üks paremaid alternatiive töö- ja ajamahukale referent- ehk mikrobioloogilisele meetodile.

PCR-meetodil *L. monocytogenes*'e tuvastamist piiravaks parameetriks on patogeeni madal arvukus nii toidu- kui hügieeniproovides. Lisaks ei suuda PCR-meetod eristada elusatest ja surnud rakkudest pärinevat DNAd. Nende piirangute leevendamiseks kasutatakse toidu- ja hügieeniproovide rikastamist. Rikastamisetapid võimaldavad rakkudel stressitingimustest taastuda ning paljunemist. Eelrikastusetapp on põhiliselt rakkude turgutamiseks ning selles etapis ei toimu spetsiifiliselt ainult tuvastatavate patogeenide arvukuse kasvu (Dalmasso jt., 2014). Jasson jt., (2009) näitasid oma uurimustöös, et *L. monocytogenes*'e kasvutempo oli ½ Fraser puljongis küllaltki aeglane ning pool-selektiivne sööde tekitas pikaajalise taastumisfaasi, mistõttu tuvastamispiiri saavutamiseks vajalik aeg kasvas (Jasson jt., 2009). Selletõttu võib *L. monocytogenes*'e rakkude arvukus jääda esimeses ehk eelrikastuse etapis PCR-meetodil tuvastamiseks madalaks. Dalmasso jt., (2014) leidsid, et ainult 23-26% positiivsetest tulemustest tuvastati eelrikastusest eraldatud DNA-st. Selektiivrikastus stimuleerib spetsiifilisemalt *L. monocytogenes*'e kasvu, võrreldes teiste toiduainetes leiduvate taustamikrofloorasse kuuluvate bakteritega (Jasson jt., 2009). Tänu rikastamisetappidele kasvab patogeeni tuvastamise võimalus, kuna surnud rakkude agregaadid ei mõjuta tõenäoliselt enam PCR-analüüsi edukust (Dalmasso jt., 2014). Mitte-sihtmärkbakterite ning potentsiaalselt PCR-reaktsiooni inhibeerivate komponentide sisaldus lahjeneb eelrikastuses 10 korda ning selektiivrikastuses 1000 korda (Krascsenicsova jt., 2008). Põhiliselt elusate rakkude DNA amplifitseerimine on eriti oluline, kuna potentsiaalset nakkusohtu kujutavad endast elujõulised ja nakatamisvõimelised rakud. Seega PCR-meetod võib olla küll efektiivne, spetsiifiline ja kiire viis patogeeni tuvastamiseks, kuid tulemused on usaldusväärsed vaid juhul, kui katseproov on õigesti ettevalmistatud ja DNA on amplifitseeritav. Antud uurimustöös kasutati kunstlikku proovide nakatamist ning seetõttu eeldati, et selektiivrikastuse söötimest eraldatud *L. monocytogenes*'e DNA pärineb elusatest rakkudest.

PCR-meetodi täpsuse määramisel on olulisteks parameetriteks ka selektiivsus ja suhteline tuvastamispiir. PCR-meetodi selektiivsuse hindamiseks testitakse suurt hulka sihtmärk – ja

mitte-sihtmärkbaktereid. Töös sihtmärk ja mitte-sihtmärkbakterite DNA-de analüüsimisel saadud tulemused kinnitasid praimerite LM\_F2/LM\_R2 selektiivsust ja spetsiifilisust ainult *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks. Uurimustöö käigus analüüsiti ühtekokku 309 proovi nii referent- kui alternatiivmeetodiga ning tulemused ühtisid 99,6%.

*L. monocytogenes*'e määramise suhteliseks tuvastamispriiriks nii optimeeritud PCR-meetodi kui ka referentmeetodiga on vastavalt 1,2 ja 1,4 cfu katseproovi kohta (Tabel 13). Kõigi uuritud toidu- ja keskkonnaproovidest määrati üldiseks *L. monocytogenes*'e tuvastamispriiriks 1-4 cfu/katseproovi kohta. Katsetulemustest lähtuvalt on mõlema meetodiga võimalik *L. monocytogenes*'e tuvastada toidu- ja keskkonnaproovidest ka madala arvukusega bakteriaalse saastuse puhul. Kuigi infektsiooni põhjustavate rakkude arvukuse alampiir pole selgelt määratletud, siis terve immuunsüsteemiga indiviidide jaoks loetakse ohutuks toitu, milles *L. monocytogenes*'e arvukus on <100 cfu/g. Epidemioloogilised andmed näitavad, et listerioosi puhanguid põhjustanud toitudes esines *L. monocytogenes*'e arvukusega >1000 cfu/g (Ross jt., 2002; Thévenot jt., 2006).

PCR-meetodi kombineerimine standardmeetodi rikastusetappidega mitte ainult ei tõsta *L. monocytogenes*'e tuvastamise tundlikkust, vaid ka lühendab proovide analüüsimiseks kuluvat aega. Näiteks D'Amico ja Donnelly (2008) näitasid, et tundlikkus kasvas ja tulemuste saamiseks kuluv aeg kahanes, kui kasutada kombineeritult proovide rikastamist, millele järgneb PCR-analüüs selektiivrikastuse proovidest eraldatud DNA-dele. Antud uurimustöös kasutatud PCR-meetod tagab standardse protseduuri *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivsete tulemuste tuvastamiseks ja võimaldab saada tulemused vähemalt kaks päeva kiiremini kui standardmeetodiga ehk 3 kuni 4 ööpäeva jooksul. EVS-EN ISO 11290-1 standardmeetod vajab 5 päeva-

Hügieeniproovide kategoorias tuvastati referent- ja alternatiivmeetodiga kolm negatiivset tulemust. ALOA ja Oxford söötmetassidele teostatud väljakülvidest ei leitud mitte ühtegi tüüpilist *L. monocytogenes*'e bakterikolooniat, samuti ei amplifitseeritud nendest proovidest PCR-produkti (Joonis 14, rajad 4, 8 ja 11). Kaks negatiivset uhteproovi (UH-L-II-MP1-4; UH-L-II-MP1-8) olid nakatatud *L. monocytogenes*'e inokulaadiga, milles esines 2 cfu/10 g uuritava proovi kohta (Joonis 14, rajad 4 ja 8). Võib oletada, et kuna nakatamine toimus väga väikese bakterite arvuga, siis nende uhtekäsnaade nakatamiseks kasutatud *L. monocytogenes*'e rakud ei olnud võimelised kohanema antud tingimustega rikastuspuljongis ning mittekohanenud rakud hukkusid. Samas peaks PCR-meetodiga olema võimalik tuvastada ka surnud rakkude DNA-d, kuid suure tõenäosusega oli rakkude arvukus nii väike, et see ei ületanud PCR-meetodi tuvastamispriiri. Samuti on võimalik, et nakatamine ebaõnnestus, kuna väike arv rakke ei jõudnud pipeteerimise käigus rikastusöötmesse. Üks negatiivseks jäänud

proov oli nakatatud inokulaadiga, milles oli eeldatavalt 20 *L. monocytogenes*'e rakku 10 grammi proovi kohta (Joonis 14, rada 11). Sellise tulemuse põhjenduseks võib olla bakteriaalse kasvu inhibitsioon kásnas, mis on sõltuv väga paljudest tingimustest (maatriksi koostisained, toitekeskkond, temperatuur, pH, süsihappe kontsentratsioon söötmes, bakterikultuuri vanus jm.) või inokuleerimise ebaõnnestumine. Teised hügieeniproovide kategoorias tehtud võrdluskatsed on kokkulangevad ning suhteline täpsus, tundlikkus ja spetsiifilisus olid 100% (Tabelid 11 ja 12).

Lihatoodete kategoorias tuvastati PCR-meetodiga üks nõrk positiivne tulemus (VO-L-II-MP1-1), mille nakatusannuseks oli 1 cfu/25 grammi toote (keeduvorst) kohta (Jooni 16, rada 1). Samast katseproovist tehtud väljakülvil ALOA tassile esinesid mõned üksikud sinakasrohelistes kolooniad ning rohkearvuliselt beežikas-valged kolooniad, eeldatavasti perekonnast- *Bacillus*. Kuna toiduained ei ole mikroobide ja sisalduvate ainete suhtes homogeensed, siis selles katseproovis võisid suure osakaalu moodustada taustamikrofloorasse kuuluvad bakterid ja toidus esinevad inhibeerivad komponendid (näiteks soolad, vürtsid, rasvad). Sellest tulenevalt võis *L. monocytogenes*'e bakteri eksponentsiaalse faasi kasv olla takistatud. Selles faasis on bakterite aktiivsus suurim, kuid samas on nad ka kõige tundlikumad välistegurite (konkureerivad mikroorganismid, substraadi või söötme koostis ehk kui palju on keskkonnas bakterite kasvuks ja paljunemiseks vajalikke aineid, jm tegurid) suhtes. Keeduvorsti proovidest tuvastamiskiiri määramisel registreeriti *L. monocytogenes*'e tuvastamiskiiri lähedase arvukuse (1 cfu/25 g katseproovis) puhul üks positiivne hálve [(PD); tabel 11]. Kuna proov oli nakatatud, siis seda võib lugeda tõeseks positiivseks tulemuseks. Teised katsetulemused lihatoodete kategoorias ühtisid mõlema meetodi puhul (Tabel 10).

Piima- ja kalatoodete kategooriate tulemused olid mõnevõrra üllatavad, kuna PCR-meetodiga *L. monocytogenes*'e DNA amplifitseerimisel ei tekkinud väga tugevat inhibitsiooni. On teada, et toorpiim ja toores kala on väga keerulised maatriksid nendes leiduvate rohketes PCR-i inhibeerivate ainete (kaltsium ja rasvad) tõttu (Bickley jt., 1996). Samas ei olnud roogitud lõhe PCR-saaduste signaalid kuigi tugevad (LISA 6m), hoolimata sellest, et ALOA- ja Oxford-söötmetassidel oli nende proovide väljakülvides *L. monocytogenes*'e kasv tüüpiline. Seega võib oletada, et toore lõhe proovides võis mõningane inhibeerimine aset leida, kuna toore kala rasvasisaldus on oluliselt suurem kui töödeldud toodetel. Olenemata sellest, et mitmed uurimustööd keskenduvad just piimatoodetes, eriti toorpiimas rohkesti leiduva kaltsiumi inhibeerivale mõjule PCR- reaktsioonis (Bickley jt., 1996), ei täheldatud seda antud uurimustöös. Inhibeeriva toime puudumine võis tuleneda ka sellest, et DNA eraldati selektiivrikastuse puljongist, milles on esialgsed toidu koostisained lahjenenud 1000 korda.

Käesolevas uurimustöös valideeritud analüüsis kasutatakse ka PCR-meetodi tundlikkust mõjutavate ainete esinemise tuvastamiseks sisemist amplifikatsioonikontrolli (IAC), et välistada valenegatiivsed tulemused. Sisemise amplifikatsioonikontrolli plasmiidse DNA amplifitseerimisel probleeme ei tekkinud ning valenegatiivsete tulemuste esinemine on seega välistatud.

Optimeeritud ja valideeritud PCR-meetod on töös läbiviidud katsete põhjal kasutatav kiireks ja efektiivseks *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks. Edaspidises tööd kombineeritakse omavahel mikrobioloogilise referentmeetodi- ja PCR-meetodi etappe, et veelgi suurendada *L. monocytogenes*'e toidu- ja keskkonnaproovidest määramise meetoodika spetsiifilisust ja tundlikkust.

## KOKKUVÕTE JA JÄRELDUSED

*L. monocytogenes* on inimestel listerioosi tekitav toiduga leviv patogeenne bakter. Seetõttu on väga oluline *L. monocytogenes*'e kiire tuvastamine toidust enne selle turustamist ja tarbimist. Samas on klassikalised mikrobioloogilised meetodid patogeeni tuvastamiseks aeganõudvad ning seega on huvipakkuv alternatiivsete meetodite väljatöötamine ja valideerimine, mis annab võimaluse tuvastada patogeenseid baktereid väiksema töö- ja ajakuluga.

Käesoleva uurimustöö „PCR-meetodi optimeerimine ja valideerimine *Listeria monocytogenes*'etuvastamiseks toidu- ja hügieeniproovidest“ raames analüüsiti mikrobioloogilise referentmeetodi ja optimeeritava/valideeritava alternatiivmeetodiga (PCR-meetodiga) võrdlevalt 309 katseproovi piima-, liha-, kala- ja uhteproovide kategooriatest. Nendest 48 olid naturaalselt *L. monocytogenes*'ega nakatunud, 187 katseproovi nakati kunstlikult kahe erineva *L. monocytogenes*'e serotüübiga (4b ja 4e) ning 74 katseproovi olid nakatamata. Alternatiivmeetodi valideerimisel järgiti standardis EVS-EN ISO 16140:2003 „Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll“ toodud nõudmisi.

Antud töö tulemusena töötati usaldusväärne PCR-meetod *L. monocytogenes*'e spetsiifiliseks tuvastamiseks toidu- ja hügieeniproovide selektiivrikastusest. Näidati, et referent- ja alternatiivmeetodil saadud tulemused olid kokkulangevad. Lisaks näitas alternatiiv- ja referentmeetodi võrdlev analüüs, et PCR-meetod on efektiivsem ja kiirem, kui vastav standardmeetod. PCR-meetodi jaoks määrati sellist tüüpi analüüsides jaoks kriitilise tähtsusega parameetrite väärtused: i) suhteline täpsus: 99,6%; ii) suhteline spetsiifilisus: 98,1 %; iii) suhteline tundlikkus: 100%. Toidu- ja hügieeniproovide analüüsil saadi *L. monocytogenes*'e tuvastamispiiriks mõlema meetodiga 1-4 cfu/25g katseproovi kohta. Sellest järeldati, et PCR-meetodi selektiivsus ja spetsiifilisus *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks oli piisav. Lisaks leiti, et kõik analüüsitud 50 *L. monocytogenes*'esihtmärktüve olid tuvastatavad ehk PCR-meetod on 100% inklusiivne. 31 analüüsitud mitte-sihtmärktüve, mis pärinesid samast perekonnast, sugukonnast või muude toidus esineda võivate bakterite hulgast, ei olnud meetodis kasutatavatel PCR-reaktsiooni tingimustel tuvastatavad ehk PCR-meetod on 100% eksklusiivne. Arendatud PCR-metoodika võimaldab *L. monocytogenes*'e tuvastamist piima-, kala-, liha- ja hügieenikategooria proovidest 72-96 tunni jooksul. Seega on valideeritud meetod kasutatav *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks nii toidu- kui keskkonnaproovidest ning rakendatav toiduainete mikrobioloogia labori igapäevases töös. Valideeritud PCR-meetod

akrediteeriti Eesti Akrediteerimis Keskuse (EAK) poolt, kui alternatiivne meetod *L. monocytogenes*'e tuvastamiseks toidust ja hügieeniproovidest.

## **Optimization and validation of PCR method to detect *Listeria monocytogenes* in food and hygiene samples.**

**Merlin Soopere**

### **SUMMARY**

*L. monocytogenes* is a foodborne pathogen, which causes listeriosis in humans. Thus, the rapid detection of *L. monocytogenes* in food is essential prior to sales and consumption. Microbiological methods for the detection of pathogens, however, are time-consuming and laborious. Development and validation of new alternative methods allowing the detection of pathogenic bacteria in a shorter time would be beneficial.

Altogether 309 samples of milk, meat, fish and hygiene samples were analysed in the current study by comparative testing, using microbiological reference method and alternative PCR method, which was optimized and validated as a part of the research project. Analysed samples included 48 test samples naturally infected with *L. monocytogenes*, 187 test samples inoculated artificially with two different serotypes of *L. monocytogenes* (4b and 4e), and 74 test samples uninfected natural samples. Validation of the alternative method followed the requirements of the standard EVS-EN ISO 16140:2003.

As a result of this study, a reliable PCR method was developed for specific detection of *L. monocytogenes* in selective enrichment broth of food and hygiene samples. The results of the alternative PCR method consistently matched the reference method. The critical parameters determined for the PCR method were as follows: relative accuracy: 99.6%; relative specificity: 98.1%; and relative sensitivity: 100%. The detection limit values of the *L. monocytogenes* in food and hygienic samples were obtained as 1-4 cfu/25g by both methods. All analysed 50 target *L. monocytogenes* strains were detected by the PCR method, demonstrating that the PCR-method is 100 % inclusive. All 31 analysed non-target strains, either from the same genus or family, or from bacteria that are normally found in food, were not detectable with the PCR method, demonstrating 100% exclusiveness. Validated PCR method allows detection of *L. monocytogenes* in dairy, fish, meat and hygiene samples in a time-frame of 72-96 hours which is faster than the reference method. It is concluded that the validated PCR method can be used for the detection of *L. monocytogenes* in food and environmental samples and can be integrated as a standard practice of food microbiology laboratory service. Validated PCR-method was accredited by Estonian Accreditation Centre as an alternative in-house method for the detection of *L. monocytogenes* in food and environmental samples.

## **TÄNUAVALDUSED**

Täna oma juhendajad Ene Talpsepa ja Tiina Alamäed ning kõiki toetavaid ja innustavaid laborikaaslasi, kes olid igakülgset töö valmimisel abiks. Eriti sooviksin tänada Tatjana Versti, Gaily Kivi ning Andres Männikut, kes suure pühendumusega nõustasid, juhendasid ning abistasid mind töö koostamisel ja katsete läbiviimisel.

## KASUTATUD KIRJANDUS

Allerberger, F., (2003). *Listeria*: growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. FEMS Immunol. Med. Microbiol., 35: 183- 189.

Amagliani, G., Giammarini, C., Omiccioli, E., Bandi, G., Magnani, M., (2005). Detection of *Listeria monocytogenes* using a commercial PCR kit and different DNA extraction methods. ScienceDirect, Food Control 18: 1137-1142.

Arnett, E., Vadia, S., Nackerman, C. C., Oghumu, S., Satoskar, A. R., McLeish, K. R., Uriarte, S. M., Seveau, S., (2014). The pore-forming toxin Listeriolysin O is degraded by neutrophil metalloprotease-8 and fails to mediate *Listeria monocytogenes* intracellular survival in neutrophils. J. Immunol., 192: 234-244.

Aznar, R., Alarcón, B., (2003). PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity. J. Appl. Microbiol., 95: 958-966.

Aznar, R., Solis, I., (2006). PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. J. Con. Prot. Food Safety, 1: 115-120.

Bickley, J., Short, J. K., McDowell, D. G., Parkes, H. C., (1996). Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. Lett. Appl. Microbiol., 22: 153-158.

Breslauer, K. J., Frank, R., Blocker, H., Marky, L., 1986. Predicting DNA duplex stability from the base sequence. Proc. Natl. Acad. Sci., 83, 3746-3750.

Churchill, R. L. T., Lee, H., Hall, J. C., (2005). Detection of *Listeria monocytogenes* and the toxin listeriolysin O in food. J. Microbiol. Met., 64: 141-170.

D'Agostino, M., Wagner, M., Vazquez-Boland, J. A., Kuchta, T., Karpiskova, R., Hoorfar, J., N'OVella, S., Scortti, M., Ellison, J., Murray, A., Fernandes, I., Kuhn, M., Pazlarova, J., Heuvelink, A., Cook, A. (2004). A validated PCR-based method to detect *Listeria monocytogenes* using raw milk as a food model- towards an international standard. J. Food Prot., 67(8): 1646-1655.

D'Amico, D. J., Donnelly, C. W., (2008). Enhanced detection of *Listeria* spp. in farmstead cheese processing environments through dual primary enrichment, PCR and molecular subtyping. J. Food Prot., 71: 2239-2248.

Dalmasso, M., Bolocan, A. S., Hernandez, M., Kapetanakou, A. E., Kuchta, T., Manios, A. G., Melero, B., Minarovicova, J., Muhterem, M., Nicolau, A. I., Rovira, J., Skandamis, P. N., Stessl, B., Wagner, M., Jordan, K., Rodriguez-Lazar, D., (2014). Comparison of polymerase chain reaction methods and plating for analysis of enriched cultures of *Listeria monocytogenes* when using the ISO11290-1 method. J. Microbiol. Met., 98: 8-14.

den Bakker, H. C., Bundrant, B. N., Fortes, E. D., Orsi, R. H., Wiedmann, M. (2010a). A population genetic-based and phylogenetic approach to understanding the evolution of virulence in the genus *Listeria*. Appl. Environ. Microbiol., Vol. 76, No. 18, 6085-6100.

den Bakker, H. C., Cummings, C. A., Ferreira, V., Vatta, P., Orsi, R. H., Degoricija, L., Barker, M., Petrauskene, O., Furtado, M., Wiedmann, M., (2010b). Comparative genomics of the bacterial genus *Listeria*: Genome evolution is characterized by limited gene acquisition and limited gene loss. BMC Genomics, 11:688.

Doyle, M. E. (2001). Virulence characteristics of *Listeria monocytogenes*. FRI Briefings, October.

EC, 1999.09. Opinion of the scientific committee on veterinary measures relating to public health on *Listeria monocytogenes*. European Commission, [http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf).

EFSA<sup>a</sup>, 2013. The European union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2011. EFSA J., 11(4):3129 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>

EFSA<sup>b</sup>, 2013. Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Listeria monocytogenes* in certain ready-to-eat foods in the EU, 2010-2011. Part A: *Listeria monocytogenes* prevalence estimates. EFSA J., 11(6):3241 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3241.pdf>

EFSA<sup>c</sup>, 2013. 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., 11(12): 3502-19 <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3502.pdf>

EN ISO 16140 validation study of MicroSEQ® *Listeria monocytogenes* method in food products and environmental samples. (2011). Validation study according to the EN ISO 16140 standard. MicroSEQ *Listeria monocytogenes*.

EVS-EN ISO 11290-1:2000/A1:2004. Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia – horisontaalmeetod *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks ja loendamiseks (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes*).

EVS-EN ISO 16140:2003. Toiduainete ja loomasööda mikrobioloogia. Alternatiivsete meetodite valideerimise protokoll (*Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods*).

EVS-EN ISO 17025:2006. Katse- ja kalibreerimislaborite kompetentsuse üldnõuded. (*General requirements for the competence of testing and calibration laboratories*).

FDA 2003, 09. *Listeria monocytogenes* Risk Assessment: I. Introduction. <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment/ucm184052.htm>

Feldsine, P., Abeyta, C., Andrews, W. (2002). AOAC International Methods Committee guidelines for validation of qualitative and quantitative food microbiological official methods of analysis. OMA Program Manual.

Freitag, N. E., Port, G. C., Miner, M. D., (2009). *Listeria monocytogenes* – from saprophyte to intracellular pathogen. Nat. Rev. Microbiol., 7: 623-628.

- Gouws, P. A., Liedemann, I., (2005). Evaluation of Diagnostic PCR for the detection of *Listeria monocytogenes* in food products. *Food Technol. Biotechnol.* 43(2): 201-205.
- Gambarin P., Magnabosco C., Losio M. N., Pavoni E., Gattuso A., Arcangeli G., Favretti M., (2012). *Listeria monocytogenes* in Ready-to-Eat seafood and potential hazards for the consumers. *Int. J. Microbiol.*, ID 497635.
- Goulet, V., King, L. A., Valliant, V., de Valk, H., (2013). What is the incubation period for listeriosis? *BMC Infectious Diseases* 13:11.
- Gudbjörnsdóttir, B., Suihko, M. I., Gustavsson, P., (2004). The incidence of *Listeria monocytogenes* in meat, poultry and seafood plants in the Nordic countries. *Food Microbiol.*, 21: 217-225.
- Göksoy, E. Ö., Kirkan, S., Kaya, O., (2006). Comparison of Polymerase chain reaction and conventional methods for the diagnosis of *Listeria monocytogenes* in stuffed mussels. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30: 229-234.
- Hamon, M., Bierne, H., Cossart, P., (2006). *Listeria monocytogenes*: a multifaceted model. *Microbiology*, 4: 423-434.
- Hecker, K. H., Roux, K. H., (1996). High and low annealing temperatures increase both specificity and yield in touchdown and stepdown PCR. *BioTechniques*, 20(3): 478-485.
- Hoorfar, J., Malorny, B. Abdulmawjood, A., Cook, N., Wagner, M., Fach, P. (2004). Practical considerations in design of international amplification controls for diagnostic PCR assays. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1863-1868.
- Ingianni, A., Quartuccio, M., Madeddu, M. A., Sanna, A., Dessi, S., Pompei, R., (2007). Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in processed meat by combined cultural-molecular method. *Am. J. Infect. Dis.* 3(3): 159-164.
- Janakiraman, V., (2008). Listeriosis in Pregnancy: Diagnosis, Treatment and prevention. *Rev. Obst. & Gynecol.*, 1(4): 179-185.
- Janzten, M. M., Navas, J., Corujo, A., Moreno, R., Lopez, V., Martinez-Suarez, J. V. (2006). Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR. *Span. J. Agric. Res.*, 4 (3): 235-247.
- Jasson, V., Rajkovic, A., Debevere, J., Uyttendaele, M., (2009). Kinetics of resuscitation and growth of *L. Monocytogenes* as a tool to select appropriate enrichment conditions as a prior step to rapid detection methods. *Food Microbiol.*, 26: 88-93.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: An overview and selection criteria. *Food Microbiol.*, 27: 710-730.
- Jeyaletchumi, P., Tunung, R., Margaret, S. P., Son R., Farinazleen, M. G., Cheah, Y. K., (2010). Detection of *Listeria monocytogenes* in foods. *Int. Food Res. J.* 17: 1-11.
- Kalra, K. (i.a) Method Development and validation of Analytical Procedures. Quality Control of Herbal Medicines and Related Areas. Dev Bhoomi Institute of Pharmacy and Research.

[http://cdn.intechopen.com/pdfs/23463/InTechMethod\\_development\\_and\\_validation\\_of\\_analytical\\_procedures.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/23463/InTechMethod_development_and_validation_of_analytical_procedures.pdf)

Karki, T., (1998). Kliinilise mikrobioloogia käsiraamat, toimetajad M. Mikelsaar ja R. Mändar. AS Medicinia, Tallinn. Lk 289-291.

Kasalica, A., Vukovic, V., Vranjes, A., Memiši, N., (2011). *Listeria monocytogenes* in milk and dairy products. Biotechn. Anim. Husb., 27(3): 1067-1082.

Krascenicsova, K., Piknova, L., Kaclikova, E., Kuchta, T., (2007). Detection of *Salmonella enterica* in food using two-step enrichment and real-time polymerase chain reaction. Lett. Appl. Microbiol., 46: 483-487.

Kramarenko, T., Roasto, M., Meremäe, K., Koningas, M., Pöltsama, P., Elias, T., (2012). *Listeria monocytogenes* prevalence and serotype diversity in various foods. Food Cont., 30(1): 24-29.

Lakicevic, B., Stjepanovic, A., Milijašević, M., Terzic-Vidojevic, A., Golic, N., Topisirovic, L., (2010). The presence of *Listeria spp.* And *Listeria monocytogenes* in a chosen food processing establishment in Serbia. Arch. Biol. Sci. Belgrade, 62(4): 881-887.

Liu, D., (2004). *Listeria monocytogenes*: comparative interpretation of mouse virulence assay. FEMS Microbiol. Lett., 233: 159-164.

Liu, D., (2006). Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. J. Med. Microbiol., 55: 645-659.

Lombard B., Leclercq A., (2010). Validation of innovative food microbiological methods according to the EN ISO 16140 standard. Food Anal. Methods, 4: 163-172.

Lomonaco, S., Verghese, B., Gerner-Smidt, P., Tarr, C., Gladney, L., Joseph, L., Katz, L., Turnsek, M., Frace, M., Chen, Y., Brown, E., Meinersmann, R., Berrang, M., Knabel, S., (2013). Novel epidemic clones of *Listeria monocytogenes*, United States, 2011. Emerg. Infect. Dis., 19(1): 147-150.

Luo, Z., Li, Z., Chen, K., Liu, R., Li, X., Cao, H., Zheng, S. J., (2012). Engagement of heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M with listeriolysin O induced type I interferon expression and restricts *Listeria monocytogenes* growth in host cells. Immunology, 217: 972-981.

McLauchlin, J., Mitchell, R. T., Smerdon, W. J., Jewell, K., (2004). *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods. Int. J. Food Microbiol., 92: 15-33.

Miettinen, M. K., Siitonen, A., Heiskanen, P., Haajanen, H., Björkroth, K. J., Korkeala, H. J., (1999). Molecular epidemiology of an outbreak of febrile gastroenteritis caused by *Listeria monocytogenes* in cold-smoked rainbow trout. J. Clin. Microbiol., 37(7): 2358-2360.

Morobe I. C., Obi C. L., Nyila M. A., Matsheka M. I., Gashe B. A. (2012). Molecular characterization and serotyping of *Listeria monocytogenes* with a focus on food safety and disease prevention. Biochemical Testing, 8: 197-216.

Norton, D. M., (2002). Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples. *J. AOAC Int.*, 85(2): 505-515.

O'Connor, L., (2003). Detection of *Listeria monocytogenes* using PCR/DNA probe assay. *Methods Mol. Biol.*, 216: 185-192.

Orsi, R. H., den Bakker, H. C., Wiedmann, M. (2011). *Listeria monocytogenes* lineages: Genomics, evolution, ecology and phenotypic characteristics. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 79-96.

Pontello, M., Guaita, A., Sala, G., Cipolla, M., Gattuso, A., Sonnessa, M., Gianfranceschi, M. V., (2012). *Listeria monocytogenes* serotypes in human infections (Italy, 2000-2010). *Ann. Ist. Super Sanita*, 48(2): 146-150.

Protocol for the validation of alternative microbiological methods. (2009). Nordval. c/o National Veterinary Institute. <http://www.nmkl.org/NordVal/NordValprotocolmarch2009.pdf>

Ragon, M., Wirth T., Hollandt, F., Lavenir, R., Lecuit, M., Monnier, A. L., Brisse, S., (2008). A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. *PloS Pathogens*, Vol. 4 (9): e1000146.

Roasto, M., (2011). *Listeria monocytogenes* toidupatogeenina. <http://www.listeriamonocytogenes.edicypages.com/en>

Rocourt, J., Buchrieser, C., (2007). The genus *Listeria* and *Listeria monocytogenes*: phylogenetic position, taxonomy, and identification. *Listeria, Listeriosis, and Food Safety*, 3: 1-20.

Ross, R. P., Morgan, S., Hill, C., (2002). Preservation and fermentation: past, present and future, *Int. J. Food Microbiol.*, 79: 3-16.

Rossen, L., Norskov, P., Holmstrom, K., Rasmussen, O. F., (1992). Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions. *Int. J. Food Microbiol.*, 17(1): 37-45.

SantaLucia, J., 1998. A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 95(4): 1460-1465.

Serraino, A., Giacometti, F., Piva, S., Florio, D., Pizzamiglio, V., Zanoni, R. G., (2011). Isolation of glucosidase and phospholipase positive *Bacillus circulans* on ALOA medium. *Lett. Appl. Microbiol.*, 53: 244-246.

Shen, J., Rump, L., Zhang, Y., Chen, Y., Wang, X., Meng, J., (2013). Molecular subtyping and virulence gene analysis of *Listeria monocytogenes* isolates from food. *Food Microbiol.* 35: 58-64.

Schlech, W., (2000). Foodborne listeriosis. *Clin. Infect. Dis.*, 31: 770-775.

Slama, R. B., Miladi, H., Chaieb, K., Bakhrouf, A., (2013). Survival of *Listeria monocytogenes* cells and the effect of extended frozen storage (-20 °C) on the expression of its virulence gene. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 170: 1174-1183.

Swetha, C. S., Rao, M. T., Krishnaiah, N., Kumar, V. (2012). Detection of *Listeria monocytogenes* in fish samples by PCR assay. Scholars Research Library. Annals of Biological Research, 3 (4): 1880-1884.

Temple, M. E., Nahata, M. C., (2000). Treatment of listeriosis. An. Pharmac., 34: 656-661.

Thevenot, D., Dernburg, A., Vernozy-Rozand, C., (2006). An update review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. J. Appl. Microbiol., 101: 7-17.

Thompson, M., Ellison, L. R. S., Wood, R. (2002). Harmonized guidelines for single laboratory validation of methods of analysis. Pure Appl. Chem., 74 (5): 835-855.

Vencia, W., Nogarol, C., Bianchi, D. M., Gallina, S., Zuccon, F., Adriani, D., Gramaglia, M., Decastelli, L., (2014). Validation according to ISO 16140:2003 of a commercial real-time PCR-based method for detecting *Campylobacter jejuni*, *C. coli* and *C. lari* in foods. Int. J. Food Microbiol., 177: 78-80.

Vergheze, B., Lok, M., Wen, J., Alessandria, V., Chen, Y., Kathariou, S., Knabel, S., (2011). *comK* prophage junction fragments as markers for *Listeria monocytogenes* genotypes unique to individual meat and poultry processing plants and a model for rapid niche-specific adaptation, biofilm formation and persistence. Appl. Environ. Microbiol., 7(10): 3279-3292.

Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., Lane, D. J., (1991). 16S Ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. J. Bacteriol., 173(2): 697-703.

Wunderlichova, L., Bunkova, L., Koutny, M., Valenta, T., Bunka, F., (2013). Novel touchdown-PCR method for the detection of putrescine producing Gram-negative bacteria in food products. Food Microbiol., 34: 268-276.

## **KASUTATUD VEEBIAADDRESSID**

[http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out25_en.pdf)

<http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/RiskSafetyAssessment/ucm184052.htm>

<http://www.terviseamet.ee/fileadmin/dok/Nakkushaigused/nakkused/Listerioos.pdf>

<http://www.terviseamet.ee/nakkushaigused/nakkushaigustesse-haigestumine.html>

[http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST\\_PROGRAMS=megaBlast&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&SHOW\\_DEFAULTS=on&LINK\\_LOC=blasthome](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome).

[http://www.scied.com/pr\\_cmpro.htm](http://www.scied.com/pr_cmpro.htm)

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3129.pdf>

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3241.pdf>

<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/3502.pdf>

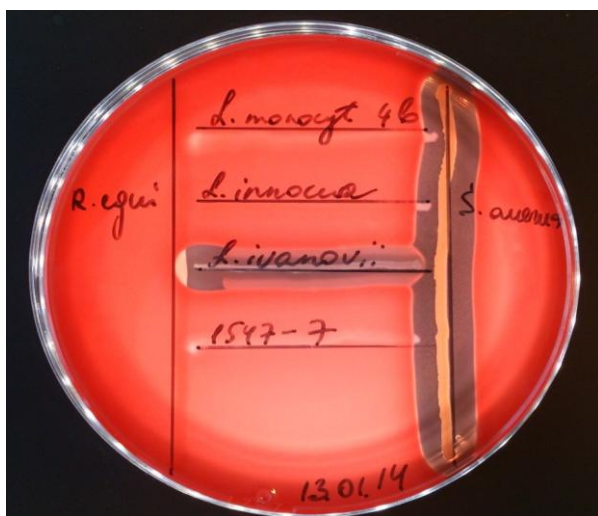
[http://cdn.intechopen.com/pdfs/23463/InTechMethod\\_development\\_and\\_validation\\_of\\_analytical\\_procedures.pdf](http://cdn.intechopen.com/pdfs/23463/InTechMethod_development_and_validation_of_analytical_procedures.pdf)

<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/ABH11351>

## LISAD

### LISA 1

*L. monocytogenes*'e tuvastamiseks läbiviidud CAMP-test:



### LISA 2

Bakteriaalse DNA eraldamise eeskiri:

1. 1 ml selektiivrikastuse puljongit pipeteeritakse 1,5 ml plasttuubi ja tsentrifugeeritakse tsentrifugaaljõuga 11000x g 3 minutit,
2. kogu supernatant eemaldatakse,
3. sademele lisatakse 400 µl puhvrit Resuspension Buffer ja segatakse lahust üles–alla pipeteerides,
4. suspensioon tõstetakse tuubidesse Extraction Tube L (milles on pulbriline lüsoosüüm, lüüsi puhver ja proteinaas K), tuube segatakse lühidalt vorteks–mikseril,
5. proove inkubeeritakse termostaatmikseris 10 minutit temperatuuril 37 °C, 10 minutit 65 °C ja 10 minutit 95 °C, pidev loksumine suurendab lüüsi efektiivsust.
6. Pärast inkubeerimist lisatakse proovidele 400 µl puhvrit Binding Buffer B6 ja segatakse lühidalt vorteks–mikeril,
7. proovimaterjal tõstetakse tuubidesse RTA Spin Filter Set ning inkubeeritakse toatemperatuuril 2 minutit (DNA seondub filtrile), tsentrifugeeritakse tsentrifugaaljõuga 11000x g 2 minutit,
8. filtraat visatakse minema ja filter DNA-ga asetatakse tagasi tuubi RTA Receiver,
9. lisatakse 500 µl puhvrit Wash Buffer I ja tsentrifugeeritakse tsentrifugaaljõuga 11000x g 1 minut,
10. filtritud vedelik eemaldatakse ja filter DNA-ga asetatakse uude tuubi RTA Receiver,
11. lisatakse 600 µl puhvrit Wash Buffer II ja tsentrifugeeritakse tsentrifugaaljõuga 11000x g 1 minut,
12. filtritud vedelik eemaldatakse ja filter asetatakse samasse tuubi RTA Receiver ning tsentrifugeeritakse maksimumpööratel 2 minutit ja 30 sekundit,
13. filter asetatakse uude 1,5 ml tuubi RTA Receiver ja lisatakse 100 µl Elution Buffer D puhvrit (vabastamaks DNA filtri küljest). Elueerimispuhver on soojendatud temperatuurini 56 °C,
14. proove inkubeeritakse 2 minutit toatemperatuuril ja tsentrifugeeritakse tsentrifugaaljõuga 11000x g 1 minut. DNA-d sisaldav eluaat kogutakse ja hoiustatakse edasiseks analüüsiks -20 °C juures.

### LISA 3

PCR reaktsioonides kasutatud valmissegud (Solis BioDyne, Eesti):

1. *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>* mastermixi koostis:
  - HOT FIREPol® DNA polümeraas
  - Proofreading ensüüm
  - 5x Blend Master Mix puhver
  - 7.5 mM MgCl<sub>2</sub>
  - *1x PCR reaktsioonisegus – 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>*
  - 2 mM dNTPs igat nukleotiidi
  - *1x PCR reaktsioonisegus– 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP and 200 μM dTTP*
  - BSA (Veise seerumi albumiin - *Bovine Serum Albumin*)
  - Sinine värv- (*Migration equivalent to 3.5-4.5 kb DNA fragment*)
  - Kollane värv- (*Migration rate in excess of primers in 1% agarose gel: <35-45 bp*)
  
2. PCR reaktsioonisegu *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 10 mM MgCl<sub>2</sub>* mastermixi koostis:
  - HOT FIREPol® DNA polümeraas
  - Proofreading ensüüm
  - 5x Blend Master Mix puhver
  - 10 mM MgCl<sub>2</sub>
  - *1x PCR reaktsioonisegus – 2,0 mM MgCl<sub>2</sub>*
  - 2 mM dNTPs igat nukleotiidi
  - *1x PCR reaktsioonisegus– 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP and 200 μM dTTP*
  - BSA (Veise seerumi albumiin - *Bovine Serum Albumin*)
  - Sinine värv- (*Migration equivalent to 3.5-4.5 kb DNA fragment*)
  - Kollane värv- (*Migration rate in excess of primers in 1% agarose gel: <35-45 bp*)
  
3. PCR reaktsioonisegu *5x HOT FIREPol® Blend Master Mix Ready to Load (-) with BSA and 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>* mastermixi koostis:
  - HOT FIREPol® DNA polümeraas
  - Proofreading ensüüm
  - 5x Blend Master Mix puhver

- 12. 5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 1x PCR reaktsioonisegus – 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 2 mM dNTPs igat nukleotiidi
- 1x PCR reaktsioonisegus– 200 μM dATP, 200 μM dCTP, 200 μM dGTP and 200 μM dTTP
- BSA (Veise seerumi albumiin - *Bovine Serum Albumin*)
- Sinine värv- (*Migration equivalent to 3.5-4.5 kb DNA fragment*)
- Kollane värv- (*Migration rate in excess of primers in 1% agarose gel: <35-45 bp*)

## LISA 4

16S rRNA geeni amplifitseerimiseks PCR-metoodika optimeerimises kasutatud programmid:

### 1. „Vana programm“

1. PCR masina kaane kuumutus – kuni 99 °C
2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon temperatuuril 95 °C 15 minutit.

Järgnevat 3 etappi korratakse 35 tsükli:

3. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 1 minut, 95°C.
4. Praimerite seondumine DNA-ga 1 minut, 53 °C.
5. Uue DNA ahela süntees 3 minut, 72 °C.
6. DNA sünteesijärgne lisaetapp 10 minutit, 72 °C.
7. PCR saadusi sünteesijärgne hoidmine 10 °C.

PCR programmi pikkus on 3 tundi ja 34 minutit.

### 2. „Nr.1 uus programm“

1. PCR masina kaane kuumutus – kuni 99 °C
2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon temperatuuril 95 °C 15 minutit.

Järgnevat 3 etappi korratakse 26 tsükli:

3. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 1 minut, 95°C.
4. Praimerite seondumine DNA-ga 1 minut, 53 °C.
5. Uue DNA ahela süntees 1 minut, 72 °C.
6. DNA sünteesijärgne lisaetapp 10 minutit, 72 °C.
7. PCR saadusi sünteesijärgne hoidmine 10 °C.

PCR programmi pikkus on 2 tundi ja 3 minutit.

### 3. „Nr.2 uus programm“

1. PCR masina kaane kuumutus – kuni 99 °C
2. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon temperatuuril 95 °C 15 minutit.

Järgnevat 3 etappi korratakse 28 tsükli:

3. Matriits-DNA kaksikahela denaturatsioon 1 minut, 95°C.
4. Praimerite seundumine DNA-ga 1 minut, 53 °C.
5. Uue DNA ahela süntees 1 minut, 72 °C.
6. DNA sünteesijärgne lisaetapp 10 minutit, 72 °C.
7. PCR saadusi sünteesijärgne hoidmine 10 °C.

PCR programmi pikkus on 2 tundi ja 10 minutit.

## LISA 5

- a. Praimerite LM\_F2/LM\_R2 spetsiifilisuse analüüsimiseks kasutatud BLAST algoritmis valitud parameetrid.

The image shows a screenshot of the NCBI BLAST search interface. The parameters are as follows:

- Database:** Nucleotide collection (nr/nt)
- Organism:** Listeria monocytogenes (taxid:1639)
- Exclude:** Models (XM/XP) and Uncultured/environmental sample sequences are unchecked.
- Entrez Query:** Empty field.
- Program Selection:** Highly similar sequences (megablast) is selected.
- General Parameters:** Max target sequences: 100; Short queries: Automatically adjust parameters for short input sequences is checked; Expect threshold: 10; Word size: 28; Max matches in a query range: 0.
- Scoring Parameters:** Match/Mismatch Scores: 1,-2; Gap Costs: Linear.
- Filters and Masking:** Low complexity regions is checked; Species-specific repeats for: Homo sapiens (Human); Mask for lookup table only is checked; Mask lower case letters is unchecked.

**b. Praimeri LM\_F2 BLAST analüüsi tulemus.** Praimeri järjestusega 100% sarnasuse tulemuse andsid erinevad *L. innocua* tüved ja üks *L. ivanovii* tüvi.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain Lin9 listeriolysin O (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808548.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain Lin8 listeriolysin O (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808547.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain Lin7 listeriolysin O (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808546.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain Lin6 listeriolysin O (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808545.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain Lin5 listeriolysin O (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808544.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria ivanovii strain Lm47 listeriolysin O (hly) gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808537.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain FSL W3-075 hemolysin (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">GU810923.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria innocua strain FSL J1-023 hemolysin (hly) gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">GU810922.1</a>

**c. Praimeri LM\_R2 BLAST analüüsi tulemus.** Praimeri järjestusega 100% sarnasuse esineb *L. ivanovii* tüvega ning kahe listeriolüsiini järjestustega kahest sünteetilisest konstruktist.

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> <a href="#">Listeria ivanovii strain Lm47 listeriolysin O (hly) gene, complete cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">KC808537.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct hemolysin BL-listeriolysin O-enterotoxin B fusion protein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">EU912538.1</a>
<input type="checkbox"/> <a href="#">Synthetic construct lytic 1/listeriolysin O fusion protein gene, partial cds</a>	40.1	40.1	100%	0.091	100%	<a href="#">EU716167.1</a>

**d. Praimerite LM\_F2 ja LM\_R2 PCR-reaktsiooniks oluliste omaduste iseloomustamise väljund programmist Clone Manager 9.3 Professional Edition.** Kõik analüüsitud parameetrid vastavad praimerite loomisel etteantud kriteeriumitele.

Primer Definition:

Name: LM\_F2  
Description:  
Notes:

Sequence: GAAACACGCGGATGAAATCG  
Length: 20  
Composition: A: 8 C: 4 G: 6 T: 2  
Molar absorbance: 29.8 µg/ml = 1 OD260  
Analysis criteria: PCR Primer

✓	%GC	Tm°C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	FP
	50	62	OK	2.9	OK	OK	OK	-

PCR Primer: LM\_F2  
One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm°C	Range 55-80	62	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	4	Yes
Stability	>= 1.2 kcal/s 5' vs 3'	2.9	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	2	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes

Primer Definition:

Name: LM\_R2  
 Description:  
 Notes:

Sequence: CGCTTGCAACTGCTCTTTAG  
 Length: 20

Composition: A: 3 C: 6 G: 4 T: 7  
 Molar absorbance: 34.3  $\mu\text{g/ml}$  = 1 OD260

Analysis criteria: PCR Primer

✓	%GC	Tm°C	Dimers	Stability	GC clamp	Runs	Hairpin	FP
	50	61	OK	2.7	OK	OK	OK	-

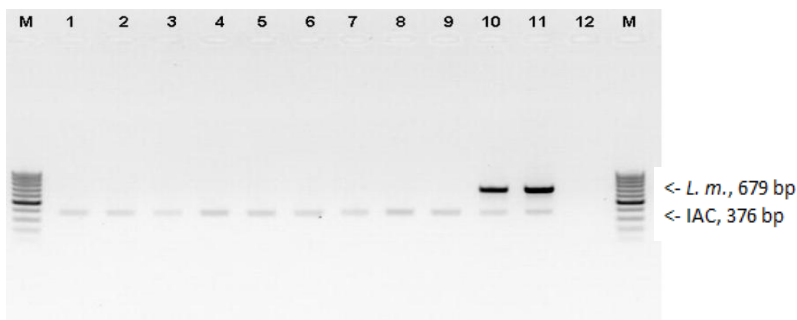
PCR Primer: LM\_R2  
 One Primer Report

Criteria Used:	PCR Primer	This Primer	Meets Criteria
% GC	Range 50-60	50	Yes
Tm°C	Range 55-80	61	Yes
3' Dimers	< 3 matches at 3' end	2	Yes
Dimers-Any	< 7 adj homol bases	6	Yes
Stability	>= 1.2 kcals 5' vs 3'	2.7	Yes
GC clamp	>= 1 G or C at 3' end	1	Yes
Runs	< 4 base runs	3	Yes
Repeats	< 3 dinuc repeats	2	Yes
Hairpins	Annealing 55°C	none	Yes

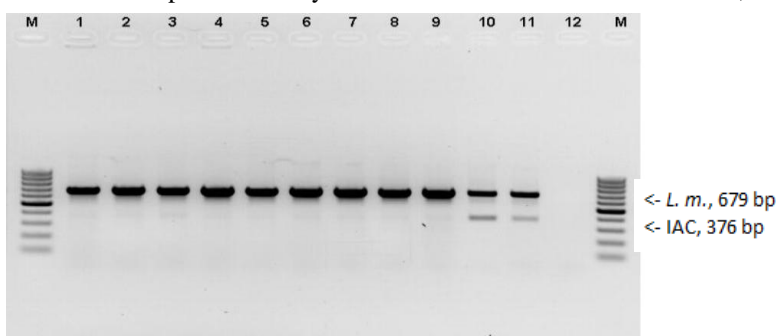
## LISA 6

PCR-analüüside katsetulemused toidu- ja hügieeniproovide kategooriates.

**Hügieeniproovide kategoorias** PCR-meetodil analüüsitud naturaalselt *L. monocytogenes*'ega nakatunud proovid:

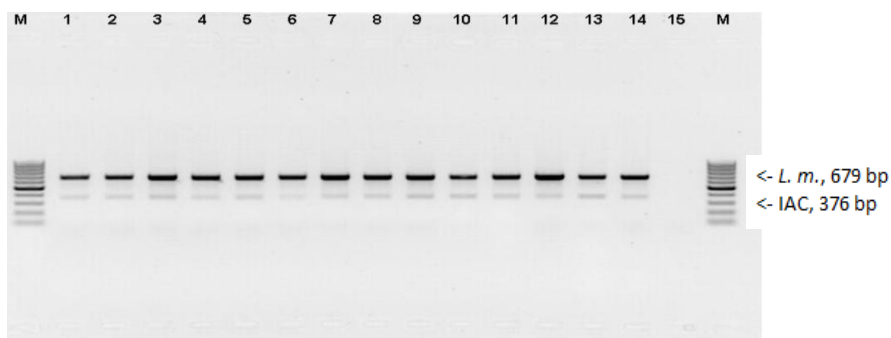


- a. **Naturaalsete (negatiivsete) uhteproovide (NUH) PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 9: NUH-L-II; nr 10: PK *Listeria monocytogenes*; nr 11: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 12: MQ].

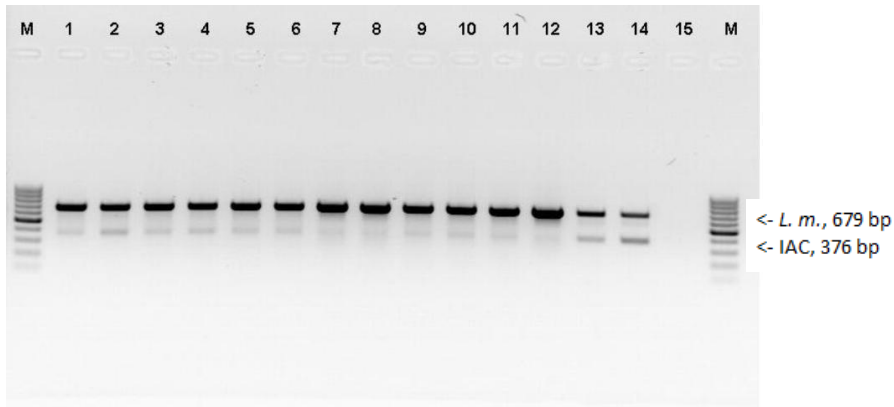


- b. **Naturaalsete (positiivsete) uhteproovide (NUP) PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 9: NUP-L-II; nr 10: PK *Listeria monocytogenes*; nr 11: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli reaktsiooni kohta; nr 12: MQ].

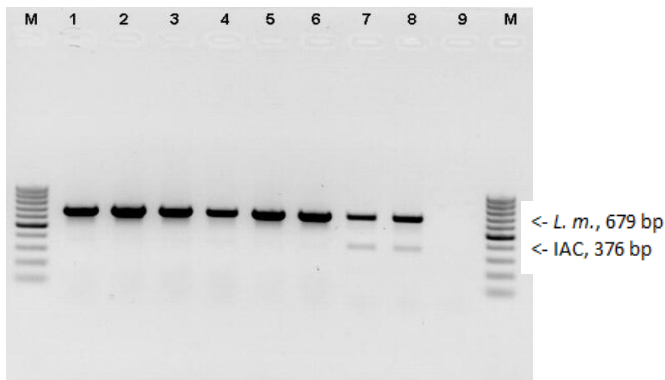
**Lihatoodete kategoorias** analüüsitud naturaalselt *L. monocytogenes*'ega nakatunud ning kunstlikult nakatatud proovide PCR-analüüs:



- c. ***Listeria monocytogenes* inokulumidega 10 - 20 cfu/25g ja 100 – 400 cfu/25 g nakatatud õllepunnide (SAR) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: SAR-L-II-MA10; nr 7-12: SAR-L-II-KA100; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].

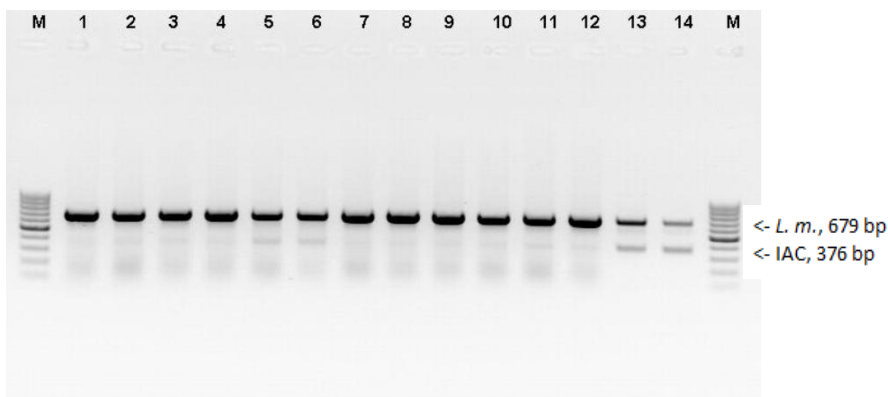


- d. **Naturaalselt nakatunud grillvorstide (NGVO) ja singikreemi (NSK) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: NGVO-L-II; nr 7-12: NSK-L-II; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 15: MQ]

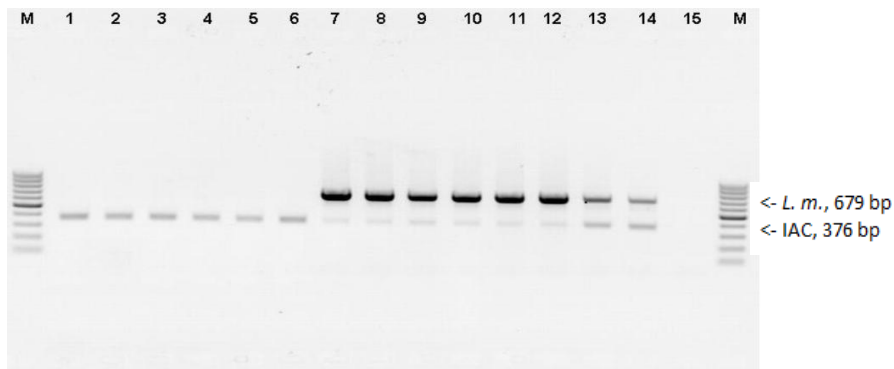


- e. **Naturaalselt nakatunud kanaliha (NKA) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: NKA-L-II; nr 7: PK *Listeria monocytogenes*; nr 8: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 9: MQ].

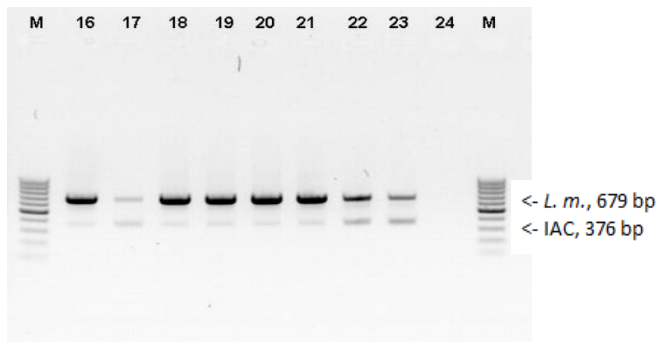
**Piimatoodete kategoorias läbi viidud PCR-meetodi katsetulemused nakatamta ehk naturaalseste ning *Listeria monocytogenes*'ega nakattud proovid:**



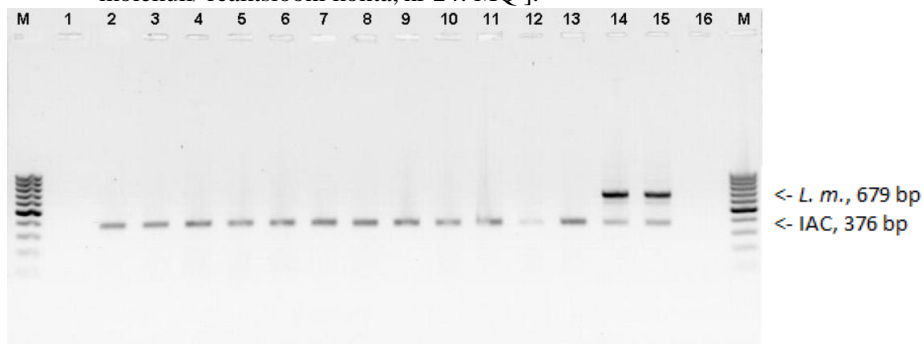
- f. ***Listeria monocytogenes* inokulumidega 10 - 20 cfu/25g ja 100 - 400 cfu/25g nakatatud toorpiima (TRP) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: TRP-L-II-MA10; nr 7-12: TRP-L-II-KA100; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta].



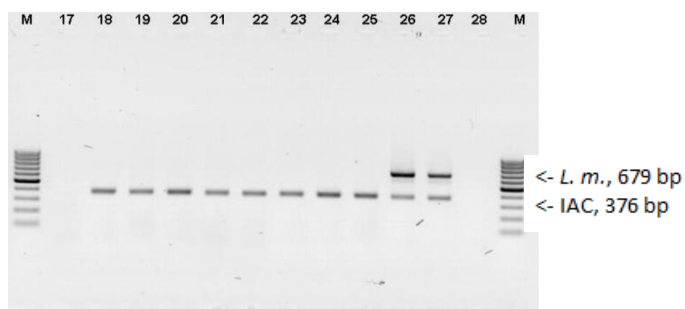
- g. **Nakatamata ja *Listeria monocytogenes* inokulumiga 10 - 20 cfu/25g nakatatud maitsestatamata jogurti (MJ) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: MJ-L-II-NK; nr 7-12: MJ-L-II-MA10; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 15: MQ ].



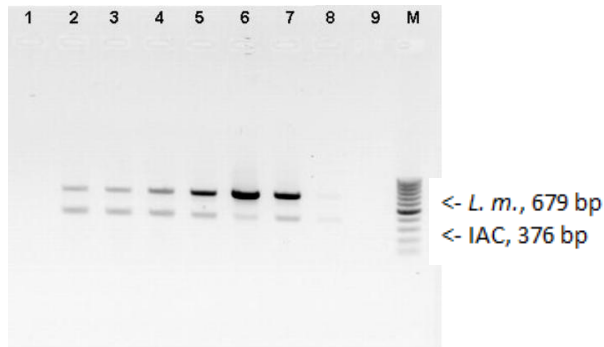
- h. ***Listeria monocytogenes* inokulumiga 100 - 400 cfu/25g nakatatud maitsestatamata jogurti (MJ) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 16 – 21: MJ-L-II-KA100; nr 22: PK *Listeria monocytogenes*; nr 23: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 24: MQ ].



- i. **Naturaalsete (negatiivsete) piimatoodete (NPT) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 13: NPT-L-II; nr 14: PK *Listeria monocytogenes*; nr 15: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 16: MQ].

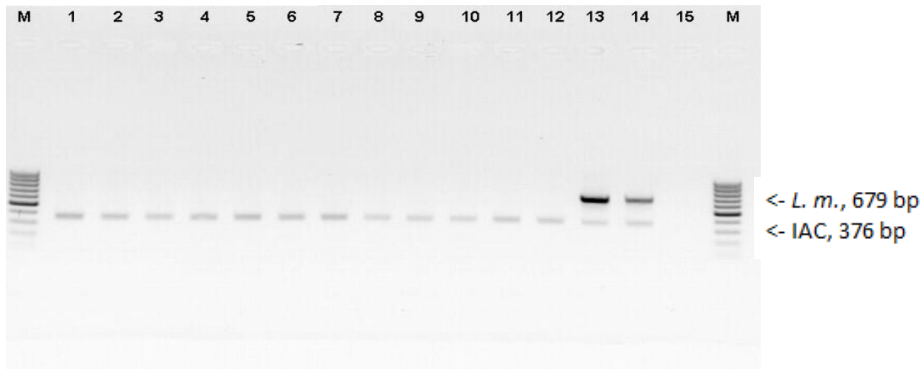


- j. **Naturaalsete (negatiivsete) piimatoodete (NPT) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 17: MQ; nr 18 – 25: NPT-L-II; nr 26: PK *Listeria monocytogenes*; nr 27: pGEM-T Easy LM1/2 10<sup>3</sup> molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 28: MQ].

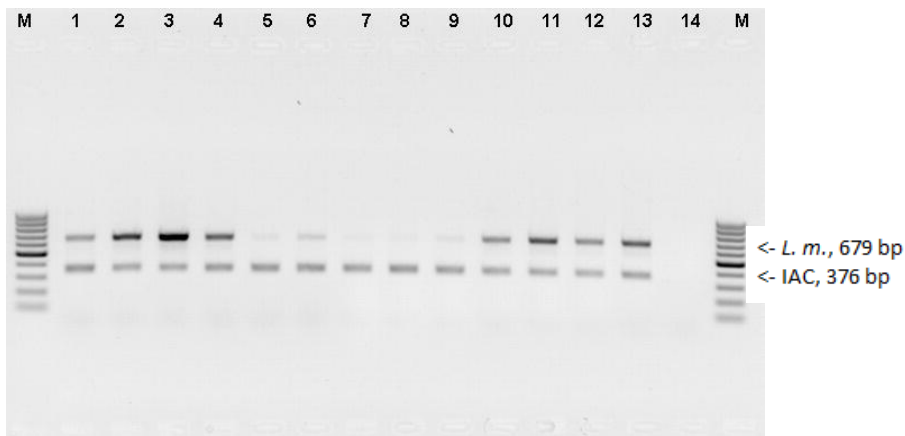


- k. **Naturaalse kakaopudingu (NKP) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 6: NKP-L-II; nr 7: PK *Listeria monocytogenes*; nr 8: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 9: MQ].

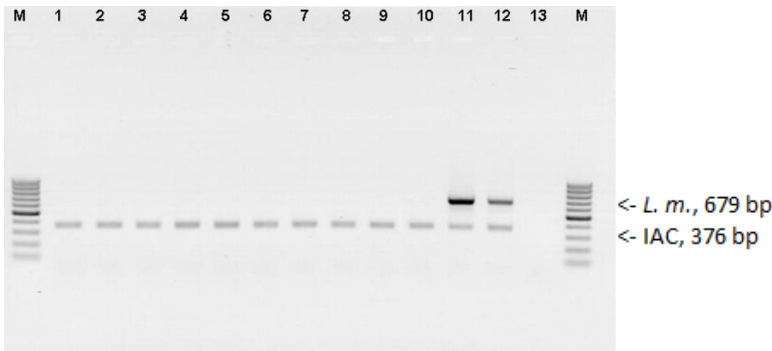
**Kalatoodete kategoorias** läbiviidud PCR-analüüsi katsetulemused naturaalselt *L. monocytogenes*'ega nakatunud ja kunstlikult nakatunud proovide analüüs:



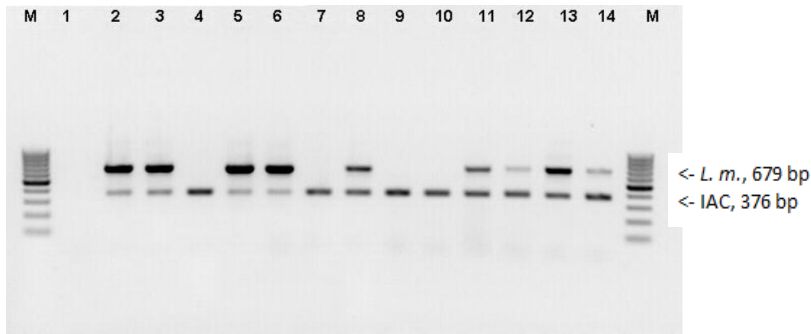
- l. **Nakatamata pangassiuse filee (PG) ja roogitud lõhe (RLÕ) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: PG-L-II-NK; nr 7-12: RLÕ-L-II-MA10; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 15: MQ].



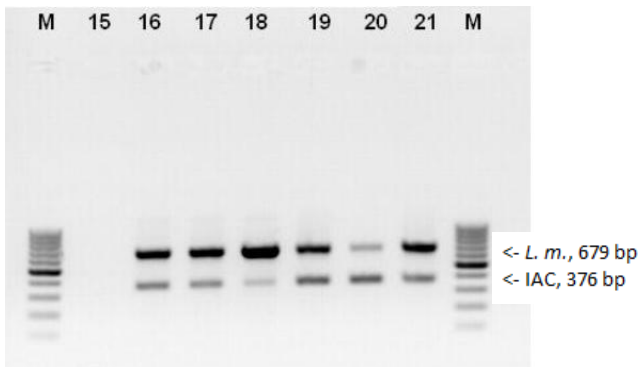
- m. ***Listeria monocytogenes* inokulumidega 10 - 20 cfu/25g ja 100 – 400 cfu/25 g nakatatud roogitud lõhe (RLÕ) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: RLÕ-L-II-MA10; nr 7-12: RLÕ-L-II-KA100; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: MQ].



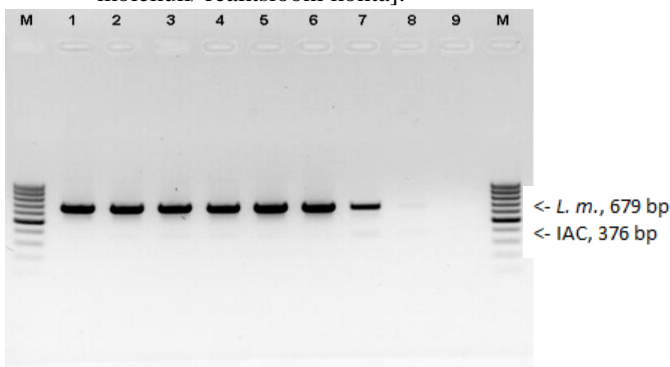
- n. **Naturaalse lõhefilee (NLH) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 10: NLH-L-II; nr 11: PK *Listeria monocytogenes*; nr 12: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 13: MQ].



- o. **Naturaalsete kalatoodete (NKT) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 12: NKT-L-II; nr 13: PK *Listeria monocytogenes*; nr 14: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta].



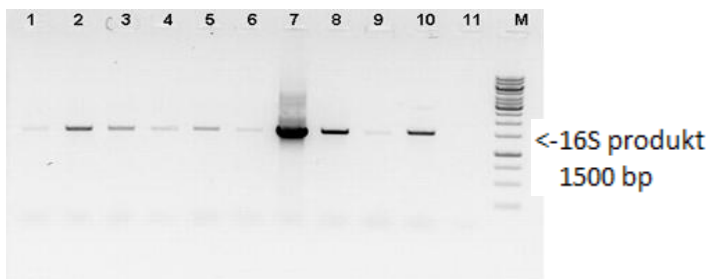
- p. **Naturaalsete kalatoodete (NKT) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 15: MQ; nr 16 – 18: NKT-L-II; nr 19: PK *Listeria monocytogenes*; nr 20: pGEM-T Easy LM1/2  $10^2$  molekuli/ $\mu$ l kohta; nr 21: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta].



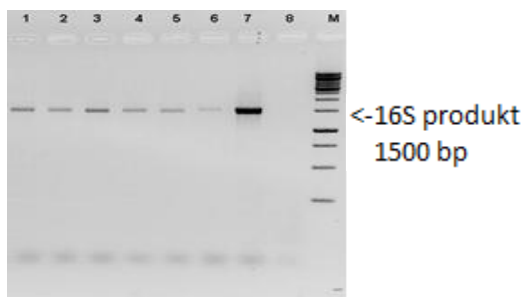
- q. **Naturaalse külmsuitsu lõhefilee (NKL) proovide PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1 – 6: NKL-L-II; nr 7: PK *Listeria monocytogenes*; nr 8: pGEM-T Easy LM1/2  $10^3$  molekuli/ reaktsiooni kohta; nr 9: MQ].

## LISA 7

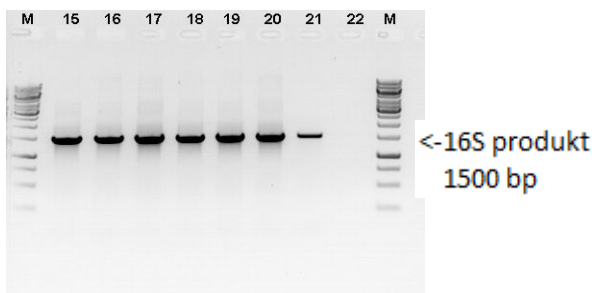
16S rRNA analüüs *L. monocytogenes*'e suhtes negatiivseks jäänud proovidele:



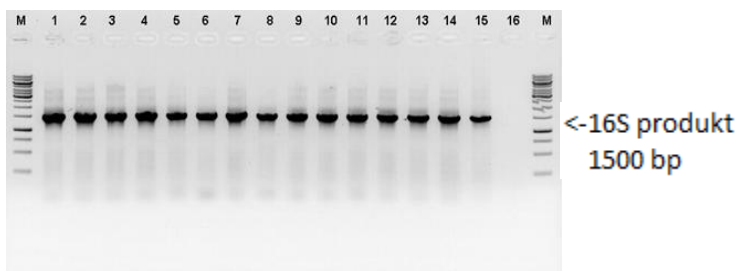
- a. **Naturaalsete (negatiivsete) uhteproovide (NUH) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 9: NUH-L-II; nr 10: PK *Listeria monocytogenes*; nr 11: MQ].



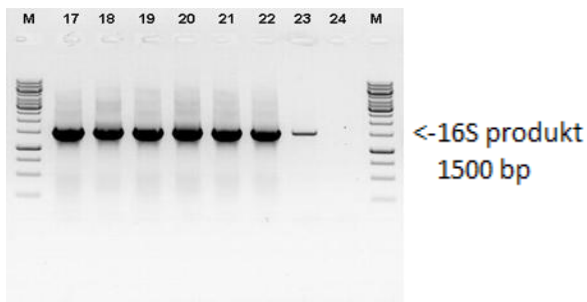
- b. **Õllepunnid juustuga (SAR) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 6: VO-L-II-NK; nr 7: PK *Listeria monocytogenes*; nr 8: MQ].



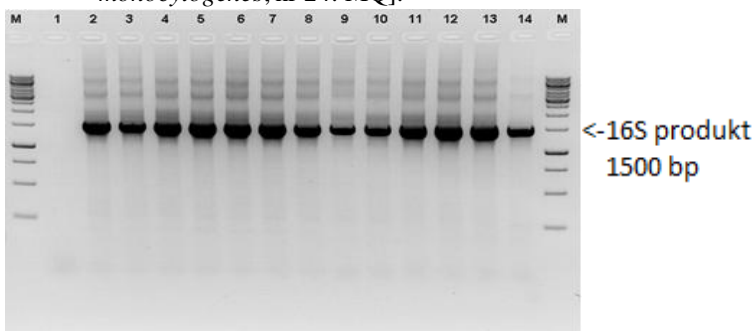
- c. **Nakatamata maitsestatamata jogurti (MJ) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 6: MJ-L-II-NK].



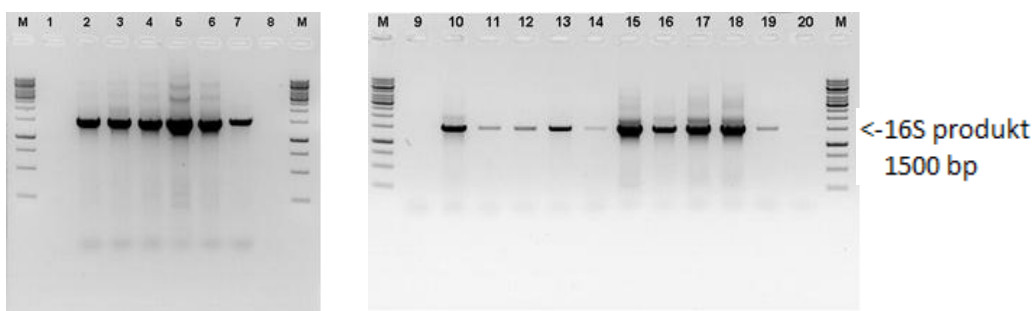
- d. **Naturaalsete (negatiivsete) piimatoodete (NPT) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 14: NPT-L-II; nr 15: PK *Listeria monocytogenes*; nr 16: MQ].



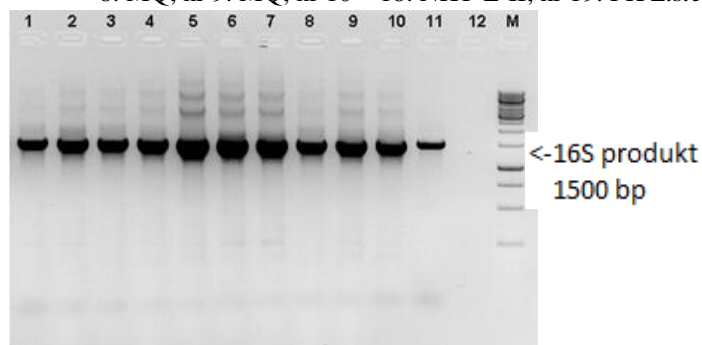
- e. **Naturaalsete (negatiivsete) piimatoodete (NPT) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 17 – 22: NPT-L-II; nr 23: PK *Listeria monocytogenes*; nr 24: MQ].



- f. **Nakatamata pangassiuse filee (PG) ja roogitud lõhe (RLÕ) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 7: PG-L-II-NK; nr 8 - 13: RLÕ-L-II-MA10; nr 14: PK *Listeria monocytogenes* ].



- g. **Naturaalsete kalatoodete (NKT) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder); nr 1: MQ; nr 2 – 6: NKT-L-II; nr 7: PK *Listeria monocytogenes*; nr 8: MQ; nr 9: MQ; nr 10 – 18: NKT-L-II; nr 19: PK *Listeria monocytogenes*; nr 20: MQ].



- h. **Naturaalse lõhefilee (NLH) 16S rRNA PCR-analüüs** [M – suurusmarker (Thermo Scientific; GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder); nr 1 – 10: NLH-L-II; nr 11: PK *Listeria monocytogenes*; nr 12: MQ].

## Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina Merlin Soopere

(sünnikuupäev: 27.02.1989)

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

„PCR-meetodi optimeerimine ja valideerimine *Listeria monocytogenes*'e tuvastamiseks toidu- ja keskkonnaproovidest“,

mille juhendajad on Ene Talpsep ja Tiina Alamäe,

1.1. reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2. üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu alates **25.05.2019** kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, 26.05.2014