

## Záverečná karta projektu

Názov projektu Evidenčné číslo projektu **APVV-16-0119**

**Priama nekultivačná kvantitatívna detekcia bakteriálnych patogénov v tradičných slovenských a importovaných potravinárskych výrobkoch živočíšneho pôvodu**

Zodpovedný riešiteľ **Ing. Eva Kaclíková, CSc.**

Príjemca **Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav potravinársky**

### Názov pracoviska, na ktorom bol projekt riešený

Národné poľnohospodárske a potravinárske centrum - Výskumný ústav potravinársky

### Názov a štát zahraničného pracoviska, ktoré spolupracovalo pri riešení

-

### Udelené patenty/podané patentové prihlášky, vynálezy alebo úžitkové vzory, ktoré sú výsledkami projektu

-

### Najvýznamnejšie publikácie (knihy, články, prednášky, správy a pod.) zhrňujúce výsledky projektu – uveďte aj publikácie prijaté do tlače

Minarovičová J. – Véghová, A. – Kaclíková, E. (2020) Evaluation of DNA extraction methods for culture-independent real-time PCR-based detection of *Listeria monocytogenes* in cheese. *Food Analytical Methods*, 13 (10), 667-677.

Minarovičová, J. – Véghová, A. – Kaclíková, E. (2020) Evaluation of immunomagnetic separation and polymerase chain reaction for culture-independent detection of *Listeria monocytogenes* low numbers in cheese. *Journal of Food and Nutrition Research*, 59, 120-126.

Markusková, B. – Lichvariková, A. – Drahovská, H. (2019) Sekvenovanie DNA v laboratórnej diagnostike bakteriálnych patogénov. *NewsLab*. - Roč. 10, č. 1, s. 25-27. ISSN (print) 1338-9661 ISSN (online) 2454-0021.

Kaclíková, E. – Minarovičová, J. – Véghová, A.: Nekultivačná detekcia *Listeria monocytogenes* v syroch založená na analýze DNA (Non-culture detection of *Listeria monocytogenes* in cheeses based on DNA analyses). *Trendy v potravinárstve* 23 (2), 2018, s. 100-102. ISSN 1336-085X

### Uplatnenie výsledkov projektu

Publikované výsledky riešenia projektu - zdokonalené rýchle metódy detekcie patogénov v potravinách

Priama nekultivačná detekcia *Listeria monocytogenes* v syroch založená na extrakcii celkovej DNA a vysoko špecifickej real-time PCR, vnútrolaboratórne validovaná metóda

adaptovateľná aj na iné bakteriálne patogény a potravinové matrice  
Priama nekultivačná detekcia *Listeria monocytogenes* v syroch založená na imunoseparácii a real-time PCR, vnútrolaboratórne validovaná metóda adaptovateľná aj na iné bakteriálne patogény a potravinové matrice  
Štúdiá vplyvu rôznych metód extrakcie DNA zo syrovej matrice na výsledky analýzy mikrobiómu sekvenovaním amplicónu 16S rRNA použitím Miseq a NextSeq platformy

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v slovenskom jazyku (max. 20 riadkov)**

Extrakcia DNA je rozhodujúcim krokom pre úspech následnej analýzy založenej na amplifikácii pre nekultivačnú mikrobiálnu detekciu. Na extrakciu DNA sa použili dva laboratórne extrakčné postupy a päť súprav. Extrakčné postupy sa hodnotili kvantitatívnou PCR extrahovanej bakteriálnej DNA zo vzoriek syrov umelo kontaminovaných *L. monocytogenes*. Všetky extrakčné postupy viedli k amplifikovateľnej bakteriálnej DNA, aj keď s rôznymi detekčnými limitmi *L. monocytogenes*. Súpravy PowerFood a DNeasy Mericon dosiahli najlepšie výsledky s detekčnými limitmi 210-470 KTJ/g. Hodnotil sa aj potenciál imunomagnetickkej separácie (IMS) na kultivačne nezávislú PCR detekciu nízkeho počtu *L. monocytogenes* v syroch. Na umelo kontaminované syry sa aplikovala IMS a následnou jednoduchou lýzou a špecifická real-time PCR. Získali sa výsledky s detekčným limitom 160-200 KTJ/g bez negatívneho vplyvu relatívne vyššieho obsahu prírodnej mikroflóry v syroch. Výsledky preukázali, že vyvinuté a optimalizované postupy majú potenciál priamej detekcie nízkeho počtu *L. monocytogenes* v syroch v priebehu niekoľkých hodín, pričom sú adaptovateľné a aplikovateľné pre iné bakteriálne patogény a potravinové matrice. Vplyv rôznych metód extrakcie DNA na výsledky analýz bakteriálnych spoločenstiev v syre sa hodnotil na základe sekvenovania 1465 bp amplicónu 16S rRNA. Zistilo sa, že šesť postupov extrakcie DNA poskytlo bakteriálnu DNA vhodnú pre 16S rRNA sekvenačnú analýzu, ale jednotlivé extrakčné postupy viedli k variabilným výsledkom. Najmä mechanicky podporená lýza použitím guľôčok v súprave PowerFood viedla k vyššiemu relatívnemu podielu G+ baktérií v profilochoch, pravdepodobne pre účinnejšie rozrušenie bunkovej steny.

### **Súhrn výsledkov riešenia projektu a naplnenia cieľov projektu v anglickom jazyku (max. 20 riadkov)**

DNA extraction is a crucial step for the success of amplification-based downstream analysis for a microbial culture-independent detection. Two open-formula extraction procedures and five kits were used to extract DNA prior to detection of *L. monocytogenes* in cheese. The extraction procedures were evaluated in qPCR analyses of extracted bacterial DNA from artificially contaminated samples. All seven extraction procedures provided intact and amplifiable bacterial DNA, although with different detection limits. PowerFood and DNeasy Mericon kits performed the best with detection limits of 210-470 CFU/g. A potential of immunomagnetic separation for culture-independent determination of *L. monocytogenes* low numbers in cheese was evaluated. IMS followed by simple lysis and specific real-time PCR was applied on artificially contaminated cheese. Results were obtained in five hours with detection limit of 160-200 CFU/g with no negative effect due to relatively higher content of natural microflora. The evaluated procedures proved to be the fast methods for *L. monocytogenes* low numbers detection in cheese in hours. Both methods should be adapted and used for other bacterial pathogens and food matrices. The impact of different DNA extraction methods was evaluated on the results of bacterial communities analyses in cheese based on sequencing of 1465 bp 16S rRNA amplicon. Six DNA extraction procedures were found to be able to provide bacterial DNA suitable for 16S rRNA sequencing, but individual extraction procedures led to variable results. In particular, lysis supported with bead-beating in PowerFood kit led to a higher proportion of G+ bacteria in relative abundance profiles, probably because of the more efficient cell wall disruption