

LAMP test usmjeren na gen *inIA* za detekciju bakterije *Listeria monocytogenes* u hrani

SAŽETAK

Pozadina istraživanja. Za detekciju bakterije *Listeria monocytogenes* u hrani razvijeno je nekoliko LAMP (*engl.* loop-mediated isothermal amplification (LAMP)) testova; međutim, rijetki su primjeri u kojima se ekstrakcija DNA, amplifikacija i detekcija mogu provesti u jednoj epruveti.

Ekperimentalni pristup. Učinkovitost ekstrakcije DNA pomoću pufera za lizu stanica ispitana je primjenom LAMP testa. Novi setovi početnica za LAMP testove dizajnirani su programom PrimerExplorer V5. Osjetljivost i specifičnost unutarnjih LAMP početnica određene su optimiranjem metode PCR. Završna detekcija uključivala je elektroforezu u gelu, mjerenje zamućenja te kolorimetrijsku reakciju s eriochrome black T (EBT). Osjetljivost, specifičnost i granica detekcije razvijenih LAMP testova potom su određeni primjenom sojeva *L. monocytogenes*, drugih vrsta roda *Listeria* koje nisu *L. monocytogenes*, te bakterija koje ne pripadaju rodu *Listeria*.

Rezultati i zaključci. Alkalna liza stanica temeljena na natrijevom hidroksidu i puferu Tris-HCl (HotSHOT)+Tween, kao i pufer TZ koji sadržava Triton X-100 i natrijev azid, omogućili su dobivanje DNA prikladne za LAMP testove. Međutim, pufer TZ dao je statistički značajno veći prinos DNA u odnosu na pufer HotSHOT+Tween. LAMP početnice dizajnirane su za ciljanje virulentnih gena *hlyA* i *inIA* bakterije *L. monocytogenes*. Osjetljivost i specifičnost unutarnjih LAMP početnica iznosile su 100 % za oba gena; međutim, PCR reakcija usmjerena na gen *inIA* generirala je manje nespecifičnih produkata u usporedbi s reakcijom usmjerenom na gen *hlyA*. Osjetljivost LAMP testa za *inIA* iznosila je 100 %, dok je njegova specifičnost bila 96 %. Granica detekcije iznosila je 500 fg po reakciji, što odgovara 157 kopija genoma. Kombinacija ekstrakcije DNA, LAMP amplifikacije i završne kolorimetrijske detekcije u jednoj epruveti rezultirala je LAMP testom pogodnim za detekciju *L. monocytogenes* u hrani u laboratorijskim uvjetima, s potencijalom za daljnji razvoj za terensku primjenu na mikrofluidičkim platformama.

Novina i znanstveni doprinos. Prema našim saznanjima, ovo je prvo izvješće o LAMP testu usmjerenom na gen *inIA* bakterije *L. monocytogenes*. Razvijeni LAMP test u jednoj epruveti prikladan je za integraciju s mikrofluidičkim sustavima.

Ključne riječi: LAMP test; *Listeria monocytogenes*; detekcija; *inIA*