

ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΤΡΟΦΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ *SALMONELLA* ΚΑΙ *LISTERIA* ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

Λαμπιδώνης Αντώνης,¹ Αγγελολιαννάκης Ιωάννης,¹ και Σειραγάκης Γιώργος²

¹Food Allergens Lab, Ποσειδώνος 1, 74100, Ρέθυμνο, Κρήτη

²Food Allergens Lab, Κ. Βάρναλη 40, 14231 Ν. Ιωνία, Αττική, Αθήνα

email: foodallergenslab@gmail.com

Περίληψη

Οι πρόσφατες εξελίξεις στον τομέα της διαγνωστικής Μοριακής Βιολογίας επιτρέπουν νέες προσεγγίσεις στην ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των παθογόνων οργανισμών, όπου αυτό είναι δυνατό, στα τρόφιμα. Στην ανάλυση τροφίμων νέες τεχνικές Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) επιτρέπουν την ταχύτερη διάγνωση συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους Μικροβιολογίας. Οι αντιδράσεις PCR στηρίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων περιοχών γονιδίων-στόχων των υπό εξέταση παθογόνων μικροοργανισμών μέσω ειδικών ζευγών εκκινητών. Το πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι τα άμεσα αποτελέσματα που απαιτεί ο έλεγχος των τροφίμων, η υψηλή ευαισθησία και η επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Η εφαρμογή της PCR αποτελεί έναν προοδευτικό παράγοντα στην ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών στα τρόφιμα, χρησιμοποιώντας κάποιο από την πληθώρα διαθέσιμων εμπορικών πακέτων ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα από μεγάλους ή μικρότερους εμπορικούς οίκους του χώρου. Παράλληλα, καθίσταται ολοένα και περισσότερο επιτακτική η ανάγκη απομάκρυνσης των παραδοσιακών μεθόδων Μικροβιολογίας από τη βιομηχανία εξαιτίας του μεγάλου χρονικού διαστήματος διεξαγωγής αυτών για την ανίχνευση των παθογόνων. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εφαρμογή κατάλληλων πρωτοκόλλων για την ανίχνευση παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella* και *Listeria* σε βασικές πρώτες ύλες της ελληνικής βιομηχανίας τροφίμων, όπως είναι τα γαλακτοκομικά προϊόντα, τα λαχανικά, τα πουλερικά, τα ψάρια, το κρέας κ.α. Η επιτυχής διεξαγωγή της συγκεκριμένης εργασίας θα εξασφαλιστεί με τη συμμετοχή σε διεργαστηριακά (3 τουλάχιστον εργαστηρίων), μέσα από τα οποία θα αντιμετωπιστούν προβλήματα που παρουσιάζονται στον ακριβή ποσοτικό και μη προσδιορισμό των παθογόνων μικροοργανισμών. Η αποτελεσματικότητα του διεργαστηριακού σχήματος εξαρτάται τόσο από το εμπορικό «κιτ» που χρησιμοποιεί το εργαστήριο που συμμετέχει, όσο και από την πλειοψηφία των συμμετεχόντων εργαστηρίων στο συγκεκριμένο διεργαστηριακό σχήμα.

Λέξεις-Κλειδιά: Τροφογενή παθογόνα, PCR, *Salmonella*, *Listeria*

Abstract

Recent developments in diagnostic Molecular Biology allow new approaches for the detection and quantification of pathogens in foods. New modifications of molecular

Λαμπιδώνης Αντώνης, Αγγελολιαννάκης Ιωάννης, και Σειραγάκης Γιώργος
Οργανισμός: Food Allergens Laboratory

Τίτλος Εργασίας: Ανίχνευση των Τροφογενών Παθογόνων *Salmonella* και *Listeria* με Μοριακές Τεχνικές

5^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών, Αθήνα, 9-10 Μαΐου 2014

techniques like Polymerase Chain Reaction (PCR), allow faster diagnosis compared to conventional Microbiology methods. PCR technique is based on the detection of target genes of test pathogens using specific primers. The main advantages of these methods are the direct results which are required by food control, high sensitivity and repeatability. Besides, it has become increasingly important the abatement of traditional methods of Microbiology in the industry due to the long time of the detection of pathogens. The aim of this work is the implementation of appropriate protocols, for the detection of the two pathogens, *Salmonella* and *Listeria*, which are found in raw materials used in Greek food industry, such as dairy products, vegetables, poultry, fish, meat etc. It is necessary the participation in inter-laboratory tests (at least 3 laboratories), which we will make clear any issues in the quantitative / qualitative determination of the microorganisms. However, this highly depends on both the commercial "kits" used by the laboratories involved, as well as the number of the participating laboratories.

Keywords: Pathogens, PCR, Salmonella, Listeria

1. Εισαγωγή

1.1 *Salmonella*

Η *Salmonella* αποτελεί γένος παθογόνων ραβδόμορφων κινητών βακτηρίων (εξαιρέσεις τα μη κινητά *Salmonella gallinarum* και *Salmonella pullorum*), που προκαλεί ποικίλες ασθένειες στο έντερο και το στομάχι. Οι ασθένειες αυτές ονομάζονται σαλμονέλωση. Η σαλμονέλωση αποτελεί μια από τις πιο συχνές τροφολοιμώξεις του ανθρώπου και ένα σημαντικό πρόβλημα Δημόσιας Υγείας σε πολλές χώρες. Οι δύο κυριότερες κατηγορίες σαλμονέλας είναι η τυφική (τυφωειδής πυρετός) και η μη τυφική (ηπιότερη μορφή εκδήλωσης με συμπτώματα όπως ο πυρετός, ο κοιλόπονος και η διάρροια) σαλμονέλωση. Η σαλμονέλα προκαλείται, όταν το μικρόβιο της διεισδύσει στο επιθήλιο του λεπτού εντέρου, προκαλώντας φλεγμονή, με αποτέλεσμα την παραγωγή εντεροτοξίνης στα εντερικά κύτταρα. Η ασθένεια αυτή προέρχεται συνήθως από το νερό, το χώμα, τα έντομα, τις επιφάνειες εργοστασίων και κουζινών, τα ζωικά περιττώματα και τα ακατέργαστα κρέατα, πουλερικά και θαλασσινά. Συγκεκριμένα, οι περισσότερες σαλμονέλες είναι παθογόνες για τα ζώα και τα πτηνά. Αυτά αποτελούν τη δεξαμενή για τη μόλυνση τον άνθρωπο, που γίνεται κυρίως με τα κόπρανα. Τα ζώα που προσβάλλονται είναι τα πουλερικά, χοίροι, βοοειδή, τρωκτικά, όλα τα κατοικίδια (από σκύλους μέχρι χελώνες και παπαγάλους) και πολλά άλλα. Η τροφογενής μετάδοση των σαλμονέλων στον άνθρωπο γίνεται με την κατανάλωση τροφίμων που μολύνονται με: i) τα κόπρανα των ζώων, ii) τα χέρια ατόμων φορέων που ασχολούνται με την επεξεργασία των τροφίμων και iii) την επαφή τους με μολυσμένα εργαλεία και σκεύη.

Η σαλμονέλωση είναι ενδημική στις αναπτυσσόμενες χώρες, αλλά τα τελευταία χρόνια παρουσιάζει εξάρσεις και στις ανεπτυγμένες. Η επιδημιολογία της είναι πολύ σύνθετη και η συχνότητά της ως αίτιο τροφολοιμώξης εξαρτάται από τις διατροφικές συνήθειες, τις συνθήκες υγιεινής στην παραγωγή των τροφίμων, την υγιεινολογική κατάσταση των χώρων εστίασης, καθώς και από τις πρακτικές

εκτροφής των ζώων. Σύμφωνα με επιδημιολογικές έρευνες, για την αύξηση των τροφικών δηλητηριάσεων από σαλμονέλες ευθύνονται μεταξύ άλλων και οι παρακάτω παράγοντες: α) Η αλλαγή του τρόπου διατροφής (συγκεκριμένα η αύξηση των γευμάτων σε καντίνες, εστιατόρια, fast-food κ.α.), β) Η κατανάλωση μισοψημένων τροφίμων, γ) η αύξηση της κατανάλωσης τροφίμων ζωικής προέλευσης, δ) η αύξηση των κρουσμάτων σαλμονέλωσης στα ζώα εντατικής εκτροφής και ιδιαίτερα στα πτηνά, ε) η μαζική αποθεματοποίηση τροφίμων αλλά και ζωοτροφών, που εννοεί την εύκολη διασπορά της νόσου και στ) η μείωση της αντίστασης του ανθρώπινου οργανισμού, που είναι αποτέλεσμα των καλύτερων συνθηκών διαβίωσης και της κατάχρησης αντιβιοτικών (Βάσσος 2004, Wagner 2006).

Η συχνότητα εμφάνισης του συγκεκριμένου παθογόνου βακτηρίου στο RASFF (Σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης για Τρόφιμα και Ζωοτροφές) αποτελεί ακόμα ένα δείκτη για την σημαντικότητά του στην βιομηχανία τροφίμων. Σύμφωνα με την Ετήσια έκθεση του RASFF για το 2012 οι ειδοποιήσεις λόγω σαλμονέλας σε κρέας και προϊόντα του πτην πουλερικών αυξήθηκαν από 36 το 2011 σε 62, ενώ το αμέσως επόμενο παθογόνο ήταν η *Listeria* που μειώθηκε από 18 ειδοποιήσεις το 2011 σε 17 το 2012. Αλλά και στα πουλερικά είχαμε σημαντική αύξηση από 54 περιπτώσεις το 11 σε 62 το 2012. Η Ευρωπαϊκή Επιτροπή με βάση αυτά τα στοιχεία προχώρησε στην Commission Decision 2012/761/EU για κατάρτιση ενός προγράμματος ελέγχου της *Salmonella* στα ορνιθοτροφεία. Σκοπός του προγράμματος είναι η μείωση του πολλαπλασιασμού των οροτύπων σαλμονέλας: *Salmonella enteritidis*, *Salmonella typhimurium*, σε ενήλικα σμήνη των ορνίθων ωοπαραγωγής του είδους *Callus gallus* σε επίπεδο τουλάχιστον 8% στις 31 Δεκεμβρίου του 2013 (SANCO/10726/2013).

1.2 *Listeria monocytogenes*

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα παθογόνο βακτήριο το οποίο βρίσκεται στο έδαφος, νερό, φυτά και σε πάνω από 40 ζωικά είδη. Επίσης, συναντάται σε αποστραγγίσεις πατώματος, στάσιμα νερά, υπολείμματα, επιφάνειες επαφής με τρόφιμα, οικιακά ψυγεία, πετσέτες κουζίνας και σκουπιδοτενεκέδες. Προκαλεί σοβαρή ασθένεια. Καταστρέφεται με το μαγείρεμα, ενώ ένας από τους σημαντικότερους λόγους που έχει σχέση με την ανθεκτικότητά της και συνηγορεί για την επικινδυνότητά της είναι η ικανότητά της να πολλαπλασιάζεται ακόμη και σε θερμοκρασία 4°C.

Σύμφωνα με στατιστικά στοιχεία και μελέτες, μετά το 1955, και κυρίως τις δεκαετίες του 1980 και 1990, η λοίμωξη αυτή έχει συγκεντρώσει την προσοχή ολόκληρου του ιατρικού κόσμου και του καταναλωτικού κοινού, γιατί υπήρξαν κρούσματα ομαδικής προσβολής από το βακτήριο *Listeria monocytogenes* τροφογενούς προέλευσης. Σύμφωνα με τα επιδημιολογικά στοιχεία, πηγή των λιστεριών είναι το έδαφος, η βλάστηση, τα επιφανειακά νερά λιμνών και ποταμών, τα λύματα, η λάσπη των βιολογικών καθαρισμών και τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων. Ο μικροοργανισμός απομονώνεται από θηλαστικά, πτηνά, τρωκτικά, ερπετά, ψάρια, ακόμη και έντομα.

Ο κύριος τρόπος μετάδοσης του μικροοργανισμού στον άνθρωπο (εκτός από την άμεση, από τα προσβεβλημένα ζώα) είναι τα μολυσμένα τρόφιμα και κυρίως το γάλα (παστεριωμένο ή μη), τα γαλακτοκομικά προϊόντα (μαλακά τυριά, παγωτό, βούτυρο κ.α.), τα κρέατα, τα κρεατοσκευάσματα (λουκάνικα, πατέ κ.α.), οι ωμές σαλάτες, τα

πουλερικά, τα ψάρια και τα οστρακοειδή. Ο μικροοργανισμός μολύνει τα τρόφιμα με τους παρακάτω τρόπους: i) μέσω της διασποράς του με τα κόπρανα ανθρώπων και ζώων στο περιβάλλον, οπότε συναντάται στο χώμα και στο νερό. Με τον τρόπο αυτό μολύνονται εύκολα τα λαχανικά, τα ψάρια, τα οστρακοειδή, αλλά και έμμεσα τα άλλα τρόφιμα. ii) άμεσα από τα μολυσμένα ζώα με τα προϊόντα τους (γάλα, τυρί, κρέας, πουλερικά, ψάρια, οστρακοειδή) και iii) από ατυχείς χειρισμούς των τροφίμων κατά την παρασκευή και τη διανομή τους.

Σύμφωνα με στοιχεία που αφορούν τη νοσολογία στον άνθρωπο, η τροφογενής λιστερίωση εμφανίζεται σ' αυτόν με μορφή σποραδικών κρουσμάτων ή επιδημιών. Τα συμπτώματα μπορεί να είναι ήπια με τη μορφή τοπικής λοίμωξης του δέρματος ή να μοιάζουν με εκείνα της γρίπης, με εντόπιση κυρίως στο αναπνευστικό σύστημα. Συνήθως όμως, παρουσιάζεται ως μηνιγγοεγκεφαλίτιδα με μικροβιαμία. Η θνησιμότητα της νόσου είναι μεγάλη και κυμαίνεται μεταξύ 30% - 35% στο σύνολο των περιπτώσεων, ενώ στις ομάδες ειδικού κινδύνου στη νόσο, όπως τα νεογνά, οι ηλικιωμένοι και οι ανοσοκατασταλαμένοι, το ποσοστό ανέρχεται στο 65% (Βάσσος 2004, Σειραγάκης 2007, Janzten et al. 2006)

2. Μεθοδολογία

Η εξελικτική πορεία του τομέα της διαγνωστικής Μοριακής Βιολογίας τα τελευταία έτη επιτρέπει την ανίχνευση τέτοιου είδους παθογόνων οργανισμών σε βασικές πρώτες ύλες στην ελληνική βιομηχανία τροφίμων. Στην ανάλυση τροφίμων οι τεχνικές Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR) επιτρέπουν την άμεση και έγκυρη μικροβιολογική διάγνωση συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους καλλιέργειας. Το πλεονέκτημα αυτών των μεθόδων είναι η μεγάλη ευαισθησία καθώς και τα άμεσα αποτελέσματα που απαιτεί ο έλεγχος των τροφίμων. Στόχος της συγκεκριμένης εργασίας είναι η εφαρμογή κατάλληλων πρωτοκόλλων και τεχνικών (διαπιστευμένων σύμφωνα με τα ISO standards) για την ανίχνευση των παθογόνων μικροοργανισμών *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes*, σε διάφορα δείγματα κρεάτων/κρεατοσκευασμάτων, αλλαντικών, λαχανικών, γαλακτοκομικών προϊόντων, προϊόντων άρτου κ.α.

Για την εφαρμογή των Μεθόδων Μοριακής Βιολογίας (οι οποίες περιλαμβάνουν την απομόνωση DNA και την PCR), πραγματοποιήθηκαν αξιολογήσεις συγκεκριμένων εμπορικών πακέτων (kits) απομόνωσης DNA από τους εμπορικούς οίκους «HAI KANG Life Corporation» και «Bioo Scientific».

2.1 Απομόνωση γενετικού υλικού

Η διαδικασία απομόνωσης του γενετικού υλικού πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το kit της Bioo Scientific – Nucleic Acid Extraction Kit (Cat No. 3802-03), η οποία στηρίζεται στην καλή ομογενοποίηση των δειγμάτων, τη λύση των κυτταρικών τοιχωμάτων με κατάλληλα διαλύματα και την προσθήκη ενζύμου πρωτεΐνάσης K. Επίσης, για την απομόνωση του γενετικού υλικού εφαρμόστηκε και η μέθοδος εκχύλισης με διάλυμα CTAB, σύμφωνα με το πρότυπο ISO/FDIS 21571, η

οποία πραγματοποιείται με την προσθήκη ενζύμου Rnase που προτείνεται για δείγματα όπου η ταυτόχρονη κατακρήμνιση του RNA δυσκολεύει περαιτέρω την ανάλυση.

Μετά την απομόνωση του γονιδιωματικού DNA, πραγματοποιείται φωτομέτρηση ενώ διαπιστώνεται η ποιότητά του απομονωμένου δείγματος (μη αποδομημένη μορφή) με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 0.8% - 1% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου. Ο ποιοτικός έλεγχος συνίσταται στην απουσία προσμίξεων, φαινόλης ή RNA, καθώς και στην ακεραιότητα του DNA που απομονώθηκε. Η απουσία «αλείμματος» (smear) από το πήκτωμα της αγαρόζης, υποδηλώνει ότι το απομονωμένο DNA είναι ικανοποιητικής ποιότητας.

2.2 Αλυσιδωτή Αντίδραση της Πολυμεράσης (PCR)

Την απομόνωση DNA διαδέχονται οι Αλυσιδωτές Αντιδράσεις της Πολυμεράσης (PCR και Real Time PCR) για την ποιοτική και ημι-ποσοτική ανίχνευση των συγκεκριμένων παθογόνων, αντίστοιχα. Όσον αφορά τα όρια ανίχνευσης (LOD) των μοριακών μεθόδων, ανήλθαν στα 2 cfu/25g. Οι αντιδράσεις PCR στηρίζονται στην ανίχνευση συγκεκριμένων περιοχών γονιδίων-στόχων για κάθε παθογόνο παράγοντα ξεχωριστά μέσω ειδικών ζευγών εκκινητών.

Ειδικότερα, για τον παθογόνο μικροοργανισμό της *Salmonella spp.* ανιχνεύθηκαν συγκεκριμένες χρωμοσωμικές θέσεις έναρξης της αντιγραφής του DNA που αφορούν το συγκεκριμένο βακτήριο [chromosomal DNA replication origins (oriC)] και έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για την ανίχνευση του συγκεκριμένου παθογόνου. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής, ήταν για τον πρόσθιο (5'-TTA TTA GGA TCG CGC CAG GC-3') και για τον οπίσθιο (5'-AAA GAA TAA CCG TTG TTC AC-3'). Το προϊόν της PCR, έχει παρατηρηθεί στα στελέχη της *Salmonella spp.* και το μέγεθός του ανέρχεται στις 164 bp (Fluit et al. 1993, Kornberg 1982).

Παράλληλα, για τον παθογόνο μικροοργανισμό της *Listeria monocytogenes* ανιχνεύθηκε συγκεκριμένο τμήμα της κωδικεύουσας περιοχής του γονιδίου hlyA (υπεύθυνο γονίδιο για την ανίχνευση του λοιμογόνου παράγοντα της λιστεριολυσίνης O - virulence factor listeriolysin O), γονίδιο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε μελέτες για την ανίχνευση συγκεκριμένα της *Listeria monocytogenes*. Η αλληλουχία των εκκινητών που χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό της συγκεκριμένης περιοχής του γονιδίου, ήταν για τον πρόσθιο (5'-CGG AGG TTC CGC AAA AGA TG-3') και για τον οπίσθιο (5'-CCT CCA GAG TGA TCG ATG TT-3'). Το προϊόν του γονιδίου αυτού, έχει παρατηρηθεί σε όλα τα στελέχη της *Listeria monocytogenes* και το μέγεθός του ανέρχεται στις 234 bp (Furrer et al. 1991, Niederhauser et al. 1992).

Για την εφαρμογή των μεθόδων PCR επιλέχθηκαν πακέτα του εμπορικού οίκου «HAI KANG Life Corporation» και συγκεκριμένα τα «Watcher *Salmonella spp.*» / «Watcher *Listeria monocytogenes*» - PCR και «Hunter *Salmonella spp.* / «Hunter *Listeria monocytogenes*» - Real Time PCR. Παράλληλα, εφαρμόστηκαν σε συνδυασμό με 2 μεθόδους εκχύλισης DNA, ώστε να αξιολογηθούν ως προς την αποτελεσματικότητά τους. Οι ποσότητες που απαιτούνται για μια αντίδραση PCR και Real Time PCR δίνονται στους παρακάτω Πίνακες 1 και 2, αντίστοιχα:

Πίνακας 1: Αντιδραστήρια και ποσότητα αντιδραστηρίων ανά αντίδραση PCR για την ποιοτική ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes*.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα Αντιδραστηρίων (μl)
Master Mix [dNTPs (10 μM), MgCl ₂ (25 μM), Εκκινητές (10 pmol/μl)]	5,1
Taq Polymerase (5U/μl)	0,1
Απομονωμένο DNA (~200 ng)	X
ddH ₂ O	14,8 - X
Συνολική Αντίδραση	20

Πίνακας 2: Αντιδραστήρια και ποσότητα αντιδραστηρίων ανά αντίδραση Real Time PCR για την ημι-ποσοτική ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes*.

Αντιδραστήρια	Ποσότητα Αντιδραστηρίων (μl)
Real Time Master Mix (SYBR Green, dNTPs, MgCl ₂ , Εκκινητές, Taq Polymerase)	11,2
Απομονωμένο DNA (~150 ng)	X
ddH ₂ O	8,8 - X
Συνολική Αντίδραση	20

Τα θερμοκρασιακά πρωτόκολλα για τη διαδικασία της PCR και Real Time PCR (παρουσιάζονται στους Πίνακες 3 και 4, αντίστοιχα) εφαρμόστηκαν δύο φορές για κάθε διπλή εκχύλιση DNA, χρησιμοποιώντας τις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις, ανά δείγμα.

Πίνακας 3: Συνθήκες PCR για την ποιοτική ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella spp.* / *Listeria monocytogenes*.

Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο PCR – <i>Salmonella spp.</i> / <i>L. monocytogenes</i>		
Αρχική αποδιάταξη	95°C για 10 min	} Αριθμός κύκλων αντίδρασης : 35
Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C για 1 min	
Υβριδοποίηση εκκινητών	58°C / 55°C για 1 min	
Επιμήκυνση εκκινητών	72°C για 1 min	
Τελική επέκταση	72°C για 10 min	

Πίνακας 4: Συνθήκες PCR σε πραγματικό χρόνο (Real Time PCR) για την ημι-ποσοτική ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes*.

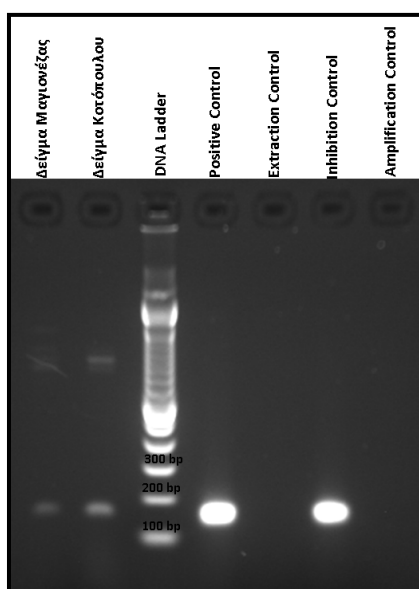
Θερμοκρασιακό πρωτόκολλο Real Time PCR		
UNG Αποδιάταξη	50°C για 2 min	} Αριθμός κύκλων αντίδρασης : 1
Αρχική Αποδιάταξη	95°C για 10 min	
Αποδιάταξη DNA στόχου	95°C για 15 sec	} Αριθμός κύκλων αντίδρασης : 40
Υβριδοποίηση - Επιμήκυνση εκκινητών	60°C για 60 min	

Η χρήση απαραίτητων control (Positive control, Extraction control, Inhibition control, Amplification control), θα πρέπει να συμπεριλαμβάνονται σε κάθε αντίδραση PCR, όπως παρουσιάζονται στις παρακάτω Εικόνες 1 και 2. Η ποσότητα του γενετικού υλικού που χρησιμοποιείται στην περίπτωση των control (Inhibition control), όπως και η ποσότητα αποσταγμένου και ελεύθερου από νουκλεάσες νερό, είναι αντίστοιχη με αυτή του γενετικού υλικού από το προς ανάλυση δείγμα. Ορισμένα από τα controls αυτά χρησιμοποιούνται και ελέγχονται κάθε φορά που αναλύεται ένα δείγμα (Positive control, Extraction control, Amplification control), ενώ άλλα χρησιμοποιούνται κατά τακτά χρονικά διαστήματα, και πάντα όταν κάποιο από τα controls δεν δώσει τα αναμενόμενα αποτελέσματα. Τέλος, ένα control μπορεί να έχει παραπάνω από μία λειτουργία, όπως στην περίπτωση του Inhibition control με το οποίο διαπιστώνεται η ύπαρξη διαφόρων αναστολέων στο απομονωμένο γενετικό υλικό, οι οποίοι εμποδίζουν τη δράση της πολυμεράσης και την αντίδραση της PCR.

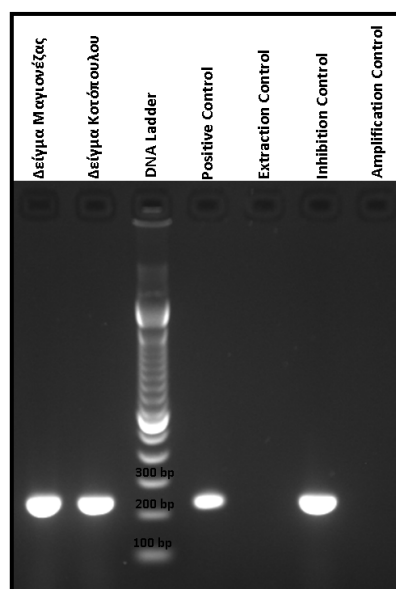
3. Αποτελέσματα - Συμπεράσματα

Ο έλεγχος του μεγέθους των προϊόντων της PCR που αφορά την ποιοτική ανίχνευση των συγκεκριμένων παθογόνων (164 bp και 234 bp για τη *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes*, αντίστοιχα) καθώς και του θετικού control του εμπορικού πακέτου, πραγματοποιήθηκε με ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 2% παρουσία βρωμιούχου αιθιδίου και κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος (TBE). Μετά τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό σε πήκτωμα αγαρόζης, παρατηρήθηκαν τα αντίστοιχα για τα δύο παθογόνα προϊόντα αναμενόμενου μήκους 164 bp και 234 bp (σε ενδεικτικά δείγματα μαγιονέζας και κοτόπουλου). Επίσης, παρατηρήθηκε και η ενίσχυση της ζώνης του αντίστοιχου αναμενόμενου μήκους του θετικού control (Positive Control), καθώς και του Inhibition Control (Εικόνες 1, 2).

Εικόνα 1



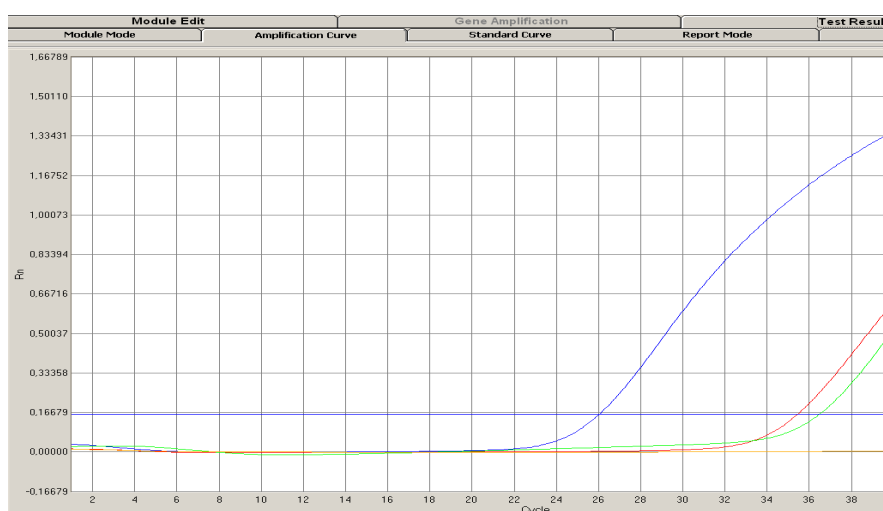
Εικόνα 2



Εικόνες 1, 2: Αποτελέσματα εφαρμογής PCR μετά από τον ηλεκτροφορητικό διαχωρισμό των προϊόντων σε πήκτωμα αγαρόζης 2%. Στα πήκτωματα απεικονίζονται τα μεγέθη των μοριακών δεικτών (DNA Ladder), τα προϊόντα της PCR μήκους 164 bp και 234 bp [*Salmonella spp.* (Εικόνα 1) και *Listeria monocytogenes* (Εικόνα 2), αντίστοιχα] σε ενδεικτικά δείγματα μαγιονέζας και κοτόπουλου. Επιπλέον, απεικονίζονται τα προϊόντα των αντίστοιχων controls που αντιστοιχούν στα Positive και Inhibition Control των υπό μελέτη παθογόνων μικροοργανισμών, ενώ δεν παρατηρείται επιμόλυνση τόσο στη διαδικασία απομόνωσης του DNA (Extraction Control), όσο και στη διαδικασία της PCR (Amplification Control).

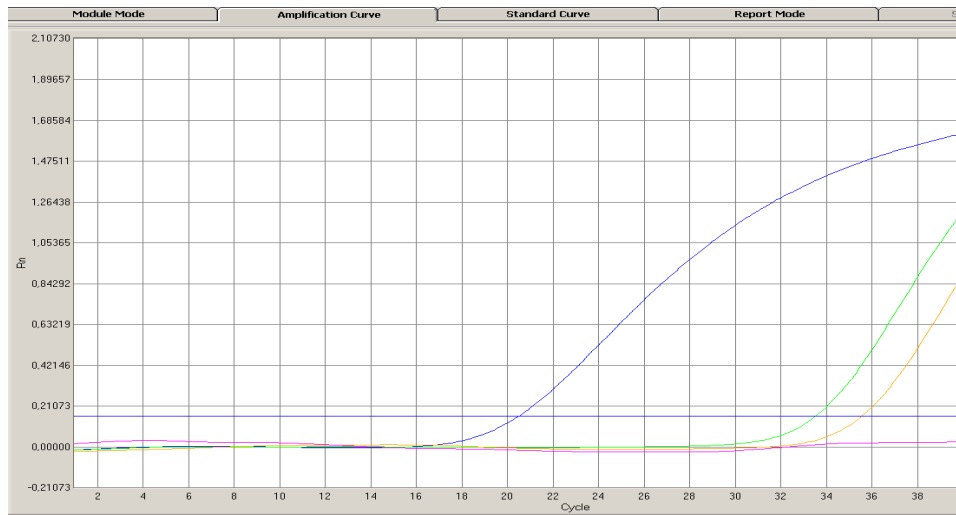
Για την ημι-ποσοτική ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella* και *Listeria monocytogenes* μέσω Real Time PCR, εξετάστηκε ο αριθμός των κύκλων κατά την διάρκεια του οποίου, το δείγμα φτάνει την γραμμή «Threshold» [Threshold cycle (Ct)] δηλαδή του σημείου στο οποίο ξεχωρίζει έντονα το φθορίζον σήμα των προϊόντων της Real Time PCR από το φόντο. Όσο μεγαλύτερη είναι η ποσότητα της αρχικής αλληλουχίας DNA στο κάθε δείγμα τόσο νωρίτερα εμφανίζεται η τιμή Ct για κάθε δείγμα, δηλαδή αναλογικά η Ct θα είναι μικρότερη.

Στις παρακάτω Εικόνες καθώς και στους Πίνακες, φαίνονται παραστατικά οι περιπτώσεις θετικών δειγμάτων στην ανίχνευση των συγκεκριμένων παθογόνων, όπως εμφανίζεται στο “Test Report” της Real Time PCR.



Well	Type	Test Item	CT
B4	Sample 1	<i>Salmonella spp.</i>	35.42
B5	Sample 2	<i>Salmonella spp.</i>	36.45
B6	Positive	<i>Salmonella spp.</i>	26.04
B7	Control	<i>Salmonella spp.</i>	No CT

Εικόνα 3, Πίνακας 5: Αποτελέσματα Real Time PCR δειγμάτων κοτόπουλου (Sample 1) και μαγιονέζας (Sample 2) για την ανίχνευση του παθογόνου *Salmonella spp.*, χρησιμοποιώντας συνολικά 150 ng απομονωμένου DNA/αντίδραση.



Well	Type	Test Item	CT
C4	Sample 1	<i>Listeria monocytogenes</i>	33.49
C5	Sample 2	<i>Listeria monocytogenes</i>	35.52
C6	Positive	<i>Listeria monocytogenes</i>	20.46
C7	Control	<i>Listeria monocytogenes</i>	No CT

Εικόνα 4, Πίνακας 6: Αποτελέσματα Real Time PCR δειγμάτων κοτόπουλου (Sample 1) και μαγιονέζας (Sample 2), για την ανίχνευση του παθογόνου *Listeria monocytogenes*, χρησιμοποιώντας συνολικά 150 ng απομονωμένου DNA/αντίδραση.

Η ερευνητική διαδικασία πραγματοποιείται με την παράλληλη χρήση των εσωτερικών ελέγχων που κάθε μέθοδος προτείνει, ώστε να διασφαλιστεί η ποιότητα των αποτελεσμάτων και η αξιοπιστία του κάθε εμπορικού πακέτου. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των αποτελεσμάτων πραγματοποιούνται 3 επαναλήψεις για κάθε μεμονωμένη ανάλυση ανίχνευσης, ενώ πραγματοποιείται και συμμετοχή σε διεργαστηριακά 3 τουλάχιστον εργαστηρίων (εργαστήρια FAL Αθήνας, Κρήτης και Κύπρου) για την άρτια εξαγωγή πειραματικών αποτελεσμάτων και συμπερασμάτων.

4. Προοπτικές

Η ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας, η οποία είναι μέρος Ερευνητικού Προγράμματος, επιδοτούμενο από την Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την ανίχνευση παθογόνων σε τρόφιμα με μοριακές τεχνικές, στα πλαίσια της Δράσης «Υποστήριξη των Επιχειρήσεων για την απασχόληση προσωπικού υψηλού επιπέδου», με Επιστημονικό Υπεύθυνο τον Δρ. Αντώνης Λαμπιδώνης, θα δώσει μια σειρά από συγκεκριμένα πρωτόκολλα ανίχνευσης. Ο τύπος και οι συνθήκες ανάλυσης κάθε πρωτοκόλλου ξεχωριστά θα είναι ανάλογα προσαρμοσμένες για την ανίχνευση των παθογόνων *Salmonella spp.* και *Listeria monocytogenes* στα αντίστοιχα δείγματα τροφίμων που εξετάζονται.

Επιπλέον, η Neogen Corporation, της οποίας αποκλειστικός αντιπρόσωπος είναι η εταιρία Food Allergens Laboratory, αποτελεί μια από τις 100 ταχύτερα αναπτυσσόμενες στο NASDAQ εταιρείες με πάνω από 600 επιστήμονες σε ΗΠΑ και Ευρώπη και με παγκόσμια πρωτοπορία, αναπτύσσει, κατασκευάζει και εμπορεύεται σειρά καινοτόμων προϊόντων για την ασφάλεια των τροφίμων και των ζώων, στα

πλαίσια ανίχνευσης παθογόνων στα τρόφιμα. Συγκεκριμένα, έχει αναπτύξει μια νέα πρωτοποριακή, γρήγορη μέθοδο ανίχνευσης *Salmonella* και *Listeria* διαπιστευμένη κατά AOAC (Association Of Analytical Communities). Η επανομαζόμενη μέθοδος ANSR (Amplified Nucleic Single-Temperature Reaction) χρησιμοποιεί μια νέα τεχνολογία ενίσχυσης περιοχών DNA εφαρμόζοντας ενιαία θερμοκρασία, καθιστώντας την ίδια απλή, εξαιρετικά ευαίσθητη και περισσότερο γρήγορη από τις συμβατικές μεθόδους. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι εύκολο να εφαρμοστεί, απαιτεί ελάχιστη εκπαίδευση, είναι ικανή να δώσει αποτελέσματα σε λιγότερο από 21 h, ενώ δεν απαιτεί ακριβό εξοπλισμό.

4. Βιβλιογραφία

- Βάσσης Β.Δ.: “Τρόφιμα και Υγεία του Καταναλωτή (τροφογενείς Διαταραχές)”, Εκδόσεις Παπασωτηρίου, 2004, Αθήνα.
- Σειραγάκης Γ.: “Λιστέρια: Ένας κίνδυνος που μπορεί να ελεγχθεί”, Περιοδικό Meat Point. σελ 84-85, Δεκέμβριος 2007.
- Fluit A.C., Widjoatmodjo M.N., Box A.T., Torensma R. and Verhoef J., “Rapid detection of salmonellae in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay”, Appl. Environ. Microbiol., 59(5), 1342-1346, 1993.
- Furrer B., Candrian U., Hoefelein C. and Luethy J., “Detection and identification of *Listeria monocytogenes* in cooked sausage products and in milk by in vitro amplification of haemolysin gene fragments”, J. Appl. Bacteriol. 70(5), 372-379, 1991.
- Janzten M.M., Navas J., Corujo A., Moreno R., López V. and Martínez-Suárez J.V., “Specific detection of *Listeria monocytogenes* in foods using commercial methods: from chromogenic media to real-time PCR”, Spanish Journal of Agricultural Research 4(3), 235-247, 2006.
- Kornberg A., “Supplement to DNA replication”, p. S149, 1982, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
- Niederhauser C., Candrian U., Höfelein C., Jermini M., Bühler H.P. and Lüthy J., “Use of polymerase chain reaction for detection of *Listeria monocytogenes* in food”, Appl. Environ. Microbiol. 58(5), 1564-1568, 1992.
- SANCO/10726/2013 Programmes for the eradication, control and monitoring of certain animal diseases and zoonoses (http://ec.europa.eu/food/animal/diseases/eradication/programme2013/salm_el_en.pdf)
- Wagner R.D., “Efficacy and food safety considerations of poultry competitive exclusion products”, Mol. Nutr. Food Res. 50, 1061-1071, 2006.