

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

*«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία,
το περιβάλλον και τη διατροφή»*



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης



ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων (1^η)

Μαντώ Κυριακού

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
2014

Δομή του μαθήματος

✧ Διάλεξη 1η

- ✧ Μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα
- ✧ Μικροοργανισμοί δείκτες
- ✧ Τροφεγενείς ασθένειες
- ✧ Αναδυόμενα τροφογενή παθογόνα
- ✧ Gram - παθογόνα
- ✧ *Salmonella enterica*

✧ Διάλεξη 2η

- ✧ *Escherichia coli* O157:H7
- ✧ *Campylobacter jejuni*
- ✧ *Listeria monocytogenes*

Μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα

- Φυσιολογική μικροχλωρίδα των τροφίμων επιφέρει αλλαγές - αλλοιώσεις
- Ύπαρξη παθογόνων μο - τοξίνες
- Για ποιο λόγο χρειάζονται;
- Διευκολύνουν τους παραγωγούς και τις ελεγκτικές αρχές στον έλεγχο της ποιότητας - ασφάλειας των τροφίμων μέσω της μέτρησης κάποιου μο δείκτη ή κάποιου μικροβιακού μεταβολίτη

Μικροβιολογικά κριτήρια στα τρόφιμα

- Απαιτείται η θέσπισή τους όταν υπάρχει κάποιος κίνδυνος στην κατανάλωση ενός τροφίμου (επιδημιολογικά στοιχεία, ανάλυση επικινδυνότητας, επεξεργασία κλπ)
- Υποχρεωτικά ή Συμβουλευτικά

Μικροοργανισμοί δείκτες

- Χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή των μικροβιολογικών κριτηρίων
- Δίνουν γρήγορη και αξιόπιστη πληροφορία σε σχέση με την ποιότητα/ασφάλεια των πρώτων υλών ή με τη διαδικασία της επεξεργασίας και της αποθήκευσης

Μικροοργανισμοί δείκτες ποιότητας

Οι δείκτες που χρησιμοποιούνται για τον έλεγχο της ποιότητας θα πρέπει να:

- Ανιχνεύονται σε όλα τα τρόφιμα που πρόκειται να γίνει εκτίμηση της ποιότητάς τους
- Υπάρχει άμεση συσχέτιση των αριθμητικών τους μεγεθών με την ποιότητα του τροφίμου
- Υπάρχει εύκολη και γρήγορη μέθοδος ανίχνευσης και καταμέτρησής τους

Χρήση της ΟΜΧ ή άλλων μο ή και κάποιου μεταβολίτη

Μικροοργανισμοί δείκτες ασφάλειας

Δεν είναι απαραίτητως παθογόνοι

Θα πρέπει όμως να είναι:

- ο εύκολα και γρήγορα ανιχνεύσιμοι
- ο να διαχωρίζονται εύκολα από άλλους μικροοργανισμούς που αποτελούν τη φυσική μικροχλωρίδα του τροφίμου
- ο να συσχετίζονται με το /τα παθογόνα που υποδεικνύουν
- ο να παρουσιάζονται όταν παρουσιάζεται το παθογόνο
- ο να μειώνονται όταν μειώνεται το παθογόνο
- ο να απουσιάζουν όταν το παθογόνο απουσιάζει από το τρόφιμο

Οι πιο γνωστοί δείκτες είναι οι περιττωματικοί δείκτες και ιδιαίτερα τα κολίμορφα βακτήρια και το *E.coli*

Τροφογενή παθογόνα

Τα τροφογενή παθογόνα ομαδοποιούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με τη σοβαρότητα της επικινδυνότητας:

- ❖ **Κατηγορία I:** σοβαροί κίνδυνοι (*C. botulinum*, *S. dysenteriae*, *S. enterica* Paratyphi A, B, Εντεροαιμορραγική *E.coli* (EHEC))
- ❖ **Κατηγορία II:** μέτριοι κίνδυνοι, πιθανή εκτεταμένη εξάπλωση (*Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp.)
- ❖ **Κατηγορία III:** μέτριοι κίνδυνοι, περιορισμένη εξάπλωση (*B.cereus*, *Campylobacter jejuni*, *C. perfringens*, *S. aureus*, *V. cholerae*)

Τροφογενείς ασθένειες

- ❖ Σύμφωνα με τον ΠΟΥ οι τροφογενείς ασθένειες είναι ασθένειες που έχουν προκληθεί από την κατανάλωση κάποιου τροφίμου και ή οφείλονται σε κάποιο μολυσματικό παράγοντα ή σε κάποια τοξίνη.
- ❖ ~1,8 εκατομμύρια άνθρωποι πέθαναν από διαρροϊκές ασθένειες, το μεγαλύτερο ποσοστό οφείλονταν σε κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου και νερού (2005)
- ❖ Βιομηχανοποιημένες χώρες: 30% του πληθυσμού υποφέρει από τροφογενείς νόσους

Τροφογενείς ασθένειες: αιτίες αύξησης

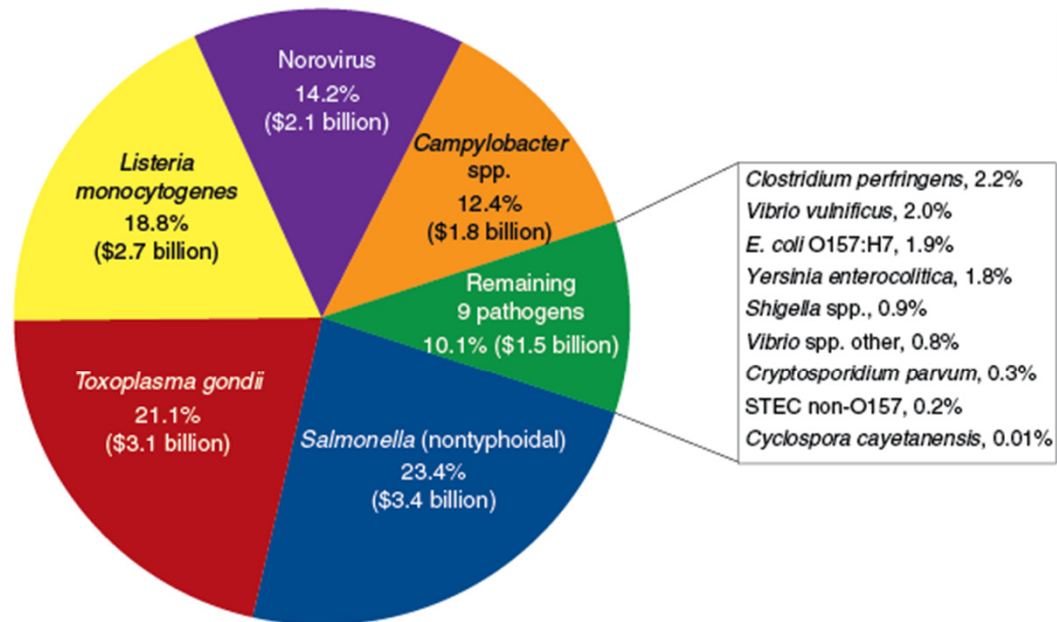
- ❖ Παγκοσμιοποίηση του δικτύου παραγωγής και διακίνησης των τροφίμων
- ❖ Ανάγκη για παραγωγή μεγαλύτερης ποσότητας τροφής και πιο ειδικά κρέατος που ακολουθεί την αύξηση του ανθρώπινου πληθυσμού
- ❖ Συστήματα παρακολούθησης των τροφογενών νόσων έχουν εντατικοποιηθεί
- ❖ Τα περισσότερα δεδομένα: από Β. Αμερική (κυρίως ΗΠΑ και Καναδά) και Ευρώπη

Κόστος

- ❖ 2012: δύο μεγάλες μελέτες στις ΗΠΑ για το οικονομικό κόστος των τροφογενών νόσων στην δημόσια υγεία (14,6 δις δολάρια η μία μελέτη, 16,3 δις δολάρια η άλλη κάθε χρόνο)
- ❖ Κοστίζουν περισσότερο: η σαλμονέλλωση (μη-τυφοειδής) και δεύτερη σε κόστος είναι η νόσος που προκαλείται από το πρωτόζωο *Toxoplasma gondii*, ενώ ακολουθούν η λιστερίωση (*Listeria monocytogenes*), οι ιώσεις που προκαλεί ο Νοροϊός, και η καμπυλοβακτηρίωση (*Campylobacter*)
- ❖ Το κόστος: φθάνει το 85% του συνολικού κόστους που προέρχεται από όλα τα τροφογενή παθογόνα

Κόστος

Salmonella imposes the greatest cost of the 14 major foodborne pathogens



Note: Annual cost estimates are in 2010 dollars based on disease incidence estimates published in 2011.

Source: USDA, Economic Research Service.

Αναδυόμενα τροφογενή παθογόνα

Χαρακτηρίζονται είτε καινούργια στελέχη που δεν είχαν ταυτοποιηθεί μέχρι τώρα και συνδέεται η μετάδοσή τους με την κατανάλωση τροφίμων και ποτών ή ακόμα ήδη γνωστά παθογόνα που αποδεικνύεται πλέον η μετάδοσή τους μέσω της κατανάλωσης τροφής

Αναδυόμενα τροφογενή παθογόνα (βακτήρια)

Arcobacter butzleri

Campylobacter jejuni

Cronobacter sakazakii

E. coli O157:H7, *E. coli*, non-O157

Listeria monocytogenes

Vibrio cholerae O139

toxigenic *Vibrio vulnificus*

Vibrio parahaemolyticus

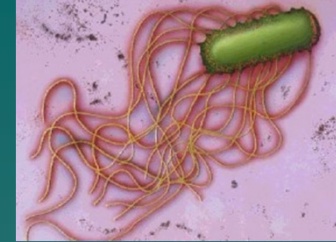
Yersinia enterocolica

Τρόφιμα

15 νέα τρόφιμα που προκάλεσαν τροφογενείς ασθένειες (2005-2012):

- συσκευασμένο σπανάκι
- παστεριωμένος χυμός καρότου
- Φυστικοβούτυρο
- σκόνη μπρόκολου σε παιδικό snack
- ξηρή τροφή σκύλων
- καταψυγμένες πίτες
- κονσερβοποιημένη σάλτσα τσίλι
- καυτερές πιπεριές
- άσπρο και μαύρο πιπέρι,
- αποξηραμένη ζύμη (μίγμα) για μπισκότα
- φουντούκια
- φύτρα μοσχοσίταρου
- Παπάγια
- κουκουναρόσποροι,
- «κιμάς» τόνου ωμού και κατεψυγμένου

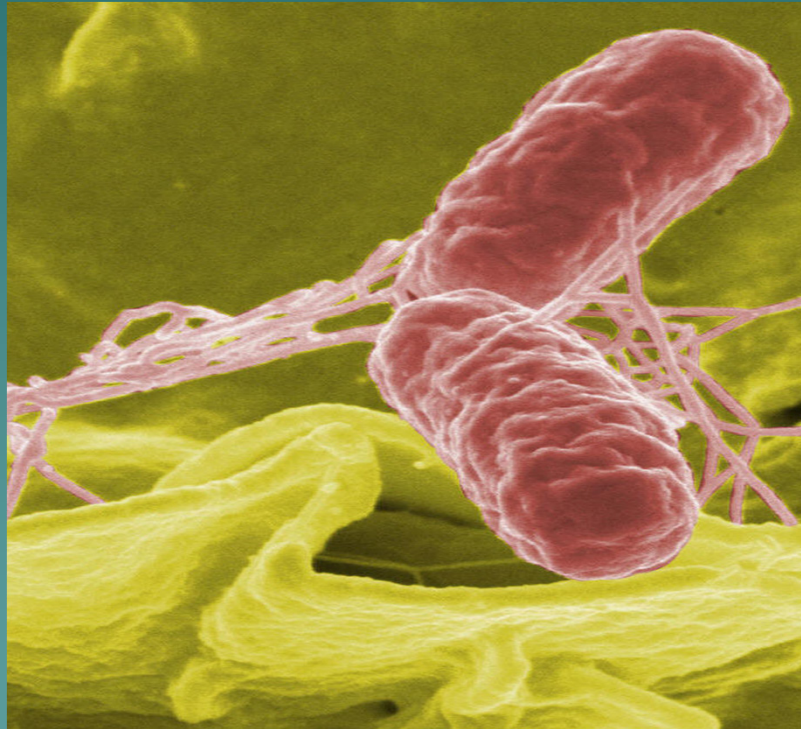
Προσοχή: όχι μόνο ζωϊκής προέλευσης, αλλά και φυτικής!!!



Salmonella spp.

(Μηχανισμοί - Ασθένειες -
Ανίχνευση)

Salmonella spp.



Χαρακτηριστικά του γένους *Salmonella*

- ✓ **Gram** - μικροί βάκιλλοι (0.7-1.5X 2.0-5.0μm), προαιρετικά αναερόβια, συνήθως με δυνατότητα κίνησης (περίτριχα μαστίγια)
- ✓ Η κατάταξή τους στηρίζεται στα διαφορετικά αντιγόνα που διαθέτουν (O, H, Vi) με αποτέλεσμα να καταμετρώνται περίπου **2.443 διαφορετικοί ορολογικοί** τύποι μόνο για το κυρίαρχο είδος
- ✓ Σημαντικό σημείο για την κατάταξή τους η ευαισθησία τους σε βακτηριοφάγους (επηρεάζει την παθογένειά τους- **PT-provisional phage type, DT-definitive phage type**)

Χαρακτηριστικά του γένους *Salmonella*

- ✓ Το γένος *Salmonella* χωρίζεται σε δύο είδη: *S.enterica*, *S bongori*
- ✓ Το *S.enterica* διαιρείται σε 6 ομάδες υποειδών: I, II, IIIa, IIIb, IV, VI
- ✓ Η ομάδα V αποτελείται από ορολογικούς τύπους του *S.bongori*

Salmonella enterica Serovar Typhimurium DT104

- ❑ Εμφανίστηκε τέλη της δεκαετίας του 1980 και έκτοτε έχει προκαλέσει μεγάλη ανησυχία για την εξάπλωσή του
- ❑ Παρουσιάζει ανθεκτικότητα στα: αμπικιλίνη, χλωραμφενικόλη, στρεπτομυκίνη, σουλφοναμίδια, τετρακυκλίνη
- ❑ Κάποια στελέχη εμφανίζουν επιπλέον ανθεκτικότητα στα: γκενταμυκίνη, φθοροκινολόνες, trimethoprim ή και σε άλλες αντιβιοτικές ενώσεις
- ❑ Από την δεκαετία του 1990: πανδημία του συγκεκριμένου τύπου τόσο στους ανθρώπους, όσο και στα ζώα

Ασθένεια

- Δύο τύποι ασθενειών
- 1) Εντοπισμένη λοίμωξη του εντερικού επιθηλίου: μη-τυφοειδής σαλμονέλλωση ή γαστρεντερίτιδα
- Σαλμονέλλωση: λοίμωξη που προκαλείται από την κατανάλωση ωμού ή όχι αρκετά ψημένου ζωϊκού τροφίμου ή νερού μολυσμένου από περιττώματα. Το αποτέλεσμα εξαρτάται από τον ορότυπο της σαλμονέλλας και από τον ξενιστή
- ⇒ Συμπτώματα: Διάρροια με κίνδυνο αφυδάτωσης, κοιλιακοί πόνοι, εμετός και πυρετός
- ⇒ Χρόνος επώασης: 12-72h, Διάρκεια συμπτωμάτων: 2-7 ημέρες

Ασθένεια

- ⇒ Αριθμός κυττάρων του παθογόνου που απαιτούνται για να προκαλέσουν ασθένεια: 10^4 , αλλά σε κάποιες περιπτώσεις τροφίμων (υψηλά λιπαρά) 100 κύτταρα ή και λιγότερο
- ⇒ Οι ιδιαίτερα επιθετικοί ορότυποι (*Choleraesuis*, *Dublin*) προκαλούν σηψαιμία
- ⇒ Άλλες επιπλοκές μπορεί να είναι: μηνιγγίτιδα, οστεομυελίτιδα, σηπτική αρθρίτιδα, πνευμονία, χολοκυστίτιδα, ενδοκαρδίτιδα, περικαρδίτιδα κ.α.

Ασθένεια

- ◆ 2) Γενικευμένη λοίμωξη: τυφοειδής σαλμονέλλωση ή εντερικός πυρετός, τυφοειδής και παρατυφοειδής πυρετός

Επιδημιολογία

- Κάθε χρόνο 90 εκατομμύρια άνθρωποι προσβάλλονται από σαλμονέλλωση
- Κόστος: στην Ευρωπαϊκή Ένωση 3δισ € και στις ΗΠΑ 2.7 δισ δολάρια
- ΗΠΑ: προσβάλλονται ~1,2 εκατομ. άνθρωποι κάθε χρόνο, 23.000 νοσηλεύονται σε νοσοκομεία, ~ 450 πεθαίνουν κάθε χρόνο (CDC)

Επικίνδυνα τρόφιμα

- ❑ Παραδοσιακά: το κρέας των πουλερικών, τα αυγά και όλα τα τρόφιμα που περιέχουν τα συστατικά αυτά
- ❑ Όλα τα κρέατα και γενικότερα τα προϊόντα ζωικής προέλευσης
- ❑ Τα τελευταία χρόνια όλο και πιο συχνά: φρέσκα λαχανικά και φρούτα ή προϊόντα που δεν θεωρούνταν ευαίσθητα τρόφιμα (π.χ. μπαχαρικά)
- ❑ Νερό άρδευσης αμφίβολης ποιότητας ή κοπριά που ήταν ακατάλληλη μικροβιολογικά, κατανάλωση χωρίς θερμική επεξεργασία

Μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Προβλήματα στην ανίχνευση:

- μικρός αριθμός των κυττάρων του παθογόνου
- μεγάλη σε ποικιλία και αριθμούς κυττάρων υπόλοιπη μικροχλωρίδα
- η χημική σύσταση του τροφίμου

Σχέδιο δειγματοληψίας, αριθμός δειγμάτων, κατάλληλη επεξεργασία των δειγμάτων

Η ανίχνευση της σαλμονέλλας γίνεται σε: **25 ή 10g** δείγματος (βαθμός επικινδυνότητας του τροφίμου ή τους καταναλωτές στους οποίους απευθύνεται)

Μέθοδοι ανίχνευσης του *Salmonella* spp.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανίχνευση της σαλμονέλλας συνήθως χωρίζονται στις:

- κλασσικές μικροβιολογικές που χρησιμοποιούν καλλιεργητικές τεχνικές και παραμένουν στις μεθόδους αναφοράς που αναγνωρίζονται από τις ελεγκτικές αρχές
- ανοσολογικές που στηρίζονται στη χρήση αντισωμάτων
Κάποια τέτοια μέθοδος απαιτείται έστω και στο τελικό στάδιο της ταυτοποίησης του στελέχους που απομονώνεται για να βρεθεί ο ορολογικός του τύπος
- μοριακές που στηρίζονται στην ανίχνευση κάποιας ακολουθίας DNA που είναι χαρακτηριστική για το παθογόνο π.χ. PCR

Κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι

- Προ-εμπλουτισμός
(πεπτονούχο νερό, επώαση στους 35-37°C για 16-20 ώρες)
- Εμπλουτισμός
(Rappaport - Vasiliadis broth 1:100, Selenite-Cysteine υλικό 1: 10, Tetrathionate broth 1: 10, στους 42°C για 24 ώρες ή περισσότερο)
- Επίστρωση σε εκλεκτικά υλικά
(Γραμμική διασπορά σε τρυβλία με εκλεκτικά υποστρώματα: XLD, Salmonella Shigella agar (S.S), Bismuth Sulfite agar (BS), στους 35 ή 37°C για 24 ώρες ή περισσότερο)
- Έλεγχος για την παρουσία τυπικών αποικιών σαλμονέλλας
- Καθαρισμός των ύποπτων αποικιών
(Nutrient agar, στους 35 ή 37°C για 24 ώρες και πρώτες βιοχημικές δοκιμές)

Κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι

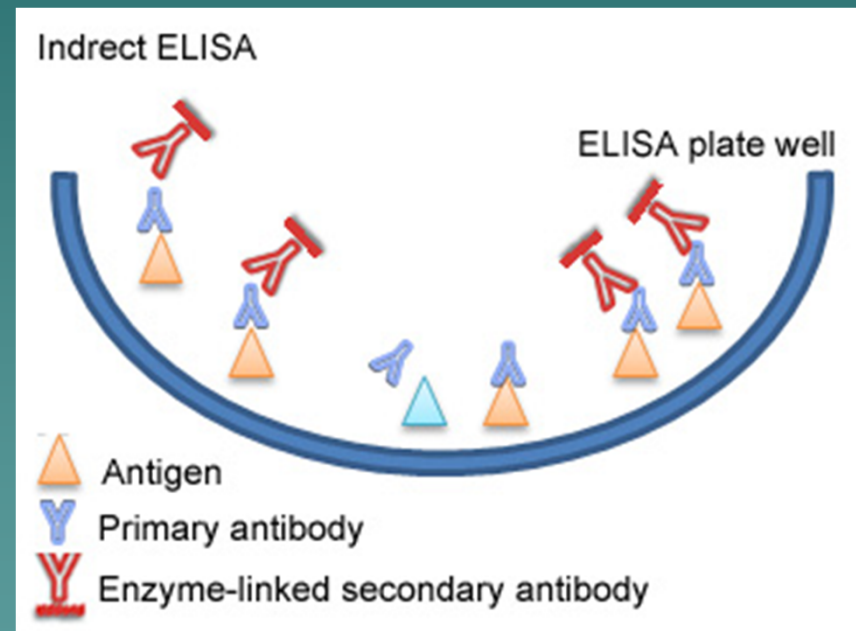
- ❑ Ταυτοποίηση του στελέχους και του αντιγονικού τύπου:
 - ✓ βιοχημικό προφίλ του στελέχους και
 - ✓ ανίχνευση των O ή H αντιγόνων
- ❑ Ταυτοποίηση του στελέχους με μοριακές τεχνικές (pulsed-field gel electrophoresis ή με PCR)
- ❑ Έλεγχος ευαισθησίας σε διάφορα αντιβιοτικά!!!
- ❑ Χρονική διάρκεια: από 5 έως 7 ημέρες

Ανοσολογικές μέθοδοι

- Πλεονέκτημα:
 - ☒ ταχύτητα
 - ☒ δυνατότητα να ανιχνεύσουν σε ζωντανούς ιστούς αντισώματα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα
- Μειονέκτημα: απαιτείται σημαντική συγκέντρωση του αντισώματος για την ανίχνευση
- Οι σύγχρονες ανοσολογικές μέθοδοι για την ανίχνευση της σαλμονέλλας συνδυάζονται με την τεχνική ELISA
- Χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: στις έμμεσες μεθόδους και στις ανταγωνιστικές μεθόδους

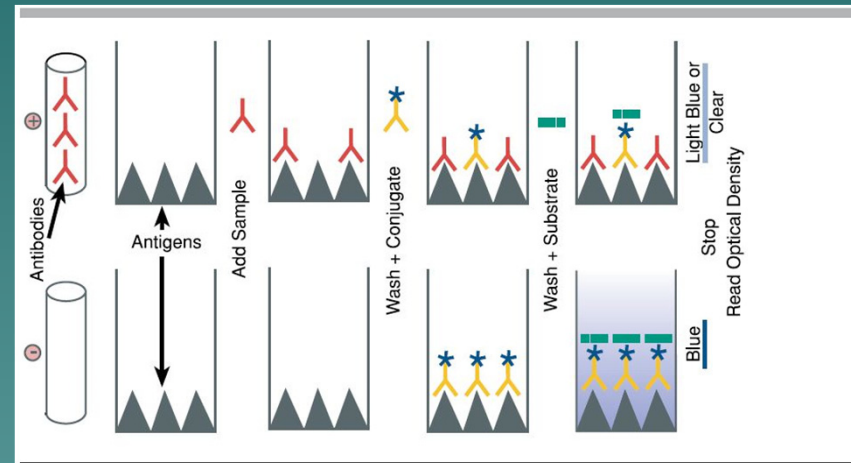
Έμμεσες ανοσολογικές μέθοδοι

- Το αντιγόνο βρίσκεται συνδεδεμένο στο «πηγάδι» του ειδικού πλακιδίου
- Προσθήκη ειδικού αντιδραστήριου που μειώνει τις μη-ειδικές συνδέσεις με το αντίσωμα
- Προσθήκη των δειγμάτων
- Η αντίδραση του ειδικού αντιγόνου με το αντίσωμα ανιχνεύεται μέσω της σύνδεσης του αντισώματος με κάποιο ένζυμο και δίνει τελικά κάποιο σήμα χρωματικό ή φθορισμού
- Αντιγόνα: λιποπολυσακχαρίδια από το κυτταρικό τοίχωμα (LPS), αντιγόνα από τα μαστίγια, SEF14 ινίδια, πιο ακατέργαστα μίγματα αντιγόνων του παθογόνου



Ανταγωνιστικές ανοσολογικές μέθοδοι

- Επώαση του αντισώματος με το δείγμα (αντιγόνο)
- Προσθήκη του μίγματος στο «πηγάδι», όπου υπάρχει το ίδιο αντιγόνο
- Ξέπλυμα της περίσσειας του αντισώματος (όσο πιο πολύ αντιγόνο στο δείγμα, τόσο λιγότερο αντίσωμα θα περισσέψει για να αντιδράσει με το αντιγόνο που υπήρχε στο πλακίδιο)
- Προσθήκη του αντισώματος προσδεμένου με κάποιο ένζυμο
- Αντίδραση με παρατήρηση χρώματος ή φθορισμού (όσο πιο πολύ αντιγόνο υπάρχει στο δείγμα τόσο πιο μικρό σήμα θα δώσει η αντίδραση)
- Πλεονέκτημα: μπορεί να χρησιμοποιηθούν δείγματα που είναι πιο ακατέργαστα με μεγάλη εξειδίκευση στην αντίδραση
- Μειονέκτημα: κόστος



Μοριακές μέθοδοι

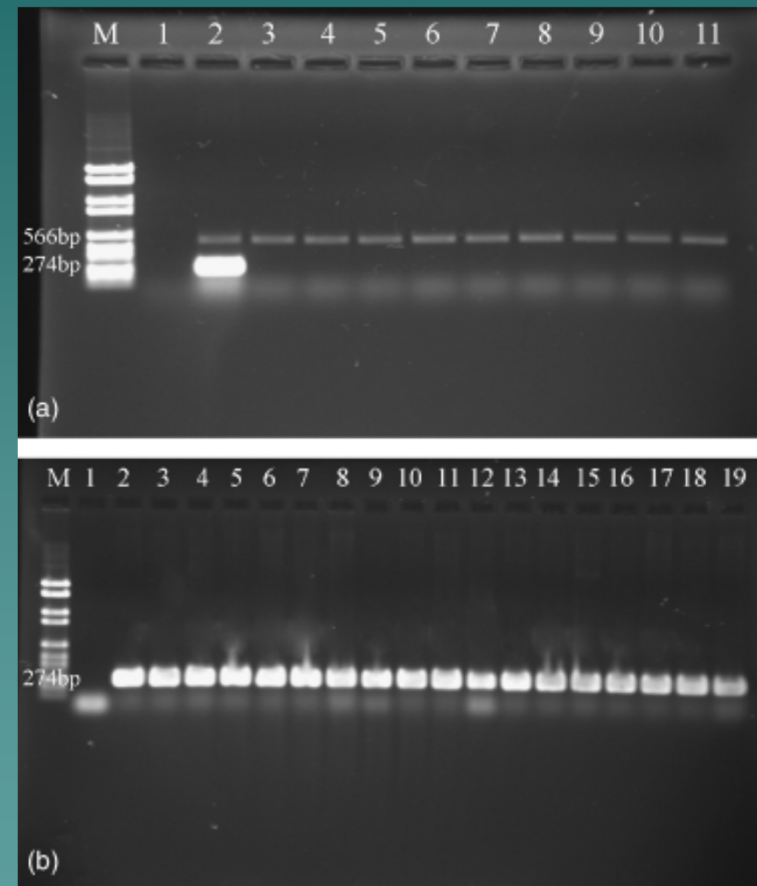
- ⊙ PCR ή real-time PCR (qPCR)
- ⊙ Πλεονεκτήματα: σύντομες και ευαίσθητες.
- ⊙ Μειονεκτήματα: Απαιτούν εξειδικευμένο προσωπικό, μεγάλη προσοχή στην χρήση ιδιαίτερα της real-time PCR, λόγω της ευαισθησίας που έχει ως μέθοδος
- ⊙ Αναστολείς στο δείγμα που μπορεί να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα!
- ⊙ Δεν είναι εφικτή η απομόνωση του στελέχους και η ταυτοποίησή του
- ⊙ Χρησιμοποιούνται και για το τελικό στάδιο της ταυτοποίησης στις καλλιεργητικές τεχνικές

Μοριακές μέθοδοι

- ◎ 1. Προετοιμασία δείγματος για την απομόνωση του DNA (κόπρανα, αίμα, τρόφιμα κ.α.). Πιθανά προηγείται στάδιο εμπλουτισμού (R-V broth κ.α.)
- ◎ 2. Απομόνωση του DNA
- ◎ 3. Ενίσχυση της ακολουθίας DNA. PCR μέθοδος (εκκινητές: στοχεύουν στην περιοχή εκείνη του βακτηριακού χρωμοσώματος που κωδικοποιούνται αρκετοί παράγοντες παθογένειας π.χ. γονίδιο *ihnA* σε μία περιοχή 284bp)
- ◎ Βήμα 4. Αποτελέσματα (ηλεκτροφόρηση νουκλεϊκών οξέων και εντοπισμός της ζώνης εκείνης του DNA που έχει το αναμενόμενο μέγεθος)
- ◎ Real-time PCR: ποσοτικοποίηση του δείγματος με πρότυπη καμπύλη DNA ενός ή κάποιων στελεχών του γένους σαλμονέλλα)

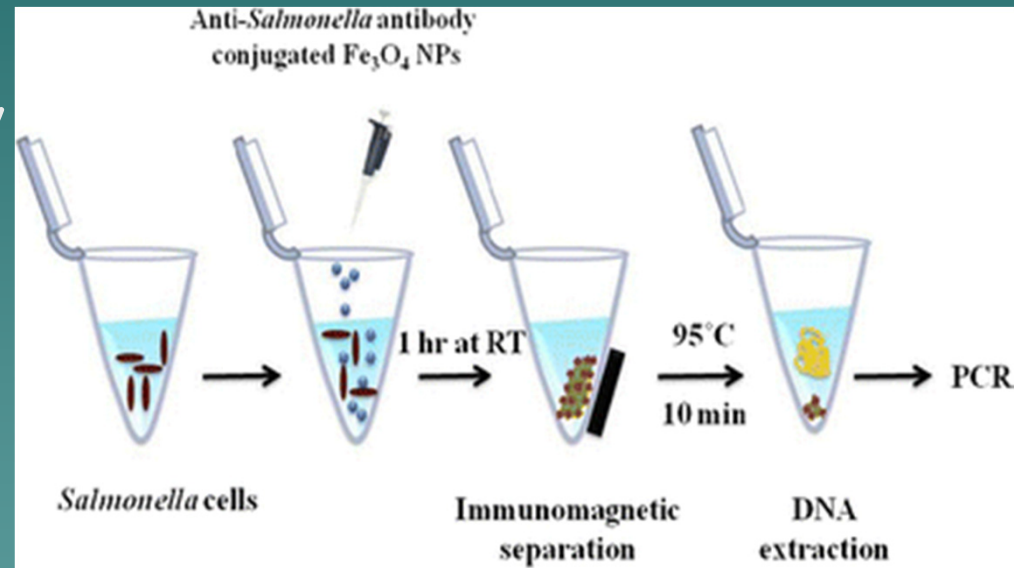
Ηλεκτροφόρηση προϊόντων PCR για την ανίχνευση *Salmonella* spp.

- Α) Δείγματα 1-11: 1. αρνητικός μάρτυρας, 2, *Salmonella enterica* (positive control); 3, *Escherichia coli*; 4, *Shigella dysenteriae*; 5, *Klebsiella pneumoniae*; 6, *Listeria monocytogenes*; 7, *Pseudomonas aeruginosa*; 8, *Campylobacter jejuni*; 9, *Citrobacter freundii*; 10, *Proteus mirabilis*; 11, *Bifidobacterium longum*.
- (b) PCR using as template DNA from *Salmonella* strains. Lanes 1-19: 1, negative control; 2-10, *S. Senftenberg*, 11; *S. Liverpool*; 12, *S. enterica* ssp. *arizonae*; 13, *S. Enteritidis*; 14, *S. enterica* ssp. *salamae*; 15, *S. Choleraesuis*; 16, *S. Typhimurium*; 17, *S. Blockley*; 18, *S. ParatyphiB* var. *Java*; 19, *S. Muenchen*. M: pBR 328/HinfI/BglI DNA ladder (size marker)



Συνδυασμός μεθόδων

- Ανοσολογικές με μοριακές ή καλλιεργητικές με κάποια άλλη κατηγορία.
- Παράδειγμα: συνδυασμός ανοσολογικών και μοριακών τεχνικών
- Προσθήκη μαγνητικών νανο-σωματιδίων καλυμμένων με πυρίτιο και ακινητοποιημένα με αντισώματα για τη *Salmonella* spp. (διαχωρισμός με μαγνητισμό των κυττάρων της σαλμονέλλας)
- Ακολουθεί multiplex PCR ή real-time PCR



Ευχαριστώ!!!

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗΣ ΑΕΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΠΙΚΑΙΡΟΠΟΙΗΣΗ ΓΝΩΣΕΩΝ ΑΠΟΦΟΙΤΩΝ ΑΕΙ (ΠΕΓΑ)

«Οι σύγχρονες τεχνικές βιο-ανάλυσης στην υγεία, τη γεωργία, το περιβάλλον και τη διατροφή»



Ευρωπαϊκή Ένωση
Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο



ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ
επένδυση στην κοινωνία της γνώσης

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ

Με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης

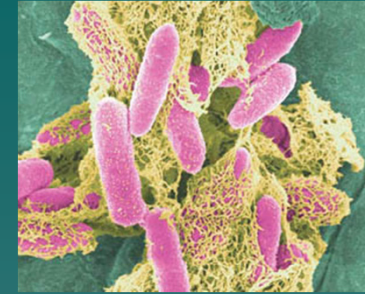


ΕΣΠΑ
2007-2013
πρόγραμμα για την ανάπτυξη
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ

Μικροβιολογική Ανάλυση Τροφίμων (2^η)

Μαντώ Κυριακού

Τμήμα Επιστήμης Διαιτολογίας - Διατροφής
Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο
2014



Escherichia coli O157: H7

(Παθογόνα στελέχη –
Μηχανισμοί – Ανίχνευση)

Χαρακτηριστικά του είδους *Escherichia coli*

- Ανήκει στη φυσική μικροχλωρίδα του παχέος εντέρου όλων των ζώων και του ανθρώπου
- Αποτελεί λιγότερο από το 1% του συνολικού βακτηριακού πληθυσμού
- Ο πληθυσμός του ανέρχεται σε 10^8 κυτ/g στον άνθρωπο

Χαρακτηριστικά του είδους *Escherichia coli*

- Gram- βάκιλος, προαιρετικά αναερόβιος, δεν σχηματίζει ενδοσπόρια, έχει συνήθως αυτόνομη κίνηση (περίτριχα μαστίγια)
- Ταξινομικά ανήκει στα *Enterobacteriaceae*
- Διαχωρισμός στελεχών με κριτήριο τον ορολογικό τύπο
- Τα στελέχη μπορεί να διαφέρουν ως προς:
 - ✓ τα σωματικά αντιγόνα (O) >170
 - ✓ τα αντιγόνα του μαστιγίου (H) > 50
 - ✓ τα αντιγόνα του ελύτρου (K) ~ 100
- Άλλα σημαντικά χαρακτηριστικά για την ταξινόμηση: βακτηριοφάγοι που προσβάλλουν, παραγωγή εντεροτοξινών

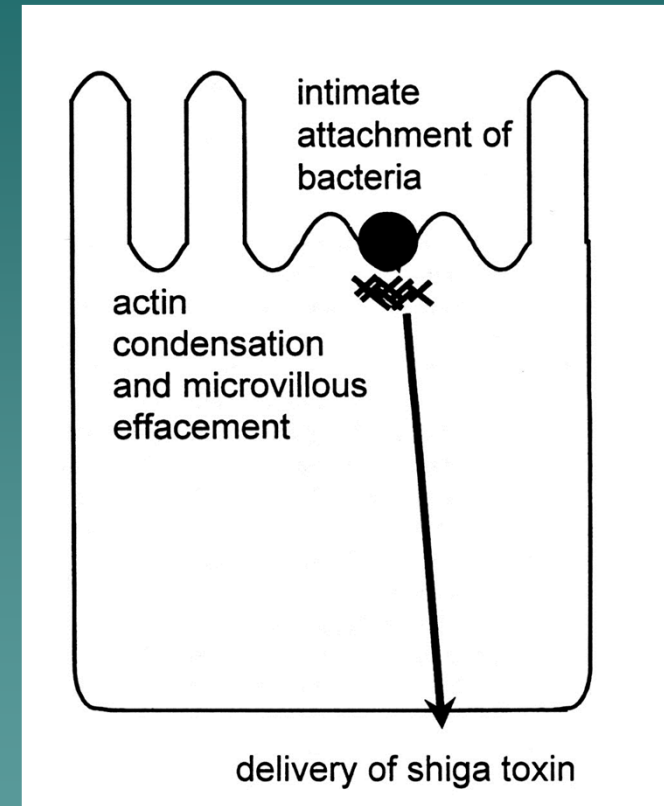


Παθογόνα στελέχη του *E.coli*

- Κάποια στελέχη έχουν συνδεθεί με παθογένεια και ιδιαίτερα με εκδήλωση διάρροιας
- Οι κατηγορίες παθογόνων *E.coli* είναι οι εξής:
 - ✦ Εντεροπαθογόνο (Enteropathogenic-EPEC)
 - ✦ Εντεροτοξικό (Enterotoxigenic-ETEC)
 - ✦ Εντερο-διηθητικό (Enteroinvasive-EIEC)
 - ✦ Εντεροαιμορραγικό (Enterohaemorrhagic-EHEC)
 - ✦ Εντεροσυσσωρευτικό (Enteroadgregative-EAEC) και το
 - ✦ (Diffusely adherent-DAEC)

Εντεροαιμορραγικό *E.coli* (EHEC)

- ❑ Αιμορραγική διάρροια μετά από την κατανάλωση μολυσμένου τροφίμου ή πόσιμου νερού
- ❑ Οι πιο γνωστοί ορότυποι: O26, O111 και O157
- ❑ Παράγουν κυτταροτοξικούς παράγοντες και ονομάζονται βεροτοξίνες (vero) ή Shiga-τοξίνες (Stxs)
- ❑ Μηχανισμός δράσης σε κυτταρικό επίπεδο του O157:H7 :
 - ❖ προσκολλάται στο εντερικό επιθήλιο προκαλώντας πληγές και καταστρέφοντας τις μικρολάχνες τοπικά
- ❑ εισέρχεται στα κύτταρα όπου παράγει τοξίνες Shiga, οι οποίες διαφεύγουν από τον εντερικό αυλό και προκαλούν γενικευμένες βλάβες (καταστρέφουν τα ενδοθηλιακά κύτταρα και ιδιαίτερα αυτά των νεφρών)



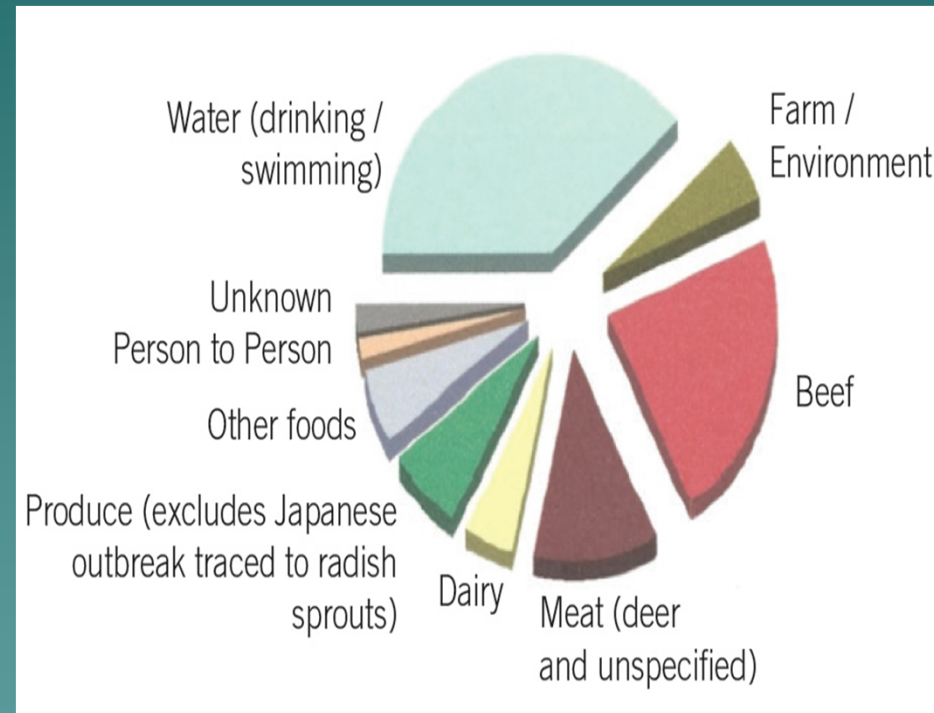
Ασθένεια

(*E.coli* O157:H7)

- ❑ Χρόνος επώασης: 3-9 ημέρες
- ❑ Διάρκεια των συμπτωμάτων: 2-9 ημέρες
- ❑ Συμπτώματα: ξεκινούν με υδαρή διάρροια που γρήγορα καταλήγει σε αιμορραγική κολίτιδα (σοβαρούς κοιλιακούς πόνους, αιμορραγική διάρροια, εμετός, όχι πυρετός)
- ❑ 5-10% εκδηλώνει θρόμβωση σε μικροαγγεία που μπορεί να καταλήξει σε αιμολυτικό-ουραιμικό σύνδρομο, οξεία θρομβοκυτταροπενία και ειδικά στα παιδιά σε οξεία νεφρική ανεπάρκεια, αλλά εκτός από τους νεφρούς μπορεί να επηρεαστούν και άλλα όργανα.
- ❑ Θνησιμότητα: ~3% των ασθενών
- ❑ Μολυσματική δόση: πολύ χαμηλή, <100 κύτταρα του παθογόνου

Επιδημιολογία

- ◆ Προκαλεί κάθε χρόνο στις ΗΠΑ ~ 73.500 περιστατικά
- ◆ (1982-2002): 350 ξεσπάσματα της ασθένειας σε 49 πολιτείες με αποτέλεσμα:
- ◆ 8.598 ασθενείς, 1493 εισαγωγές στο νοσοκομείο, 354 παιδιά με αιμολυτικό - ουρεμικό σύνδρομο, 40 απεβίωσαν (0,4%) (CDC)



Επικίνδυνα τρόφιμα

- Διαφέρουν μεταξύ των χωρών και αντανακλούν τις διατροφολογικές συνήθειες των κατοίκων
 - Κυρίως το μοσχαρίσιο κρέας
 - τα γαλακτοκομικά προϊόντα
 - φρούτα και λαχανικά, χυμός μήλου κ.α.
-
- Γερμανία, 2011: κατανάλωση αγγουριών, άγνωστης τελικά προέλευσης. Παθογόνο *E.coli* O104:H4 προκάλεσε μεγαλύτερο αριθμό περιστατικών με αιμολυτικό - ουρεμικό σύνδρομο (22%)

Σημαντικά περιστατικά αιμοραγικής κολίτιδας

- ✦ Ιαπωνία (Sakai) το 1996:
- ✦ *E. coli* O157:H7
- ✦ 7.966 περιστατικά, από τα οποία 2.764 ήταν μικροβιολογικά ελεγμένα
- ✦ 106 από αυτά εξελίχθηκαν σε αιμολυτικό ουρεμικό σύνδρομο
- ✦ Πηγή μόλυνσης ήταν φύτρα από άσπρο ραπανάκι

Μέθοδοι ανίχνευσης του *E.coli* O157:H7

- ✦ Πρέπει να είναι πολύ ευαίσθητες (μικροοργανισμοί ανταγωνιστές στα περιβαλλοντικά ή στα κλινικά δείγματα)
- ✦ Καλλιεργητικές τεχνικές σε συνδυασμό με ανοσολογικό προσδιορισμό του στελέχους
- ✦ Ανοσολογικές τεχνικές
- ✦ Μοριακές τεχνικές και διάφοροι συνδυασμοί αυτών
- ✦ Εμπορικά kits: βοηθούν ως προς τον περιορισμό του όγκου των δειγμάτων, την ταχύτητα και αυξάνουν την ευαισθησία

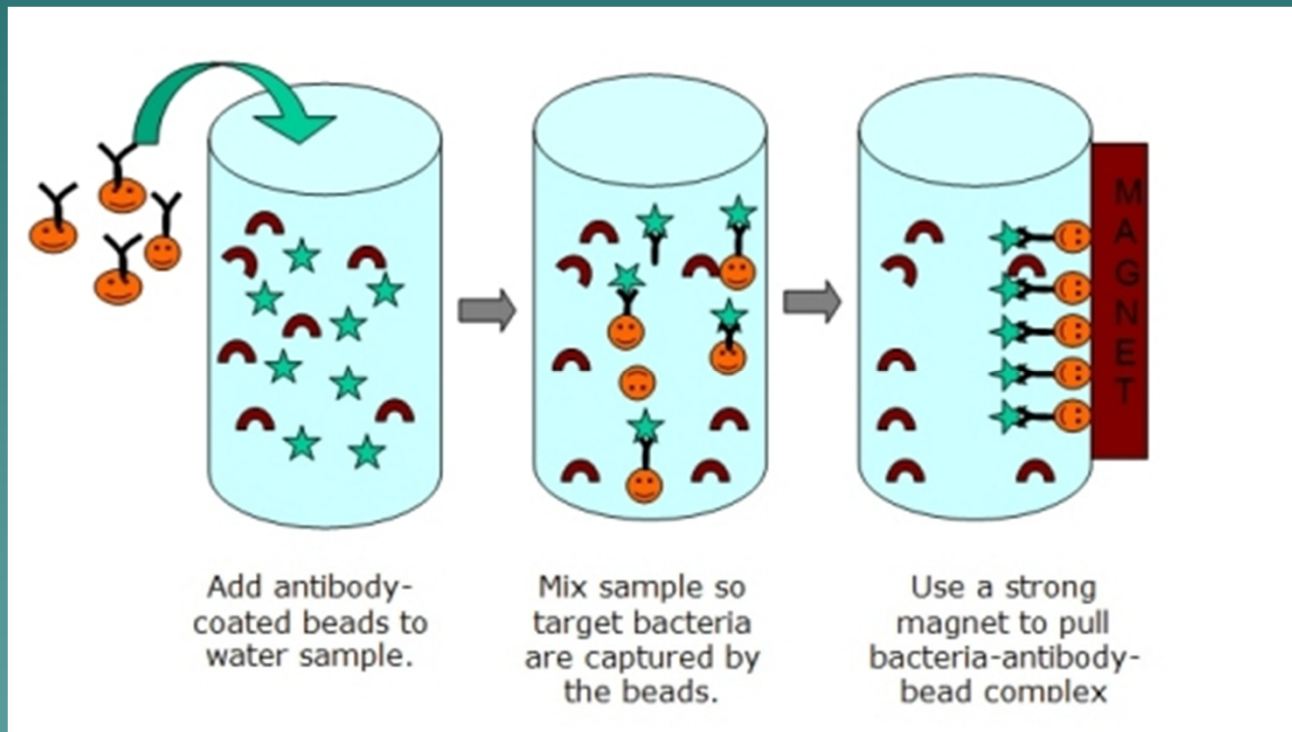
Κλασσικές μέθοδοι ανίχνευσης του *E.coli* O157:H7

- 1. Εμπλουτισμός (π.χ. το modified TSB με novobiocin, στους 41.5oC για 22 ώρες περίπου)
- 2. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός των κυττάρων (με την χρήση ανοσομαγνητικών σφαιριδίων για 6 ώρες, όπου δεσμεύονται τα κύτταρα του παθογόνου)
- 3. Μεταφορά με επίστρωση σε εκλεκτικά υποστρώματα (Sorbitol Mac Conkey agar+ cefixime +potassium tellurite, Sorbitol Mac Conkey agar+ cefixime + rhamnose, για 24 ώρες στους 37 oC)
- 4. Έλεγχος αποικιών και καθαρισμός των ύποπτων στελεχών σε κάποιο γενικό θρεπτικό υλικό, για 24 ώρες στους 37 oC.
- 5. Ταυτοποίηση των ύποπτων στελεχών με κάποια ανοσολογική τεχνική

- Στα περισσότερα εργαστήρια που ασχολούνται με τον επιδημιολογικό έλεγχο: ταυτοποίηση του στελέχους με PFGE

- Δεν μπορούν να ανιχνεύσουν το παθογόνο όταν είναι σε πολύ μικρή ποσότητα κυττάρων και δεν ανιχνεύουν πάντα τα στελέχη του *E.coli* που παράγουν την τοξίνη, αλλά δεν είναι O157:H7

Αρχή του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού των βακτηριακών ΚΥΤΤΑΡΩΝ (Πηγή: <http://oh.water.usgs.gov>)



Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης του *E.coli* O157:H7

Μέθοδοι ELISA

- ☒ στοχεύουν στον εντοπισμό:
- ☒ των shiga τοξινών Stx1 και Stx2
- ☒ των αντιγόνων O157 που βρίσκονται στο στρώμα των λιπολυσακχαριτών

Σύντομες, αλλά δεν επιτρέπουν την απομόνωση του παθογόνου και τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *E.coli* O157:H7

- ❑ PCR: ενίσχυση και ανίχνευση συγκεκριμένων γονιδίων του παθογόνου (όπως τα γονίδια που κωδικοποιούν για τη σύνθεση των τοξινών shiga)
- ❑ Multiplex-PCR: ταυτόχρονη ενίσχυση και ανίχνευση περισσότερων γονιδίων με τη βοήθεια περισσότερων ζευγών εκκινητών
- ❑ Multiplex-PCR: Γίνεται συνδυασμός των θετικών σημάτων για την ανίχνευση στελεχών που παρουσιάζουν ιδιαιτερότητες (παραγωγή τοξίνης από διαφορετικούς αντιγονικούς τύπους)
- ❑ Για να αυξηθεί η ευαισθησία τους: στάδιο εμπλουτισμού πριν από την απομόνωση του DNA από το δείγμα



Campylobacter spp.

(Μηχανισμοί - Ασθένειες -
Ανίχνευση)

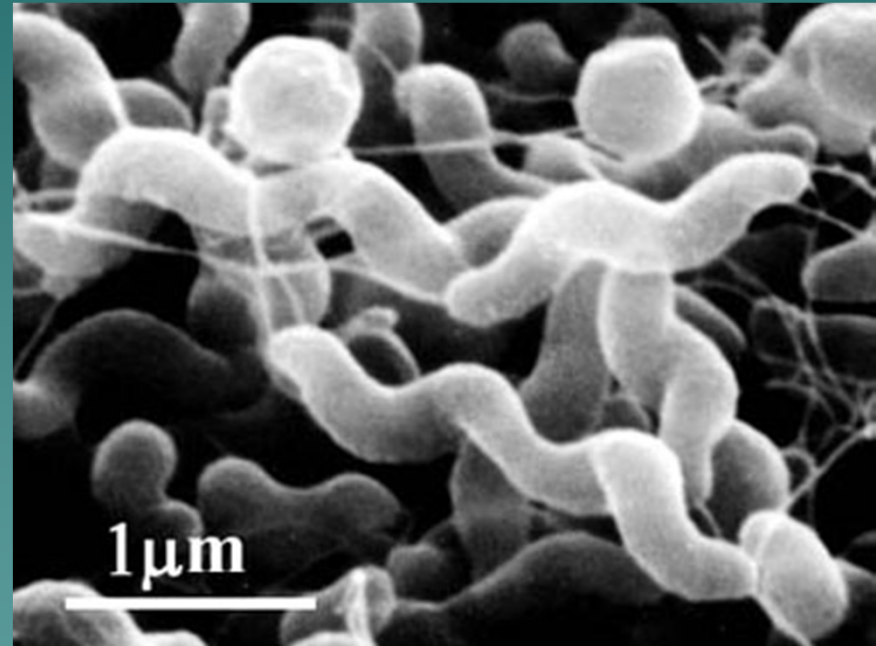
Χαρακτηριστικά του βακτηρίου

- ❖ Gram - , σπειρίλλιο ή κεκαμμένος βάκιλλος, με χαρακτηριστική κίνηση που κατευθύνεται από ένα ή δύο πολικά μαστίγια
- ❖ Μικροαερόφιλο, απαιτεί πλούσια υποστρώματα για την ανάπτυξή του. Δεν μπορεί να οξειδώσει, ούτε να ζυμώσει τους υδατάνθρακες
- ❖ Μη-σποριογόνο βακτήριο
- ❖ Το γένος περιλαμβάνει 15 είδη και 6 υποείδη, ενώ ταυτοποιούνται συνεχώς καινούργια μέλη. Τα σημαντικότερα παθογόνα για τον άνθρωπο είναι το *C.jejuni* και το *C.coli*



Χαρακτηριστικά του βακτηρίου

- ❖ Μεγάλη ποικιλία στους φαινότυπους των στελεχών που απομονώνονται από διαφορετικά περιβαλλοντικά δείγματα
- ❖ Αυξημένη δυνατότητα για ανταλλαγή γενετικού υλικού;
- ❖ Διαπιστώνεται και από τους διαφορετικούς γονότυπους που ελέγχονται με μοριακές τεχνικές (PFGE, ribotyping)
- ❖ Τα κύτταρά του μπορεί να πέσουν σε κατάσταση βιώσιμη αλλά μη-καλλιεργήσιμη (VBNC). Στην κατάσταση αυτή μεταπίπτουν σε κοκκοειδή μορφή και είναι δύσκολο να ανιχνευτούν



Ασθένεια

- ❑ Χρόνος επώασης: 24-72 ώρες
- ❑ Διάρκεια συμπτωμάτων: 5-8 ημέρες
- ❑ Συμπτώματα: διάρροια (με ή χωρίς αίμα), πυρετός και κοιλιακοί σπασμοί (γαστρεντερίτιδα)
- ❑ Μπορεί να μην εμφανίσουν καθόλου συμπτώματα έως να είναι σοβαρά ασθενείς. Στις περισσότερες περιπτώσεις είναι αυτό-ιάσιμη νόσος
- ❑ Επιπλοκές: πρωκτίτιδα, γενικευμένη σήψη, μηνιγγίτιδα, αποβολή εμβρύου, αρθρίτιδα και σύνδρομο Guillain Barré

Σύνδρομο Guillain Barré (GBS)

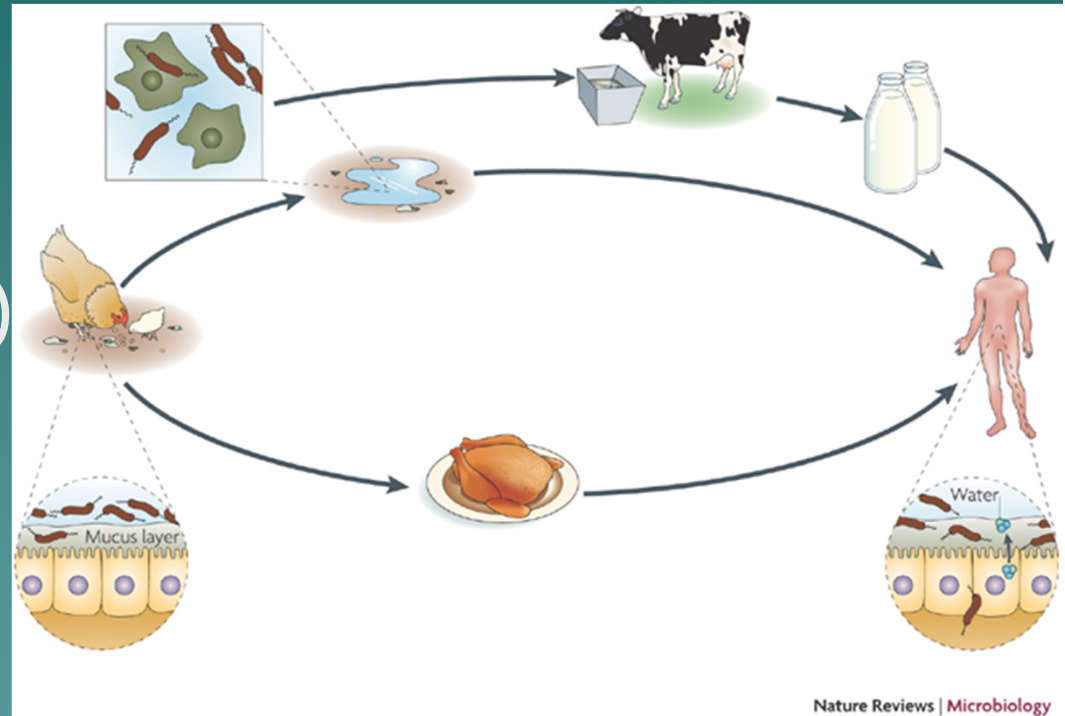
- Το *C.jejuni* θεωρείται ο σημαντικότερος λόγος πρόκλησης του GBS
- Φλεγμονώδης πολυνευρίτιδα με πόνο, πυρετό και αδυναμία που προοδευτικά γίνεται παράλυση και συχνά καταλήγει σε μακρά παραλυσία
- 1/1000 προσβεβλημένους από το *C.jejuni* εκδηλώνει το GBS. 13% καταλήγουν και 75% παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα και 15% αναρρώνουν πλήρως

Επιδημιολογία

- Από τις πιο συχνά εμφανιζόμενες αιτίες διάρροιας στις ΗΠΑ
- Σποραδικά κρούσματα και όχι επιδημίες
- Συχνότητα εμφάνισης της νόσου - ΗΠΑ : ~14 κρούσματα κάθε χρόνο ανά 100.000 πληθυσμό (πολλά περιστατικά δεν καταγράφονται)
- Προσβάλλονται ~1,3 εκατομμύρια άνθρωποι κάθε χρόνο (CDC)
- Συχνότητα εμφάνισης της νόσου - ΕΕ : πιο συχνά εμφανιζόμενη ασθένεια για το 2012 (214.268 κρούσματα) (EFSA)
- Μολυσματική δόση του παθογόνου: <1000 κύτταρα

Επικίνδυνα τρόφιμα

- ❑ Κοτόπουλο αλλά και άλλα κρέατα
- ❑ Νερό μη - χλωριωμένο (VBNC)
- ❑ Σαλάτες, λαχανικά
- ❑ Μη-παστεριωμένο γάλα



Μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

- ☒ Καλλιεργητικές μέθοδοι: απομόνωση του στελέχους και μετά ταυτοποίηση με ανοσολογική ή μοριακή μέθοδο
- ☒ Ανοσολογικές μέθοδοι
- ☒ Μοριακές μέθοδοι

Καλλιεργητικές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

- ❑ Δυσκολία στην καλλιέργεια και διατήρηση
- ❑ Προσπάθεια να μην καταστραφούν οι μορφές VBNC (στάδιο προ-εμπλουτισμού)

Σύμφωνα με την standard μέθοδο:

- ✦ Εμπλουτισμός σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες (Preston broth στους 42°C για 18 ώρες ή στο Park και στο Sanders broth όπου προηγείται επώαση στους 32 °C για 4 ώρες πριν από την προσθήκη των αντιβιοτικών και ακολουθεί επώαση στους 37°C για 2 ώρες και μεταφορά στους 42 °C για 40-42 ώρες)
- ✦ Γραμμική διασπορά σε 2 ή περισσότερα διαφορετικά εκλεκτικά υποστρώματα, στους 42 °C για πέντε ημέρες σε μικρο-αερόφιλες συνθήκες
- ✦ Δοκιμές επιβεβαιωτικές στις ύποπτες αποικίες

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

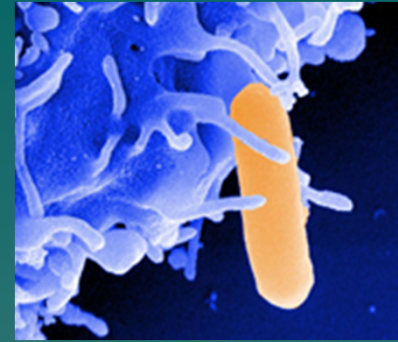
- ✦ Εμπορικά διαγνωστικά kits: εξειδικευμένες ανοσοσφαιρίνες συνδεδεμένες με latex για συγκεκριμένες πρωτεΐνες του είδους
- ✦ Όχι πολύ ευαίσθητες (βελτίωση: στάδιο εμπλουτισμού)
- ✦ Ανίχνευση του παθογόνου κατευθείαν στα δείγματα (τρόφιμα, κόπρανα): υπάρχει κίνδυνος λανθασμένων αρνητικών δειγμάτων
- ✦ Λανθασμένα θετικά δείγματα: μη-εξειδικευμένη αντίδραση αντιγόνου - αντισώματος, ή και πιθανή αντίδραση με VBNC
- ✦ ELISA: πιο ευαίσθητες μέθοδοι

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

- Τμήματα DNA ειδικά σχεδιασμένα για το είδος ως μόρια ιχνηθέτες (probes)
- Αρχή της μεθόδου: ελάχιστη παρουσία των αντίστοιχων τμημάτων DNA στο δείγμα, οδηγεί στη δημιουργία δεσμών υδρογόνου μεταξύ των ομόλογων τμημάτων (υβριδισμός)
- Η αντίδραση αυτή του υβριδισμού ανιχνεύεται με διάφορους τρόπους στα διαφορετικά kits
- Probes: 16S rRNA, γονίδιο όπως φλαγγελίνης, *mapA* κ.α.
- Αναφορές για ψευδώς αρνητικά αλλά και θετικά αποτελέσματα
- Ανίχνευση όμως των VBNC

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *Campylobacter jejuni*

- PCR (αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης)
- Πλεονέκτημα: ενίσχυση κάποιας ακολουθίας DNA, χαρακτηριστικής για το παθογόνο και στη συνέχεια ανίχνευση
- Εκκινητές: 16S rRNA και λιγότερο συχνά από την 23S rRNA, το *mapA*, το *flaA* γονίδιο
- Εξειδίκευση, ταχύτητα, ευαισθησία
- Προσοχή! Απαιτείται πολύ καλός καθαρισμός του DNA, εξουδετέρωση των αναστολέων της διαδικασίας που υπάρχουν στα δείγματα
- Ηλεκτροφόρηση του PCR προϊόντος, είτε σύνδεση με κάποια ανοσολογική μέθοδο για τον εντοπισμό του
- real-time PCR: ποσοτική καταμέτρηση των παθογόνων



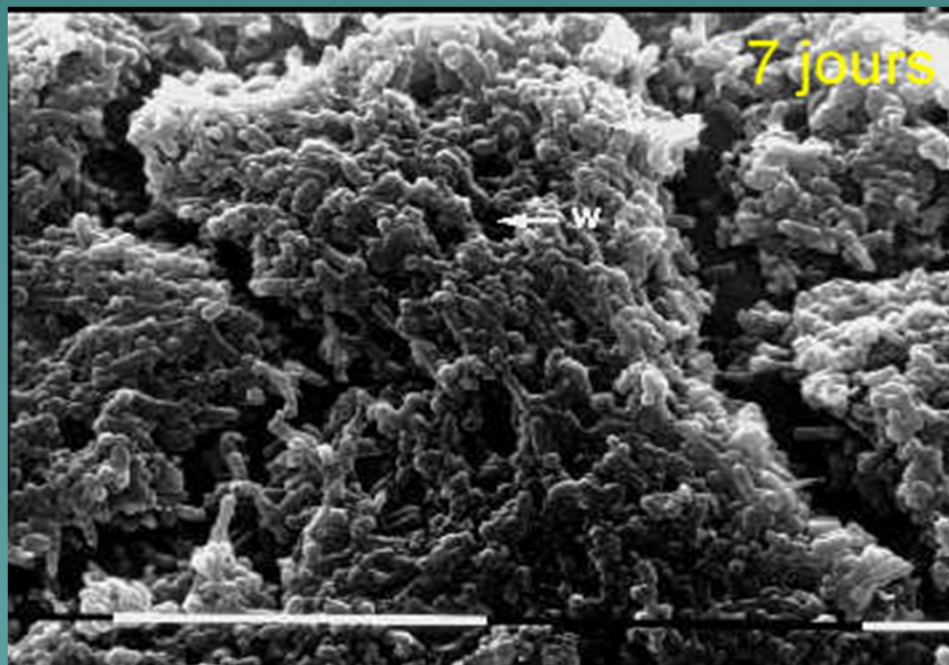
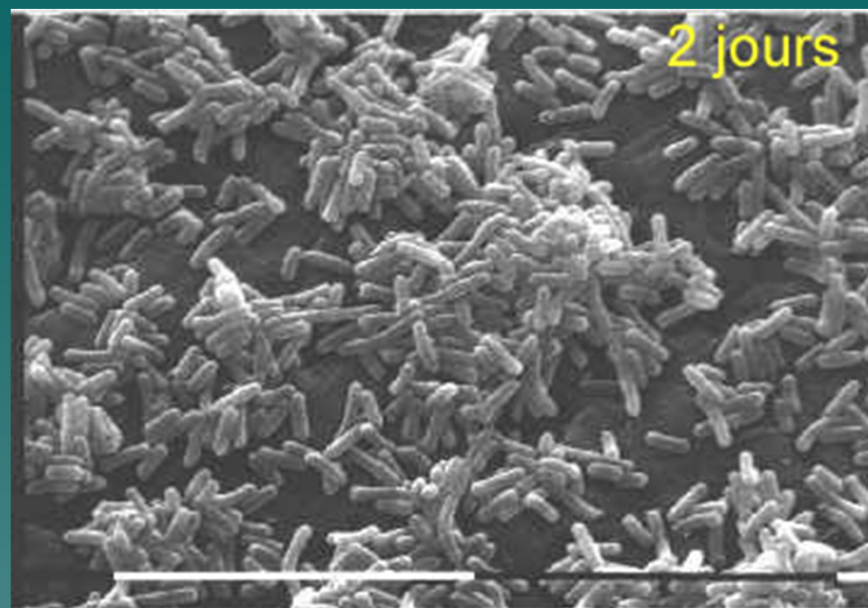
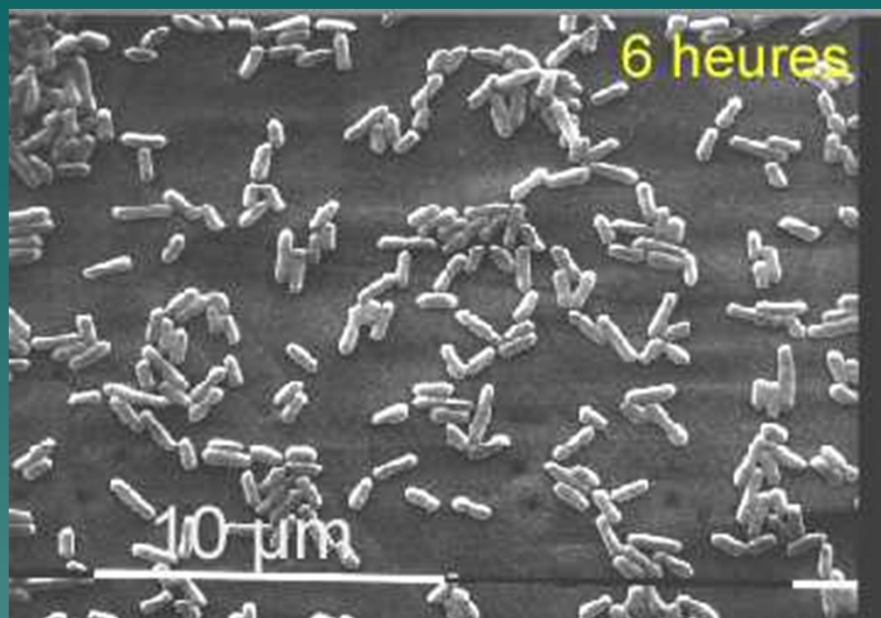
Listeria monocytogenes

(Μηχανισμοί - Ασθένειες -
Ανίχνευση)

Χαρακτηριστικά του παθογόνου

- ✓ Gram+ βάκιλλος, αερόβιος με κύριο χαρακτηριστικό ότι αυξάνεται και σε χαμηλές θερμοκρασίες (ψυγείου)
- ✓ Απομονώνεται από το περιβάλλον (υπάρχει σχεδόν παντού) και φαίνεται ότι συνδέεται περισσότερο με τη βλάστηση παρά με το έδαφος
- ✓ Το είδος αυτό θεωρείται το παθογόνο του γένους και ειδικότερα οι ορολογικοί τύποι που συνήθως συνδέονται με κρούσματα λιστερίωσης είναι το 1/2α, 1/2β, 4b
- ✓ (1,2,4: σωματικά αντιγόνα, a, b, c: αντιγόνα μαστιγίου)





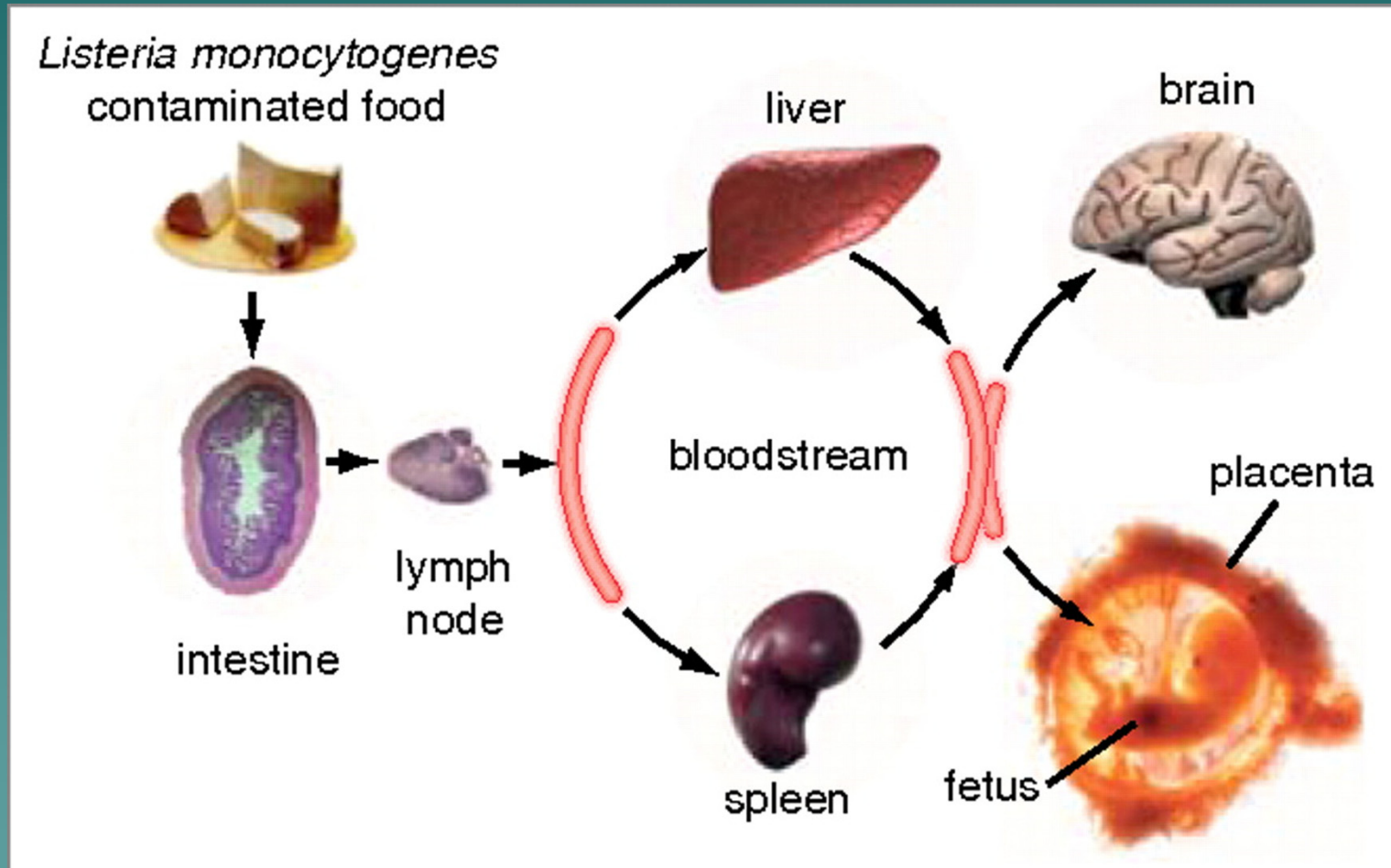
Ασθένεια: ποιους προσβάλλει;

- ✓ Ασθενείς που έχουν υποστεί κάποια μεταμόσχευση, ανοσοκατασταλμένοι, ασθενείς με AIDS, εγκυμονούσες γυναίκες, καρκινοπαθείς, ηλικιωμένοι, παιδιά
- ✓ Το παθογόνο μεταδίδεται μέσω τριών οδών: επαφή με ζώα, μόλυνση νεογέννητων στο νοσοκομείο και μέσω μολυσμένων τροφίμων

Ασθένεια

- ✓ Μόλυνση από μολυσμένο ζώο: προκαλεί τοπικές πληγές στην επιδερμίδα, χρόνος επώασης 1-2 ημέρες, ακολουθεί αυτο-ίαση
- ✓ Μόλυνση βρέφους (από την μητέρα κατά τον τοκετό ή από άλλα βρέφη στο νοσοκομείο): πολύ σοβαρή μηνιγγίτιδα και θάνατος. Χρόνος επώασης: 1-2 ημέρες
- ✓ Μόλυνση της μητέρας κατά την εγκυμοσύνη από μολυσμένη τροφή: μέτρια μορφή γρίπης, ή χωρίς συμπτώματα στη μητέρα. Σοβαρές επιπλοκές στο έμβryo (αποβολή, γέννηση νεκρού βρέφους, μηνιγγίτιδα). Χρόνος επώασης: 1ημέρα-5 εβδομάδες
- ✓ Μόλυνση μη-εγκύων από μολυσμένη τροφή: ασυμπτωματική ή μέτριας βαρύτητας ασθένεια, μπορεί να μολύνει το κεντρικό νευρικό σύστημα (μηνιγγίτιδα). Κίνδυνος για ανοσοκατασταλμένους και ηλικιωμένους. Χρόνος επώασης: 1ημέρα- 5 εβδομάδες

In vivo μόλυνση του ξενιστή από το παθογόνο

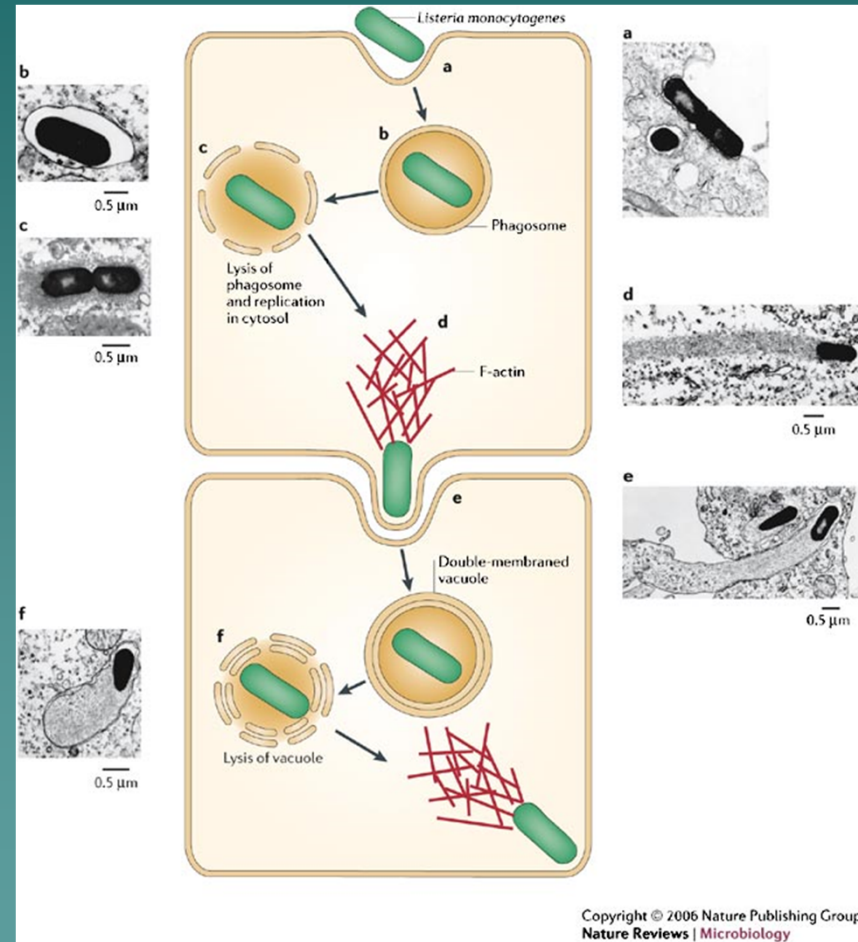


Μηχανισμός παθογένειας

- ✓ Προαιρετικά ενδοκυτταρικό παθογόνο, έχει αναπτύξει διάφορες στρατηγικές όπως: διήθηση, ενδοκυτταρική αύξηση, απευθείας μετάδοση από κύτταρο σε κύτταρο
- ✓ Τα βακτήρια προσβάλλουν εντεροκύτταρα ή κύτταρα M (πλάκες Peyer) και μεταφέρονται από τα φαγοκύτταρα στα όργανα στόχους: ήπαρ και σπλήνα. Εάν δεν καταστραφούν από τα μακροφάγα, έστω και ελάχιστα κύτταρα μολύνουν τα ηπατοκύτταρα και οδηγούν σε γενικευμένη λοίμωξη των δευτερογενών οργάνων στόχων (ΚΝΣ, πλακούντα, έμβρυο)
- ✓ Σημαντικό σημείο: η ικανότητα του παθογόνου να πολλαπλασιάζεται μέσα στα μακροφάγα

Κίνηση των κυττάρων του παθογόνου στο εσωτερικό των κυττάρων του ξενιστή

Τα κύτταρα της λιστέριας έχουν την ικανότητα να χρησιμοποιούν τα μόρια ακτίνης του ξενιστή για να κινούνται μέσα στα κύτταρα



Τρόφιμα ευαίσθητα

- ✓ Μαλακά τυριά, πατέ, λουκάνικα
- ✓ Σχεδόν όλα τα τρόφιμα όμως εμπλέκονται: ωμά και επεξεργασμένα θαλασσινά, ωμά λαχανικά, κρέατα και πουλερικά όπως και τα υποπροϊόντα τους
- ✓ 2-6% του υγιούς πληθυσμού είναι ασυμπτωματικοί φορείς στα κόπρανα του *L.monocytogenes*

Μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*

- ❑ Κλασσικές καλλιεργητικές τεχνικές (standard μεθοδολογία)
- ❑ Ανοσοβιολογικές τεχνικές
- ❑ Μοριακές τεχνικές
- ❑ Συνδυασμός (μετά την απομόνωση του ύποπτου στελέχους από το δείγμα και την καταμέτρησή του, ακολουθεί η ταυτοποίησή του με κάποια ανοσολογική ή μοριακή μέθοδο)

Καλλιεργητικές μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*

- Προ-εμπλουτισμός. (Buffered Listeria enrichment broth, για 4 ώρες στους 30°C)
- Εμπλουτισμός. (Μετά την 4η ώρα προστίθενται διάφοροι εκλεκτικοί παράγοντες και συνεχίζεται η επώαση για 48 ώρες συνολικά). Εναλλακτικά Fraser broth $\frac{1}{2}$ σε δύο στάδια επώασης (ISO 11290-1)
- Μεταφορά σε εκλεκτικά υποστρώματα. (Oxford agar, στους 30°C για 48 ώρες). Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθούν δύο υποστρώματα (Oxford & Palcam agar) (ISO 11290-1)
- Παρατήρηση αποικιών και απομόνωση, καθαρισμός των ύποπτων στελεχών
- Δοκιμές για την ταυτοποίηση (Gram χρώση, Δοκιμή καταλάσης, Κατανάλωση υδατανθράκων, δοκιμή αιμόλυσης κλπ) (FDA, BAM)
- Ηλεκτροφόρηση παλλόμενου πεδίου (PFGE)

Ανοσολογικές μέθοδοι ανίχνευσης της *Listeria monocytogenes*

- Δημιουργία αντισωμάτων για τον εκλεκτικό προσδιορισμό κάποιου μορίου του παθογόνου (π.χ. η Ρ60 πρωτεΐνη)
- Πιθανά κάποιο στάδιο εμπλουτισμού (Fraser broth $\frac{1}{2}$, Palcam broth).
- Σύνδεση του αντισώματος με κάποιο ένζυμο (υπεροξειδάση) και ακολουθεί η τελική αντίδραση με την παραγωγή έγχρωμου προϊόντος που μετριέται φωτομετρικά

Μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης του *Listeria monocytogenes*

- ✱ Απλή PCR ή multiplex-PCR
- ✱ Real-time PCR για τον ποσοτικό προσδιορισμό
- ✱ Πιθανό στάδιο εμπλουτισμού
- ✱ Σημαντικά σημεία:
 - επεξεργασία του δείγματος (ανασταλτικοί παράγοντες πιθανόν να οδηγήσουν σε ψευδώς αρνητικά αποτελέσματα στη PCR)
 - μέθοδος απομόνωσης του DNA από το δείγμα.

Μεθοδολογία των μικροσυστοιχιών (microarrays)

- Αρχή της μεθόδου: χαρακτηριστικές αλληλουχίες - ιχνηθέτες που παρουσιάζουν κάποια μοναδικότητα στο συγκεκριμένο παθολόγο (probes) προσδένονται σε ένα υλικό - μήτρα.
- Σήμανση του δείγματος (DNA που απομονώθηκε από τρόφιμο, προϊόν PCR) π.χ. με κάποια χρωστική φθορισμού και στη συνέχεια προστίθεται στη μήτρα με τα probes.
- Αντίδραση μεταξύ των μορίων που εμφανίζουν ομολογία (υβριδισμός)
- Σύνδεση με την παραγωγή σήματος εύκολα αναγνωρίσιμου από κάποια συσκευή ανάγνωσης

Ευχαριστώ!!!