

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**  
**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**  
**ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΡΓΙΚΩΝ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ -  
ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ**

**ΣΙΩΡΟΣ ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ**



**ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2008**

## **Ευχαριστίες**

Ευχαριστώ θερμά την καθηγήτρια μου στο τμήμα Τεχνολογίας Γεωργικών Προϊόντων, του ΤΕΙ Καλαμάτας, κ. Μαρίνα Παπαδέλη για την πολύτιμη βοήθειά της στην εκπόνηση της πτυχιακής μου εργασίας.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	1
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	4
ABSTRACT.....	5
ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	6
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ.....	9
1.1. Εισαγωγή.....	9
1.2. Μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι μικροοργανισμών.....	9
1.3. Μέθοδος Ενζυμικής Ανοσοπροσρόφησης (ELISA).....	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ.....	20
2.1. Εισαγωγή.....	20
2.2. Προετοιμασία δείγματος.....	21
2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)....	23
2.4. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Immunomagnetic Separation, IMS).....	36
2.5. Ηλεκτροφόρηση.....	40
2.6. Υβριδισμός.....	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	47
3.1. Εισαγωγή.....	47

3.2. Φωτομετρικός προσδιορισμός του ΑΤΡ .....	48
3.3. Βιοφθορισμός .....	51
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....	55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58

## ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- **BSA** - Bovine Serum Albumin
- **CFU** – Colony Forming Unit
- **ELISA**– Enzyme Linked Immunoabsorbed Assay
- **HAV** – ιός της ηπατίτιδας Α
- **IMS** - Immunomagnetic Separation, Ανοσομαγνητικός Διαχωρισμός
- **MAb** – Μονοκλωνικό Αντίσωμα
- **NLV** - Norwalk-like viruses
- **PBS** – Phosphate Buffered Saline
- **PCR** – Polymerase Chain Reaction
- **RLU** – Relative Light Unit
- **RT PCR** - Reverse Transcription PCR
- **Rti PCR** – Real Time PCR
- **TBS** - tris-HCl buffered saline
- **TBS Tween** – TBS + 0,05% Tween 20
- **T<sub>m</sub>** – melting temperature
- **TRIzol** – Διάλυμα φαινόλης και guanidine isothiocyanate
- **Tween 20** –polyoxyethylenesorbitan monolaurate
- **TYG**- tryptone, yeast extract, glucose
- **Triton X-100** - polyethylene glycol p-(1,1,3,3-tetramethylbutyl)-phenyl ether
- **Ε.Ε.** – Ευρωπαϊκή Ένωση
- **HACCP** – Hazard Analysis of Critical Control Point
- **TQM** – Total Quality Management
- **ATP** – Τριφωσφορική Αδενοσίνη
- **FMNH** - Φλαβινομονονουκλεοτίδιο

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία εξετάζει μία σειρά από μεθόδους ταχείας ανίχνευσης μικροοργανισμών.

Στο πρώτο κεφάλαιο περιγράφονται οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι και ειδικότερα οι διαφορές μεταξύ μονοκλωνικών και πολυκλωνικών αντισωμάτων όπως επίσης οι τρόποι με τους αυτά κατασκευάζονται. Η ανοσοβιολογική μέθοδος ELISA περιγράφεται και δίνονται παραδείγματα σε πολλά δείγματα τροφίμων.

Το δεύτερο κεφάλαιο αναφέρεται στις μοριακές μεθόδους. Αναλύεται η μεθοδολογία για την εκχύλιση του μικροβιακού DNA από τα συστατικά των τροφίμων όπως επίσης και η αρχή λειτουργίας της PCR και των παραλλαγών της multiplex PCR, nested PCR, real time PCR και reverse transcription PCR. Θεωρείται χρήσιμο να εξεταστεί ο ανοσµαγνητικός διαχωρισµός σε αυτό το κεφάλαιο, διότι είναι µία σηµαντική τεχνική η οποία µπορεί να συνδιαστεί µε τις µοριακές µεθόδους. Δίνονται πολλά παραδείγματα της εφαρμογής των μοριακών μεθόδων σε δείγματα τροφίμων.

Τέλος, το τρίτο κεφάλαιο αναφέρεται στη φωτομετρική ανίχνευση του ATP όπως επίσης και στις τεχνικές βιοφθορισμού. Περιγράφεται η παραγωγή φωτός μέσω της αντίδρασης του ATP με το ένζυμο λουσιφεράση. Η μεθοδολογία αυτή χρησιμοποιείται εδώ και πολλά χρόνια στον έλεγχο της υγιεινής και των διαδικασιών καθαρισμού στην παραγωγή τροφίμων. Εξετάζεται η εκπομπή φωτός από ζωντανά μικροβιακά κύτταρα (βιοφθορισμός) μέσω της εισαγωγή του γονιδίου *lux*, η οποία είναι μία ταχεία τεχνική με υψηλή διακριτική ικανότητα.

## ABSTRACT

This review describes a series of rapid techniques for detection of microorganisms.

At first chapter the immunoassays are described, and particularly the differentiations between monoclonal and polyclonal antibodies as well as the ways that antibodies are constructed. The immunoassay Enzyme Linked Immunoabsorbed Assay is described and several examples of the assay in several food samples are provided.

The second chapter refers to molecular biology methods. The methodology for microbial DNA extraction from food components is analysed, as well as the principle of PCR and its main variations like multiplex PCR, nested PCR, real time PCR and Reverse Transcription PCR. We found it useful to examine immunomagnetic separation in this chapter because it is a powerful tool which can be combined with molecular methods. Many examples of applications of molecular methods in food samples are also given.

Lastly, the third chapter refers to the ATP luminescence as well as the bioluminescence techniques. We describe the light production through ATP reaction with the enzyme luciferase. This technique has been used for several years for monitoring the hygiene and the cleaning efficiency in food production. The light emission from living cells of microorganisms (bioluminescence) via the intake of *lux* gene is a high specific rapid technique that is also examined.

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Οι σύγχρονες τάσεις στο τομέα της τεχνολογίας τροφίμων απαιτούν τη διασφάλιση της υγιεινής και της ποιότητας αυτών. Έχουν θεσπιστεί συστήματα ελέγχου όπως είναι το TQM (Total Quality Management) και το HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point). Βασικός στόχος του HACCP είναι η εξάλειψη κάθε χημικού, φυσικού και βιολογικού κινδύνου που μπορεί να περιέχεται στα παραγόμενα τρόφιμα. Από 1/1/2006 έχει τεθεί σε ισχύ ο κανονισμός 852/2004 της Ε.Ε. βάση του οποίου όλες οι εταιρίες που σχετίζονται με τρόφιμα πρέπει να έχουν σε ισχύ σύστημα HACCP. Ο κανονισμός προβλέπει την θέσπιση μικροβιολογικών κριτηρίων για τα τρόφιμα καθώς και την υποχρεωτική εργαστηριακή ανάλυση των τροφίμων σε κάθε εταιρία.

Η μη έγκαιρη ανίχνευση ενός μικροοργανισμού πέραν των κινδύνων που συνεπάγεται για την δημόσια υγεία μπορεί να έχει και μεγάλες οικονομικές συνέπειες λόγω ανάκλησης προϊόντων. Ειδικότερα στα ευαλλοιώτα προϊόντα, η γρήγορη διαπίστωση ύπαρξης παθογόνων μικροοργανισμών κρίνεται αναγκαία γιατί σε αυτή τη περίπτωση η διακίνηση και η εμπορία εξαρτάται άμεσα από αυτή. Για τους παραπάνω λόγους η μικροβιολογία τροφίμων πέραν του βασικού της στόχου που είναι η ανίχνευση και ταυτοποίηση των μικροοργανισμών που υπάρχουν στα τρόφιμα καλείται να καλύψει τις σύγχρονες ανάγκες που έχουν οι επιχειρήσεις τροφίμων ως προς την τήρηση της νομοθεσίας, την έγκαιρη διαπίστωση τυχών επιμολύνσεων και την διασφάλιση της ποιότητας των τροφίμων.

Οι σύγχρονες τεχνικές που αφορούν στην ανίχνευση των χημικών και φυσικών παραγόντων, που επηρεάζουν την ποιότητα και την υγιεινή των τροφίμων, προσφέρουν γρήγορα και άμεσα αποτελέσματα. Μέχρι σήμερα οι μικροβιολογικές αναλύσεις περιλαμβάνουν στάδια ανακαλλιέργειας σε εκλεκτικά ή μη θρεπτικά υποστρώματα, επώσεις με χρόνους που μπορεί να κυμαίνονται από 1 έως και 10 ημέρες και τέλος διάφορα τεστ επιβεβαίωσης και ταυτοποίησης των μικροοργανισμών. Οι κλασσικές μικροβιολογικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από την έλλειψη αυτοματοποίησης, την ανάγκη εκπαίδευσης εξειδικευμένου προσωπικού για την διεξαγωγή τους και κυρίως τη μεγάλη χρονική διάρκεια. Παρόλα αυτά προσφέρουν μεγάλη ακρίβεια γιατί μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμα και 1 CFU / 25 g δείγματος. Το κόστος των μικροβιολογικών αναλύσεων με τις κλασσικές μεθόδους δεν είναι υψηλό και δεν απαιτεί σύνθετο εξοπλισμό, ωστόσο το μεγάλο διάστημα που πολλές φορές απαιτείται για τη λήψη των



αποτελεσμάτων παραμένει το μεγαλύτερο μειονέκτημά τους ιδιαίτερα στα πλαίσια της εφαρμογής τους σε βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων.

Οι σύγχρονες ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών προσπαθούν να μειώσουν το χρόνο ανάλυσης. Ο όρος ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών, αναφέρεται σε κάθε μέθοδο που μπορεί να ανιχνεύσει μικροοργανισμούς πιο γρήγορα από τις κλασικές μεθόδους. Τέτοιες μέθοδοι μπορεί να ενσωματώνονται στις κλασικές μεθόδους, όπως είναι η χρήση ειδικών εκλεκτικών υποστρωμάτων με χρωμογόνα συστατικά για την ταχεία ανίχνευση μίας κατηγορίας μικροοργανισμών (π. χ. Total Coliforms). Τα τελευταία 20 χρόνια οι ταχείες μέθοδοι στη μικροβιολογία τροφίμων έχουν διαφοροποιηθεί από τις κλασικές μεθόδους και αποτελούν πλέον ξεχωριστό κεφάλαιο στην εφαρμοσμένη μικροβιολογία.

Μέχρι σήμερα βέβαια, στην παγκόσμια αγορά κυριαρχούν οι κλασικές μέθοδοι μικροβιολογίας, κυρίως διότι οι ταχείες μέθοδοι έχουν μεγαλύτερο κόστος, απαιτούν σύνθετο εργαστηριακό εξοπλισμό και εξειδικευμένο προσωπικό. Παράλληλα οι περισσότεροι παγκόσμιοι οργανισμοί έχουν πιστοποιήσει έναν μικρό μόνο αριθμό από αυτές τις μεθόδους με αποτέλεσμα να μειώνεται η αξιοπιστία τους και η ευρύτερη αποδοχή τους.

Από τον πίνακα που ακολουθεί (πίνακας 1), ο οποίος παρουσιάζει κάποια οικονομικά στοιχεία σχετικά με τις δαπάνες που πραγματοποιήθηκαν παγκοσμίως για μικροβιολογικές αναλύσεις κατά τα έτη 1999 και 2005, μπορούμε να εξάγουμε ορισμένα ενδιαφέροντα συμπεράσματα. Αρχικά οι μικροβιολογικές αναλύσεις αυξάνονται συνεχώς ώστε να καλύψουν τις ανάγκες των επιχειρήσεων στη σύγχρονη παγκόσμια τάση για παραγωγή και διακίνηση πιστοποιημένων προϊόντων ως προς την ασφάλεια και υγιεινή. Οι παραδοσιακές μέθοδοι μικροβιολογίας κυριαρχούν στην παγκόσμια αγορά και στην προτίμηση των επιχειρήσεων καθώς μέχρι και το 2005 κατείχαν τόσο τις μεγαλύτερες πωλήσεις όσο και το μεγαλύτερο μερίδιο αγοράς. Οι ταχείες μέθοδοι κατέχουν ένα σημαντικό μερίδιο στη παγκόσμια αγορά και παρουσιάζουν όλο και μεγαλύτερη αύξηση τόσο σε πωλήσεις όσο και στη υιοθέτηση τους από περισσότερες επιχειρήσεις.

Χρονολογία	1999		2005	
Τεχνολογία	Πωλήσεις (Εκατομμύρια €)	Μερίδιο Αγοράς %	Πωλήσεις (Εκατομμύρια €)	Μερίδιο Αγοράς %
Θρεπτικά Υποστρώματα	350	62	460	53
Συστήματα Ταυτοποίησης (π.χ. API)	50	9	65	8
Ταχείες μέθοδοι (PCR, ELISA)	115	20	244	28
Φωτομετρικές Μέθοδοι ATP	50	9	95	11
<b>Σύνολο</b>	<b>565</b>	<b>100</b>	<b>864</b>	<b>100</b>

**Πίνακας 1.** Οικονομικά στοιχεία για στοιχεία για τις δαπάνες που πραγματοποιήθηκαν παγκοσμίως για μικροβιολογικές αναλύσεις, κατά τα έτη 1999 και 2005 (Blankenfeld, 2006)

Η σύγχρονη τάση της παγκόσμιας αγοράς για την διεξαγωγή ταχείας ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα απαιτεί την μελέτη και αξιολόγηση των μεθόδων αυτών από όλες τις επιχειρήσεις που εμπλέκονται στην παραγωγή, διακίνηση και εμπορία τροφίμων ώστε να ενσωματώσουν τις μεθόδους αυτές στις ανάγκες τους. Η παρούσα εργασία εξετάζει τις βασικότερες σύγχρονες μεθόδους ανίχνευσης μικροοργανισμών στα τρόφιμα. Δίνονται πολλά παραδείγματα της κάθε μεθόδου ώστε να γίνουν κατανοητά τα πλεονεκτήματα της κάθε μεθόδου αλλά και τα προβλήματα εφαρμογής στην εφαρμογή τους.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΝΟΣΟΒΙΟΛΟΓΙΑΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

## 1.1. Εισαγωγή

Το κεφάλαιο αυτό αποτελεί μία εισαγωγή στη μελέτη μίας σειράς ταχέων μεθόδων αναγνώρισης μικροοργανισμών οι οποίες βασίζονται στη χρήση αντισωμάτων.

Τα **αντισώματα** ή **ανοσοσφαιρίνες** είναι πρωτεΐνες που φτιάχνονται από κάθε ζώο εξαιτίας της παρουσίας μέσα του μίας ξένης ουσίας. Εκκρίνονται από τα πλασματοκύτταρα που προέρχονται από τα Β λεμφοκύτταρα. Αυτές οι διαλυτές πρωτεΐνες είναι τα μόρια αναγνώρισης για τη χημική ανοσολογική απόκριση. Κάθε αντίσωμα έχει μια ειδική συγγένεια με τη χημική ουσία που έχει προκαλέσει την σύνθεσή του. Κάθε ξένο μακρομόριο που είναι ικανό να προκαλέσει το σχηματισμό αντισώματος ονομάζεται **αντιγόνο** ή **ανοσογόνο**, όπως για παράδειγμα κάποιος πολυσακχαρίτης στην κυτταρική μεμβράνη κάποιου βακτηρίου. Η ειδική συγγένεια δεν αφορά ολόκληρο το μακρομοριακό αντιγόνο αλλά μια συγκεκριμένη θέση του που ονομάζεται **αντιγονικός προσδιοριστής** ή **επίτοπος** (Stryer, 1997).

Τα περισσότερα ξένα μακρομόρια δεν προκαλούν το σχηματισμό αντισωμάτων. Όμως τα μόρια αυτά μπορούν να προκαλέσουν τη σύνθεση ειδικού αντισώματος αν είναι συνδεδεμένα με μακρομόρια. Το μακρομόριο τότε είναι ο **φορέας** της συνδεδεμένης χημικής ομάδας που ονομάζεται **απτενικός προσδιοριστής**. Το μικρό ξένο μόριο αυτό καθ'αυτό ονομάζεται **απτένιο**. Τα αντισώματα που προκαλούνται από συνδεδεμένα απτένια μπορούν να δεσμεύουν το ίδιο καλά και ελεύθερα απτένια (Stryer, 1997).

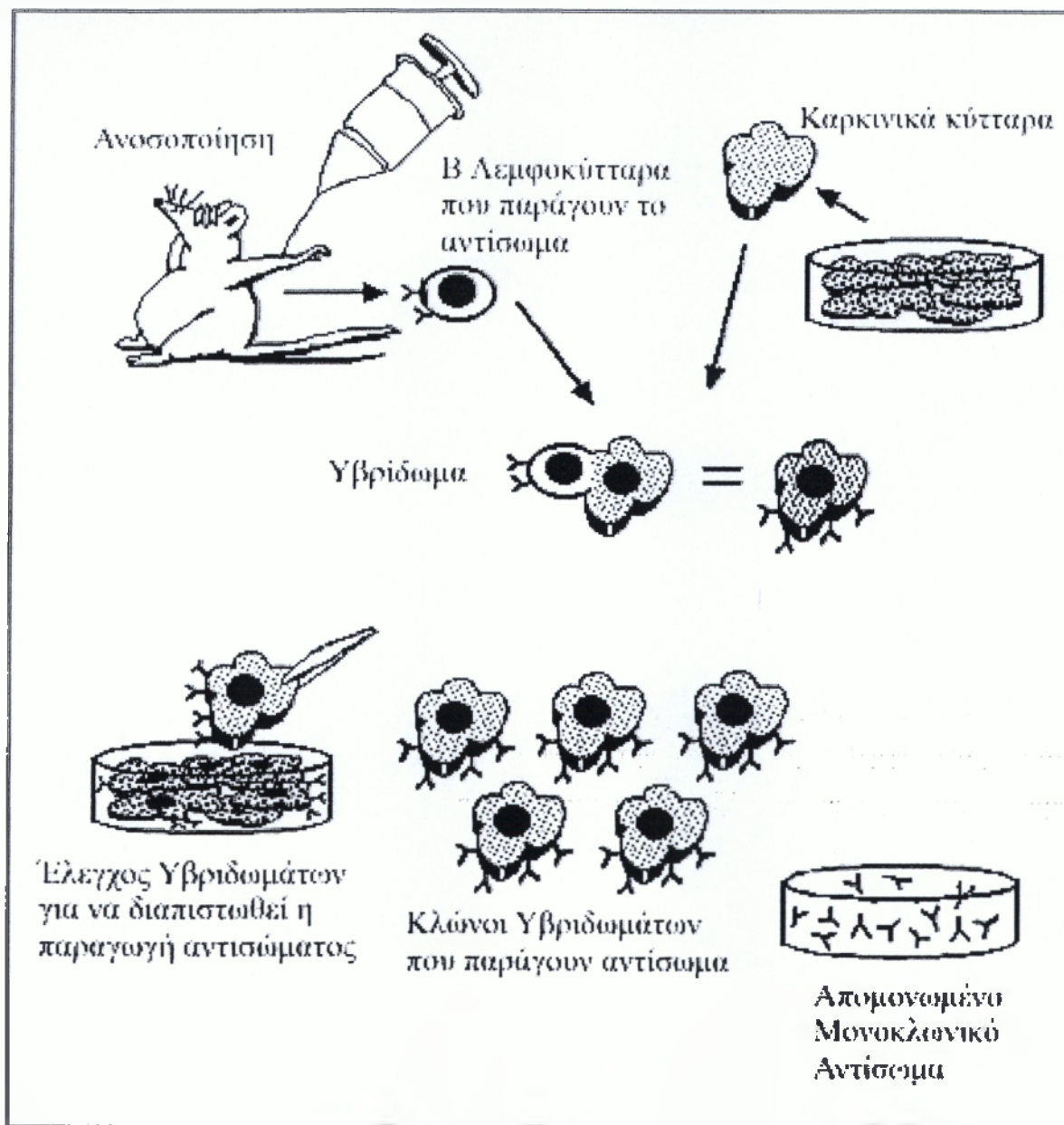
## 1.2. Μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα έναντι μικροοργανισμών

Τα αντισώματα διακρίνονται σε μονοκλωνικά και πολυκλωνικά ανάλογα με τον τρόπο που παράγονται. Τα πολυκλωνικά αντισώματα παράγονται μετά από ανοσοποίηση ενός ζώου (ποντίκι, λαγός) με ένα συγκεκριμένο αντιγόνο όπως π.χ. με ένα βακτήριο. Μετά την ανοσοποίηση του ζώου συλλέγουμε τον ορό ο οποίος είναι ένα μείγμα από αντισώματα που αντιδρούν με διαφορετικά επιτόπια του ίδιου αντιγόνου (Todd et al., 1988). Η σύνθεση πολυκλωνικών αντισωμάτων είναι σχετικά εύκολη, γρηγορότερη και δεν απαιτεί σύνθετο εργαστηριακό εξοπλισμό σε σχέση με την σύνθεση μονοκλωνικών αντισωμάτων. Τα πολυκλωνικά αντισώματα μπορούν να παραχθούν μέσα σε 3 με 6 εβδομάδες (Seong-Hee et al.,

2005), όμως παρουσιάζουν το μειονέκτημα της διαφορετικής ανοσοαπόκρισης μεταξύ διαφορετικών ζώων (Todd et al., 1988). Έτσι δεν είναι δυνατή η επαναληψιμότητα της σύνθεσης των πολυκλωνικών αντισωμάτων. Αντί θηλαστικών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε πτηνά όπου το αντίσωμα συλλέγεται από το ασπράδι του αβγού χωρίς να γίνεται χρήση αφαίμαξης και παράγοντας μεγαλύτερες ποσότητες αντισώματος (Gassmann et al., 1990).

Πολυκλωνικά αντισώματα για το βακτήριο *Salmonella typhimurium* κατασκευάστηκαν ανοσοποιώντας λαγό (Lee et al., 1990). Αφού ανοσοποιήθηκε ο λαγός, συλλέχθηκε το αίμα από την άνω φλέβα του αντιού τη 10<sup>η</sup> και 14<sup>η</sup> ημέρα. Το αίμα φυγοκεντρήθηκε και το παραλαβόμενο πλάσμα περιείχε τα πολυκλωνικά αντισώματα (Lee et al., 1990). Για το ίδιο βακτήριο μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε σαν αντιγόνο, για την ανοσοποίηση του ζώου, όχι ολόκληρα στελέχη του βακτηρίου αλλά ειδικά το αντιγόνο που μας ενδιαφέρει (Wyatt et al., 1993). Η πρωτεΐνη φλαγγελίνη (flagelin) που παράγει το *S. typhimurium* χρησιμοποιήθηκε για την ανοσοποίηση λαγού σε συγκέντρωση 100 μg (Wyatt et al., 1993).

Τα μονοκλωνικά αντισώματα παράγονται από ένα Β λεμφοκύτταρο. Κάθε Β λεμφοκύτταρο μπορεί να παράξει μονάχα ένα αντίσωμα το οποίο είναι εξειδικευμένο για ένα επίτοπο. Μετά την απομόνωση Β λεμφοκυττάρων από ανοσοποιημένο ζώο με το επιθυμητό αντιγόνο και την σύντηξή τους με καρκινικά κύτταρα μπορούμε να πάρουμε υβριδώματα τα οποία μπορούν να παράγουν συνεχώς ένα αντίσωμα (Εικόνα. 1) (Kohler and Milstein, 1975). Έτσι τα μονοκλωνικά αντισώματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ώστε να εφαρμοστούν τυποποιημένες μέθοδοι ανοσοβιολογίας. Επιπλέον τα μονοκλωνικά αντισώματα έχουν υψηλή εξειδίκευση καθότι αντιδρούν μονάχα με ένα επίτοπο. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα των μονοκλωνικών αντισωμάτων είναι ότι η σύνδεσή τους με το αντίσωμα απαιτεί πολύ συγκεκριμένες συνθήκες (Lipman et al., 2005). Τα μονοκλωνικά αντισώματα εξαιτίας της μεγάλης συγγένειας με το αντιγόνο μπορεί να μην δημιουργήσουν σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος αν για κάποιο λόγο (pH, θερμοκρασία, συγκέντρωση αλάτων) αλλάξει η στερεοδιάταξη του αντιγόνου (Nelson et al., 1997).



Εικόνα 1. Παραγωγή μονοκλωνικών αντισωμάτων

Για το βακτήριο *Bacillus cereus* έχουν παραχθεί 2 μονοκλωνικά αντισώματα (8D3 και 9B7) τα οποία μπορούν να εντοπίσουν τα κύτταρα του βακτηρίου όχι όμως και τα σπόρια αυτού (Charni et al., 2000). Η διαδικασία περιλάμβανε την ανοσοποίηση ποντικού με μικροβιακά κύτταρα *B. cereus* LMG2963 σε συγκέντρωση  $10^8$ /ml. Τα υβριδίσματα ελέγχθηκαν για την παραγωγή του αντισώματος και κλωνοποιήθηκαν τουλάχιστον 2 φορές (Galfre and Milstein, 1981). Τα αντιγόνα που αντιδρούν με τα δύο αντισώματα είναι πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 22



kDa για το αντίσωμα 8D3. Το αντίσωμα 9B7 αντιδρά με δύο πρωτεΐνες μοριακού βάρους 58 και 62 kDa (Charni et al., 2000). Τα αντισώματα παρουσιάζουν μεγάλη εξειδίκευση καθότι δεν αντιδρούν καθόλου με βακτήρια της οικογένειας Enterobacteriaceae (*Salmonella enteridis*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*) και με άλλα βακτήρια (*Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas stutzeri*, *Micrococcus luteus*) (Charni et al., 2000).

Μονοκλωνικά αντισώματα έχουν παραχθεί για το βακτήριο *E. coli* O157:H7 (He et al., 1996). Τα αντισώματα αυτά (2B7 και 46E-9) αντιδρούν με την πρωτεΐνη H7 που βρίσκεται στο στέλεχος O157:H7 καθώς επίσης και με τις πρωτεΐνες H23 και H24 των αντίστοιχων στελεχών. Τα αντισώματα αυτά δεν αντιδρούν με άλλα βακτήρια (ελέχθησαν 19 είδη σαλμονέλας και 22 είδη Gram- βακτηριών) καθώς επίσης και με άλλα στελέχη του *E. coli* (He et al., 1996). Για το ίδιο βακτήριο έχει κατασκευαστεί μονοκλωνικό αντίσωμα που στοχεύει στο αντιγόνο O157 (Todd et al., 1988). Για την ανίχνευση του ίδιου βακτηριακού στελέχους χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με 2 εξωκυττάρια πρωτεΐνες των εντεροαιμοραγικών τύπων O157:H7 και O157:H11 (Padhye and Doulet, 1991).

Για το βακτήριο *Listeria monocytogenes* έχουν βρεθεί μονοκλωνικά αντισώματα που στοχεύουν στις πρωτεΐνες τύπου φλαγγελίνης του βακτηρίου (Seong-Hee et al., 2005). Αρχικά οι πρωτεΐνες απομονώθηκαν από καλλιέργεια του βακτηρίου. Μετά από καλλιέργεια του βακτηρίου σε κατάλληλο θρεπτικό υλικό, τα μικροβιακά κύτταρα συλλέχθηκαν με φυγοκέντριση στις 7,000 rpm για 20 min και πλύθηκαν 3 φορές με PBS. Έπειτα, χρησιμοποιώντας μικροσκοπικές χάντρες ύαλου έγινε η λύση των μικροβιακών κυττάρων με έντονη ανακίνηση (vortex) για 30 min. Μετά από φυγοκέντριση στις 7,000 rpm για 30 min συλλέχθηκε η άνω φάση όπου και εφαρμόστηκε εκ νέου φυγοκέντριση στα 14,000 rpm για 40 min. Στην άνω φάση που προέκυψε από αυτή την φυγοκέντριση βρίσκονται οι πρωτεΐνες τύπου φλαγγελίνης (Peel et al., 1988). Χρησιμοποιώντας 50 µg/ml για την ανοσοποίηση ποντικού και υβριδοποιώντας τα ανοσοποιημένα λεμφοκύτταρα του ποντικού παρήχθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα 2B1 το οποίο αντιδρά με την *L. monocytogenes* αλλά όχι με το *E. coli* O157:H7 ή τη *Salmonella enteridis* (Seong-Hee et al., 2005).

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella typhimurium* χρησιμοποιήθηκε μονοκλωνικό αντίσωμα που αντιδρά με μία πρωτεΐνη τύπου φλαγγελίνης του βακτηρίου (Wyatt et al., 1993).

Για το βακτήριο *Salmonella* spp. έχει ανακαλυφθεί το T6 αντίσωμα που αντιδρά πολύ καλά με όλα τα είδη του βακτηρίου και που στοχεύει σε έναν λιποσακχαρίτη που βρίσκεται στην επιφάνεια του μικροβιακού κυττάρου (Ng et al., 1996).

### 1.3. Μέθοδος Ενζυμικής Ανοσοπροσρόφησης (ELISA)

Η μέθοδος ενζυμικής ανοσοπροσρόφησης (Enzyme Linked Immunoabsorbed Assay – ELISA) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο ανοσοβιολογίας, όχι μόνο για την ανίχνευση μικροοργανισμών, αλλά και για την ανίχνευση πολλών χημικών ουσιών (ορμόνες, πρωτεΐνες, φάρμακα, αλλεργιογόνες ουσίες κ.λπ.). Η ELISA αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τον Berson και τους συνεργάτες του (1956), για να αντικαταστήσει άλλες μεθόδους ανοσοβιολογίας που χρησιμοποιούσαν ραδιενεργά υλικά σήμανσης. Με την ELISA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ένζυμα που αντικαθιστούν τα ραδιενεργά υλικά και η πρόσδεση μεταξύ αντισώματος και αντιγόνου να μπορεί διαπιστωθεί με την αλλαγή χρώματος ενός υποστρώματος (Weemen and Schuurs, 1971).

Η βασική αρχή της μεθόδου είναι η ακόλουθη:

1. Αντιγόνο γνωστής συγκεντρώσεως ακινητοποιείται σε πλαστικό μικροσωλήνα (τύπου erpendorf). Αυτό το δείγμα αποτελεί το θετικό μάρτυρα (positive control) και θα χρησιμοποιηθεί ως πρότυπο για να υπολογιστούν οι συγκεντρώσεις των άλλων δειγμάτων.
2. Σε έναν άλλο δοκιμαστικό σωλήνα ακινητοποιούνται τα συστατικά του προς εξέταση δείγματος.
3. Προσθέτουμε BSA (αλβουμίνη ορού βοός) για να μπλοκάρουμε τις θέσεις του μικροσωλήνα που δεν έχουν καλυφθεί από τις πρωτεΐνες του δείγματος.
4. Μετά από πλύσιμο του δοκιμαστικού σωλήνα για την απομάκρυνση των μη σταθεροποιημένων συστατικών, προστίθεται το αντίσωμα. Το αντίσωμα θα αντιδράσει με το αντιγόνο δημιουργώντας σύμπλοκο αντίσωμα – αντιγόνου και δεν θα αντιδράσει με τα υπόλοιπα συστατικά (πρωτεΐνες και αλβουμίνη).
5. Μετά από πλύσιμο του μικροσωλήνα για την απομάκρυνση του μη συνδεδεμένου αντισώματος, προσθέτουμε αντίσωμα το οποίο θα αντιδράσει με το σύμπλοκο αντισώματος-αντιγόνου που έχει παραμείνει στο μικροσωλήνα. Το αντίσωμα αυτό φέρει

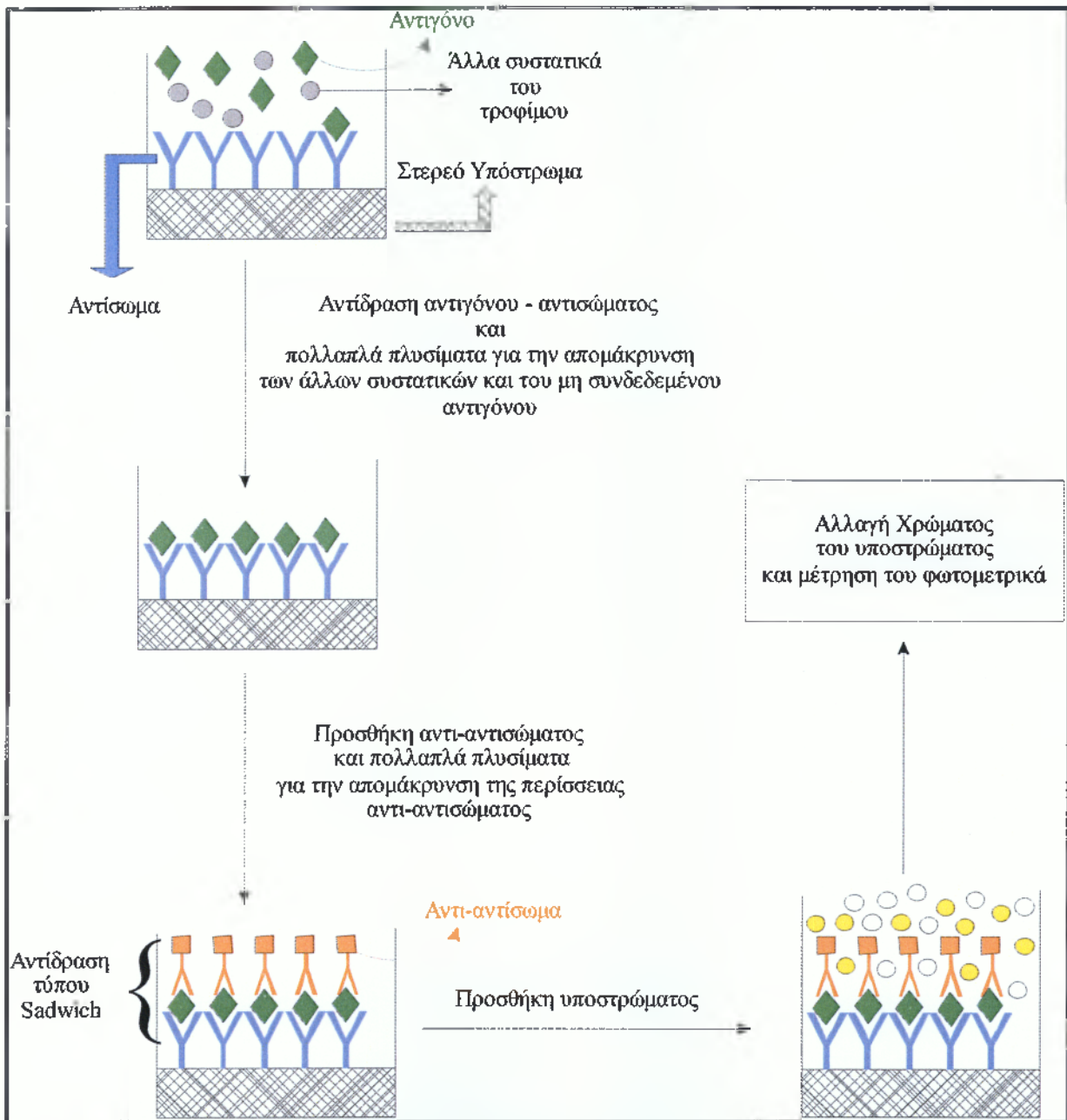
ένζυμο το οποίο θα αντιδράσει με το υπόστρωμα. Αυτό το βήμα μπορεί να παραλειφθεί αν το αντίσωμα του συμπλόκου αντισώματος-αντιγόνου φέρει το ένζυμο.

6. Γίνεται πλύση του σωλήνα για την απομάκρυνση του αντισώματος ανίχνευσης που δεν έχει αντιδράσει με το σύμπλοκο αντισώματος – αντιγόνου. Έπειτα προστίθεται το υπόστρωμα. Το ένζυμο θα αντιδράσει με το υπόστρωμα με αποτέλεσμα την αλλαγή χρώματος ή την παραγωγή φωτός ανάλογα με το υπόστρωμα.

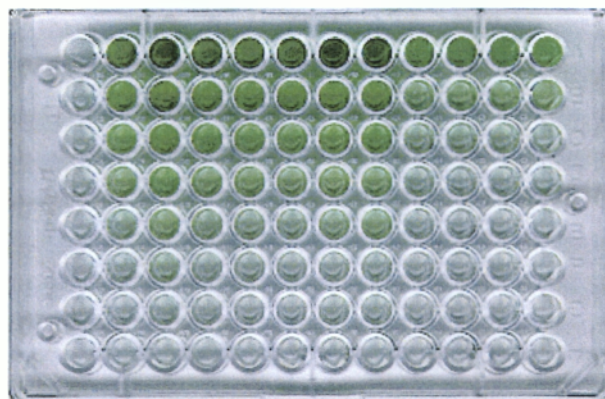
Το βασικό μειονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η προσρόφηση του αντιγόνου στο μικροσωλήνα δεν γίνεται με ακρίβεια. Κάθε πρωτεΐνη του δείγματος θα ανταγωνιστεί τις θέσεις πρόσδεσης πάνω στην επιφάνεια του σωλήνα εμποδίζοντας την πρόσδεση του συγκεκριμένου αντιγόνου που θέλουμε να ανιχνεύσουμε.

Το μειονέκτημα της μη εκλεκτικής προσρόφησης του αντιγόνου μπορούμε να το λύσουμε χρησιμοποιώντας μία παραλλαγή της μεθόδου. Σε αυτή την περίπτωση γνωστή ποσότητα αντισωμάτων είναι προσροφημένα στην επιφάνεια του μικροσωλήνα. Με αυτό το τρόπο μπορούμε να εισάγουμε πολύπλοκα χημικά συστήματα όπως είναι τα τρόφιμα και να έχουμε εκλεκτική σύνδεση του αντιγόνου. Το σύμπλοκο αντιγόνου – αντισώματος αντιδρά με ένα αντίσωμα που φέρει όπως και πριν ένζυμο που θα αντιδράσει με την σειρά του με το υπόστρωμα (Εικόνα 2). Το αντίσωμα μπορεί να είναι προσδεμένο είτε σε δοκιμαστικά σωληνάρια είτε σε μεμβράνες. Στην εικόνα 3 φαίνεται ένας δίσκος πολλαπλών θέσεων (microplate) που χρησιμοποιείται σήμερα για την εφαρμογή της ELISA σε πολλά δείγματα ταυτόχρονα.





Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου ELISA.



Εικόνα 3. Δίσκος πολλαπλών θέσεων για τη μέθοδο ELISA (www.rit.edu)

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *Pseudomonas fluorescenes* στο κρέας έχει εφαρμοστεί ELISA με ικανότητα ανίχνευσης  $3 \times 10^5$  CFU/ml και υψηλή συσχέτιση (95%) με τις κλασικές μεθόδους ανίχνευσης του βακτηρίου (Eriksson et al., 1994). Δείγματα κρέατος (2x2x1 cm) διαλύθηκαν σε 100 μl φυσιολογικού ορού και διάλυμα πεπτόνης 5 %. Στη συνέχεια για να πραγματοποιηθεί η ELISA χρησιμοποιήθηκε δίσκος πολλαπλών θέσεων όπου αρχικά τοποθετήθηκαν 50 μl από το δείγμα. Σταθεροποιήθηκαν τα αντιγόνα με επώαση του δίσκου στους 56 °C για 30 min. Έπειτα ακολούθησαν 3 πλύσεις των θέσεων με PBS 10 mM, pH 7,6. Στη συνέχεια χρησιμοποιήθηκε διάλυμα PBS με Tween και σκόνη αποβουτηρομένου γάλακτος προκειμένου να γίνει μη εξειδικευμένη κατάληψη των θέσεων πρόσδεσης στις θέσεις του δίσκου. Ακολούθησε επώαση του δίσκου σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h. Αφού ξεπλύθηκαν οι θέσεις του δίσκου εκ νέου με PBS προστέθηκε το πρώτο αντίσωμα πρόσδεσης (50 μl) και ακολούθησε επώαση για 1 h στους 37 °C. Έπειτα έγινε εκ νέου πλύση με PBS και προστέθηκαν 100 μl από πολυκλωνικό αντίσωμα χοίρου κατά του βακτηρίου το οποίο είναι συνδεδεμένο με κατάλληλο ένζυμο (horseradise peroxidase). Το ένζυμο αυτό έχει απομονωθεί από το φυτό *Armoracia rusticana* και έχει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να αντιδράσει με πολλές ουσίες λόγω της στερεοδιάταξης της. Αφού έγινε επώαση για 1 h στους 37 °C προστέθηκε υπόστρωμα o-phenylenediamine 0,1% και ο δίσκος ανακινήθηκε ελαφρά για 20 min. Η αντίδραση σταμάτησε με την προσθήκη θειικού οξέος 2 M 50 μl/θέση. Έπειτα έγινε μέτρηση φωτομετρικά στα 492 nm (Eriksson et al., 1994).

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 σε βοδινό κρέας έχει χρησιμοποιηθεί ELISA χρησιμοποιώντας υδροφοβική μεμβράνη πολυβινυλίου για την προσρόφηση των αντισωμάτων (Kim and Doulet, 1992). Οι μεμβράνες αρχικά πλύθηκαν με αιθανόλη και έπειτα

τοποθετήθηκαν σε διάλυμα επίστρωσης (άλας ανθρακικού οξέος, pH 9,6) για 10 min. Έπειτα οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν σε διάλυμα του αντισώματος πρόσδεσης που σε αυτή την περίπτωση ήταν ένα *E. coli* O157:H7 πολυκλωνικό αντίσωμα από αίγα σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml σε διάλυμα επίστρωσης και έγινε επώαση για 5 min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα οι μεμβράνες εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα που περιείχε αλβουμίνη (BSA), για το μπλοκάρισμα των θέσεων που δεν έχουν επιστρωθεί από το πολυκλωνικό αντίσωμα, στις 100 rpm για 45 min. Για την πραγματοποίηση της ELISA τα δείγματα κρέατος εμβολιάστηκαν με διάφορα στελέχη του βακτηρίου *E. coli* O157:H7 τα οποία αναφέρονται στην εικόνα 4. Ως αρνητικά δείγματα χρησιμοποιήθηκαν, κρέας εμβολιασμένο με το βακτήριο *E. coli* K12, διάλυμα PBS και μη εμβολιασμένο δείγμα ενώ ως θετικό δείγμα χρησιμοποιήθηκε καθαρή καλλιέργεια *E. coli* O157:H7. Το μονοκλωνικό αντίσωμα που χρησιμοποιήθηκε είναι το 4E8C12 (Padhye and Doulet, 1991). Τα δείγματα κρέατος (25 g) αφού εμβολιάστηκαν με τα διάφορα στελέχη του βακτηρίου επώαστηκαν σε 225 ml θρεπτικού υλικού TBS για 12 h στους 37 °C και στα 150 rpm. Σε καθένα από τα παραπάνω δείγματα δείγμα βυθίστηκαν οι επικαλυμμένες με αντίσωμα μεμβράνες και ακολούθησε ανακίνηση στις 100 rpm για 30 min στους 37 °C. Έπειτα οι μεμβράνες πλύθηκαν 2 φορές με TBS το οποίο περιείχε 0,05% Tween, προστέθηκε το μονοκλωνικό αντίσωμα 4E8C12 σε συγκέντρωση 5 µg/ml. Οι μεμβράνες αφού καλύφθηκαν για να μην στεγνώσουν επώαστηκαν για 45 min στους 37 °C. Σαν αντίσωμα αναγνώρισης χρησιμοποιήθηκε πολυκλωνικό αντίσωμα το οποίο αναγνωρίζει το μονοκλωνικό αντίσωμα 4E8C12 και που έφερε το ένζυμο αλκαλική φωσφατάση. Μετά από 2 πλύσεις με TBS Tween οι μεμβράνες τοποθετήθηκαν στο υπόστρωμα που σε αυτή την περίπτωση είναι το tetrazolium-5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η θετική αντίδραση ανιχνεύεται με μία σκοτεινή κηλίδα πάνω στη μεμβράνη (Kim and Doulet, 1992). Η μεμβράνη πολυβινυλίου παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλες μεμβράνες όπως οι νιτροκυτταρίνες διότι εξαιτίας του υδροφοβικού χαρακτήρα της δεν προσροφούνται στην επιφάνειά της πολλά συστατικά των τροφίμων (Campbell, 1988).

A  
B  
C  
D  
E  
F  
G  
H  
I

**Εικόνα 4.** Μεμβράνες ELISA μετά από επώαση δειγμάτων βοδινού κρέατος εμβολιασμένα με 30 CFU/ 25 gr. (A) *E. coli* O157:H7 στέλεχος 932, (B) *E. coli* O157:H7 στέλεχος 933, (C) *E. coli* O157:H7 στέλεχος 505-B, (D) *E. coli* O157:H7 στέλεχος 32381, (E) *E. coli* O157:H7 στέλεχος CL-8, (F) Δείγμα χωρίς να έχει εμβολιαστεί, (G)  $10^6$  *E. coli* O157:H7 στέλεχος 932, (H) PBS, (I) *E. coli* K12 (εμβολιασμένο δείγμα με  $10^2$  CFU/ 25 g) (Kim and Doulet, 1992)

Ανάλογα με το θρεπτικό υλικό που θα χρησιμοποιήσουμε για την επώαση των δειγμάτων αυξάνεται και η ευαισθησία της ELISA (Padhye and Doyle, 1991). Για το βακτήριο *E. coli* O157:H7 χρησιμοποιώντας το μονοκλωνικό αντίσωμα 4E8C12 σε δείγματα κρέατος μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε σαν θρεπτικό υπόστρωμα το TBS το οποίο ευνοεί την ανάπτυξη του βακτηρίου στόχου αλλά δεν αυξάνει την ευαισθησία της μεθόδου (Doyle and Schoeni, 1987). Εάν όμως προσθέσουμε στο θρεπτικό αυτό υπόστρωμα, acriflavin HCl τότε η ευαισθησία της μεθόδου αυξάνεται, από  $10^5$  CFU/ml σε  $10^3$  CFU/ml (Padhye and Doyle, 1991). Η προσθήκη χολικού οξέος στο θρεπτικό υπόστρωμα και η ταυτόχρονη θέρμανση του δείγματος πριν την εφαρμογή της ELISA αυξάνει σημαντικά τον αριθμός των στελεχών του *E. coli* που ανιχνεύονται από το συγκεκριμένο αντίσωμα (Johnson et al., 1994).

Για την ανίχνευση εντεροτοξίνης Β σταφυλοκοκκικής προελεύσεως σε τυρί, έχει εφαρμοστεί ELISA με τη χρήση πολυκλωνικών αντισωμάτων ενσωματωμένα σε dipsticks πολυεστέρα (Morissette et al., 1990). Αρχικά έγινε εμβάπτιση των dipsticks σε διάλυμα πολυκλωνικού αντισώματος σε φωσφορικό νάτριο 0,1 N και ακολούθησε επώαση 12 ωρών. Έπειτα τα dipsticks επώαστηκαν για 10 min με το δείγμα το οποίο είχε ομογενοποιηθεί. Η ομογενοποίηση του δείγματος είναι πολύ σημαντική διότι η διαλυτότητα των πρωτεϊνών, η στερεοδιάταξη τους και η ταχύτητα αντίδρασης αντιγόνου – αντισώματος εξαρτάται σε ένα μεγάλο βαθμό από το διαλύτη (Notermans et al., 1983). Μετά την επώαση των dipsticks με το δείγμα γίνονται 2 διαδοχικές πλύσεις για την απομάκρυνση των συστατικών του τυριού από την επιφάνειά τους. Έπειτα τα dipsticks επωάζονται με το δεύτερο αντίσωμα το οποίο είναι σημασμένο με το ένζυμο horseradise peroxidise. Τέλος τα dipsticks επωάζονται με το υπόστρωμα για 10 min και μετράται φωτομετρικά η αλλαγή του χρώματος. Η διαδικασία της ELISA σε αυτή τη περίπτωση διαρκεί 1 h και μπορεί να ανιχνεύσει εντεροτοξίνη σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,5 ng/ml δείγματος (Morissette et al., 1990).

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *Listeria monocytogenes* 4b με τη μέθοδο ELISA έχουν χρησιμοποιηθεί μονοκλωνικά και πολυκλωνικά αντισώματα από κοτόπουλο (Seong-Hee et al., 2005). Έγινε χρήση 5 συνολικά μονοκλωνικών αντισωμάτων σε συνδυασμό με πολυκλωνικό αντίσωμα και διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερη ακρίβεια στη μέθοδο είχε ο συνδυασμός του μονοκλωνικού αντισώματος MAb 2B1 σαν αντίσωμα πρόσδεσης και το μονοκλωνικό αντίσωμα MAb 7A3 σαν αντίσωμα ανίχνευσης με το ένζυμο horseradise peroxidise (Seong-Hee et al., 2005).

Τελειώνοντας, να αναφέρουμε την ύπαρξη μεγάλου αριθμού βιβλιογραφικών αναφορών σχετικά με την εφαρμογή ανοσολογικών μεθόδων για την ανίχνευση διαφόρων μικροοργανισμών στα τρόφιμα ή και γενικότερα. Στο κεφάλαιο αυτό περιοριστήκαμε στην ανάλυση ορισμένων μόνο βιβλιογραφικών αναφορών, προσπαθώντας να συμπεριλάβουμε τα πιο σημαντικά, για τη μικροβιολογία τροφίμων, βακτήρια.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

### 2.1. Εισαγωγή

Σήμερα βρίσκεται σε εξέλιξη μία από τις σημαντικότερες μεθόδους ανίχνευσης και ταυτοποίησης μικροοργανισμών. Η μέθοδος αυτή αφορά την ανίχνευση συγκεκριμένων τμημάτων του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών. Τα νουκλεϊκά οξέα (DNA και RNA) περιέχουν στα μόρια τους όλες τις πληροφορίες που αφορούν τα χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες όλων των έμβιων όντων, συμπεριλαμβανομένων και των μικροοργανισμών.

Η ανίχνευση του γενετικού υλικού των μικροοργανισμών είναι μία διαδικασία ιδιαίτερα πολύπλοκη και απαιτεί πλούσιο εργαστηριακό εξοπλισμό καθώς και κατάλληλα εκπαιδευμένο προσωπικό. Η εξέλιξη της τεχνολογίας και της βιοτεχνολογίας βοήθησε στην κατασκευή νέων οργάνων και εργαλείων, καθιστώντας αυτές τις μεθόδους προσιτές από όλα τα μικροβιολογικά εργαστήρια.

Η ανίχνευση των μικροοργανισμών μέσω της ανίχνευσης του DNA (με εξαίρεση τους RNA ιούς) χωρίζεται σε δύο κατηγορίες :

- Προσδιορισμός του γενετικού αποτυπώματος με τη δράση περιοριστικών ενζύμων.
- Ανίχνευση συγκεκριμένων αλληλουχιών στο γενετικό υλικό με τη χρήση ανιχνευτών (Probes)

Πολλές φορές, ειδικά στις περιπτώσεις εκείνες που ο αναζητούμενος μικροοργανισμός βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες στο δείγμα, είναι απαραίτητη η ενίσχυση του DNA στόχου. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζουμε μία μέθοδο που καλείται Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (PCR-Polymerase Chain Reaction). Με την PCR μπορούμε να ανιχνεύσουμε συγκεκριμένη περιοχή στο γενετικό υλικό των μικροοργανισμών ακόμα και όταν βρίσκεται σε πολύ μικρές ποσότητες στο δείγμα.

Όπως θα διαπιστώσουμε στη συνέχεια το δείγμα πρέπει να υποβληθεί σε μία σειρά από επεμβάσεις ώστε να εξάγουμε και να ανιχνεύσουμε με έναν από τους παραπάνω τρόπους το DNA των μικροοργανισμών.

## 2.2. Προετοιμασία δείγματος

Πριν την εφαρμογή οποιασδήποτε μοριακής μεθόδου είναι απαραίτητο να προετοιμάσουμε το δείγμα. Η προετοιμασία του δείγματος αφορά την σωστή απομόνωση (εξαγωγή) του μικροβιακού DNA από το δείγμα. Το στάδιο αυτό είναι μεγάλης σημασίας διότι από αυτό εξαρτάται η ταχύτητα και η ακρίβεια της ανάλυσης. Πολλοί είναι οι παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την απομόνωση ή την ενίσχυση του μικροβιακού DNA. Οι περιοριστικοί παράγοντες εμποδίζουν την ανάλυση σε τρία βασικά σημεία της :

1. Εμποδίζουν την λύση των κυττάρων καθιστώντας αδύνατη την εκχύλιση του DNA
2. Εμποδίζουν την αποδιάταξη του DNA
3. Όταν εφαρμόζουμε PCR για την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου, εμποδίζουν την λειτουργία της DNA πολυμεράσης.

Τα τρόφιμα είναι πολύπλοκα συστήματα χημικών ενώσεων. Κάποιο από τα συστατικά του τροφίμου μπορεί να επηρεάσει την μικροβιολογική ανάλυση. Τα συστατικά του γάλακτος μπορεί να εμποδίσουν την PCR επειδή επικαλύπτουν τα μόρια του DNA στόχου (Jackson et al., 1996).

Οι Makino et al. το 1995 έκαναν σύγκριση σε τρεις διαδικασίες επεξεργασίας δειγμάτων τυριού, πριν την εφαρμογή μοριακών μεθόδων για την ανίχνευση του *L. monocytogenes*. Συγκεκριμένα εφάρμοσαν τα εξής :

- Διαδικασία 1<sup>η</sup> : Το τυρί ομογενοποιήθηκε και έβρασε για 15 min. Έπειτα φυγοκεντρίθηκε στις 15.000 rpm για 5 min και 20 μl από την υπερκείμενη φάση χρησιμοποιήθηκε για PCR.
- Διαδικασία 2<sup>η</sup> : Το τυρί αφού πρώτα ομογενοποιήθηκε διαλύθηκε με 0,5 ml από 2xTES. Το διάλυμα αυτό αποτελείται από 50 mM Tris-Cl, 5mM EDTA, 50 mM NaCl, pH 8,0. Το DNA εκχυλίστηκε με SDS, πρωτεϊνάση K και φαινόλη.
- Διαδικασία 3<sup>η</sup> : Το τυρί αφού ομογενοποιήθηκε διαλύθηκε σε αποστειρωμένο νερό και 200 μl από την υδατική φάση μεταφέρθηκαν σε ειδικό δοκιμαστικό σωλήνα και ανακατεύτηκαν καλά με vortex. Στο μείγμα αυτό προστέθηκαν 400 μl από ειδικό διαλύτη (50 mM Tris-Cl, 0.5% N-laurylsarcosine, 25 mM EDTA, pH 8,0). Μετά από ανάδευση και φυγοκέντριση το ίζημα ξανακατεργάστηκε με ειδικό διαλύτη που περιείχε πρωτεϊνάση K. Μετά από επώαση για 1 h στους 37 °C, 300 μl διαλύματος NaI (6 M NaI

σε 50 mM Tris-Cl, 25 mM EDTA, pH 8,0) και 500 μl ισοπροπανόλης προστέθηκαν και το μείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 15,000 rpm. Το ίζημα αφού στέγνωσε και διαλύθηκε με αποστειρωμένο νερό χρησιμοποιήθηκε για την PCR.

Από αυτές τις τρεις διαδικασίες καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η τελευταία. Παρόλο που η 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> διαδικασία εφαρμόζονται πιο εύκολα, το παραγόμενο DNA δεν είναι αρκετά καθαρό με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία των μοριακών μεθόδων που εφαρμόζονται στη συνέχεια. Συγκεκριμένα η ευαισθησία στην 1<sup>η</sup> και 2<sup>η</sup> διαδικασία ήταν 10<sup>3</sup> CFU/gr δείγματος όταν με την τρίτη διαδικασία η ευαισθησία ήταν πολύ μεγαλύτερη: 10<sup>1</sup> CFU/gr δείγματος.

Πολλές φορές, ένα απαραίτητο στάδιο πριν την ανίχνευση μικροοργανισμών σε ένα δείγμα τροφίμου με την εφαρμογή μοριακών μεθόδων, είναι μία αρχική επώαση του δείγματος σε κατάλληλες συνθήκες ώστε να πολλαπλασιαστούν οι μικροοργανισμοί που τυχόν βρίσκονται στο δείγμα. Επίσης η ταυτόχρονη αραίωση του δείγματος, μπορεί να οδηγήσει σε καλύτερα αποτελέσματα διότι διαλυτοποιούνται τα συστατικά του τροφίμου που μπορεί να αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες για την περαιτέρω ανάλυση (Waage et al., 1999). Ωστόσο, το στάδιο της επώασης αυξάνει σημαντικά το χρόνο της ανάλυσης.

Πολλές έρευνες έχουν γίνει για την ανίχνευση του θερμοανθεκτικού βακτηρίου *Campylobacter jejuni*. Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι είναι δυνατή η ανίχνευσή του με μία μοριακή μέθοδο, έπειτα από μία επώαση 20 h (Josefsen et al., 2004). Ανάλογα με την προετοιμασία του δείγματος και την εκχύλιση του DNA από τα δείγματα ο χρόνος επώασης μπορεί να ποικίλλει. Η ανίχνευση του *C. jejuni* μπορεί να γίνει με μία επώαση για 12 h αν η εκχύλιση του DNA γίνει με Triton X-100 (Cheng and Griffiths, 2003). Μετά από μία επώαση για 12 h μπορούμε να ανιχνεύσουμε το *C. jejuni* σε προϊόντα κρέατος με πολύ μεγάλη ευαισθησία (3 CFU/g τροφίμου), ενώ χωρίς επώαση η ευαισθησία αλλά και η επαναληψιμότητα της ανάλυσης μειώνεται (15 CFU/g τροφίμου) (Waage et al., 1999).

Οι Fach et al. (1994), για την ανίχνευση του τοξινογόνου βακτηρίου *Clostridium botulinum* εφάρμοσαν ένα στάδιο επώασης για 18 h προκειμένου να αυξήσουν την ευαισθησία της μεθόδου ανίχνευσης στα 10 βακτηριακά κύτταρα ανά γραμμάριο τροφίμου. Συγκεκριμένα, 10 g από δείγματα τροφίμων (χοιρινό, μοσχάρι, ψάρι) επώαστηκαν στους 37 °C για 18 h αφού πρώτα ομογενοποιήθηκαν με 90 ml TYG. Έπειτα 1 ml από κάθε διάλυμα φυγοκεντρήθηκε σε ταχύτητα 12.000 rpm για 3 min. Το ίζημα που προέκυψε ξηπλύθηκε με 2 ml απεσταγμένο νερό



και φυγοκεντρήθηκε σε 12000 rpm και προστέθηκαν 200 μl αντιδραστηρίου που παρέχεται σε σχετικό kit της Εταιρείας Biorad. Το διάλυμα επωάστηκε στους 56 °C για 30 min, αναδεύτηκε με vortex για 10 sec και τοποθετήθηκε στους 100 °C για 8 min. Από αυτό το διάλυμα χρησιμοποιήθηκαν 3 ml από την υπερκείμενη φάση, η οποία θα περιέχει και το μικροβιακό DNA, για την περαιτέρω μοριακή ανάλυση (Fach et al., 1994).

Γενικά, σκοπός της προετοιμασίας του δείγματος είναι να παραλάβουμε το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού που μας ενδιαφέρει και στη συνέχεια να προχωρήσουμε στη μοριακή μέθοδο ανίχνευσης.

### **2.3. Αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction – PCR)**

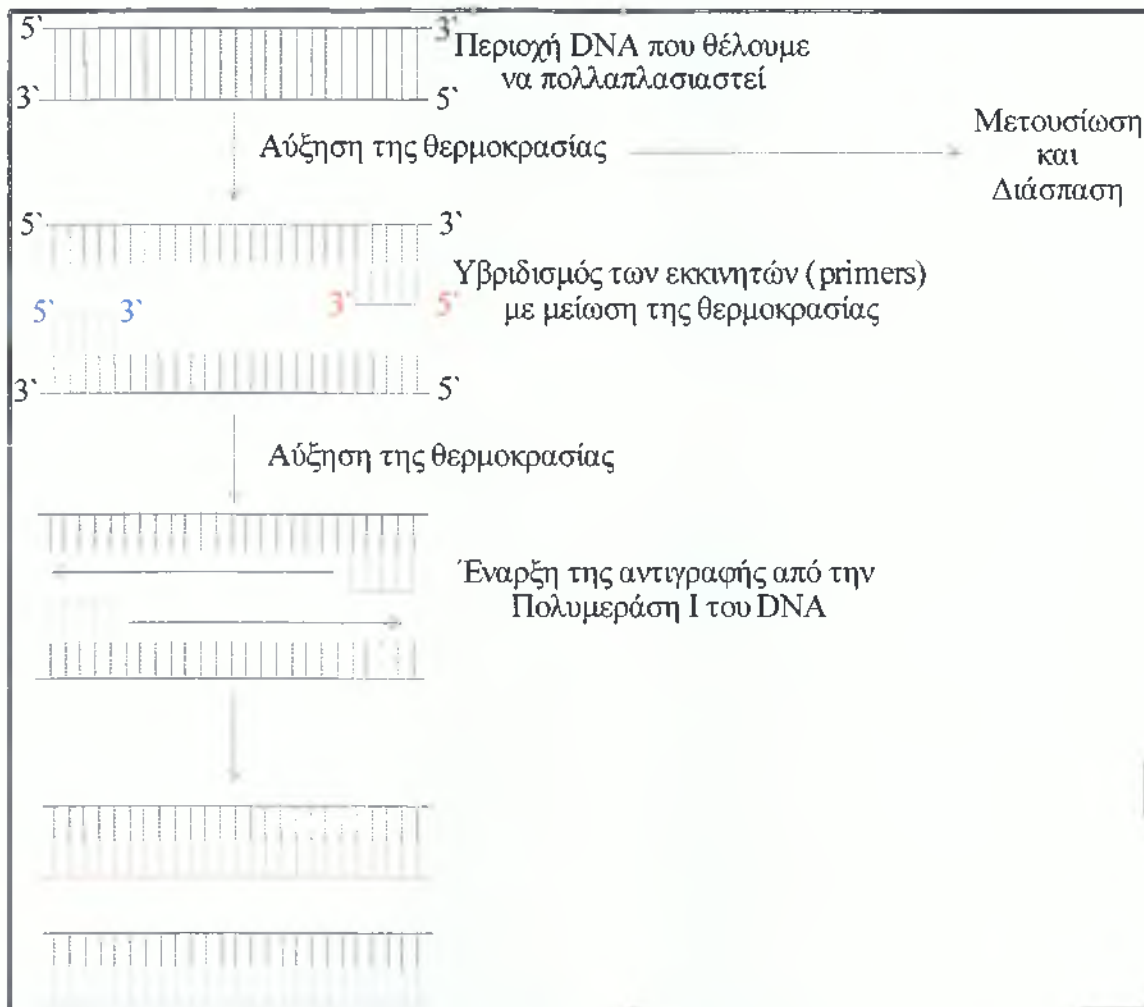
Το μικροβιακό DNA σε ένα δείγμα τροφίμου μπορεί να είναι σε πολύ μικρή ποσότητα. Έτσι ακόμα και με την πιο πετυχημένη μέθοδο εκχύλισης του μικροβιακού DNA μπορεί να μην μπορούμε να πάρουμε σωστά μικροβιολογικά αποτελέσματα εξαιτίας της μικρής ποσότητας αυτού. Έτσι είναι απαραίτητη η ενίσχυση του μικροβιακού γενετικού υλικού.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε δύο παραμέτρους. Αρχικά η ενίσχυση του γενετικού υλικού του μικροοργανισμού στόχου δεν αφορά ολόκληρο το γονιδίωμα του αλλά μονάχα μία συγκεκριμένη περιοχή αυτού. Το τμήμα του γενετικού υλικού που θα ενισχυθεί επιλέγεται ύστερα από έρευνα και εξαρτάται από τον μικροοργανισμό, τη μέθοδο ανίχνευσης και τα διαθέσιμα δεδομένα που αφορούν το μικροοργανισμό στόχο.

Η ενίσχυση του DNA στόχου γίνεται in nitro με εφαρμογή μίας μοριακής μεθόδου που καλείται Αλυσιδωτή Αντίδραση της (DNA) πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction-PCR). Η PCR έχει φέρει επανάσταση στην σύγχρονη μικροβιολογία διότι χάρη σε αυτή μπορούμε να εφαρμόσουμε τις μοριακές μεθόδους ανίχνευσης μικροοργανισμών με μεγαλύτερη ταχύτητα και ευαισθησία.

Η PCR είναι μία μέθοδος που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά από τους Mullis και τους συνεργάτες του (1985) και εφαρμόζεται σχετικά εύκολα και μέσα σε ένα μικρό χρονικό διάστημα μπορούμε να πάρουμε αρκετά μεγάλες ποσότητες του τμήματος-στόχου του γενετικού υλικού (Εικόνα 5). Η PCR εκτελείται σε δοκιμαστικό μικροσωλήνα όπου βάζουμε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια. Τα αντιδραστήρια που χρειαζόμαστε για την PCR είναι :

- Μόριο μήτρα, που είναι το DNA που περιέχει την αλληλουχία της οποίας επιδιώκεται ο πολλαπλασιασμός (ενίσχυση).
- Τα 4 τριφωσφορικά δεοξυριβοζονουκλεοτίδια ( ATP, TTP, CTP & GTP)
- Οι εκκινητές
- DNA Πολυμεράση
- Ρυθμιστικό διάλυμα, που προσδίδει στο μείγμα κατάλληλη ιοντική ισχύ και pH που κυμαίνεται από 7,5 έως 8,0. Το ρυθμιστικό διάλυμα μαζί με την θερμοκρασία που γίνεται η αντίδραση παίζει σπουδαίο ρόλο στην πετυχημένη πορεία της ενίσχυσης του DNA διότι ουσιαστικά υποκαθιστά όλα τα ένζυμα εκείνα που de novo είναι υπεύθυνα για την σύνθεση του DNA



Εικόνα 5. Σχηματική παράσταση της Αλυσιδωτής Αντίδρασης της Πολυμεράσης (PCR)

Ανάλογα με τις συνθήκες που θα εφαρμόσουμε στην PCR μπορούμε να επιλέξουμε από μία μεγάλη ποικιλία DNA πολυμερασών. Η DNA πολυμεράση που συνήθως χρησιμοποιείται είναι η Taq DNA πολυμεράση που απομονώθηκε από το βακτήριο *Thermus aquaticus*. Το συγκεκριμένο ένζυμο έχει εξαιρετική αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες για αυτό και χρησιμοποιείται κυρίως στα εργαστήρια. Υπάρχουν όμως και άλλες DNA πολυμεράσες που ανάλογα με την περίπτωση (συνθήκες, δείγμα) εξυπηρετούν καλύτερα από την Taq DNA πολυμεράση. Για παράδειγμα η Deep Vent<sup>TM</sup> DNA πολυμεράση προέρχεται από ένα βακτήριο του γένους *Pyrococcus*. Αυτό το βακτήριο απομονώθηκε από μία υποθαλάσσια θερμή περιοχή στα 2010 μέτρα κάτω από την επιφάνεια της θάλασσας και μπορεί να επιβιώσει έως τους 104°C. Ο χρόνος ημιζωής της Deep Vent<sup>TM</sup> DNA πολυμεράσης στους 95 °C είναι 23 h σε αντίθεση με την Taq DNA πολυμεράση που είναι 1,6 h. Υπάρχουν και άλλες DNA πολυμεράσες που απομονώθηκαν από διάφορα βακτήρια. Παρόλο που οι ιδιότητες τους είναι παρόμοιες με την Taq DNA πολυμεράση αποτελούν εναλλακτικές λύσεις για την PCR όταν η δράση της Taq εμποδίζεται από κάποια συστατικά των δειγμάτων. Τέτοιες πολυμεράσες είναι η Pfu DNA πολυμεράση από το βακτήριο *Pyrococcus furiosus* και η Vent<sup>TM</sup> DNA πολυμεράση από το βακτήριο *Thermococcus litoralis*.

Η διαδικασία της *in vitro* ενίσχυσης του DNA περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια :

1. Διαχωρισμός των δύο αλυσίδων του DNA μήτρας με θέρμανση στους 94 °C για 1 – 2 min
2. Σύνδεση των εκκινητών με τα άκρα της αλληλουχίας που πρόκειται να ενισχυθεί. Η θερμοκρασία και ο χρόνος εξαρτάται από τον εκκινητή και το ποσοστό ομολογίας με την περιοχή στόχο.
3. Σύνθεση των νέων μορίων DNA με τη δράση της DNA πολυμεράσης. Η θερμοκρασία που λαμβάνει χώρα η σύνθεση εξαρτάται από το είδος της DNA πολυμεράσης και είναι συνήθως 72 °C.

Τα τρία αυτά στάδια αποτελούν 1 κύκλο, ενώ για την συνήθη εφαρμογή της μεθόδου χρειάζονται περίπου 25-35 κύκλοι οπότε δημιουργούνται πολλά αντίγραφα της τάξης του 1 έως 10 εκατομμυρίων. Η διαδικασία της PCR λαμβάνει χώρα σε ειδικές συσκευές που είναι αυτοματοποιημένες και μπορούν να προγραμματιστούν για τις παραμέτρους του κάθε κύκλου (θερμοκρασία, διάρκεια) καθώς και για τον αριθμό των κύκλων (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Μία τυπική συσκευή PCR.

Η εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* διαφέρει ανάλογα με την επιλογή των εκκινητών, το μέγεθος της αλληλουχίας στόχου και τη φύση του δείγματος. Οι Cocolin et al. (2002) για παράδειγμα εφάρμοσαν τους εκκινητές List-univ1 (5'-ATGTCATGGAATAA-3') και List-univ2 (5'-GCTTTTCCAAGCTGTTTT-3') χρησιμοποιώντας 10 mM Tris HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 3,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 1,25 U από Taq DNA πολυμεράση. Κάθε κύκλος PCR αποτελείται από 95 °C για 1 min, 36 °C για 2 min και 72 °C για 3 min. Η περιοχή του DNA που ενισχύθηκε αφορούσε το γονίδιο *iap* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης p60 που συναντάται σε όλα τα *Listeria* spp. (Bubert et al., 1992). Το προϊόν της PCR είχε μέγεθος 457 bp.

Για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* με διαφορετικούς εκκινητές εφαρμόζονται διαφορετικές συνθήκες για κάθε κύκλο PCR. Όταν οι Blais and Phillippe (1993) χρησιμοποίησαν τους εκκινητές 5'-CATTAGTGGAAGATGGAATG-3' και 5'-GTATCCTCCAGAGTGATCGA-3' οι συνθήκες που εφάρμοσαν για κάθε κύκλο της PCR ήταν 94 °C για 1 min για την αποδιάταξη του DNA, 55 °C για 1 min για τον υβριδισμό των εκκινητών και 72 °C για 2 min για τον πολυμερισμό του DNA.

Για την ανίχνευση του βακτηρίου *Salmonella* spp. μπορούμε να εφαρμόσουμε PCR με πολύ μεγάλη επιτυχία εξαιτίας των εκκινητών που έχουν βρεθεί, οι οποίοι για παράδειγμα στοχεύουν περιοχές του γονιδίου *itrC*. Αυτό το γονίδιο είναι υπεύθυνο για την παραγωγή ενζύμων (αναγωγάσες) που εμπλέκονται στην κυτταρική αναπνοή (Malorny et al., 2004). Το γονίδιο αυτό υπάρχει μονάχα στις σαλμονέλλες και έτσι δεν πέρνουμε προϊόντα PCR από άλλα βακτήρια. Έτσι η εφαρμογή της PCR για την ανίχνευση των ειδών της *Salmonella* βρίσκει όλο και μεγαλύτερη εφαρμογή. Ο Malorny και οι συνεργάτες του (2004) χρησιμοποίησαν τους εκκινητές *itr-6* (5'-CTCACCAGGAGATTACAACATGG-3') και *itr-4* (5'-AGCTCAGAC CAAAAGTGACCAT C-3') σε μία τυπική αντίδραση PCR για την ανίχνευση της *Salmonella* (400 nM από κάθε εκκινητή, 200 μM από κάθε ένα τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 1XPCR buffer που αποτελείται από 20 mM Tris-HCl και 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 U από Taq Πολυμεράση και 5 μL από το διάλυμα DNA του δείγματος). Ο κάθε κύκλος PCR σε αυτή τη περίπτωση αποτελείτο από τα βήματα: 95 °C για 30 sec, 60 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec.

Όπως έχουμε αναφέρει σπουδαίο ρόλο στην PCR εκτός από τους εκκινητές διαδραματίζει και το ίδιο το δείγμα. Τα τρόφιμα περιέχουν ουσίες που μπορεί να εμποδίζουν την δράση της DNA πολυμεράσης. Για την ανίχνευση της *Salmonella* σε δείγματα ζωοτροφών δοκιμάστηκαν συνολικά 8 διαφορετικές DNA πολυμεράσες (Lofstorm et al., 2003) (Πίνακας 2).

Αποτελέσματα PCR με διαφορετικές DNA πολυμεράσες σε ομογενοποιημένα δείγματα ζωοτροφών διαφορετικών συγκεντρώσεων (% vol/vol)

Ζωοτροφή	DNALynck II				FastStart Tac				Platinum Tac				Pwo				iT#				Tae				T#				T#						
	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2	20	4	2	0.4	0.2
Πλουμένη καλαμποκού	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+	-	±	+	+	+
Καλαμπίνα	-	±	+	+	+	-	±	+	+	±	-	±	+	+	±	-	±	+	+	±	-	±	+	+	±	-	±	+	+	±	-	±	+	+	±
Απόβγατα επεξεργασίας	±	±	+	+	+	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±
Τροφή καρβίων	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±
Τροφή ζιτών	-	±	+	+	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±
Βρώμη	-	±	+	+	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±
Τροφή από φρέσκα	-	±	+	+	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±
Σβώλοι	-	±	+	+	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±	-	±	+	±	±
Γογγύλι	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ζωοτροφή από γογγύλι	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Σάγνα	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±	-	±	+	-	±
Ζωοτροφή από σάγνα	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-
Στάβρι	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-	-	±	+	+	-
Τυρόγαλο	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±	±	±	+	+	±

**Πίνακας 2.** Τα αποτελέσματα PCR για ανίχνευση Σαλμονέλας με διαφορετικές πολυμεράσες σε διαφορετικά τρόφιμα και διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι ζωοτροφές αρχικά αραιώθηκαν με BPW 1:10 (wt/vol). Με απασταγμένο νερό δημιουργήθηκαν αραιώσεις των ζωοτροφών από την αρχική αραιώση 1:10 σε συγκεντρώσεις 20, 4, 2, 0.4, 0.2 % vol/vol (Lofstorm et al., 2003)



Από τις οχτώ εξεταζόμενες DNA πολυμεράσες βρέθηκε ότι κατάλληλη για την ανίχνευση *Salmonella* σε 14 είδη ζωοτροφών είναι η Tth DNA πολυμεράση.

Το βακτήριο *S. enterica* μπορεί να βρεθεί σε πολλά τρόφιμα που καταναλώνονται ενώπιόντως είναι τα φρούτα και τα λαχανικά. Για την ανίχνευση του *S. enterica* σε φρέσκες τομάτες μπορούμε να εφαρμόσουμε PCR στοχεύοντας περιοχές του γονιδίου *hila* (Guo et al., 2000). Το γονίδιο *hila* ανήκει σε μία ομάδα γονιδίων SPI που είναι υπεύθυνα για την λοιμογόνο δράση πολλών ειδών του γένους *Salmonella* (Bajaj et al., 1995). Οι εκκινητές HILA1 (5'-CTGCCGCAGTGTTAAGGATA-3') και HILA2 (5'-CTGCCGCCTTAATCGCATGT-3') έδωσαν ένα προϊόν PCR μεγέθους 497 bp για όλα τα βακτήρια του γένους *Salmonella* που δοκιμάστηκαν και η ευαισθησία της μεθόδου ήταν  $10^1$  και  $10^0$  CFU/mL μετά από μία επώαση 6 h και 9 h αντίστοιχα (Guo et al., 2000).

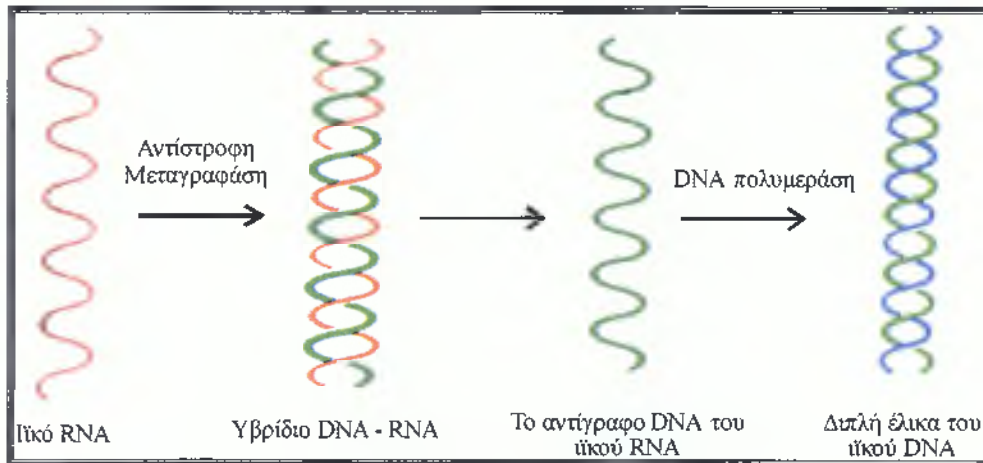
Μέχρι στιγμής είδαμε πώς η PCR μπορεί να ενισχύσει ορισμένες αλληλουχίες στόχους στο γονιδίωμα των βακτηρίων. Όπως είναι γνωστό το γενετικό υλικό των βακτηρίων είναι το DNA. Στις περιπτώσεις των ιών το γενετικό υλικό είναι το RNA. Οι ιοί αποκτούν όλο και μεγαλύτερη σημασία στην μικροβιολογία τροφίμων διότι εμφανίζονται όλο και περισσότερα κρούσματα λοιμώξεων ιογενούς προέλευσης. Οι μέθοδοι μοριακής βιολογίας για την ανίχνευση μικροοργανισμών μπορούν να εφαρμοστούν και στην περίπτωση των ιών. Η μέθοδος PCR στην ανίχνευση των ιών λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια :

- Αρχικά το RNA των ιών μετατρέπεται σε DNA.
- Ακολουθεί ενίσχυση περιοχής του γενετικού υλικού των ιών μέσω της PCR.

Το RNA είναι ένα πολυμερές χωρίς διακλαδώσεις, που αποτελείται από νουκλεοτίδια ενωμένα με 3'→5' φωσφοδιεστερικούς δεσμούς. Η ομοιοπολική δομή του RNA διαφέρει από αυτή του DNA σε δύο σημεία. Όπως φανερώνει το όνομα του, το σάκχαρο στο RNA είναι η ριβόζη αντί για δεοξυριβόζη. Η άλλη διαφορά είναι ότι μία από τις αζωτούχες βάσεις του RNA είναι η ουρακίλη (U) αντί της θυμίνης. Η ουρακίλη όπως και η θυμίνη μπορεί να σχηματίσει ζεύγη βάσης με την αδενίνη αλλά δεν έχει τη μεθυλομάδα που υπάρχει στην θυμίνη. Τα μόρια του RNA μπορεί να είναι μονόκλωνα ή δίκλωνα. Το RNA δεν μπορεί να σχηματίσει διπλή έλικα τύπου Watson – Crick, γιατί υπάρχει παρεμπόδιση από το 2'-OH της ριβόζης. (Stryer, 1997)

Ένα χαρακτηριστικό των ιών είναι ότι πολλαπλασιάζονται μέσω ενδιάμεσων μορίων DNA. Το RNA των ιών που ονομάζεται (+) αλυσίδα, μεταφέρεται στο κύτταρο ξενιστή. Αυτό το (+) RNA είναι το εκμαγείο για τη σύνθεση μίας συμπληρωματικής αλυσίδας (-) DNA από μία

αντίστροφη μεταγραφάση, ένα ένζυμο που μεταφέρεται στο κύτταρο από τον ιό για το σκοπό αυτό. Η αντίστροφη μεταγραφάση είναι μία RNA κατευθυνόμενη DNA πολυμεράση. Σε αυτή τη περίπτωση οι γενετικές πληροφορίες κυλούν από το RNA στο DNA. Το (-) DNA στη συνέχεια χρησιμεύει σαν εκμαγείο για την σύνθεση του (+) DNA (Εικόνα 7).



**Εικόνα 7.** Δημιουργία DNA με τη βοήθεια του ενζύμου αντίστροφη μεταγραφάση. Σε αυτή τη περίπτωση το γενετικό υλικό είναι το RNA (Stryer, 1997)

Αυτό το (+) DNA είναι και το γενετικό υλικό που προσπαθούμε να εντοπίσουμε στις μικροβιολογικές εξετάσεις ενός τροφίμου. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιούμε μία παραλλαγή της PCR που λέγεται RT-PCR (Reverse Transcription-PCR). Στην RT-PCR προηγείται της PCR μία διαδικασία κατά την οποία το μονόκλωνο RNA του ιού μετατρέπεται σε DNA. Έπειτα με την PCR ενισχύουμε την αλληλουχία στόχο του ιϊκού DNA.

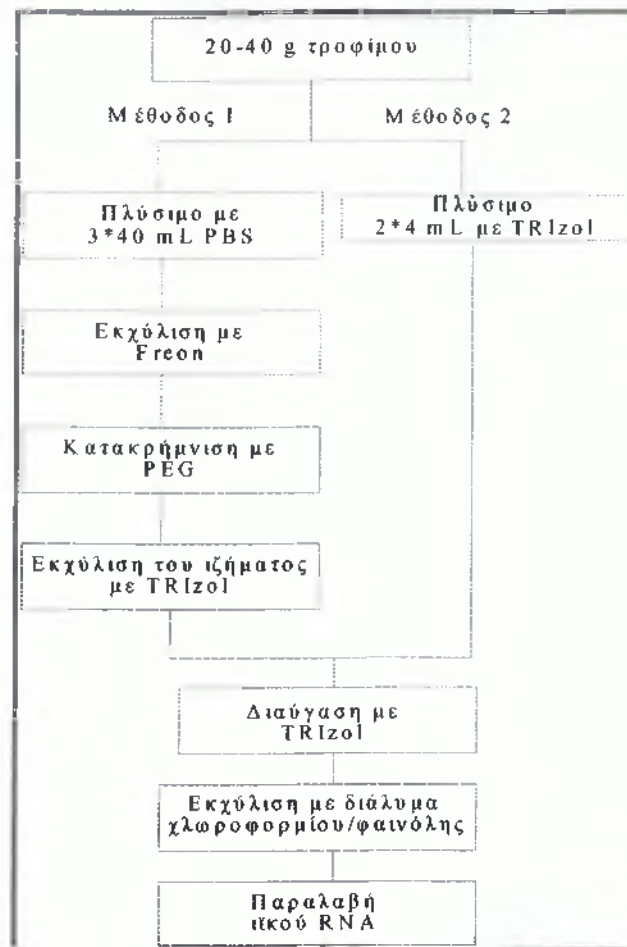
Μία ομάδα ιών που σχετίζονται με τις τροφολοιμώξεις είναι οι Norwalk-like viruses (NLVs). Οι NLVs προκάλεσαν το 1998 στις ΗΠΑ το 96% των μη βακτηριακών γαστρεντερίτιδων (Fankhauser et al., 1998). Λοιμώξεις που οφείλονται σε NLVs έχουν σχετιστεί με την κατανάλωση οστρακοειδών, νερού, πάγου, κατεψυγμένων αρτοσκευάσματος και σαλάτων (πατάτα, φρούτα, λαχανικά, κοτόπουλο) (Hedberg and Osterholm, 1993).

Ένας άλλος ιός που απασχολεί την μικροβιολογία τροφίμων είναι αυτός της ηπατίτιδας A (HAV) που είναι ο πιο κοινός ιός σε γαστρεντερίτιδες που οφείλονται κυρίως στην κατανάλωση μολυσμένων τροφών και νερού (Hutin et al., 1999).

Ένα από τα σπουδαιότερα προβλήματα για την ανίχνευση των ιών με μεθόδους μοριακής βιολογίας είναι η παραλαβή του ιϊκού RNA από το δείγμα. Όπως φαίνεται και στην εικόνα 8 οι Schwab et al. (1999) εφάρμοσαν δύο τρόπους για την παραλαβή του ιϊκού RNA από δείγματα τροφίμων. Σύμφωνα με την πρώτη μέθοδο η παραλαβή του RNA περιλάμβανε τα ακόλουθα στάδια: αρχικά 40 ml PBS χρησιμοποιήθηκαν για την ομογενοποίηση του δείγματος. Η υγρή φάση συλλέχθηκε και ακολούθησαν δύο πλυσίματα με PBS. Το διάλυμα που προέκυψε (περίπου 120 ml) εκχειλίστηκε με 70 ml Freon 11 (Trichlorofluoromethane) με ανάδευση για 5 min και το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 5.000 rpm για 10 min στους 4 °C. Η υδατική φάση απομακρύνθηκε και επαναλήφθηκε εκχύλιση. Η υδατική φάση περιείχε το ιϊκό RNA. Με την προσθήκη PEG (polyethylene glycol) 10 % και NaCl 0,3 M έγινε η κατακρήμνιση του ιϊκού RNA στους 4°C για 2 h. Μετά από φυγοκέντριση στις 7000 rpm για 30 min στους 4°C το ίζημα που προκύπτει διαλύεται με TRIzol (8 ml) και μεταγγίζεται σε ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες.

Με τη δεύτερη μέθοδο γίνεται κατευθείαν πλύσιμο με TRIzol 2 φορές (4 ml για 5 min) και το διάλυμα που συλλέχθηκε από κάθε πλύσιμο μεταφέρθηκε σε ειδικούς δοκιμαστικούς σωλήνες. Έπειτα και για τις δύο διαφορετικές μεθόδους η πορεία παραλαβής του RNA είναι κοινή. Μετά από φυγοκέντριση (8000 rpm για 20 min στους 4 °C) και αφού παραλήφθηκε η άνω υδατική στοιβάδα που προέκυψε έγινε εκχύλιση με 1,6 ml χλωροφορμίου για 4 min. Η υδατική φάση που προέκυψε κατακρημνίστηκε με 8 ml αιθανόλης και μετά από φυγοκέντριση (8000 rpm για 5 min στους 4 °C) προέκυψε σε καθαρή μορφή το ιϊκό RNA. Από τις δύο μεθόδους καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η πρώτη μέθοδος. Με την πρώτη μέθοδο γίνεται καλύτερη απομάκρυνση των διαφόρων συστατικών των τροφίμων (όπως λιπίδια). Επίσης με την πρώτη μέθοδο μπορούμε να απομονώσουμε ολόκληρο το στέλεχος του ιού πριν την προσθήκη του TRIzol γεγονός που μπορεί να οδηγήσει στην βελτιστοποίηση άλλων μεθόδων ανοσοβιολογίας (ELISA) (Schwab et al., 1999).





**Εικόνα 8.** Μέθοδοι παραλαβής ιικού RNA με δύο διαφορετικούς τρόπους όπως περιγράφηκε από τους Schwab et al. (1999)

Μία άλλη μέθοδος παραλαβής ιικού RNA περιλαμβάνει την κατεργασία του δείγματος με λεπτότατη σκόνη γυαλιού και guanidine isothiocyanate. Το RNA ενώνεται με δεσμούς ηλεκτροστατικής φύσης με το γυαλί ενώ η guanidine isothiocyanate λύει τα κύτταρα και ταυτόχρονα προστατεύει το ιικό RNA από ενζυματική καταστροφή. Έπειτα η σκόνη γυαλιού ξεπλένεται με αιθανόλη, ακετόνη και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl. Έπειτα εκχυλίζεται με αιθανόλη και παραλαμβάνεται το RNA σε καθαρή μορφή (Lees et al., 1995).

Αφού παραλάβουμε το ιικό RNA πρέπει να το μετατρέψουμε σε DNA με την χρήση μίας αντίστροφης μεταγραφάσης. Όπως και στην PCR έτσι και στην αντίδραση αντίστροφης μεταγραφάσης (RT, Reverse Transcription) τοποθετούμε όλα τα απαραίτητα αντιδραστήρια σε ένα σωληνάριο με λεπτά τοιχώματα. Οι Schwab et al. (1999) για την ανίχνευση των NLVs και

HAV σε δείγματα κρέατος χρησιμοποίησαν το εξής διάλυμα RT : 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 3,3 μM από τον κάθε εκκινητή, 667 μM από τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και 5 U από αντίστροφη μεταγραφάση AMV. Η αντίδραση RT έγινε με επώαση στους 43 °C για 1 h, θέρμανση για 5 min στους 95 °C και τοποθέτηση σε πάγο. Έπειτα στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα που πραγματοποιήθηκε η RT τοποθετήθηκε το διάλυμα PCR. Το διάλυμα αυτό αποτελείτο από 10 mM Tris HCl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 μM από κάθε τριφωσφορικό δεοξυριβονουκλεοτίδιο, 5 U από Taq DNA πολυμεράση και 1 μM από κάθε εκκινητή. Ένας κύκλος PCR αποτελείτο από 92 °C για 15 sec, 55 °C για 30 sec και 72 °C για 30 sec.

Οι Lees et al. (1999) ανίχνευαν σε δείγματα οστρακοειδών ιούς NLVs μέσω της RT-PCR. Για την RT αντίδραση χρησιμοποίησαν 10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM από τα τριφωσφορικά δεοξυριβονουκλεοτίδια και 100 U αντίστροφης μεταγραφάσης που προέρχεται από τον ιό της λευχαιμίας. Η RT πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min ακολούθως έγινε επώαση στους 37 °C για 1 h και θέρμανση στους 95 °C για 5 min. Όταν το μείγμα κρύωσε σε πάγο προστέθηκε το διάλυμα PCR (10 mM Tris, 50 mM KCl, 20 pmol από κάθε primer NI and E3, 1 U Taq πολυμεράσης) και πραγματοποιήθηκαν 30 κύκλοι που ο κάθε ένας αποτελείτο από τα βήματα: 95 °C για 1 min, 40 °C για 1 min και 72 °C για 1.

Η PCR είναι μία μέθοδος η οποία μπορεί να υπάρξει σε αρκετές παραλλαγές. Η nested-PCR είναι μία παραλλαγή της μεθόδου. Κατά τη διάρκεια της nested-PCR αρχικά ενισχύεται μία αλληλουχία από το γενετικό υλικό του μικροοργανισμού. Στο προϊόν της πρώτης PCR εφαρμόζουμε μία δεύτερη PCR που αφορά μία αλληλουχία η οποία βρίσκεται μέσα στο προϊόν της πρώτης PCR. Με αυτό το τρόπο αυξάνεται η ευαισθησία και η διακριτική ικανότητα της μεθόδου. Για την ανίχνευση του παθογόνου βακτηρίου *Yersinia enterocolitica* οι Kapperud et al. (1987) χρησιμοποίησαν 2 ζεύγη εκκινητών οι οποίοι σχεδιάστηκαν με βάση το γονίδιο *YadA* που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της εξωκυττάριας πρωτεΐνης που παράγει η *Y. enterocolitica*. Αρχικά γίνεται η πρώτη PCR με τους εκκινητές 5'-TAAGATCAGTGTCTCTGCGGCA-3' και 5'-TAGTTATTTGCGATCCCTAGCAC-3' και λαμβάνεται ένα προϊόν μεγέθους 700-750 bp ανάλογα με τον γονότυπο του βακτηρίου. Η δεύτερη PCR έγινε σε 0,2 μl από το διάλυμα της πρώτης PCR. Οι εκκινητές 5'-GCGTTGTTCTCATCTCCATATGC-3' και 5'-GGCTTTCATGACCAATGG ATACAC-3' δίνουν ένα προϊόν PCR 520 bp (Kapperud et al.,

1993). Με την nested PCR κατέστη δυνατός ο διαχωρισμός του παθογόνου στελέχους από τα μη παθογόνα με πολύ μεγάλη ακρίβεια και ευαισθησία.

Μία άλλη παραλλαγή της μεθόδου PCR είναι η multiplex PCR. Στη multiplex PCR χρησιμοποιούμε πολλούς διαφορετικούς εκκινητές για να ενισχύσουμε ταυτόχρονα πολλές αλληλουχίες. Οι αλληλουχίες στόχοι στη multiplex PCR μπορεί να ανήκουν στο ίδιο βακτήριο ή σε διαφορετικά βακτήρια. Σε κάθε περίπτωση ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί ώστε οι εκκινητές να έχουν την ίδια ή παρόμοια θερμοκρασία αποδιάταξης (melting temperature,  $T_m$ ). Για την ανίχνευση του εντεροπαθογόνου βακτηρίου *E.coli* O157:H7 χρησιμοποιήθηκαν 6 ζευγάρια εκκινητών σε μία PCR δίνοντας πολύ καλά αποτελέσματα (Πίνακας 3) (Vora et al., 2004).

Εκκινητής	Γονίδιο	Αλληλουχία	Μέγεθος Μεγεθυνόμενου θραύσματος
IntF	<i>eaeA</i>	GACTGTCGATGCATCAGGCCAAAG	368
IntR		TTGGAGTATTAACATTAACCCCAGG	
FLIC <sub>h7</sub> -F	<i>flhC</i>	GC GCTGTCGAGTTCATCGAGC	625
FLIC <sub>h7</sub> -R		CAACGGTGACTTATCGCCATTCC	
RfbF	<i>rfbE</i>	GTGTCCATTTATACGGACATCCATG	292
RfbR		CCATAACGTCATGCCAATATTGCC	
SLT-IF	<i>stx1</i>	TGTAAC TGGAAAGGTGGAGTATAC	210
SLT-IR		GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC	
SLT-III-F		GTTTTCTTCGGTATCCTATTCCC	
SLT-III-R		GATGCATCTCTGGTCAATTGTATTAC	
ipaH-L	<i>ipaH</i>	CCACTGAGAGCTGTGAGGAC	269
ipaH-R		TGTCACTCCC GACACGCCAT	

**Πίνακας 3.** Διαφορετικοί εκκινητές (6 ζεύγη) που στοχεύουν σε διαφορετικά γονίδια του εντεροπαθογόνου *E. coli* και που παράγουν προϊόντα PCR διαφορετικού μεγέθους (Vora et al., 2004)

Για την ανίχνευση του τοξινογόνου βακτηρίου *C. botulinum* μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε μία multiplex PCR ώστε να ανιχνεύσουμε το βακτήριο. Ανάλογα με την αντιγονική ιδιότητα της τοξίνης μπορούμε να διακρίνουμε 7 ορολογικούς τύπους A, B, C, D, E, F και G. Με την multiplex PCR είναι δυνατή η ανίχνευση του βακτηρίου και η ταυτόχρονη ταυτοποίησή του ανάλογα με τον ορολογικό του τύπο (Πίνακας 3) (Lindstrom et al., 2001). Το όριο ανίχνευσης της μεθόδου αυξάνει σημαντικά (έως  $10^0$  σπόρια/100 g τροφίμου) όταν προηγείται της ανάλυσης μία επώαση σε αναερόβιες συνθήκες για 24 h στους 37 °C. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούμε σε αυτή τη περίπτωση προέρχονται από το γονίδιο BoNT που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τοξίνης και που διαφέρει σε κάθε τύπο του βακτηρίου

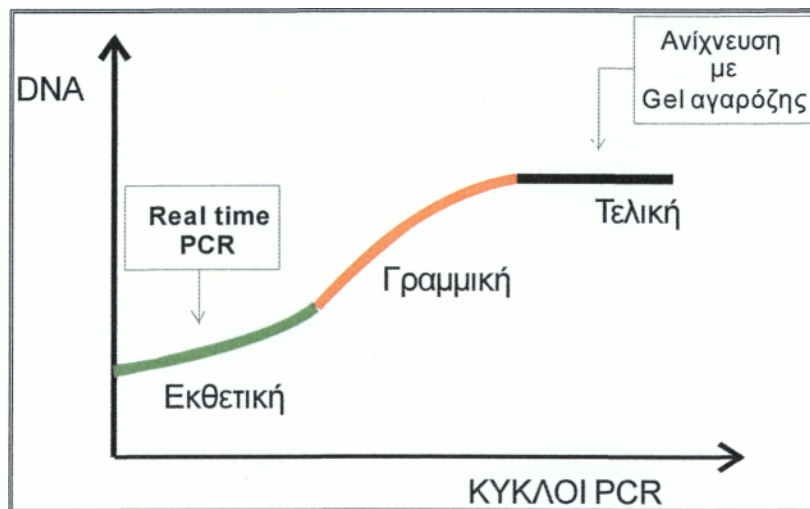
(Hatheway, 1993). Οι εκκινητές έχουν περίπου την ίδια θερμοκρασία  $T_m$  (από 63,4 έως 64,3 °C) (Lindstrom et al., 2001).

Τύπος	Εκκινητής	Αλληλουχία(5'-3')	Μέγεθος Προϊόντων (bp)
A <sub>r</sub>	CBMLA1	AGC TAC GGA GGC AGC TAT GTT	782
A <sub>r</sub>	CBMLA2	CGT ATT TGG AAA GCT GAA AAG G	
B <sub>r</sub>	CBMLB1	CAG GAG AAG TGG AGC GAA AA	205
B <sub>r</sub>	CBMLB2	CTT GCG CCT TTG TTT TCT TG	
E <sub>r</sub>	CBMLE1	CCA AGA TTT TCA TCC GCC TA	389
E <sub>r</sub>	CBMLE2	GCT ATT GAT CCA AAA CGG TGA	
F <sub>r</sub>	CBMLF1	CGG CTT CAT TAG AGA ACG GA	543
F <sub>r</sub>	CBMLF2	TAA CTC CCC TAG CCC CGT AT	

**Πίνακας 4.** Διαφορετικοί εκκινητές για την εφαρμογή multiplex PCR για την ανίχνευση του *Cl. botulinum* (Lindstrom et al., 2001)

Όπως θα δούμε παρακάτω μετά την PCR εφαρμόζουμε ορισμένες τεχνικές ώστε να ανιχνεύσουμε τα προϊόντα της PCR, δηλαδή το ενισχυμένο τμήμα του DNA στόχου. Αυτές οι τεχνικές εκτός από την αύξηση του χρόνου ανάλυσης μπορούν να δώσουν και λανθασμένα αποτελέσματα εξαιτίας επιμολύνσεων ή κακών χειρισμών.

Μία παραλλαγή της PCR, η RTi-PCR (real time PCR) δίνει αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο (άμεσα). Η Rti-PCR παρουσιάζει ορισμένες διαφορές έναντι της κλασσικής PCR. Αρχικά η ανίχνευση με την RTi-PCR γίνεται από τα πρώτο στάδιο της αντίδρασης πολλαπλασιασμού του DNA ενώ η ανίχνευση του προϊόντος της PCR ανίχνευσης γίνεται σε πηκτή αγαρόζης μετά το τέλος της αντίδρασης (Εικόνα 9). Παράλληλα η ανίχνευση σε πηκτή αγαρόζης είναι μία ποιοτική μέθοδος και όχι ποσοτική. Αντίθετα η RTi-PCR είναι μία μέθοδος που τα αποτελέσματά της είναι ποσοτικά και δίνονται και με τη μορφή γραφημάτων.



Εικόνα 9. Διάγραμμα που δείχνει την πορεία της PCR και τα στάδια στα οποία ανιχνεύεται το προϊόν ανίχνευσης στην PCR και την RTi-PCR. (Applied Biosystems , tutorials).

Έχουν αναπτυχθεί δύο τεχνολογίες για την επιτυχή χρήση της RTi-PCR. Η πρώτη τεχνολογία αφορά τη χρήση ειδικών ανιχνευτών. Οι ανιχνευτές αυτοί είναι ολιγονουκλεοτίδια που ενώνονται με κάποιο μέρος του τμήματος DNA που ενισχύεται. Οι ανιχνευτές είναι συνδεδεμένοι με δύο μόρια : ένα μόριο σήμανσης (υψηλή ενέργεια) και ένα μόριο πρόσδεσης (χαμηλή ενέργεια). Όταν το μόριο σήμανσης είναι συνδεδεμένο με το μόριο πρόσδεσης τότε δεν παράγεται σήμα εξαιτίας της διαφοράς δυναμικού που υπάρχει μεταξύ των δύο μορίων. Όταν το μόριο σήμανσης αποδεσμεύεται από το μόριο πρόσδεσης τότε παράγεται σήμα (φως) το οποίο και μπορούμε να μετρήσουμε. Οι ανιχνευτές ενώνονται συμπληρωματικά με το DNA στόχο κατά το ίδιο στάδιο της PCR που ενώνονται και οι εκκινητές. Καθώς η DNA πολυμεράση συνθέτει την καινούργια αλυσίδα DNA φτάνει στους ήδη ενωμένους ανιχνευτές και τους αποδεσμεύει από το μόριο σήμανσης. Έπειτα το μόριο σήμανσης αφού βρίσκεται σε ελεύθερη κατάσταση παράγει σήμα το οποίο μπορούμε να το μετρήσουμε. Όσο προχωράει η PCR τόσο περισσότερα μόρια σήμανσης αποδεσμεύονται από τους ανιχνευτές και επομένως θα παράγουν δυνατότερο σήμα .

Χρησιμοποιώντας έναν ανιχνευτή *ttr-5* (5'- CACCGACGGCGAGACCGACTTT-3') όπου στο 5'-άκρο είναι προσδεμένο ένα μόριο 6-carboxyfluorescein (FAM) (μόριο σήμανσης) και στο 3'- άκρο ένα μόριο Yellow quencher (μόριο πρόσδεσης), οι Malomy et al. (2004) κατάφεραν να ανιχνεύσουν τη *Salmonella* στα τρόφιμα. Σε 110 δείγματα τροφίμων (κρέας, ψάρι, κοτόπουλο) η RTi-PCR είχε 100% επιτυχία σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους ανάλυσης



μειώνοντας τον χρόνο ανάλυσης από 5 ημέρες σε 24 h συμπεριλαμβανομένου και του χρόνου επώασης.

Για την ανίχνευση του θερμοανεκτικού βακτηρίου *Campylobacter* sp. οι Josefsen et al. (2004) εφάρμοσαν την Rti-PCR χρησιμοποιώντας τον ανιχνευτή 5'-FAM-TGTCATCCTCCACGC GGCGTTGCTGC-TAMRA-3'. Το FAM αποτελεί το μόριο σήμανσης και το TAMRA (6 - carboxytetramethylrhodamine) αποτελεί το μόριο πρόσδεσης. Κάνοντας χρήση αυτού του ανιχνευτή τα αποτελέσματα που ελήφθησαν συνέπιπταν απόλυτα με τις παραδοσιακές μεθόδους.

Για την ανίχνευση των τύπων του βακτηρίου *E. coli* που είναι υπεύθυνα για την παραγωγή της Shiga τοξίνης (STEC) μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε RTi-PCR με πολύ μεγάλη ευαισθησία (3 CFU/25 g τροφίμου) (Chen et al., 1998).

Μία άλλη μέθοδος με την οποία μπορούμε να εφαρμόσουμε την RTi-PCR είναι με τη χρήση μίας χρωστικής, της SYBR Green. Αυτό το χημικό μόριο μπορεί να συνδεθεί με μία οποιαδήποτε διπλή έλικα DNA. Η SYBR Green έχει την ιδιότητα να φθορίζει όταν ενώνεται με μία διπλή έλικα DNA. Έτσι μπορούμε να λάβουμε αποτελέσματα σε πραγματικό χρόνο για την αύξηση της ποσότητας του DNA διπλής έλικας σε μία PCR. Η διαφορά με την προηγούμενη μέθοδο είναι ότι το SYBR Green θα δώσει αποτελέσματα σε οποιαδήποτε αύξηση του DNA διπλής έλικας ανεξάρτητα δηλαδή με το αν η περιοχή που ενισχύθηκε είναι η σωστή και όχι ένα λάθος προϊόν της PCR. Επομένως σε αυτή τη περίπτωση πρέπει να έχει γίνει η επιλογή των εκινητών προσεχτικά. Όπως θα δούμε παρακάτω το SYBR Green μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη χρώση του DNA σε πηκτή αγαρόζης, αντί του βρωμιούχου αιθιδίου, που είναι τοξικό και καρκινογόνο.

Για την ανίχνευση μυκήτων και ζυμών που προσβάλλουν γαλακτοκομικά προϊόντα και χυμούς φρούτων έχει αναπτυχθεί μία RTi-PCR με τη χρήση του SYBR Green στοχεύοντας μία περιοχή του γονιδίου *act*, το οποίο δεν υπάρχει στα προκαρυωτικά κύτταρα (Bleve et al., 2003).

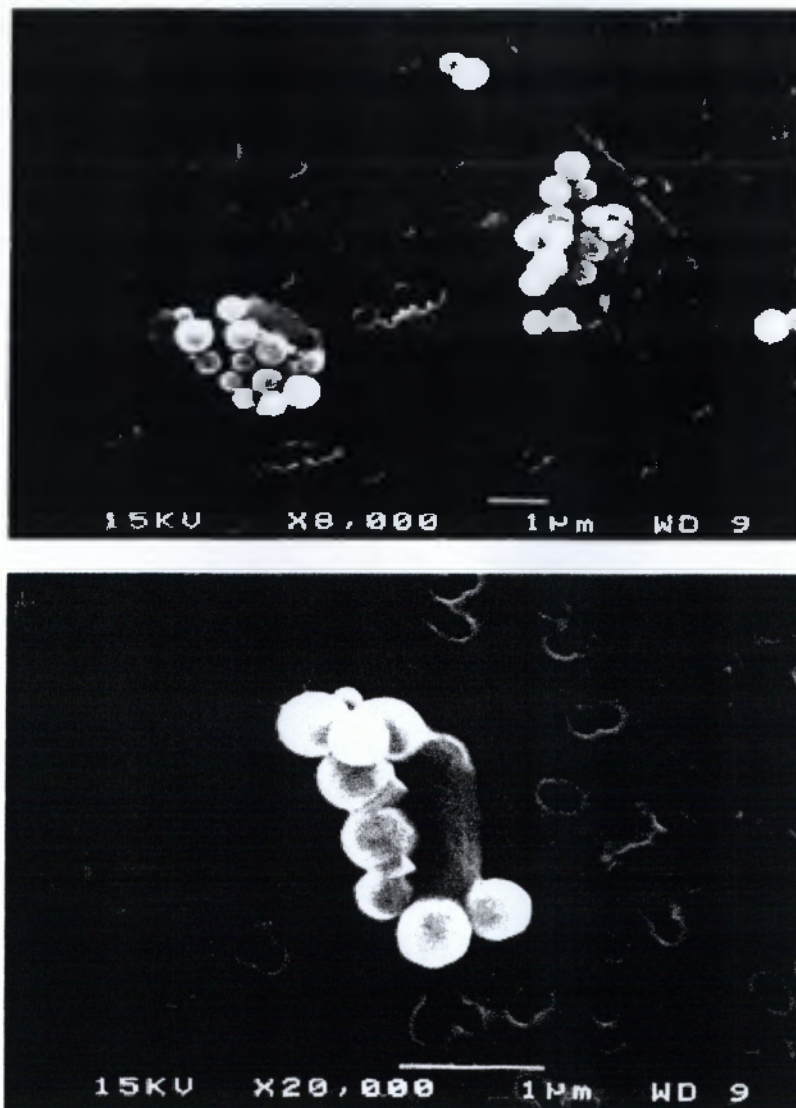
#### **2.4. Ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Immunomagnetic Separation, IMS)**

Πριν από κάθε εφαρμογή PCR είναι απαραίτητο ένα στάδιο επώασης. Με αυτό το τρόπο παίρνουμε μία ποσότητα DNA στόχου αρκετή για την ενίσχυση της αλληλουχίας στόχου. Ο λόγος που εφαρμόζουμε το στάδιο της επώασης είναι ότι η μικρή ποσότητα DNA που λαμβάνεται μετά από λύση των κυττάρων μπορεί να χαθεί. Για παράδειγμα αν το DNA είναι

μετουσιωμένο, ανάλογα με τις συνθήκες του πειράματος, τότε μπορεί να δημιουργήσει δεσμούς τύπου Van der Waals με τα τοιχώματα του δοχείου και να μην γίνει η ενίσχυσή του. Επιπλέον το στάδιο της επώασης φαίνεται να αυξάνει την επαναληψιμότητα αλλά και την ευαισθησία της μεθόδου (Yu and Bruno, 1995).

Το στάδιο της επώασης αυξάνει σημαντικά το χρόνο της μεθόδου, αποτελεί όμως απαραίτητο βήμα. Σήμερα, βρίσκεται σε εξέλιξη μία μέθοδος η οποία καθιστά δυνατή την ελάττωση ή την κατάργηση του χρόνου επώασης. Η μέθοδος αυτή ονομάζεται ανοσομαγνητικός διαχωρισμός (Immunomagnetic Separation, IMS). Η μέθοδος αυτή δεν αποτελεί μία ξεχωριστή μέθοδο για την ανίχνευση των μικροοργανισμών. Είναι όμως ένα δυναμικό εργαλείο που αν χρησιμοποιηθεί σε συνδυασμό με μία άλλη μέθοδο (PCR ή ανοσοβιολογική μέθοδο) μπορεί να δώσει εκπληκτικά αποτελέσματα. Στον ανοσομαγνητικό διαχωρισμό, μικρές χάντρες (διαμέτρου 2-5  $\mu\text{m}$ ) οι οποίες είναι μαγνητισμένες, με τον θετικό ή τον αρνητικό πόλο στην επιφάνειά τους, καλύπτονται πλήρως με ένα αντίσωμα πολυκλωνικό ή μονοκλωνικό. Το αντίσωμα αυτό είναι ειδικό για κάθε μικροοργανισμό και αφορά κάποιο αντιγόνο που βρίσκεται στην επιφάνεια του κυτταρικού τοιχώματος ή της κυτταρικής μεμβράνης του μικροοργανισμού. Η μέθοδος IMS μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση των μικροοργανισμών από ένα δείγμα όπως είναι ένα τρόφιμο (Karpegud et al., 1993).

Η μέθοδος αυτή παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα. Αρχικά, τα μικροβιακά κύτταρα παραμένουν άθικτα. Αυτό είναι απαραίτητο για μία σωστή μικροβιολογική ανάλυση διότι μπορούν να πολλαπλασιαστούν σε ένα κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα βακτήρια στόχοι απομονώνονται με αυτόν το τρόπο από το αρχικό περιβάλλον (τρόφιμο) και μεταφέρονται από έναν αρχικό μεγάλο όγκο διαλύματος (συνήθως 250 ml) σε ένα μικρότερο, κατάλληλο για ανίχνευση όγκο (Pyle et al., 1999). Όπως φαίνεται στην εικόνα 10 περισσότερες από μία παραμαγνητικές χάντρες προσκολλούνται στην επιφάνεια του *E. coli* εξαιτίας του μικρού τους μεγέθους σε σχέση με το μικροβιακό κύτταρο, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την ευαισθησία της μεθόδου.



**Εικόνα 10.** Βακτήριο το οποίο είναι επικαλυμμένο με παραμαγνητικές χάντρες. Το βακτήριο είναι πολύ μεγαλύτερο σε μέγεθος από ότι οι χάντρες έτσι ώστε πάνω στην επιφάνεια του να μπορούν να προσκολληθούν παραπάνω από μία χάντρες. Με αυτό το τρόπο αυξάνεται η ευαισθησία της μεθόδου (Pyle et al., 1999)

Παράλληλα στο τρόφιμο είναι πιθανό να υπάρχουν κάποιες ουσίες οι οποίες θα εμποδίζουν τη μικροβιακή ανάπτυξη. Με την τεχνική αυτή αφαιρούνται οι περιοριστικοί αυτοί παράγοντες. Το κλασσικό στάδιο της επώασης πέραν του γενικού θρεπτικού υποστρώματος μπορεί να περιλαμβάνει και έναν εμπλουτισμό χρησιμοποιώντας ειδικό για τον εκάστοτε μικροοργανισμό υπόστρωμα. Τέτοια εκλεκτικά υποστρώματα πολύ συχνά επιτρέπουν την ανάπτυξη μη παθογόνων βακτηρίων τα οποία όμως ανήκουν στο ίδιο είδος των παθογόνων



βακτηρίων που θέλουμε να ανιχνεύσουμε. Για παράδειγμα η καλλιέργεια δειγμάτων που προέρχονται από τρόφιμα σε εκλεκτικό υπόστρωμα για εντεροπαθογόνα του γένους *E. coli* ευνοεί την ανάπτυξη των φυσικών μη παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων του ίδιου γένους. Έτσι είναι πολύ πιθανό να μην αναπτυχθεί και έτσι να μην ανιχνευθεί το εντεροπαθογόνο βακτήριο. Με την IMS το πρόβλημα αυτό εξαλείφεται διότι με την επιλογή κατάλληλων επιτόπων που βρίσκονται στην επιφάνεια μόνο των παθογόνων για τον άνθρωπο βακτηρίων μπορούμε να απομονώσουμε μόνο αυτά τα βακτήρια (Pyle et al., 1999).

Η μεταφορά των βακτηρίων με την IMS σε έναν όγκο που κυμαίνεται από 1-20 μl και η ταυτόχρονη αφαίρεση των περιοριστικών παραγόντων της Taq πολυμεράσης αυξάνει την ευαισθησία και επαναληψιμότητα της μεθόδου. Με τη μέθοδο IMS μπορούμε να ανιχνεύσουμε μέχρι και 1 μικροβιακό κύτταρο / 25 g τροφίμου ή 100 μικροβιακά κύτταρα / ml τροφίμου. Πλέον των άλλων η IMS επιτρέπει την ευκολότερη τυποποίηση της μεθόδου. Όταν το στάδιο του ανοσομαγνητικού διαχωρισμού γίνεται χωρίς την βοήθεια μηχανημάτων, χρησιμοποιούμε έναν σταθερό επιτραπέζιο μαγνήτη για τον διαχωρισμό των φάσεων.

Για την ανίχνευση του εντεροπαθογόνου *E. coli* O157:H7 οι Pyle et al. (1999) χρησιμοποίησαν παραμαγνητικές χάντρες διαμέτρου 0,6 μm επικαλυμμένες με το ειδικό αντίσωμα. Έγινε επώαση με 0,01 ml του διαλύματος με τις ανοσοποιημένες παραμαγνητικές χάντρες για κάθε ml δείγματος για 1 h σε 60 rpm. Για την ανίχνευση του ίδιου εντεροπαθογόνου μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε 1 ml δείγματος και όλα τα απαραίτητα συστατικά για την IMS στον ίδιο δοκιμαστικό σωλήνα (Yu and Bruno, 1995). Σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα προστίθεται 1 ml δείγμα, 100 ng από το αντίσωμα (διάλυμα αντισώματος με PBS-Phosphate Buffer Solution) και παραμαγνητικές χάντρες διαλυμένες σε PBS. Μετά από επώαση 15 min μπορούμε να συγκεντρώσουμε τις χάντρες με έναν επιτραπέζιο μαγνήτη (Yu and Bruno, 1995).

Για την ανίχνευση του παθογόνου *C. enteritis* χρησιμοποιήθηκε ένα ειδικό αντίσωμα της ομάδας IgG. Η IMS σε αυτή τη περίπτωση έγινε ως εξής : Το αντίσωμα προστέθηκε στο δείγμα ώστε να γίνει η αντίδραση μεταξύ αντιγόνου και αντισώματος (επώαση για 30 min με συνεχόμενη ανακίνηση). Έπειτα προστέθηκαν παραμαγνητικές χάντρες επικαλυμμένες με έναν ειδικό αντιορό ώστε να δεσμεύσουν το σύμπλοκο αντιγόνου-αντισώματος. Οι χάντρες συγκεντρώθηκαν με έναν μαγνήτη και ξεπλύθηκαν με TBS-Tween (Waller and Ogata, 2000).

Οι Fluit et al. το 1993 ανέπτυξαν μία μέθοδο με IMS για την ανίχνευση σαλμονέλας στα πουλερικά. Χάντρες CrO<sub>2</sub> καλυμμένες με ειδικό αντίσωμα για την σαλμονέλα έδωσαν καλύτερο αποτέλεσμα όταν χρησιμοποιήθηκαν 2 ml δείγματος και 5 μl από τις ανοσοποιημένες χάντρες.

## 2.5. Ηλεκτροφόρηση

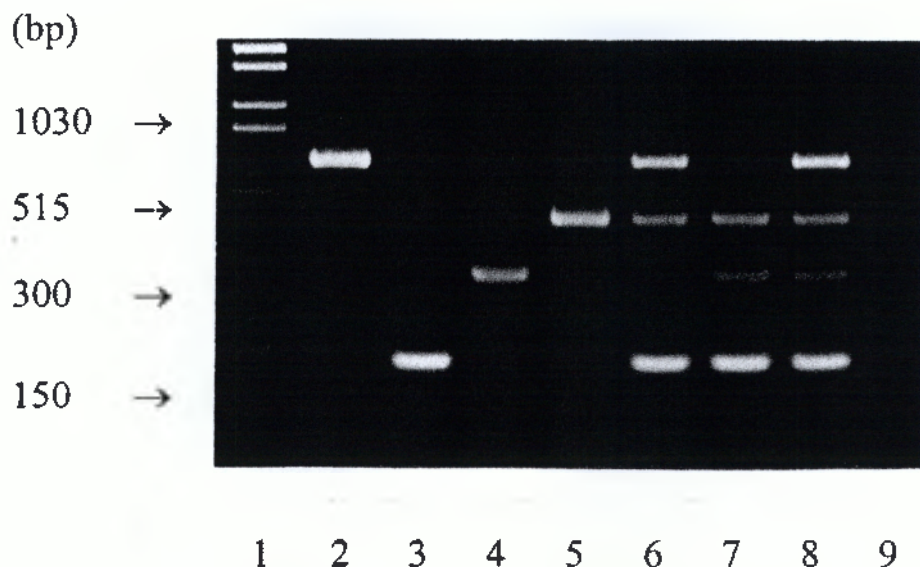
Η πρώτη μοριακή μέθοδος που μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε για την ανίχνευση ενός μικροοργανισμού είναι η ανίχνευση ενός τμήματος DNA με τη βοήθεια πηκτής. Το τμήμα του DNA το έχουμε παραλάβει από την προετοιμασία του δείγματος και το έχουμε συνήθως ενισχύσει με την PCR. Σκοπός είναι να μπορέσουμε να ανιχνεύσουμε το ενισχυμένο τμήμα του DNA.

Πριν την ηλεκτροφόρηση του DNA μπορούμε να το επεξεργαστούμε με διάφορα ένζυμα περιορισμού. Με αυτό το τρόπο μπορούμε να πάρουμε μικρότερα τμήματα του DNA και ταυτόχρονα να βρούμε διαφορές ακόμα και στα βακτήρια του ίδιου είδους.

Ο διαχωρισμός των τμημάτων DNA σε πηκτή εξαρτάται από το μέγεθος του τμήματος του DNA και από το συνολικό φορτίο του. Έτσι μπορούμε να διαχωρίσουμε μόρια DNA με διαφορετικό μοριακό βάρος και μόρια DNA με το ίδιο μοριακό βάρος αλλά με διαφορετική αλληλουχία. Η πηκτή πολυακρυλαμιδίου χρησιμοποιείται για των διαχωρισμό τμημάτων που αποτελούνται από περίπου 1000 βάσεις, ενώ η πηκτή αγαρόζης που είναι περισσότερο πορώδης χρησιμοποιείται για κλάσματα DNA με πολλές βάσεις (έως 20 kb).

Η πηκτές που χρησιμοποιούμε για την ηλεκτροφόρηση μπορούν να διαχωρίσουν τα κλάσματα του DNA με βάση το μέγεθός τους. Τα βακτήρια που ανήκουν στο γένος *Listeria* μπορούν να διαχωριστούν και να ανιχνευθούν με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης (Cocolin et al., 2002). Σε αυτή τη περίπτωση με ενίσχυση του γονιδίου *iap* παίρνουμε ένα προϊόν PCR που ανάλογα με το είδος *Listeria* παίρνουμε διαφορετικά αποτελέσματα στην ηλεκτροφόρηση. Τα *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, και *L. welsimeri* έδωσαν ένα προϊόν PCR μεγέθους 600-610 bp ενώ τα *L. monocytogenes* και *L. innocua* έδωσαν ένα προϊόν PCR 457 και 472 bp αντίστοιχα. Για την ανίχνευση του *L. monocytogenes* σε τυρί παίρνουμε ένα προϊόν PCR, από το γονίδιο που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της πρωτεΐνης Λιστεριοσίνης O, μεγέθους 521 bp. Κανένα άλλο είδος *Listeria* δεν δίνει αυτό το προϊόν PCR ενώ μπορούμε να ανιχνεύσουμε 1 CFU *L. monocytogenes* σε κάθε γραμμάριο τυριού (Fluit et al., 1993).

Για την ανίχνευση του *C. butulinum* εφαρμόστηκε η ηλεκτροφόρηση με μεγάλη επιτυχία. Σε 36 δείγματα σάλτσας που περιείχαν 4 τύπους του βακτηρίου (A, B, E και F) εφαρμόζοντας multiplex PCR και ανιχνεύοντας τα τμήματα DNA σε πηκτή αγαρόζης τα αποτελέσματα εμφανίστηκαν με πολύ μεγάλη ευκρίνεια (Lindstrom et al., 2001) (εικόνα 11).



**Εικόνα 11.** Τα αποτελέσματα από ανάλυση προϊόντων PCR σε πηκτή αγαρόζης. Στην εικόνα φαίνονται τα εξής : Θέσεις: 1. Τυποποιημένα τμήματα DNA γνωστού μοριακού βάρους, 2. *C. botulinum* τύπος A, 3. *C. botulinum* τύπος B, 4. *C. botulinum* τύπος E, 5. *C. botulinum* τύπος F, 6. πρωτεολυτικό *C. botulinum* τύπος A, B, και F, 7. μη πρωτεολυτικό *C. botulinum* τύπος B, E, και F, 8. *C. botulinum* τύπος A, B, E, and F και 9. αρνητικό δείγμα (Lindstrom et al., 2001).

Για την ανίχνευση της σαλμονέλας σε μη λιπαρά τρόφιμα μπορούμε να εφαρμόσουμε PCR και να ανιχνεύσουμε τα προϊόντα της με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης. Σε 1 % πηκτής αγαρόζης τοποθετούμε τα προϊόντα PCR και εφαρμόζουμε τάση 100 V για 1 h (Jenikova et al., 2000).

Οι Guo et al. (2000) για την ανίχνευση του *S. enteridis* σε τομάτες αναλύσανε τα προϊόντα κατάλληλης αντίδρασης PCR σε 1 % πηκτής πολυακρυλαμίδης. Η ικανότητα ανίχνευσης ήταν αρκετά υψηλή, φτάνοντας τα  $10^0$  CFU/ml όταν προηγήθηκε και μία επώαση του δείγματος για 9 h.

Βασικό μειονέκτημα της ανίχνευσης των προϊόντων PCR με τη βοήθεια πηκτής αγαρόζης είναι ότι ο χρωματισμός των τμημάτων DNA γίνεται με βρωμιούχο αιθίδιο, υλικό εξαιρετικά τοξικό και επικίνδυνο στη χρήση. Αυτό το μειονέκτημα όμως μπορεί να ξεπεραστεί κάνοντας χρήση άλλων υλικών όπως είναι το SYBR Green. Όπως είδαμε και παραπάνω το SYBR Green φθορίζει όταν ενώνεται με δίκλωνο DNA. Το DNA που βρίσκεται στην πηκτή είναι δίκλωνο και επομένως με το SYBR green μπορούμε εύκολα να το ανιχνεύσουμε.

## 2.6. Υβριδισμός

Η αναγνώριση μικροοργανισμών σε τρόφιμα ή άλλα δείγματα μπορεί να γίνει με τη χρησιμοποίηση ειδικών ανιχνευτών νουκλεϊκών οξέων οι οποίοι προέρχονται είτε από κλωνοποίηση ενός συγκεκριμένου τμήματος DNA είτε αποτελούν προϊόντα χημικής σύνθεσης. Η αναγνώριση είναι αποτέλεσμα της στενής σχέσης που υπάρχει μεταξύ της αλληλουχίας των βάσεων του ανιχνευτή και μιας αλληλουχίας του αντίστοιχου γονιδίου του υπό ανίχνευση μικροοργανισμού (Vossen and Hofstra, 1996).

Ο υβριδισμός νουκλεϊκών οξέων είναι αποτέλεσμα της ιδιότητας των μορίων αυτών να σχηματίζουν, σε κατάλληλες συνθήκες, δίκλωνες δομές που συγκρατούνται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου. Οι δίκλωνες περιοχές σχηματίζονται μόνο εκεί που υπάρχει συμπληρωματικότητα στην αλληλουχία των βάσεων, όταν δηλαδή οι περιοχές αυτές είναι ομόλογες. Όταν η δίκλωνη περιοχή μετουσιωθεί, δηλαδή όταν οι δεσμοί υδρογόνου εξουδετερωθούν με θέρμανση ή με κατεργασία με άλκαλι, τότε προστίθεται ένας σημασμένος ανιχνευτής. Με επαναφορά των συνθηκών (ψύξη ή εξουδετέρωση) ο ανιχνευτής θα συνδεθεί με την ομόλογη περιοχή του DNA στόχου και φυσικά μόνο εφόσον υπάρχει μία τέτοια περιοχή. Η εξειδίκευση της αντίδρασης δεν εξαρτάται μόνο από το βαθμό συμπληρωματικότητας μεταξύ DNA στόχου και ανιχνευτή αλλά και από τις συνθήκες (pH, θερμοκρασία, ιοντική ισχύ, συγκέντρωση του ανιχνευτή κλπ) (Southern, 1975).

Η βασική προϋπόθεση για να χαρακτηριστεί ένα oligονουκλεοτίδιο ως ανιχνευτής είναι ότι πρέπει να διαθέτει συμπληρωματικότητα με το μόριο στόχο και κατά συνέπεια να υβριδίζεται με αυτό. Ο ανιχνευτής δεν πρέπει να υβριδίζεται με τα άλλα μόρια νουκλεϊκών οξέων που πιθανώς να υπάρχουν στο δείγμα (Fach et al., 1995). Εξ' ορισμού όλοι οι οργανισμοί έχουν μία μοναδική αλληλουχία βάσεων, γεγονός που τα διακρίνει ακόμα και από τον



εξελικτικά συγγενέστερο του οργανισμού. Οι μοναδικές αυτές αλληλουχίες αποτελούν τον οδηγό για την κατασκευή αποτελεσματικών ανιχνευτών. Η συνηθέστερη πρακτική που ακολουθείται για την επιλογή της αλληλουχίας πάνω στην οποία θα δομηθεί ο ανιχνευτής συμπεριλαμβάνει την επιλογή μίας συγκεκριμένης ιδιότητας που αποτελεί χαρακτηριστικό και μοναδικό γνώρισμα για το μικροοργανισμό στόχο, κλωνοποίηση του γονιδίου που είναι υπεύθυνο για την ιδιότητα αυτή και χρησιμοποίηση ενός μικρού μέρους της αλληλουχίας του κλωνοποιημένου γονιδίου ως ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής δεν είναι απαραίτητο να αποτελείται από μία μόνο αλληλουχία του γονιδίου στόχου. Ο ανιχνευτής που αποτελείται από πολλά ολιγονουκλεοτίδια, το καθένα από αυτά ταιριάζει σε διαφορετική αλληλουχία του γονιδίου στόχου προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα μεταξύ των οποίων τα πιο σημαντικά είναι η ευκολία σύνδεσης με το στόχο και το βραχύ χρονικό διάστημα που απαιτείται για την συμπλήρωση του υβριδισμού (Fach et al., 1995). Επιπρόσθετα, ο μικρού μεγέθους ανιχνευτής παρουσιάζει το πλεονέκτημα της μεγάλης ευαισθησίας της μεθόδου μια και γίνεται δυνατός ο εντοπισμός ακόμα και ελαχίστων διαφορών στην αλληλουχία των βάσεων ενός στόχου. Το σοβαρότερο πρόβλημα με τους ανιχνευτές μικρού μεγέθους είναι η σήμανση τους, που εξαιτίας του μικρού μεγέθους τους είναι περισσότερο δύσκολο να γίνει (Lees et al., 1995).

Η σήμανση του ανιχνευτή είναι αποτέλεσμα της άμεσης ή έμμεσης σύνδεσής του με ένα μόριο που είναι φορέας ενός σήματος. Το μόριο αυτό μπορεί να είναι ένα ραδιενεργό στοιχείο, μία χημική ένωση που παράγει φως (φλουοροσκοκίνη) ή ένα ειδικό ένζυμο που όταν αντιδράσει με ένα υπόστρωμα να παράγει φως. Το σήμα που εκπέμπουν τα μόρια είναι πολύ εύκολο να ανιχνευτεί και να αξιολογηθεί. Η άμεση σύνδεση προϋποθέτει ομοιοπολική σύνδεση των δύο μορίων ενώ στην έμμεση σύνδεση παρεμβάλλεται μεταξύ του ολιγονουκλεοτιδίου και του φορέα σήματος ένα άλλο μόριο (Fluit et al., 1993).

Η διαδικασία του υβριδισμού εκτελείται με 3 τρόπους : *in situ*, σε διάλυμα ή με σύνδεση του σε στερεό υπόστρωμα. Ο υβριδισμός *in situ* εφαρμόζεται μέχρι σήμερα για τον ακριβή προσδιορισμό της θέσης συγκεκριμένων αλληλουχιών νουκλεϊκών οξέων σε μονιμοποιημένους μικροοργανισμούς και δεν παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον σε ένα εργαστήριο ποιοτικού ελέγχου τροφίμων.

Ο υβριδισμός σε διάλυμα υπερτερεί των άλλων μεθόδων σε ό,τι αφορά την ταχύτητα της αντίδρασης, αφού τα δύο μόρια (στόχος και ανιχνευτής ) βρίσκονται σε διαρκή κίνηση μέσα στο



διάλυμα και επομένως μεγιστοποιείται η πιθανότητα συνάντησής τους που θα έχει ως αποτέλεσμα τη σύνδεσή τους, εφόσον φυσικά υπάρχουν συμπληρωματικές αλληλουχίες.

Ο υβριδισμός σε στερεό υπόστρωμα εφαρμόζεται ευρύτατα και προϋποθέτει σύνδεση του DNA σε μία μεμβράνη που συνήθως είναι από νιτροκυτταρίνη, συνθετικό νάylon ή από συνδυασμό και των δύο υλικών.

Από το 1975, ο υβριδισμός σε στερεό υπόστρωμα αποτελεί το βασικό μέρος της μεθόδου που είναι γνωστή ως Southern blotting ή αποτύπωση κατά Southern γιατί καθιερώθηκε από τον E.M.Southern.

Η τεχνική αυτή περιλαμβάνει κατεργασία του DNA με περιοριστικές ενδονουκλεάσες, διαχωρισμός των κλασμάτων που προκύπτουν σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδης, μεταφορά και σύνδεσή τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης και υβριδοποίηση και ανίχνευση με την χρήση ειδικών ανιχνευτών (DNA Probes).

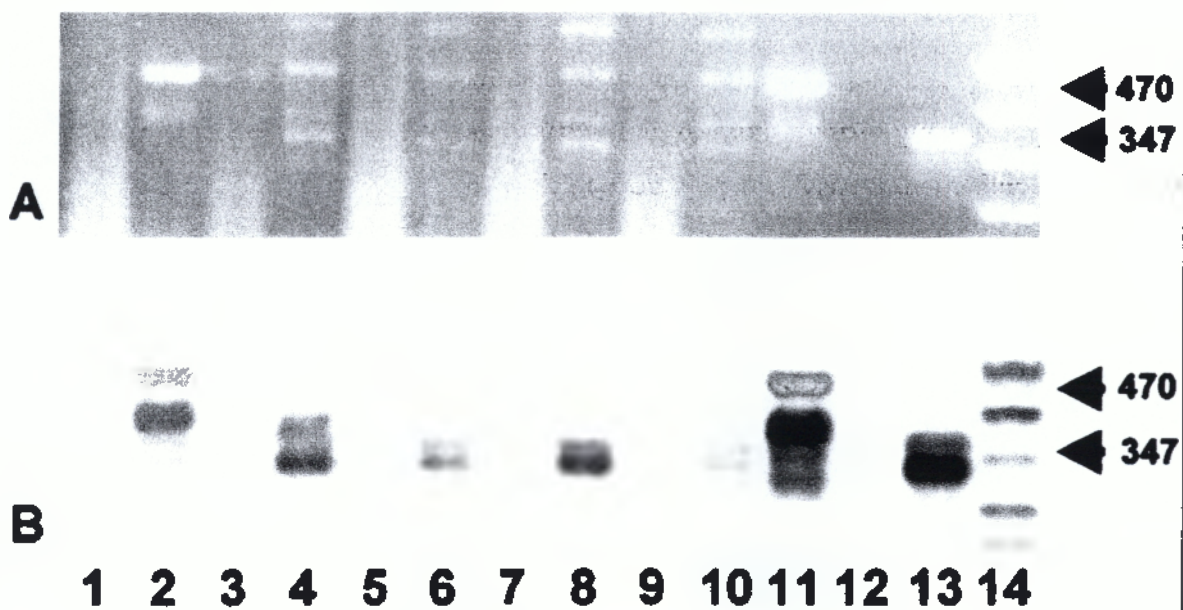
Αναλυτικότερα, το προς εξέταση δείγμα που είναι συνήθως καθαρό DNA, κατεργάζεται με περιοριστικές ενδονουκλεάσες. Έτσι προκύπτουν διάφορα κλάσματα DNA. Τα κλάσματα αυτά είναι σε αριθμό και σε μέγεθος χαρακτηριστικά του DNA από το οποίο προέρχονται και αποτελούν ένα γενετικό αποτύπωμα του οργανισμού από το οποίο λαμβάνεται το DNA. Μετά την ηλεκτροφόρηση του DNA και τον διαχωρισμό των κλασμάτων του ακολουθεί η μεταφορά τους σε μεμβράνες νιτροκυτταρίνης. Η πηκτή τοποθετείται πάνω σε πολλά φύλλα διηθητικού χάρτου και πάνω από αυτή, σε άμεση επαφή, τοποθετείται η μεμβράνη. Πάνω από τη μεμβράνη τοποθετούνται πολλά φύλλα διηθητικού χάρτου και τέλος τοποθετείται βάρος για την απαραίτητη πίεση. Η μεταφορά των κλασμάτων από την πηκτή στην μεμβράνη γίνεται με αλκαλικό διάλυμα οπότε και πραγματοποιείται η μετουσίωση του DNA κατά τη μεταφορά. Τέλος γίνεται επώαση της μεμβράνης με τον σημασμένο ανιχνευτή και αφού ξεπλύνουμε, για την απομάκρυνση της περίσσειας του ανιχνευτή και στεγνώσουμε τη μεμβράνη, γίνεται η μέτρηση και η αξιολόγηση του σήματος (Southern, 1975). Εικόνα

Η μεταφορά του DNA σε μεμβράνες μπορεί να γίνει ταχύτερη αν εφαρμόσουμε και μία ηλεκτροστατική ώθηση. Σε αυτή την περίπτωση όμως πρέπει να προσέξουμε ιδιαίτερα την αύξηση της θερμοκρασίας, άμεση συνέπεια της χρήσης ηλεκτροστατικού πεδίου.

Η ανίχνευση των προϊόντων PCR με υβριδισμό έχει εφαρμοστεί με μεγάλη επιτυχία για την ανίχνευση των NLV ιών. Κάνοντας χρήση των ανιχνευτών 1, 59-TATGTGCCCTGTCAGAAGT, 2, 59-TATCACCTGATGTTATACAATCC, 3, 59-

GTCCCCTGACATCATAACAGGCT, και 4, 59-ATCCCCTGACATCGTCCAGGCT ανιχνεύτηκαν προϊόντα που προέκυψαν από την RT-PCR τα οποία δεν ήταν ορατά στην πηκτή (Lees et al., 1995). Συγκεκριμένα, η πηκτή βυθίστηκε σε διάλυμα που περιείχε 0,5 M NaOH και 1,5 M NaCl για 30 min και έπειτα σε διάλυμα που περιείχε 3 M NaCl και 0,5 M Tris-HCl για άλλα 30 min. Τα προϊόντα της PCR μεταφέρθηκαν σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη με την προαναφερθείσα μέθοδο και σταθεροποιήθηκαν σε αυτή μέσω θέρμανσης στους 120 °C για 20 min. Ο υβριδισμός πραγματοποιήθηκε στους 40 °C για 12 h (Lees et al., 1995).

Για την ανίχνευση των ίδιων ιών μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε διαφορετικούς ανιχνευτές. Οι ανιχνευτές NVp69 και HAVp8 σημάνθηκαν στο 5' άκρο τους με διγοξιγενίνη. Τα προϊόντα της RT-PCR μεταφέρθηκαν σε θετικά φορτισμένη μεμβράνη με τη βοήθεια θερμού αέρα για 2 h και σταθεροποιήθηκαν πάνω σε αυτή με χρήση UV ακτινοβολίας. Έπειτα αφού η μεμβράνη εμβαπτίστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα για 30 min στους 55 °C, έγινε η εφαρμογή του διαλύματος που περιείχε τους ανιχνευτές για 1 h στους 55 °C (Schawb et al., 2000) (εικόνα 12).



**Εικόνα 12.** Ανίχνευση προϊόντων RT-PCR για την ανίχνευση ιών τύπου NV. Οι θέσεις 1 και 9 είναι αρνητικά δείγματα, η γραμμή 11 είναι το θετικό δείγμα, η γραμμή 14 περιέχει πρότυπα τμήματα DNA γνωστού μεγέθους και οι υπόλοιπες γραμμές περιέχουν DNA που έχει προκύψει από PCR. Στο (A) παρουσιάζεται η εικόνα από χρώση της πηκτής με βρωμιούχο αιθίδιο. Στο (B) παρουσιάζεται η απεικόνιση της πηκτής (A) μετά από υβριδισμό (Schawb et al., 1999).

Για την ανίχνευση της *L. monocytogenes* μπορούμε να εφαρμόσουμε υβριδισμό κάνοντας χρήση ειδικών RNA probes (Blais et al., 1993). Με αυτή τη μέθοδο δεν είναι ανάγκη η σήμανση του RNA probe διότι το υβρίδιο RNA – DNA μπορεί να ανιχνευθεί με ένα ειδικό αντίσωμα. Επίσης με αυτή τη μέθοδο δεν είναι ανάγκη να διαχωριστούν τα τμήματα των προϊόντων PCR, η εφαρμογή της μεθόδου γίνεται κατευθείαν στην μεμβράνη. Τα προϊόντα PCR αφού θερμανθούν στους 100 °C για 10 min, μεταφέρονται (3 μl από το κάθε δείγμα) σε μεμβράνη. Το DNA σταθεροποιείται με τη βοήθεια αέρα και UV ακτινοβολίας. Έπειτα αφού η μεμβράνη πλυθεί με διάλυμα που περιέχει και πρωτεάσες, επωάζεται με διάλυμα που περιέχει τον RNA ανιχνευτή για 1 h. Έπειτα ακολουθεί πλύσιμο της μεμβράνης με PBS Tween και εμβαπτίζουμε την μεμβράνη σε διάλυμα που περιέχει το ειδικό αντίσωμα για το υβρίδιο RNA – DNA, για 30 min. Έπειτα η μεμβράνη αφού πλυθεί με PBS Tween εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει αντι –αντίσωμα του υβριδίου RNA-DNA και χρωματίζεται με peroxidase conjugate (Blais et al, 1993).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3. ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

### 3.1. Εισαγωγή

Οι ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών είναι αναγκαίες πλέον σε κάθε βιομηχανία τροφίμων που τηρεί ένα σύστημα διασφάλισης υγιεινής όπως είναι το HACCP (Hazard Analysis of Critical Control Point) (Cutter and Siragusa, 1996). Σπουδαίο ρόλο στην βιομηχανία τροφίμων παίζει η διαδικασία της απολύμανσης των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα. Η ενδεδειγμένη καθαριότητα αυτών των επιφανειών είναι βασική προϋπόθεση για την παραγωγή τροφίμων υψηλής ποιότητας και υγιεινής.

Με το καθαρισμό των επιφανειών επιδιώκεται αφενός μεν η αφαίρεση των υπολειμμάτων τροφίμων από την προηγούμενη παρτίδα επεξεργασίας, αφετέρου δε η απολύμανση, δηλαδή απομάκρυνση του μικροβιακού πληθυσμού που πιθανώς βρίσκεται στις επιφάνειες.

Στις σύγχρονες βιομηχανίες όπου εφαρμόζεται ένα σύστημα υγιεινής όπως είναι το HACCP είναι απαραίτητο να αξιολογηθεί η αποτελεσματικότητα της διαδικασίας του καθαρισμού των επιφανειών, αφού ένα μη αποτελεσματικό πλύσιμο αποτελεί δυνητικό κίνδυνο (Dostalek and Branyik, 2005).

Οι μικροοργανισμοί που πιθανώς υπάρχουν στις επιφάνειες μπορούν να προκαλέσουν τροφολοιμώξεις ή τροφοτοξινώσεις, διότι έρχονται σε άμεση επαφή με το τρόφιμο το οποίο και επιμολύνουν. Επιπλέον, τα υπολείμματα τροφών είναι άριστες πηγές θρεπτικών συστατικών και μπορούν να ευνοήσουν την λογαριθμική αύξηση των μικροοργανισμών.

Οι κλασσικές μέθοδοι περιλαμβάνουν την άμεση λήψη δείγματος από την προς εξέταση επιφάνεια και τον εμβολιασμό του σε στερεοποιημένο θρεπτικό υλικό. Το θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι ένα εκλεκτικό ή μη υπόστρωμα. Σε κάθε περίπτωση θα πρέπει να περάσουν αρκετές μέρες για να έχουμε αποτελέσματα σχετικά με τη μικροβιακή κατάσταση της επιφάνειας. Αυτή η καθυστέρηση μπορεί να οδηγήσει σε ανάκληση του ήδη παραγόμενου τροφίμου και κατά συνέπεια να έχει μεγάλες οικονομικές συνέπειες ή να προκληθούν διάφορες λοιμώξεις και τροφοτοξινώσεις λόγω μη έγκαιρης ανάκλησης του προϊόντος (Roman, 2006).

Το ATP βρίσκεται σε όλα τα μικροβιακά κύτταρα αλλά και στα περισσότερα τρόφιμα. Έτσι χρήση της μεθόδου αυτής για την αξιολόγηση του καθαρισμού μπορεί να δώσει αποτελέσματα και ως προς το μικροβιακό φορτίο αλλά και ως προς την παρουσία υπολειμμάτων

πάνω στις επιφάνειες. Η μέθοδος της φωτομετρίας μέσω ATP είναι ευρέως διαδεδομένη στις βιομηχανίες ως δείκτης μετρήσεως της αποτελεσματικότητας των διαδικασιών καθαρισμού του εξοπλισμού (Russell, 1995). Στις φωτομετρικές μεθόδους ανίχνευσης μικροοργανισμών μπορούμε να ξεχωρίσουμε 2 βασικές κατηγορίες: τις μεθόδους εκείνες που μετράμε την ποσότητα του υπάρχοντος ATP φωτομετρικά και τις μεθόδους που βασίζονται στον βιοφθορισμό των μικροβιακών κυττάρων (Fung, 2002). Ανάλογα με τα πρωτόκολλα που εφαρμόζουμε ακόμα και η μέτρηση της ολικής μεσόφιλης χλωρίδας είναι δυνατή κάνοντας χρήση των φωτομετρικών μεθόδων μέσω ATP (Dostalek and Branyik, 2005). Οι φωτομετρικές μέθοδοι που βασίζονται στο βιοφθορισμό των μικροβιακών κυττάρων γίνονται πλέον προσιτές αν αυτές συνδιαστούν με άλλες μεθόδους όπως με την IMS (Dostalek and Branyik, 2005).

### 3.2. Φωτομετρικός προσδιορισμός του ATP

Το ATP παράγεται σε όλα τα ζωντανά κύτταρα και η εσωκυττάρια συγκέντρωσή του αυξομειώνεται ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης των μικροβιακών κυττάρων (Dostalek and Branyik, 2005). Στα νεκρά κύτταρα το ATP καταστρέφεται μέσα σε λίγα λεπτά από την στιγμή της αυτόλυσής τους. Εξαιτίας της γραμμικής σχέσης που υπάρχει μεταξύ ποσότητας ATP και μικροβιακών κυττάρων μπορούμε να μετρήσουμε τη βιομάζα εύκολα μετρώντας το ATP φωτομετρικά (Dostalek and Branyik, 2005).

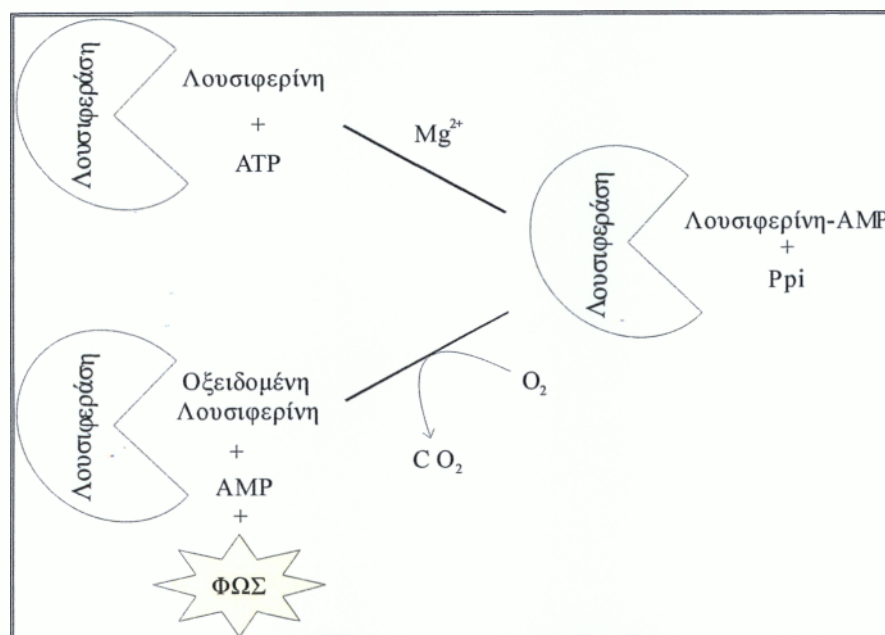
Η μέθοδος της φωτομετρίας του ATP στηρίζεται σε ένα βιολογικό φαινόμενο, που συναντάται στην πυγολαμπίδα (*Photinus pyralis*), ένα έντομο που είναι ικανό να παράγει φως. Η αντίδραση καταλύεται από ένα ένζυμο κλειδί, τη λουσιφεράση. Η λουσιφεράση χρησιμοποιεί το ATP για την οξείδωση της λουσιφερίνης, που αποτελεί το υπόστρωμα του ενζύμου, με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός (Leach and Webster, 1986) (Εικόνα 13).

Η παραγωγή φωτός από το ATP, όπως και κάθε άλλη ενζυμική αντίδραση, έχει συγκεκριμένες βέλτιστες συνθήκες στις οποίες πραγματοποιείται κατά το μέγιστο. Αυτές περιλαμβάνουν τιμή pH 7,75 και θερμοκρασία 20-22 °C.

Στην πράξη υπάρχουν πολλοί παράγοντες που επηρεάζουν την παραπάνω ενζυμική αντίδραση, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ποσότητα του φωτός που παράγεται. Τέτοιοι παράγοντες είναι η μεταβολή του pH και της θερμοκρασίας, τα μεταλλικά ιόντα κ.ά. που μπορεί να μειώσουν την αξιοπιστία του αποτελέσματος όταν για παράδειγμα ελέγχεται η καθαρότητα των επιφανειών σε βιομηχανίες παραγωγής τροφίμων. Υπάρχουν διάφορα πρωτόκολλα



εφαρμογής αυτής της μεθοδολογίας για κάθε είδος τροφίμου ώστε να αποφύγουμε την αρνητική δράση αυτών των παραγόντων (Leach and Webster, 1986).



Εικόνα 13. Σχηματική παρουσίαση της φωτοχημικής αντίδρασης του ATP με την λουσιφερίνη.

Ένας παράγοντας που κάνει τη χρήση της φωτομετρίας ολοένα πιο διαδεδομένη είναι η ταχύτητα που διεξάγεται η μέθοδος. Τα αποτελέσματα μπορεί να είναι διαθέσιμα τις περισσότερες φορές μέσα σε λίγα λεπτά. Παράλληλα η μέθοδος παρουσιάζει καλή σχετικότητα (έως 80%) με τις κλασσικές μεθόδους (Poulis et al., 1993).

Κατά τη διάρκεια μίας έρευνας που πραγματοποίησε ο Reinemann (2000), εξοπλισμός επεξεργασίας γάλακτος εμβολιάσθηκε με το βακτήριο *Lactobacillus brevis* και γάλα και ακολούθησε διαδικασία καθαρισμού του με νερό και απορρυπαντικά. Έπειτα έγινε δειγματοληψία με ειδικό στυλέο για μέτρηση του ATP φωτομετρικά και με άλλο στυλέο για την κλασσική μέθοδο καταμέτρησης της μικροβιακής χλωρίδας. Για τη μέτρηση του ATP έγινε χρήση του LUMAC<sup>R</sup> Hygiene Monitoring Kit. Η επιφάνεια δειγματοληψίας ήταν 10 cm<sup>2</sup>. Υπήρχε 70% γραμμική σχέση μεταξύ των μονάδων παραγωγής φωτός (Relative Light Units, RLU) και βακτηριακών κυττάρων (CFU).

Χρησιμοποιώντας την ίδια μεθοδολογία (ATP) μπορούμε να αξιολογήσουμε τη μικροβιακή ποιότητα του γάλακτος. Αρχικά πρέπει να γίνει διαχωρισμός του μικροβιακού ATP από το ATP που υπάρχει στα σωματικά κύτταρα που περιέχονται στο γάλα. Η διαδικασία αυτή

απαιτεί συγκεκριμένους χειρισμούς προετοιμασίας του δείγματος όπως φυγοκέντριση, εκχύλιση με μη ιονικούς διαλύτες και διήθηση (Vasavada, 1993). Η εκχύλιση με μη ιονικούς διαλύτες έχει χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση μικροβιακών κυττάρων μετρώντας το ATP σε γάλα (Webster et al., 1988). Το μεγαλύτερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή ευαισθησία της διότι μπορεί να δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα μόνο σε συγκεντρώσεις υψηλότερες από  $10^4$  CFU/ml (Vasavada, 1993).

Η φωτομετρική ανίχνευση του ATP μπορεί να δώσει πολύ γρήγορα αποτελέσματα σε περιπτώσεις όπου η υγιεινή και ο υψηλός δείκτης στειρότητας του περιβάλλοντος είναι ζωτικής σημασίας. Στο ISS (International Space Station) έγινε χρήση της μεθοδολογίας της φωτομετρικής ανίχνευσης του ATP για την ανίχνευση επιμολύνσεων στους χώρους του σταθμού (La Duc et al., 2004).

Η ανίχνευση μικροβιακών κυττάρων σε πλαστικές επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων για τον έλεγχο των διαδικασιών καθαρισμού και απολυμάνσεως μπορεί να γίνει με τη χρήση της μεθοδολογίας ATP (Leon and Albrecht, 2004). Δύο παρόμοιες μελέτες χρησιμοποίησαν την μεθοδολογία των Leon and Albrecht (2004) για τον έλεγχο των διαδικασιών καθαρισμού σε βιομηχανίες επεξεργασίας αυγών και τα αποτελέσματά τους δείχνουν ότι η φωτομετρική ανίχνευση του ATP δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα (Jones et al., 2003 ; Musgrove et al., 2004).

Ο καθαρισμός των επιφανειών σε εργοστάσιο επεξεργασίας τόνου ελέγχθηκε με την εφαρμογή της φωτομετρικής ανίχνευσης του ATP (Roman, 2006). Η διαδικασία περιλάμβανε τον έλεγχο μίας επιφάνειας λαμβάνοντας δείγμα από τρία διαφορετικά σημεία διαφορετικών διαστάσεων ( $2 \times 4$ ,  $4 \times 4$ ,  $6 \times 4$  cm<sup>2</sup>) και σε τρεις διαφορετικές χρονικές περιόδους (μετά την επεξεργασία τόνου, μετά το καθαρισμό και πριν την επεξεργασία τόνου). Τα αντιπροσωπευτικότερα αποτελέσματα έδωσε το δείγμα  $4 \times 4$  cm<sup>2</sup>. Μικρή σχέση μεταξύ της μεθοδολογίας ATP και των κλασικών μεθόδων υπήρχε κατά τη δειγματοληψία αμέσως μετά το καθαρισμό (Roman, 2006). Αυτή αποδόθηκε στο γεγονός ότι κατά τη διαδικασία καθαρισμού χρησιμοποιήθηκαν πολλά είδη απορρυπαντικών (ρουτίνα καθαρισμού) με πολλές διαφορετικές δραστικές ουσίες. Μελέτες έχουν δείξει ότι υπολλείματα απορρυπαντικών μπορούν να δράσουν περιοριστικά στη παραγωγή φωτός μέσω των αντιδράσεων λουσιφερίνης (Green et al., 1998 ; Velasquez and Feirtag, 1997). Ένας επιπλέον παράγοντας που μπορεί να δώσει εσφαλμένα αποτελέσματα με τη μέθοδο της φωτομετρίας του ATP σε επιφάνειες είναι η ύπαρξη νερού πάνω στις επιφάνειες. Το νερό μπορεί να περιέχει αρκετά μεγάλο μικροβιακό πλυθισμό και να

δώσει ψευδή αποτελέσματα σε σχέση με το μικροβιακό φορτίο που μπορεί να φέρει η επιφάνεια (Roman, 2006).

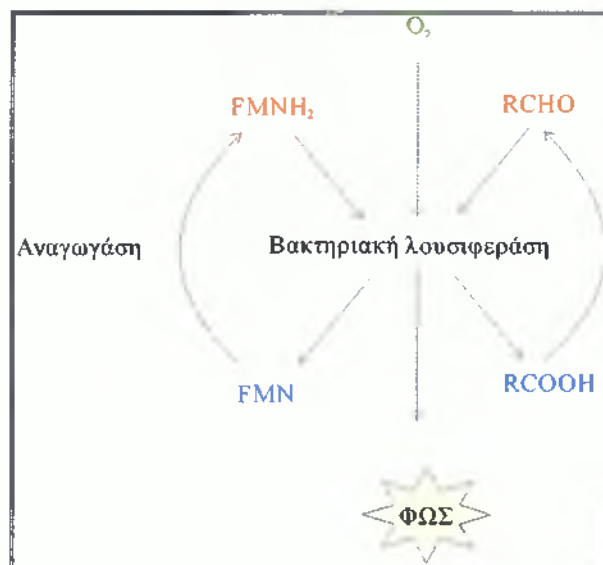
Η μεθοδολογία του ATP μπορεί να εφαρμοστεί επίσης για την ποιοτική κατάταξη του κρέατος (Dostalek and Branyik, 2005). Τα ίδια τα κύτταρα του κρέατος περιέχουν υψηλές συγκεντρώσεις ATP, επομένως η επιτυχία της μεθόδου ATP εξαρτάται από τον επιτυχή διαχωρισμό μικροβιακού ATP από αυτό του τροφίμου (Basol and Gogus, 1996).

Στα μη αλκοολούχα ποτά η ανίχνευση ζυμών και μυκήτων χρησιμοποιώντας τη μέθοδο της φωτομετρίας του ATP μπορεί να γίνει εύκολα με απλό φιλτράρισμα του δείγματος και με πολύ μικρό όριο ανίχνευσης 5 CFU/ml (Basol and Gogus, 1996). Στους χυμούς στους οποίους περιέχονται κύτταρα από τα φρούτα και που είναι πιο πολύπλοκα χημικά συστήματα είναι απαραίτητη η εκχύλιση του μικροβιακού ATP (Ugarova et al., 1993).

Στη ζυθοποιία χρησιμοποιείται ευρέως η μεθοδολογία της φωτομετρίας του ATP για την παρουσία ή απουσία ζυμών στο τελικό παραγόμενο εφάρμοζοντας το εμπορικό προϊόν με την επωνυμία Lumac Beer Microbial Kit (Odebrecht et al., 2000).

### **3.3. Βιοφθορισμός**

Τα βακτήρια που μπορούν να παράξουν φως ανήκουν κυρίως σε τέσσερα γένη : *Vibrio*, *Photobacterium*, *Alteromonas*, *Xenorhabdus*. Η φωτογόνος αντίδραση είναι ενζυματική και χρησιμοποιεί τη λουσιφεράση, την οξειδωση μίας μεγαλομοριακής αλδεϋδης και την αναγωγή του FMNH για την παραγωγή ενός γαλαζοπράσινου φωτός (Baker et al., 1992). Η βακτηριακή λουσιφεράση χρησιμοποιεί το FMNH για την οξειδωση της αλδεϋδης με ταυτόχρονη παραγωγή φωτός (εικόνα 14).



Εικόνα 14. Σχηματική αναπαράσταση των αντιδράσεων του βιοφθορισμού με βακτηριακή λουσιφεράση

Όπως είναι αναμενόμενο, το χαρακτηριστικό αυτό ανάγεται στο γονιδίωμα των βακτηρίων. Υπάρχουν γονίδια στα οποία περιέχεται η πληροφορία για τη σύνθεση της βακτηριακής λουσιφεράσης καθώς και για τα άλλα ένζυμα που συμμετέχουν στην αντίδραση. Τα γονίδια αυτά έχουν βρεθεί και μελετηθεί, και χαρακτηρίστηκαν ως γονίδια *lux* (Steward, 1990).

Τα γονίδια *lux* μπορούν να εισαχθούν σε μικροβιακά κύτταρα που δεν διαθέτουν την ικανότητα του βιοφθορισμού, χρησιμοποιώντας βακτηριοφάγους. Οι φάγοι αυτοί μεταφέρουν τα *lux* γονίδια στα μικροβιακά κύτταρα προσδίδοντάς τους την ικανότητα βιοφθορισμού (Kodikara et al., 1991). Η παραγωγή φωτός μπορεί εύκολα να μετρηθεί με φωτόμετρα και η ανίχνευση μικροβιακού φορτίου είναι δυνατή σε λιγότερο από 1 h (Steward, 1990).

Η ανίχνευση συγκεκριμένων βακτηρίων μέσω του βιοφθορισμού είναι δυνατή λόγω της ύπαρξης εξειδικευμένων βακτηριοφάγων που προσβάλλουν συγκεκριμένα βακτήρια. Ο φάγος P22 προσβάλλει μονάχα το βακτήριο *Salmonella typhimurium* (Basol and Gogus, 1996). Όταν ο φάγος P22 που φέρει το γονίδιο *lux*, μετέφεται στο *S. typhimurium* η ικανότητα παραγωγής φωτός και η ανίχνευση του βακτηρίου γίνεται εφικτή σε λιγότερο από 1 h και με όριο ανίχνευσης τα 100 CFU/ml (Basol and Gogus, 1996).

Τα εντεροβακτήρια είναι μία ομάδα βακτηρίων που ενδιαφέρει την τεχνολογία τροφίμων και που μπορούν να ανιχνευθούν με τη μεθοδολογία του βιοφθορισμού. Σε φάγους που προσβάλλουν μονάχα τα εντεροβακτήρια εισήχθη το γονίδιο *lux*. Μετά από επώαση των

δειγμάτων για 4 h με τη μέθοδο του βιοφθορισμού έγινε καταμέτρηση των εντεροβακτηρίων έως και 10 CFU/ml (Kodikara et al. 1991, Baker et al. 1992)

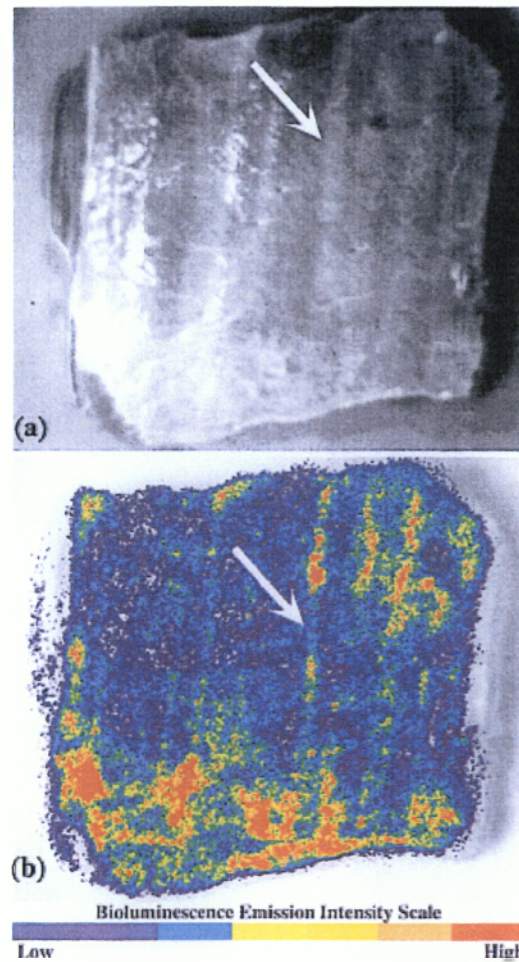
Ο βακτηριοφάγος A511 έχει σαν μοναδικό ξενιστή τα βακτήρια του γένους *Listeria*. (Loessner and Busse, 1990). Η προσθήκη του γονιδίου *lux* σε αυτό το βακτηριοφάγο καθιστά δυνατή την ταχεία ανίχνευση του βακτηρίου με τη μέθοδο του βιοφθορισμού (Loessner et al., 1996). Σε 348 δείγματα τροφίμων εντοπίστηκαν 55 δείγματα που ήταν επιμολυσμένα με λιστέρια ενώ με τις κλασσικές μεθόδους εντοπίστηκαν 57 δείγματα (Loessner et al., 1997). Θα πρέπει εδώ να επισημάνουμε ότι παρότι η μέθοδος του βιοφθορισμού χρειάζεται λιγότερο από 1 h για να διεξαχθεί, είναι απαραίτητο ένα στάδιο επώασης 24 h διότι χρειάζονται το λιγότερο 10 μικροβιακά κύτταρα για την παραγωγή ανιχνεύσιμου φωτός (Loessner et al., 1997).

Μία εφαρμογή της μεθόδου του βιοφθορισμού δεν αφορά την ανίχνευση συγκεκριμένων μικροοργανισμών αλλά τον έλεγχο των ζυμώσεων και άλλων διαδικασιών που χρησιμοποιούν μικροοργανισμούς για να πραγματοποιηθούν. Στη βιομηχανία του γάλακτος χρησιμοποιούνται μικροοργανισμοί για την παραγωγή διάφορων προϊόντων όπως είναι το γιαούρτι και το τυρί. Τα προϊόντα αυτά είναι αποτέλεσμα των ζυμώσεων που πραγματοποιούνται με τη βοήθεια των μικροοργανισμών. Στο γάλα μπορεί να υπάρχουν κατάλοιπα αντιβιοτικών και βακτηριοφάγοι που μπορούν να καταστρέψουν τα μικροβιακά κύτταρα και να εμποδίσουν την εξέλιξη της ζύμωσης (Basol and Gogus, 1996). Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε οξυγαλακτικά βακτήρια στα οποία έχουμε εισάγει το γονίδιο *lux* για να ελέγχουμε σε πραγματικό χρόνο την παρουσία τέτοιων περιοριστικών παραγόντων όπως είναι τα αντιβιοτικά και οι φάγοι. Χρησιμοποιώντας ένα ως προς το γονίδιο *lux* γενετικά τροποποιημένο στελέχος *Lactobacillus casei*, έγινε δυνατή η ανίχνευση πενικιλίνης G σε συγκέντρωση 0,03 µg/ml σε 30 min και η ανίχνευση βακτηριοφάγων σε 100 min λόγω της μείωσης της παραγωγής φωτός από τα γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *L. casei* (Baker et al., 1992).

Η μέθοδος του βιοφθορισμού μπορεί να βοηθήσει ακόμα και σε περιπτώσεις έρευνας και ανάπτυξης μίας βιομηχανίας τροφίμων. Γενετικά τροποποιημένα στελέχη του *E. coli* ως προς το γονίδιο *lux* χρησιμοποιήθηκαν για να γίνει κατανοητή η συγκέντρωση των βακτηρίων σε διαφορετικές περιοχές σε σφάγιο χοίρου (Siragusa and Cutter, 1995) (εικόνα 15). Τέτοιες έρευνες που διεξάγονται για τη μελέτη των μεθόδων καθαρισμού των επιφανειών που έρχονται σε επαφή με τα τρόφιμα, τη δραστηριότητα των απολλυμαντικών, των διαδικασιών απολυμάνσεων των τροφίμων χρησιμοποιούν τις κλασσικές μεθόδους που απαιτούν



δειγματοληψία από διαφορετικές επιφάνειες σε διαφορετικούς χρόνους (Siragusa et al., 1996). Η μέθοδος του βιοφθορισμού αν και δεν αντικαθιστά πλήρως τις κλασσικές μεθόδους μπορεί να δώσει πολύ καλά αποτελέσματα διότι μπορεί να εντοπίσει μέχρι και  $50 \text{ CFU/cm}^2$  (Siragusa and Cutter, 1995).



**Εικόνα 15.** Κομμάτι χοιρινού εμβολιασμένο με φωτογόνα στελέχη *E. coli*. (A) Σε κλίμακα του γκρι. (B) Με κάμερα υπερώθρων (Siragusa et al., 1996).

#### 4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Οι σύγχρονες ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών είναι ένας δυναμικός τομέας στην εφαρμοσμένη μικροβιολογία όπου ακόμα και σήμερα εξελίσσεται. Τα αποτελέσματα των ερευνών που έχουν γίνει μέχρι σήμερα μπορούν να δώσουν μία σαφή εικόνα για την αποτελεσματικότητα των μεθόδων αυτών σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους μικροβιολογίας που εφαρμόζονται μέχρι σήμερα.

Οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι παρόλο που έχουν μεγάλη διακριτική ικανότητα στην ταυτοποίηση των μικροοργανισμών χρειάζονται συνήθως ένα υψηλό μικροβιακό φορτίο ώστε τα αποτελέσματά τους να παρουσιάζουν υψηλή συσχέτιση με αυτά των κλασσικών μεθόδων. Παράλληλα οι μέθοδοι αυτοί τις περισσότερες φορές δίνουν ποιοτικά αποτελέσματα ως προς την παρουσία ή απουσία του μικροοργανισμού στόχου χωρίς να μπορούν να δώσουν αριθμητικά αποτελέσματα. Τις περισσότερες φορές για να αυξήσουμε την ευαισθησία της μεθόδου εφαρμόζουμε ένα στάδιο επώασης από 3 έως 12 ώρες αυξάνοντας το χρόνο ανάλυσης. Οι ανοσοβιολογικές μέθοδοι παρουσιάζουν το πλεονέκτημα του αυτοματισμού. Χάρη στη κατασκευή των μονοκλωνικών αντισωμάτων η τυποποίηση των ανοσοβιολογικών μεθόδων γίνεται πιο εύκολα και εδώ και αρκετά χρόνια κυκλοφορούν πολλά kits που βασίζονται στην μέθοδο ELISA.

Οι μοριακές μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών αποτελούν βασικό αντικείμενο έρευνας της εφαρμοσμένης μικροβιολογίας. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα των μεθόδων αυτών είναι η δύσκολη τυποποίησή τους και η έλλειψη αυτοματισμού. Αυτή η ιδιαιτερότητα οφείλεται στη διαφορετική σύσταση των τροφίμων, την ύπαρξη πολλών διαφορετικών εκκινήτων για τον ίδιο μικροοργανισμό καθώς και στις διαφορετικές μεθοδολογίες για την εξαγωγή και την ενίσχυση του μικροβιακού DNA. Επιπλέον αυτές οι μέθοδοι μπορούν να ανιχνεύσουν ακόμα και νεκρά μικροβιακά κύτταρα. Οι μοριακές μέθοδοι παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά, έχουν υψηλή συσχέτιση με τις κλασσικές μεθόδους μικροβιολογίας. Έχουν υψηλή διακριτική ικανότητα, ειδικά μετά από ένα στάδιο επώασης. Υπάρχουν πολλές παραλλαγές της PCR που μπορούν καλύψουν ένα ευρύ φάσμα της μικροβιολογίας. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των ιών με τη βοήθεια της PCR αποτελεί μία σημαντική εφαρμογή της μεθόδου. Παραλλαγές της PCR μπορούν να δώσουν πολλαπλά αποτελέσματα για διαφορετικούς μικροοργανισμούς (multiplex

PCR). Μία από τις σημαντικότερες παραλλαγές είναι η real time PCR με την οποία μπορούμε να έχουμε άμεσα αριθμητικά αποτελέσματα για το μικροβιακό φορτίο ενός δείγματος. Αναμφισβήτητα, οι μοριακές μέθοδοι αποτελούν ένα δυνατό εργαλείο για την διασφάλιση της υγιεινής των τροφίμων. Υπάρχουν διαθέσιμα πολλά kit με συγκεκριμένες μεθοδολογίες για συγκεκριμένα τρόφιμα, που ήδη εφαρμόζονται από πολλές επιχειρήσεις ανά το κόσμο.

Οι φωτομετρικές μέθοδοι αποτελούν ένα από τα πιο σύγχρονα εργαλεία στη μικροβιολογία. Παρόλο που η αρχή λειτουργίας της μεθόδου είναι γνωστή από παλιά, τα τελευταία χρόνια έχουν κατασκευαστεί εμπορικά kit. Η μεθοδολογία που βασίζεται στη παραγωγή φωτός από μικροβιακό ATP αποτελεί ίσως το καλύτερο εργαλείο για τον έλεγχο του μικροβιακού πληθυσμού πάνω σε επιφάνειες επεξεργασίας τροφίμων. Τα αποτελέσματα είναι αριθμητικά εξαιτίας της γραμμικής σχέσης μεταξύ φωτεινού σήματος και μικροβιακού πληθυσμού και άμεσα διότι η μέθοδος χρειάζεται μονάχα λίγα λεπτά για να πραγματοποιηθεί. Παράλληλα η μεθοδολογία μπορεί εύκολα να αυτοματοποιηθεί και να τυποποιηθεί. Η φωτομετρική μέθοδος του ATP δεν μπορεί ακόμα να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία απευθείας σε δείγματα τροφίμων καθότι είναι δύσκολος ο διαχωρισμός του μικροβιακού ATP από το ATP που προέρχεται από το ίδιο το τρόφιμο. Επίσης, η μεθοδολογία δεν μπορεί να ταυτοποιήσει μικροοργανισμούς καθώς μετράει το ATP που προέρχεται από οποιοδήποτε μικροοργανισμό. Ο βιοφθορισμός είναι μία μέθοδος που ανήκει στην κατηγορία των φωτομετρικών μεθόδων. Ο βιοφθορισμός βρίσκεται ακόμα στο στάδιο της μελέτης υπό την έννοια ότι δεν έχουν αναπτυχθεί εμπορικά kits για την εφαρμογή του. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα των ερευνών είναι ελπιδοφόρα διότι ο βιοφθορισμός προσφέρει μεγάλη εκλεκτική ικανότητα και υψηλή διακριτική ικανότητα ιδιαίτερα μετά από επώαση, καθώς και δυνατότητα τυποποίησης και αυτοματισμού.

Οι ανωτέρω μέθοδοι παρουσιάζουν μεγάλη ευελιξία. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα για την εξαγωγή αποτελεσμάτων. Υπάρχουν παραλλαγές των μεθόδων που χρησιμοποιούν ανοσοβιολογικές και μοριακές μεθόδους ταυτόχρονα. Για παράδειγμα ο ανοσομαγνητικός διαχωρισμός είναι μία μεθοδολογία που βασίζεται στις ανοσοβιολογικές μεθόδους αλλά που μπορεί να δώσει υψηλή διακριτική ικανότητα και να μειώσει το χρόνο διεξαγωγής των μοριακών μεθόδων.

Οι σύγχρονες ταχείες μέθοδοι ανίχνευσης μικροοργανισμών αποτελούν ένα πολύ σημαντικό κεφάλαιο στη μικροβιολογία των τροφίμων. Η ανάγκη για γρήγορη και

αποτελεσματική ανάλυση των τροφίμων ως προς το μικροβιακό τους φορτίο έχει οδηγήσει στη διεξαγωγή εκτεταμένης έρευνας με στόχο την ανάπτυξη της κατάλληλης μεθοδολογίας. Πολλά από τα αποτελέσματα αυτών των ερευνών ήδη εφαρμόζονται, ενώ άλλες βρίσκονται ακόμα σε εξέλιξη. Η ανάγκη για τη γρήγορη διεξαγωγή των μικροβιολογικών αναλύσεων καθώς και το μεγάλο ενδιαφέρον που έχει η επιστημονική κοινότητα για την ανάπτυξη των ταχείων μεθόδων ανίχνευσης μικροοργανισμών, ευνοεί την εφαρμογή τους από όλο και περισσότερα εργαστήρια και επιχειρήσεις και αναμένονται περισσότερες εμπορικές εφαρμογές και ολοένα πιο ευρεία χρήση αυτών.



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Bajaj V, Hwang C and Lee CA (1995)** *hilA* is a novel ompR/toxR family member that activates expression of *Salmonella typhimurium* invasion genes. *Molecular Microbiology*, 18:715–727.
- Baker JM, Griffiths MW and Collins-Thompson DL (1992)** Bacterial bioluminescence: Applications in Food Microbiology. *Journal of Food Protection*, 55: 62–70.
- Basol MS and Gogus U (1996)**. Methods of antibiotic applications related to microbiological quality of lamb by PCA and bioluminescence. *Journal of Food Science*, 61:348–349.
- Berson SA, Yalow RX, Bauman A, Rotschild MA and K Newerby (1956)** *The Journal of clinical investigation*, 35: 170.
- Blais BW and Phillipe LM (1993)** A simple RNA probe system for analysis of *Listeria monocytogenes*. Polymerase chain reaction products. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:2795-2800.
- Blankenfeld G (2006)** Technological trends and needs in food diagnostics. National Technology Agency of Finland, 132/2006.
- Bleve G, Rizzotti L, Dellaglio F and S Torriani (2003)** Development of reverse transcription (RT)-PCR and real-time RT-PCR assays for rapid detection and quantification of viable yeasts and molds contaminating yogurts and pasteurized food products. *Applied and Environmental Microbiology*, 69: 4116–4122.
- Bubert A, Kohler S and Goebel W (1992)** The homologous and heterologous regions within the *iap* gene allow genus-specific and species-specific identification of *Listeria* spp. by polymerase chain reaction. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:2625–2632.
- Campbell KL (1988)**. Solid state assays: reagents and film technology for dipstick assays. *Progress in Clinical and Biological Research*, 285:237-287.
- Charni N, Perissol C, Petit JL and Rugani N (2000)** Production and characterization of monoclonal antibodies against vegetative cells of *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 2278–2281.
- Chen S, Yee A, Griffiths M, Larkin C, Yamashiro CT, Behari R, Paszko-Kolva C, Rahn K and De Grandis SA (1997)** The evaluation of a fluorogenic polymerase chain reaction assay for the detection of *Salmonella* species in food commodities. *International Journal of Food Microbiology*, 35:239–250.
- Cheng Z and Griffiths M (2003)** Rapid detection of *Campylobacter jejuni* in chicken rinse water by melting peak analysis of amplicons in real time polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, 66:1343–1352.



- Cocolin L, Rantsiou K, Lacumin L, Cantoni C and Comi G (2002)** Direct identification in food samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 6273–6282.
- Cutter CN and Siragusa GR (1996)** Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. *Journal Food of Protection*, 58: 764–769.
- Dostalek P and T Brabyk (2005)** Prospects for rapid bioluminescent detection methods in the food Industry – a review. *Journal of Food Science*, 23: 85–92.
- Doyle MP and Schoeni JL (1987)** Isolation of *Escherichia coli* O157 from retail fresh meats and poultry. *Applied and Environmental Microbiology*, 53:2394–2396.
- Eriksson PV, Di Paola GN, Paseti MF and Manghi MA (1995)** Inhibition enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Pseudomonas fluorescens* on meat surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 397–398.
- Fach P, Gibert M, Griffais R, Guillou JP and Popoff MR (1994)** PCR and gene probe identification of botulinum neurotoxin A-, B-, E-, F-, and G- producing *Clostridium* spp. and evaluation in food Samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 389–392.
- Fankhauser RL, Noel JS, Monroe SS, Ando T and Glass RI (1998)** Molecular epidemiology of “Norwalk-like viruses” in outbreaks of gastroenteritis in the United States. *American Journal of Infectious Diseases*, 178:1571–1578.
- Fluit ADC, Myra N, Widjojoatmodjo, Box ATA, Torensma R and Verhoef J (1993)** Rapid detection of *Salmonellae* in poultry with the magnetic immuno-polymerase chain reaction assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59:1342-1346.
- Fung DYC (2002)** Rapid methods and automation in microbiology. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 1: 3–22.
- Galfre G and Milstein C (1981)** Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures. *Methods in Enzymology*, 73:3–46.
- Gassmann M, Tini M, Jewell UR, Camenisch G and Chilov D (2002)** Generation and application of chicken egg-yolk antibodies. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 131: 569-574.
- Green TA, Russell SM and Fletcher DL (1999)** Effect of chemical cleaning agents and commercial sanitizers on ATP bioluminescence measurements. *Journal of Food Protection*, 62: 86-90.

**Guo X, Chen J, Beuchat LR and Brackett RE (2000)** PCR detection of *Salmonella enterica* serotype Montevideo in and on raw tomatoes using primers derived from *hlyA*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 5248–5252.

**Hatheway CL (1993)** *Clostridium botulinum* and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. In A. H. W. Hauschild and K. L. Dodds (ed.), *Clostridium botulinum: ecology and control in foods*. Marcel Dekker, Inc., New York.

**He Y, Keen JE, Westerman RB, Littledike ET and Kwang J (1996)** Monoclonal antibodies for detection of the H7 antigen of *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 3325–3332.

**Hedberg CW and Osterholm MT (1993)** Outbreaks of food-borne and waterborne viral gastroenteritis. *Clinical Microbiology Reviews*, 6:199–210.

**Hutin YJ, Pool V, Cramer EH, Nainan OV, Weth J, Williams IT, Goldstein ST, Gensheimer KF, Bell BP, Shapiro CN, Alter MJ and Margolis HS (1999)** A multistate, foodborne outbreak of hepatitis A. National hepatitis A investigation team. *The New England Journal of Medicine*, 340:595–602.

**Jackson CJ, Fox AJ and Jones DM (1996)** A novel polymerase chain reaction assay for the detection and speciation of thermophilic *Campylobacter* spp. *The Journal of applied bacteriology*, 81:467–473.

**Jeníková G, Pazlarová J and Demnerová K (2000)** Detection of *Salmonella* in food samples by the combination of immunomagnetic separation and PCR assay. *International Microbiology*, 3:225–229.

**Johnson RP, Durham RJ, Johnson ST, MacDonald LA, Jeffrey SR and Butman BT (1994)** Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in meat by an enzyme-linked immunosorbent assay, EHEC-Tek. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 386–388.

**Jones DR, Northcutt JK, Musgrove MT, Curtis PA, Anderson KE, Fletcher DL and Cox, NA (2003)** Survey of shell egg processing plant sanitation programs: Effects on egg contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 66: 1486-1489.

**Josefsen MH, Jacobsen NR and Hoorfar J (2004)** Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant *Campylobacters*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3588–3592.

**Kapperud G, Namork E, Skurnik M and Nesbakken T (1987)** Plasmid-mediated surface fibrillae of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*: relationship to the outer membrane protein Yopl and possible importance for pathogenesis. *Infection and Immunity*, 55:2247-2254.

- Kapperud G, Vardud T, Skjerve E, Hornes E and Michaelsen TE** (1993) Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in foods and water by immunomagnetic separation, nested polymerase chain reactions, and colorimetric detection of amplified DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 2938-2944.
- Kim MS and Doylet MP** (1992) Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* 0157:H7 in retail ground beef. *Applied and Environmental Microbiology*, 58: 1764-1767.
- Kiss IF, Klosz K and Farkas J** (1998) ATP bioluminescence studies on effects of disinfectants on surfaces in a poultry slaughterhouse. European Commission Cost. June 6-7 Berlin, Germany. p. 113-120.
- Kodikara C, Crew HH, Steward GSAB** (1991) Near on-line detection of enteric bacteria using *lux* recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiology Letters*, 83: 261-265.
- Kohler G and Milstein C** (1975) Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*, 256:495-497.
- La Duc MT, Kern R and Venkateswaran K** (2004) Microbial monitoring of spacecraft and associated environments. *Microbial Ecology*, 47: 150-158.
- Leach FR and Webster JJ** (1986) Commercially available firefly luciferase reagents. *Methods in Enzymology*. Academic Press Inc., Orlando: 51-70.
- Lee HA, Wyatt GM, Bramham S and Morgan MR** (1990) Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: feasibility of 1-day salmonella detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 56: 1541-1546.
- Lees DN, Henshilwood K, Green J, Gallimore CI and Brown DWG** (1995) Detection of small round structured viruses in shellfish by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61: 4418-4424.
- Leon MB and Albrecht JA** (2004) Verification of ATP bioluminescence to measure levels of cleanliness on plastic food-contact surfaces. IFT Annual Meeting, July 12-16 Las Vegas.
- Lindstrom M, Keto R, Markkula A, Nevas M, Hielm S and Korkeala H** (2001) Multiplex PCR assay for detection and identification of *Clostridium botulinum* Types A, B, E, and F in food and fecal material. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:5694-5699.
- Lipman NS, Jackson LR, Trudel LJ and Weis-Garcia F** (2005) Monoclonal versus polyclonal antibodies: Distinguishing characteristics, applications, and information sources. National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, 46:258-268.
- Loessner MJ and Busse M** (1990) Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Applied and Environmental Microbiology*, 56:1912-1918.

**Loessner MJ, Rees CED, Steward GSAB and Scherer S** (1996) Construction of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for rapid and sensitive detection of viable *Listeria* cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:1133–1140.

**Loessner MJ, Rundolf M and Scherer S** (1997) Evaluation of luciferase reporter bacteriophage A511::luxAB for detection of *Listeria monocytogenes* in contaminated foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 63:2961-2965.

**Lofstrom C, Knutsson R, Axelsson CE and Radstrom P** (2004) Rapid and specific detection of *Salmonella* spp. in animal feed samples by PCR after culture enrichment. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 69–75.

**Makino S, Okada Y and Maruyama T** (1995) A new method for direct detection of *Listeria monocytogenes* from foods by PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61:3745–3747.

**Malorny B, Paccassoni E, Fach P, Bunge C, Martin A, and Helmuth R** (2004) Diagnostic real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7046–7052.

**Morissette C, Goulet J and Lamoureux G** (1991) Rapid and sensitive sandwich enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 836-842.

**Mullis KP and Faloona FF** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalysed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335–351.

**Musgrove MT, Jones DR, Northcutt JK, Curtis PA, Anderson KE, Fletcher DL and Cox NA** (2004) Survey of shell egg processing plant sanitation programs: Effects on non-egg contact surfaces. *Journal of Food Protection*, 67: 2801-2804.

**Nelson P, Westwood O, Jefferies R, Goodall M and Hay F.** (1997) Characterization of anti-IgG monoclonal antibody A57H by epitope mapping. *Biochemical Society transactions*, 25:373S.

**Ng SP, Tsui CO, Roberts D, Chau PY and Ng MH** (1996) Detection and serogroup differentiation of *Salmonella* spp. in food within 30 hours by enrichment-immunoassay with a T6 monoclonal antibody capture enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 62 : 128-133.

**Notermans S, Boot PD and De NooiJ MD** (1983) Extraction of staphylococcal enterotoxins (SE) from minced meat and subsequent detection of SE with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Journal of Food protection*, 46:238-241.

**Odebrecht E, Schmidt HJ, Franco BGM** (2000) Studies on applicability of bioluminescence in the brewery. *Comparative studies and critical evaluation. Brauwelt*, 140: 1904–1905.

- Padhye NV and Doylet MP** (1991) Rapid procedure for detecting enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 57: 2693-2698.
- Peel M, Donachie W and Shaw A** (1988) Temperature expression of flagella of *Listeria monocytogenes* studied by electron microscopy, SDS-PAGE and western blotting. *Journal of General Microbiology*, 143:2171-2178.
- Poulis JA, Pijper M and Mossel DAA** (1993) Assessment of cleaning and disinfection in the food industry with the rapid ATP-bioluminescence technique combined with the tissue fluid contamination test and a conventional microbiological method. *International Journal of Food Microbiology*, 20: 109–116.
- Pyle BH, Broadway SC and Mcfeters GA** (1999) Sensitive Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food and water by immunomagnetic separation and solid-phase laser cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:1966–1972.
- Reinemann DJ** (2000) An investigation of ATP bioluminescence and quantitative bulk tank cultures to asses cleanliness of milking machines. ASAE annual International Meeting Milwaukee, Wisconsin, USA.
- Román REU** (2006) The effectiveness of the firefly rapid method in determining sanitation procedures at a tuna processing plant. Master of Science at University of Puerto Rico Mayaguez Campus.
- Russell SM** (1995) The effect of refrigerated and frozen storage on populations of mesophilic and coliform bacteria on fresh broiler chicken carcasses. *Poultry Science*, 74: 2057–2060.
- Schwab KJ, Neil FH, Fankhauser RL, Daniels NA, Monroe SS, Bergmire-Sweat DA, Estes MK and Atmar RL** (2000) Development of methods to detect “Norwalk-Like Viruses” (NLVs) and Hepatitis A virus in delicatessen foods: Application to a Food-Borne NLV Outbreak. *Applied and Environmental Microbiology*, 66: 213–218.
- Seong-Hee K, Min-Keun P, Jin-Young K, Pham DC, Yong-Soon L, Byoung-Su Y, Kyu-Kye H, Yoon- Kyu L.** (2005) Development of a sandwich ELISA for the detection of *Listeria* spp. using specific flagella antibodies. *Journal of Veterinary Science*, 6: 41–46.
- Siragusa GR, Cutter CN** (1995) Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artificially contaminated beef carcass tissue. *Journal of Food Protection*, 58: 764–769.
- Siragusa GR, Dorsa WJ, Cutter CN, Perino LJ, Koohmaraie M** (1996) Use of a newly developed rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect microbial contamination on poultry carcasses. *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence*, 11: 297–301.
- Southern EM** (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology*, 9:503 517.



- Steward GSAB** (1990) A review: In vivo bioluminescence: new potentials for microbiology. *Letters in Applied Microbiology*, 10: 1–8.
- Stryer L.** (1997) Μοριακή Ανοσολογία, p. 980 – 1000. In Aletras A, Balkana T, Koyvelas I (ed.) Βιοχημεία. 2<sup>nd</sup> Edition Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο.
- Todd ECD, Szabo RA, Peterkin P, Sharpe AN, Parrington L, Bundle D, Gidney MAJ and Perry MB** (1988) Rapid hydrophobic grid membrane filter–enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* O157 in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 54:2536–2540.
- Ugarova NN, Brovko YL, Kutuzova GD** (1993) Bioluminescence and bioluminescent analysis: recent development in the field. *Biokhimiya*, 58: 1351–1372.
- Vasavada PC** (1993) Rapid Methods and Automation in Dairy Microbiology. *Journal of Dairy Science*, 76:3101-3113.
- Velazquez M and Feirtag J** (1997) Quenching and enhancement effects of ATP extractants, cleansers, and sanitizers on the detection of the ATP bioluminescence signal. *Journal of Food Protection*, 60: 799-803.
- Vora GJ, Meador CE, Stenger DA and Andreadis JD** (2004) Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 3047–3054.
- Waage AS, Vardund T, Lund V, and Kapperud G** (1999) Detection of small numbers of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* cells in environmental water, sewage, and food samples by a seminested PCR assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 1636–1643.
- Waller DF and Ogata SA** (2000) Quantitative immunocapture PCR assay for detection of *Campylobacter jejuni* in foods. *Applied and Environmental Microbiology*, 66:4115–4118.
- Webster JAJ, Hall MS, Rich CN, Gilliland SE, Ford SR, Leach FR** (1988) Improved sensitivity of the bioluminescent determination of numbers of bacteria in milk samples. *Journal of Food Protection*, 51: 949–954.
- Weemen BKV and Schuurs AHWM** (1971) Immunoassay using antigen – enzyme conjugate. *FEBS Letters*, 15:3.
- Wyatt GM, Langley MN, Lee HA and Morgan MRA** (1993) Further studies on the feasibility of one-day *Salmonella* detection by enzyme-linked immunosorbent assay. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1383-1390.
- Yu H and Bruno JG** (1996) Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella typhimurium* in foods and environmental water samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 62: 587–592.