

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ODDELEK ZA ŽIVILSTVO

Helena PATERNOSTER

DOLOČANJE BAKTERIJ VRST *Salmonella enterica* IN *Listeria monocytogenes* V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

DETECTION OF *Salmonella enterica* AND *Listeria monocytogenes* IN FOODS WITH REAL-TIME PCR

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija živilske tehnologije. Raziskovalno delo je bilo opravljeno v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo Katedre za biotehnologijo, mikrobiologijo in varnost živil na Oddelku za živilstvo Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija Oddelka za živilstvo je za mentorico diplomskega dela imenovala doc. dr. Barbaro Jeršek in za recenzentko prof. dr. Sonjo Smole Možina.

Mentorica: doc. dr. Barbara Jeršek

Recenzentka: prof. dr. Sonja Smole Možina

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik:

Član:

Član:

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Helena Paternoster

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

ŠD	Dn
DK	UDK 579. 67. 083: 577. 2. 08 (043) = 163. 6
KG	mikrobiološke metode/patogene bakterije/sočasno določanje bakterij/ <i>Salmonella enterica</i> / <i>Listeria monocytogenes</i> /PCR v realnem času/občutljivost PCR v realnem času/ specifičnost PCR v realnem času/ surovo mleko/ sterilizirano mleko
AV	PATERNOSTER, Helena
SA	JERŠEK, Barbara (mentorica)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (recenzentka)
KZ	SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
ZA	Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo
LI	2009
IN	DOLOČANJE BAKTERIJ VRST <i>Salmonella enterica</i> IN <i>Listeria monocytogenes</i> V ŽIVILIH S PCR V REALNEM ČASU
TD	Diplomsko delo (univerzitetni študij)
OP	IX, 67 str., 22 pregl., 17 sl., 79 vir.
IJ	sl
JI	sl/en

AI Salmoneloza in listerioza sta bolezni, ki ju povzročajo bakterije rodu *Salmonella* oziroma vrste *Listeria monocytogenes*. Do okužbe z omenjenimi bakterijami pride velikokrat zaradi uživanja kontaminirane hrane, zato je pravočasno odkrivanje patogenih bakterij v živilih glavni cilj pri preprečevanju teh problemov. Namen našega dela je bila uporaba protokola, ki je bil predhodno razvit za določanje čistih bakterijskih kultur *S. enterica* in *L. monocytogenes* s PCR v realnem času, za sočasno določitev omenjenih bakterij v umetno kontaminiranem živilu. Poleg tega smo preizkusili različne postopke priprave bakterijske DNA in določili občutljivost PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* v umetno kontaminiranem živilu. Občutljivost PCR v realnem času za določanje salmonel smo določili po treh postopkih priprave DNA (toplotna liza, liza po postopku ABI in čiščenje DNA). Občutljivost je bila najboljša po pripravi DNA z lizo po postopku ABI (10^3 cfu/ml). Za pripravo DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* smo preizkusili enake tri postopke in določili, da je občutljivost 10^4 cfu/ml pri lizi po postopku ABI, ker je bila v tem primeru najboljša učinkovitost encimske reakcije. Gojišča BPW (puferirana peptonska voda), HF (half Fraser) in UPB (univerzalno obogatitveno gojišče) niso imela inhibitornega vpliva na nobeno encimsko reakcijo. Ker so bili rezultati direktnega določanja bakterij v mleku slabi, smo za obogatitveno gojišče izbrali gojišče UPB, ki je omogočalo dobro rast bakterijam seva *S. enterica* in tudi bakterijam vrste *L. monocytogenes*. Rezultati določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* po sočasni obogatitvi v gojišču UPB v sterilnem mleku so bili pozitivni pri nizki začetni kontaminaciji (*S. Enteritidis* $7,6 \times 10^0$ cfu/ml in *L. monocytogenes* $4,4 \times 10^{-1}$ cfu/ml) in enako v surovem mleku ($5,6 \times 10^1$ cfu/ml oziroma $8,5 \times 10^{-1}$ cfu/ml).

KEY WORDS DOCUMENTATION

DN Dn
DC UDC 579. 67. 083: 577. 2. 08 (043) = 163. 6
CX microbiological methods/ pathogens/ simultaneous detection/ *Salmonella enterica*/
Listeria monocytogenes/ real-time PCR/ sensitivity of real-time PCR/ specificity of
real-time PCR/ raw milk/ UHT milk
AU PATERNOSTER, Helena
AA JERŠEK, Brbara (supervisor)/ SMOLE MOŽINA, Sonja (reviewer)
PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Food Science and
Technology
PY 2009
TI DETECTION OF *Salmonella enterica* AND *Listeria monocytogenes* IN FOODS
WITH REAL-TIME PCR
DT Graduation thesis (University studies)
NO IX, 67 p., 22 tab., 17 fig., 79 ref.
LA sl
AL sl/en

AB Salmonellosis and listeriosis are diseases caused by *Salmonella* spp. or *Listeria monocytogenes*. Infections with the above mentioned bacteria are commonly caused by eating contaminated food, therefore a detection of pathogenic bacteria is the primary goal in preventing and finding problems which are in any way connected to our health. The purpose of our work was to use the protocol which was beforehand set to detect pure bacterial cultures of *S. enterica* and *L. monocytogenes* with real-time PCR for simultaneous detection of the mentioned bacteria in artificially contaminated food. Furthermore we have tested various procedures of bacterial DNA preparation and determined sensitivity of real-time PCR for simultaneous detection of *S. enterica* and *L. monocytogenes* in artificially contaminated food samples. Sensitivity of real-time PCR for detection of *S. enterica* was determined after three procedures of DNA preparation (heat lysis, ABI lysis and DNA isolation). Sensitivity was the best after DNA preparation with ABI lysis (10^3 cfu/ml). For *L. monocytogenes* we have used the same procedures of DNA preparation as for *S. enterica* and determined sensitivity of real-time PCR which was 10^4 cfu/ml at ABI lysis, because the effectiveness of the enzyme reaction was the best. Media used for enrichment, BPW (Buffered Peptone Water), HF (Half Fraser) and UPB (Universal Preenrichment Broth), did not inhibit enzyme reaction. Since the results of direct detection of bacteria in milk samples were negative we decided to choose UPB as the enrichment medium, which enabled good growth of *S. enterica* and *L. monocytogenes*. The results of detection of *S. Enteritidis* and *L. monocytogenes* after simultaneous enrichment of food samples in UPB with real-time PCR were positive with very good sensitivity in milk samples (*S. Enteritidis* 7.6×10^0 cfu/ml and *L. monocytogenes* 4.4×10^{-1} cfu/ml) and raw milk samples (5.6×10^1 cfu/ml or 8.5×10^{-1} cfu/ml).

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA.....	III
KEY WORDS DOCUMENTATION.....	IV
KAZALO VSEBINE.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VII
KAZALO SLIK.....	VIII
OKRAJŠAVE.....	IX

1 UVOD	1
1.1 CILJI NALOGE	3
1.2 DELOVNE HIPOTEZE	3
2 PREGLED OBJAV	4
2.1 PATOGENE BAKTERIJE	4
2.1.1 Bakterije rodu <i>Salmonella</i>	5
2.1.1.1 Lastnosti bakterij rodu <i>Salmonella</i>	5
2.1.1.2 Epidemiološki podatki za bakterije rodu <i>Salmonella</i>	6
2.1.1.3 Določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> v živilih	6
2.1.2 Bakterije rodu <i>Listeria</i>	9
2.1.2.1 Lastnosti bakterij rodu <i>Listeria</i>	9
2.1.2.2 Patogenost bakterij vrste <i>Listeria monocytogenes</i>	10
2.1.2.5 Določanje bakterij rodu <i>Listeria</i> v živilih	11
2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO	13
2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU	15
2.3.1 Glavne metode določanja pomnožkov	15
2.3.1.1 Nespecifične metode	15
2.3.1.2 Specifične metode	16
2.3.1 PCR v realnem času za določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> v živilih	19
2.3.2 PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v živilih	20
2.3.3. PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> v živilih	21
2.4 SPLOŠNE LASTNOSTI MLEKA.....	23
3 MATERIAL IN METODE.....	26
3.1 MATERIAL	26
3.1.1 Bakterije	26
3.1.2 Mikrobiološka gojišča	26
3.1.3 Reagenti	26
3.1.3.1 Reagenti za toplotno lizo bakterijskih celic.....	26
3.1.3.2 Reagenti za lizo bakterijskih celic po postopku ABI	26
3.1.3.3 Reagenti za čiščenje bakterijskih celic	26
3.1.3.4 Reagenti za PCR v realnem času.....	26
3.1.4 Živilo	27
3.1.5 Laboratorijska oprema	27
3.2 METODE	28
3.2.1 Potek eksperimentalnega dela	28
3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur	32
3.2.3 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču	32
3.2.4 Priprava bakterijske DNA za PCR v realnem času.....	33
3.2.4.1 Priprava bakterijske DNA s toplotno lizo celic	33
3.2.4.2 Priprava bakterijske DNA z lizo celic po postopku ABI	33

3.2.4.3 Priprava bakterijske DNA s čiščenjem.....	33
3.2.5 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času.....	33
3.2.5.1 Reagenti reakcijske mešanice za določanje bakterij vrste <i>S. enterica</i>	34
3.2.5.2 Reagenti reakcijske mešanice za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	34
3.2.6 Potek PCR v realnem času.....	34
3.2.7 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času.....	35
4 REZULTATI.....	36
4.1.1 Vpliv načina priprave DNA bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> na občutljivost PCR v realnem času.....	36
4.1.2 Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v obogatitvenih gojiščih BPW in UPB.....	39
4.1.3 Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v mleku.....	40
4.1.4 Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih BPW in UPB.....	41
4.2 DOLOČANJE BAKTERIJ VRSTE <i>L. monocytogenes</i> S PCR V REALNEM ČASU.....	42
4.2.1 Vpliv načina priprave DNA bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> na občutljivost PCR v realnem času.....	42
4.2.2 Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v obogatitvenih gojiščih HF in UPB.....	43
4.2.3 Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po razredčitvi lizatov iz gojišč HF in UPB.....	45
4.2.4 Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku.....	46
4.2.5 Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih HF in UPB.....	48
4.3 SOČASNO DOLOČANJE BAKTERIJ SEVA <i>S. Enteritidis</i> IN VRSTE <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> S PCR V REALNEM ČASU.....	50
4.3.1 Sočasno določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku.....	50
4.3.2 Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po sočasni obogatitvi vzorcev v gojišču UPB.....	52
4.3.3 Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v surovem kravjem mleku po sočasni obogatitvi vzorcev v gojišču UPB.....	54
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	56
5.1 RAZPRAVA.....	56
5.1.1 PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i>	56
5.1.2 PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>	57
5.1.3 PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst <i>L. monocytogenes</i> in <i>S. Enteritidis</i>	58
5.2 SKLEPI.....	59
6 VIRI.....	60

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1: Lastnosti različnih metod za določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i> (Lazcka in sod., 2007).....	8
Preglednica 2: Prisotnost bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v vzorcih živil 2004 – 2007 (VURS, 2009).....	11
Preglednica 3: Lastnosti različnih metod za določanje bakterij rodu <i>Listeria</i> (Lazcka in sod., 2007).....	12
Preglednica 4: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih reporterskih fluorogenov (Lee in sod., 2004).....	16
Preglednica 5: Povprečne sestave različnih vrst mleka (Spreer, 1998).....	23
Preglednica 6: Najpomembnejše sestavine kravjega mleka (Bajt, 2002; Tratnik, 1998).....	23
Preglednica 7: Deleži najpomembnejših beljakovin mleka (Mavrin in Oštir, 2002) in njihove specifične karakteristike (Spreer, 1998).....	24
Preglednica 8: Laboratorijska oprema.....	27
Preglednica 9: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> po različnih načinih priprave DNA.....	36
Preglednica 10: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> po pripravi DNA z lizo celic po postopku ABI.....	38
Preglednica 11: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v gojiščih BPW in UPB.....	39
Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v mleku.....	40
Preglednica 13: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> po obogatitvi vzorcev mleka v gojiščih BPW in UPB.....	41
Preglednica 14: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po različnih načinih priprave DNA.....	42
Preglednica 15: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po razredčitvi obogatitvenih gojišč HF in UBP.....	44
Preglednica 16: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> po razredčitvi lizatov iz gojišč HF in UBP.....	45
Preglednica 17: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v vzorcih mleka po različnih načinih priprave DNA.....	46
Preglednica 18: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih HF.....	48
Preglednica 19: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB.....	49
Preglednica 20: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku.....	50
Preglednica 21: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v UPB.....	52
Preglednica 22: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> in vrste <i>L. monocytogenes</i> v surovem, polnomastnem kravjem mleku po obogatitvi vzorcev v UPB.....	54

KAZALO SLIK

Slika 1: Področja, kjer se najpogosteje določajo patogeni mikroorganizmi (Lazcka in sod., 2007)	4
Slika 2: Pogostost določanja patogenih bakterij glede na literaturne podatke o raziskavah s področja odkrivanja teh bakterij (Lazcka in sod., 2007)	5
Slika 3: Bakterije rodu <i>Salmonella</i> (Krop, 2002).....	5
Slika 4: Identifikacija bakterij seva <i>Salmonella</i> Enteritidis na gojišču bizmut sulfitni agar (Bismuth..., 1999)	7
Slika 5: Bakterije rodu <i>Listeria</i> (Joerger, 2009).....	9
Slika 6: Identifikacija bakterije vrste <i>L. monocytogenes</i> na selektivnem kromogenem gojišču (Listeria..., 2009)	12
Slika 7: Princip PCR (Polymerase..., 2009).....	14
Slika 8: Princip PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo (Guedry, 2009)	17
Slika 9: Emisija fluorescence pri PCR v realnem času (What is..., 2009)	18
Slika 10: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i>	29
Slika 11: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> v umetno kontaminiranem živilu.....	30
Slika 12: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst <i>S. enterica</i> in <i>L. monocytogenes</i> po obogatitvi živila.....	31
Slika 13: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNA in disociacije pomnožkov v aparatu ABI Prism 7500	34
Slika 14: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov, dobljenih s PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i>	37
Slika 15: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> po pripravi DNA z lizo po postoku ABI	37
Slika 16: Določanje bakterij seva <i>S. Enteritidis</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB s PCR v realnem času	53
Slika 17: Določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i> v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB s PCR v realnem času	53

OKRAJŠAVE

Okrajšava	Pomen
ALOA	gojišče <i>Listeria Ottavani</i> & Agosti
bp	bazni par
BHI	(angl. Brain Heart Infusion Broth)
BPW	puferirana peptonska voda (angl. Buffered Peptone Water)
CAMP	(angl. Christie Atkins Munch Petersen)
cfu	kolonijska enota (angl. colony forming unit)
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EFSA	Evropska agencija za varno hrano (angl. European Food Safety Authority)
FRET	fluorescentni resonančni prenos energije
H ₂ O _{KEM}	bi-destilirana sterilna voda
H ₂ O _{PCR}	sterilna, deionizirana, DNA prosta voda
HF	gojišče Half Fraser (angl. Half Fraser)
IMS	imunomagnetno ločevanje
IMS-ELISA	imunomagnetno ločevanje in encimskoimunski test
NA	hranljivi agar (angl. Nutrition Agar)
PCR	verižna reakcija s polimerazo (angl. Polymerase Chain Reaction)
QCM	piezoelektrični biosenzor
ST11/ST15	oligonukleotidna začetnika za določanje bakterij rodu <i>Salmonella</i>
SBF1/SBR1	oligonukleotidna začetnika za določanje bakterij vrste <i>L. monocytogenes</i>
TSA	gojišče triptični soja agar (angl. Tryptic soy agar)
UPB	univerzalno obogatitveno gojišče (angl. Universal Preenrichment Broth)
XLD	gojišče ksiloza lizin deoksiholatni agar (angl. Xylose Lysine Deoxycholate agar)
TSYEA	gojišče triptični soja agar s kvasnim ekstraktom

1 UVOD

Salmoneloza in listerioza sta bolezni, ki ju povzročajo bakterije rodu *Salmonella* oziroma vrste *Listeria monocytogenes*. Do okužbe z omenjenimi bakterijami pride velikokrat zaradi uživanja kontaminirane hrane, zato je pravočasno odkrivanje patogenih bakterij v živilih glavni cilj pri preprečevanju in ugotavljanju problemov, ki so povezani z našim zdravjem (Lazcka in sod., 2007).

Salmonele so v zadnjem desetletju najpogostejši povzročitelj bakterijskih črevesnih obolenj tako pri nas kot tudi v svetu. Evropska agencija za varno hrano EFSA (European Food Safety Authority) poroča, da je bilo v 27 državah članicah evropske unije (EU) in v 3 drugih državah, ki niso članice, potrjenih v letu 2005 173.879 primerov, 164.011 primerov v letu 2006 in leta 2007 151.995 primerov salmoneloze. Tudi v Sloveniji je bila najpogostejša bakterijsko povzročena črevesna okužba, ki je v obdobju med 2004 in 2008 dosegla povprečno incidenco 87,7 okužb na 100.000 prebivalcev (Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008; Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2009).

Salmoneloza je v Sloveniji že nekaj let med desetimi najpogostejše prijavljenimi nalezljivimi boleznimi. Bakterije rodu *Salmonella* so najpogostejši bakterijski povzročitelj gastroenterokolitov. Večina ljudi preboli salmonelozo brez zapletov, v nekaj dneh. Večje težave nastanejo pri majhnih otrocih in starejših ljudeh, ki pogosto potrebujejo bolnišnično oskrbo. Bakterije rodu *Salmonella* povzročajo okužbe prebavnega trakta s krči in slabostjo ter hudo drisko. Intenzivnost bolezni je odvisna od odpornosti organizma in količine zaužitih salmonel ter serovara. Bolezen se lahko konča tudi s smrtjo, vendar je umrljivost običajno zelo nizka (manj kot 1%) (Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2009; Suresh, 2006).

Humana listerioza je sicer redka bolezen, katero povzročajo za človeka patogene bakterije vrste *Listeria monocytogenes*. Ogrožene so predvsem rizične skupine ljudi. Smrtnost zaradi listerioze je zelo velika, med 20 in 60 % (Vazquez-Boland in sod., 2001). V Ameriki je bila na primer leta 2004 dosežena incidenca 2,7 primerov na 1.000.000 prebivalcev. Evropska agencija za varno hrano EFSA poroča, da je bilo leta 2007 v državah članicah EU potrjenih 1558 obolenj za listeriozo, kar je doseglo incidenco 0,3 primera na 100.000 prebivalcev. Tudi v Sloveniji so poročali o okužbah, in sicer je leta 2007 incidenca znašala kar 0,2 primera na 100.000 prebivalcev. Na splošno se je skupno število potrjenih primerov med leti 2004 in 2006 povečalo, le leta 2007 je bilo opaženo rahlo zmanjšanje. Inštitut za varovanje zdravja v svojem letnem poročilu za leto 2008 navaja, da so leta 2008 prejeli tri prijave listerioze. V dveh primerih je šlo za listerijski meningitis (moški, ženska), v enem primeru pa za sepsa novorojenke. Moški je zaradi okužbe umrl (Epidemiološko..., 2009).

Listerioza je redka bolezen, ki ogroža predvsem rizične skupine ljudi, vendar je smrtnost zaradi listerioze najvišja med bakterijskimi okužbami s kontaminirano hrano (20 do 50%), na srečo pa je incidenca zelo nizka. Najbolj občutljivi ljudje so nosečnice in njihovi otroci, starejši ljudje in ljudje s slabim imunskim sistemom (Adamič in sod., 2003; Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2009). Bolezen se kaže v več oblikah,

in sicer kot vročinski gastroenteritis, kot meningitis, sepsa, vnetje srčne opne, okužba centralnega živčnega sistema, vnetje očesne veznice in kot gripi podobna bolezen. Pri nosečnicah listerioza povzroča prezgodnji porod, splav ali številne zdravstvene težave pri novorojenčku (Rossmanith in sod., 2006).

Ker bakterije vrste *L. monocytogenes* kot tudi bakterije rodu *Salmonella* po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z žvili (2000), v žvilu ne smejo biti prisotne, je zelo pomembno njihovo hitro in zanesljivo določanje. Pogoji za to so hitre, specifične in občutljive metode odkrivanja (Smole Možina in sod., 2005).

Klasične metode izolacije in identifikacije bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* vključujejo bolj ali manj selektivno primarno obogatitev, selektivno sekundarno obogatitev, izolacijo ter identifikacijo izolatov z morfološkimi, biokemijskimi in serološkimi testi. Omenjene metode so delovno in materialno zahtevne ter zelo dolgotrajne, saj so rezultati znani šele v 3 – 7 dneh. Dolgotrajnost klasičnih metod določanja patogenih bakterij v živilih je glavni vzrok za razvoj novih, predvsem pa hitrejših metod (Hein, 2006).

Da bi skrajšali čas določanja bakterij, so znanstveniki razvili vrsto alternativnih metod. Pri uvajanju omenjenih metod je pomembno, da poleg hitrejših izvedb, visoke občutljivosti in specifičnosti metode upoštevamo še možnost avtomatizacije metode, neodvisnost izvedbe metode glede na vrsto živila, ceno, enostavno izvedbo, dostopnost potrebnih kemikalij ter možnost standardizacije metode. Te zahteve teoretično dobro izpolnjujejo metode, ki temeljijo na verižni reakciji s polimerazo (PCR).

V našem eksperimentalnem delu smo se poslužili uporabe alternativne metode PCR v realnem času. Omenjena metoda se od klasičnega PCR razlikuje po tem, da je izvedbeno manj zahtevna in časovno manj zamudna. PCR v realnem času ima večjo občutljivost kot klasična oblika PCR, kar je povezano z manjšo začetno količino DNA (Dhar in sod., 2008). Za PCR v realnem času je značilno tudi, da ima dobro ponovljivost, omogoča kvantitativno merjenje, ima majhno možnost kontaminacije zaradi poteka v popolnoma zaprtem sistemu, je zelo specifična metoda zaradi uporabe specifičnih sond, lahko se hkrati analizira veliko število vzorcev (Logan in Edwards, 2005; Santhosh in sod., 2007).

1.1 CILJI NALOGE

Namen našega dela je bil:

- uporabiti protokol, ki je bil predhodno postavljen za določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* s PCR v realnem času za čiste bakterijske kulture (Ledinek, 2006), za določitev omenjenih bakterij v umetno kontaminiranem živilu,
- preizkusiti različne postopke priprave bakterijske DNA za PCR v realnem času
- in določiti občutljivost PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* v umetno kontaminiranem živilu.

1.2 DELOVNE HIPOTEZE

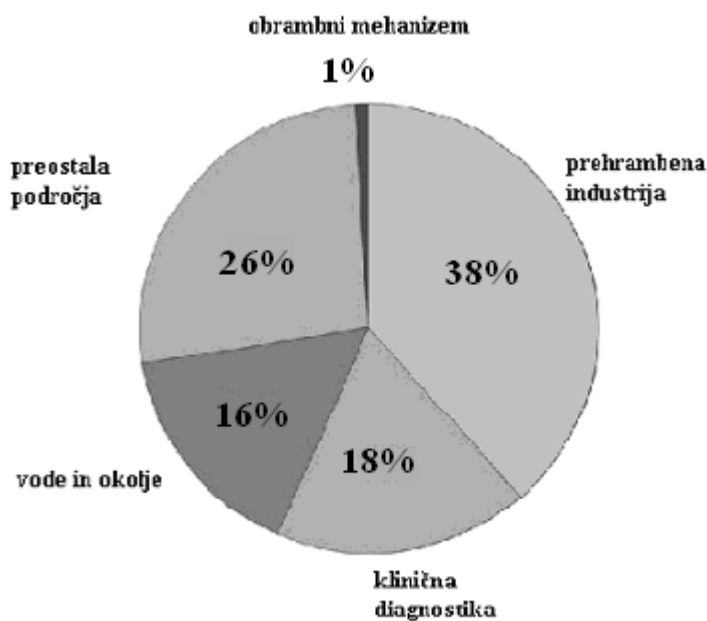
Predvidevamo:

- da bo protokol PCR za določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* po optimizaciji uporaben za sočasno določanje omenjenih bakterij v živilih,
- da bo za dosego enake občutljivosti namesto lize bakterijskih celic potrebno čiščenje DNA
- in da v živilu naravno prisotni mikroorganizmi ne bodo vplivali na občutljivost PCR v realnem času.

2 PREGLED OBJAV

2.1 PATOGENE BAKTERIJE

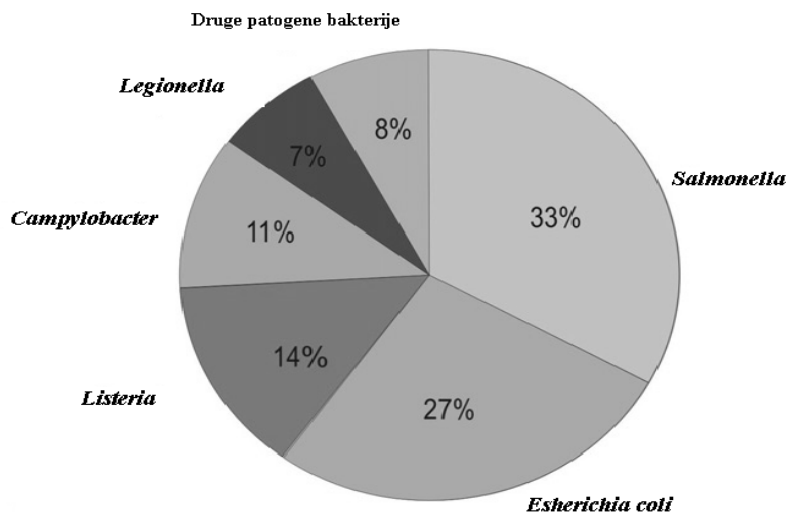
Pravočasno odkrivanje prisotnosti patogenih bakterij v živilih je glavni cilj pri ugotavljanju in preprečevanju širjenja nalezljivih bolezni s hrano, ki so povezani z našim zdravjem. Na sliki 1 so prikazana področja, v katerih se najbolj pogosto išče in odkriva patogene mikroorganizme. Najbolj pomembna področja so živilska industrija, vode in okolje ter klinična diagnostika. Preostala področja pripadajo osnovnim, temeljnim in poskusnim študijam ter razvoju novih raziskovalnih metod.



Slika 1: Področja, kjer se najpogosteje določajo patogeni mikroorganizmi (Lazcka in sod., 2007)

Živilska industrija predstavlja najpomembnejše področje za aplikacijo metod ugotavljanja prisotnosti patogenih bakterij. Neuspešno odkrivanje omenjenih bakterij pomeni tveganje za potrošnike. Cilj živilske industrije je zagotoviti varna živila, kar pomeni sproten nadzor ter kontrolo živil glede na možno prisotnost patogenih mikroorganizmov. To je tudi glavni razlog, da mnogi znanstveniki proučujejo možnosti za vpeljavo novih metod, ki bi bile enako občutljive, enako specifične ter hkrati hitrejše kot klasične mikrobiološke preiskave (Lazcka in sod., 2007).

Bakterije vrste *Escherichia coli* so najbolj splošen študijski model bakterij. Bakterije rodu *Salmonella* pa so najpogosteje omenjene bakterije pri določanju ponovljivosti, občutljivosti, specifičnosti in natančnosti različnih metod določanja patogenih bakterij. Na sliki 2 je prikazana razporeditev bakterij glede na pogostost ugotavljanja prisotnosti patogenih bakterij (Lazcka in sod., 2007).

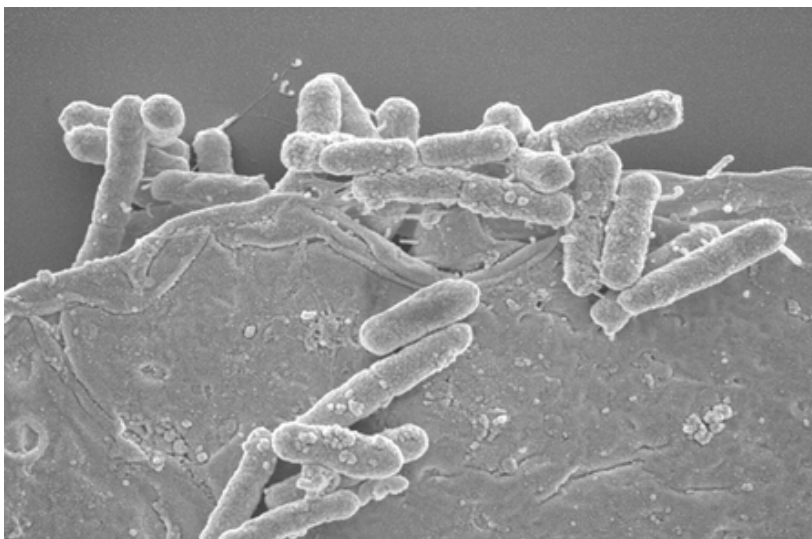


Slika 2: Pogostost določanja patogenih bakterij glede na literaturne podatke o raziskavah s področja odkrivanja teh bakterij (Lazcka in sod., 2007)

2.1.1 Bakterije rodu *Salmonella*

2.1.1.1 Lastnosti bakterij rodu *Salmonella*

Bakterije rodu *Salmonella* so gramnegativne, gibljive, citokromoksidaza-negativne, katalaza-pozitivne in fakultatitvno anaerobne paličice. Kot edini vir ogljika izkoriščajo citrat. Nitrite reducirajo v nitrat. Glukozo navadno razgrajujejo brez oblikovanja plina, laktoze ne izkoriščajo. Bakterije rodu *Salmonella* se razmnožujejo pri temperaturah med 7 in 47 °C, optimalna temperatura razmnoževanja je 37 °C. Temperatura, višja od 65 °C, jih hitro uniči. pH okolja, v katerem se razmnožujejo, se giblje med 4,5 in 9,0, pri čemer minimalno vrednost pH, ki še omogoča razmnoževanje, določa vrsta prisotne kisline. Najhitreje se razmnožujejo v nevtralnem pH območju. Bakterije rodu *Salmonella* še rastejo pri a_w 0,94. So najpogostejši povzročitelji alimentarnih toksikoinfekcij v našem okolju (Adamič in sod., 2003).



Slika 3: Bakterije rodu *Salmonella* (Krop, 2002)

2.1.1.2 Epidemiološki podatki za bakterije rodu *Salmonella*

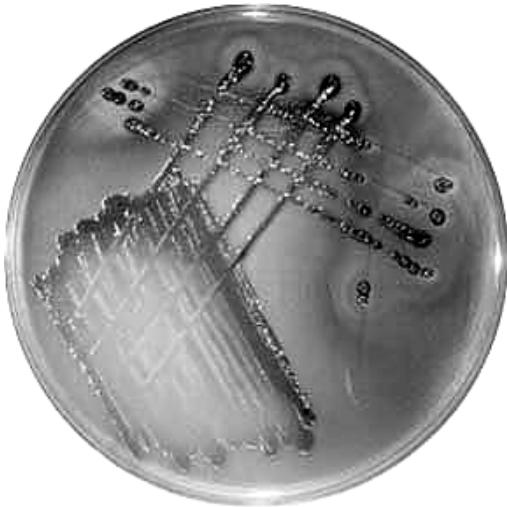
Okužba z bakterijami rodu *Salmonella* – salmoneloza pri ljudeh je v svetu zelo pogosta. V zadnjem desetletju se je pogostost izbruhov okužb z bakterijami seva *Salmonella* Enteritidis v severni in južni Ameriki, po večini Evrope, ter Indiji in nekaterih afriških državah zelo povečala, tako da je omenjen sev danes eden najpogostejše izoliranih bakterij pri bolnikih (Suresh in sod., 2006). Made in sodelavci (2004) navajajo, da je bilo v Nemčiji leta 2001 potrjenih 77.186 primerov okužb z bakterijami rodu *Salmonella*. V Avstriji so bili leta 2003 zaznani 103 primeri na 100.000 prebivalcev (Hein in sod., 2006). Bennett in sodelavci (1998) poročajo, da se je v Angliji in Walsu med leti 1980 in 1994 število primerov salmoneloze gibalo med 10.000 in 30.000 na leto. Lazcka in njegovi sodelavci (2007) opisujejo dogodek, ki se je pripetil v Španiji leta 2005, kjer se je v mesecu juniju okužilo 2500 ljudi. Evropska agencija za varno hrano EFSA (European Food Safety Authority) pokriva 30 držav, od tega 27 držav članic Evropske unije (EU) in 3 druge države, ki niso članice EU. V letu 2005 so poročali o 173.879 potrjenih primerih salmoneloz (ali 38,2/100.000), v letu 2006 o 164.011 (ali 35,8/100.000) in v letu 2007 o 151.995 (ali 31,1/100.000). To predstavlja 7,3% zmanjšanje od leta 2006, kljub prispevkom iz držav, ki so postale članice EU v letu 2007 (Bolgarija in Romunija), in 12,6% zmanjšanje od leta 2005 v države članice EU. Inštitut za varovanje zdravja poroča, da se je število salmoneloz v Sloveniji v obdobju med 1999 in 2000 povečalo, zelo visoko pa je bilo v letih med 2002 do 2004. Prijave so dosegle vrh v letu 2003, ko je incidenca znašala 201/100.000 prebivalcev. S tem se je Slovenija uvrstila med države z najvišjo incidenco salmoneloz v Evropi. Natančen vzrok za povečano število prijav salmoneloz med leti 2002 in 2004, ni znan. V primerjavi z letom 2003 se je število prijav v letu 2004 zmanjšalo za 17%, v letih 2005 in 2006 za 62%. Leta 2007 je bila incidenca salmoneloz za 11% manjša kot leta 2006, v letu 2008 se je zmanjšala še za 18,9%. Petletna povprečna incidenca (od leta 2004 do 2008) je bila 87,7, leta 2008 je bila incidenca nižja od petletnega povprečja za več kot tretjino (Epidemiološko spremljanje nalezljivih bolezni v Sloveniji v letu 2008). Najpogostejše se bakterije rodu *Salmonella* prenašajo preko neustrezno obdelanih jajc, piščančjega in svinjskega mesa, ter mesnih in mlečnih izdelkov. Bakterije seva *S. Enteritidis* povzročajo okužbe prebavnega trakta s krči in slabostjo ter hudo drisko. Večje težave nastanejo pri majhnih otrocih in starejših ljudeh, ki pogosto potrebujejo bolnišnično oskrbo. Bolezen se lahko konča tudi s smrtjo (Suresh in sod., 2006).

2.1.1.3 Določanje bakterij rodu *Salmonella* v živilih

Večina bakterij rodu *Salmonella* so potencialni patogeni. Klasične mikrobiološke metode za določanje omenjenih patogenih bakterij v bioloških vzorcih so navadno kompleksne in časovno zamudne. Določanje bakterij rodu *Salmonella* s klasičnimi mikrobiološkimi metodami traja 4 do 5 dni, od tega je potrebnih vsaj 64 ur za potrditev pozitivnih oziroma negativnih rezultatov (Made, 2004; Hein, 2006). Hein (2006) navaja, da je hitra metoda za odkrivanje omenjenih bakterij glavni cilj v preventivi kontaminacije hrane.

Standardna mikrobiološka metoda, kot je določanje patogenih bakterij rodu *Salmonella* po standardu ISO 6579 (2004), je časovno dolgotrajna. Pri omenjeni metodi je potrebna primarna obogatitev v gojišču BPW (puferirana peptonska voda). Nato moramo izvesti še sekundarno obogatitev, kjer uporabljamo gojišči RVS (Rappaport -Vassiliadis) in MKTT (Mueller-Kaufman tetrationski bujon). Za nadaljnjo izolacijo bakterij rodu *Salmonella* je predpisano trdno gojišče XLD (ksiloza lizin deoksiholatni agar), drugo selektivno gojišče je prepuščeno

izbiri izvajalca. Za potrditev omenjenih bakterij se po 5 značilnih kolonij precepi na gojišče NA (hranljivi agar). Če zrastejo značilne, 1-2 mm velike, okrogle kolonije beige barve, naredimo naslednje teste: trojni sladkor, gojišče z ureo, gojišče za dekarboksilacijo L-lizina, določanje β -galaktozidaze, reakcija Voges-Proskauer in tvorba indola. V sklopu preiskav sledi nato še serološka tipizacija, pri čemer določamo prisotnost *Salmonella* O-, Vi- in H-antigenov pri tistih vzorcih, kjer z biokemijskimi testi nismo ovrgli možnosti, da preiskovana bakterijska kultura spada med bakterije rodu *Salmonella*.



Slika 4: Identifikacija bakterij seva *Salmonella* Enteritidis na gojišču bizmut sulfidni agar (Bismuth..., 1999)

Zaradi omenjenih razlogov so raziskovalci začeli uporabljati različne molekularne metode in med njimi tudi PCR za določanje številnih mikroorganizmov v živilih (Nam in sod., 2004). Malorny in sodelavci (2004) navajajo, da je omenjena metoda postala v zadnjem desetletju eden od najpomembnejših pripomočkov v mikrobiološki diagnostiki. Ustanovljena je bila posebna mednarodna skupina Evropskega komiteja za standardizacijo, katere namen je bil, da postavi protokole za določanje patogenih bakterij v živilih z metodo PCR.

Nadgradnja klasične metode PCR se imenuje verižna reakcija s polimerazo v realnem času in ima vse omenjene lastnosti klasičnega PCR, le da poteka v zaprtem sistemu. PCR v realnem času se uporablja za specifično določanje bakterij rodu *Salmonella* kot ponovljiv in zanesljiv pripomoček v kontroli kontaminiranih vzorcev hrane tekom proizvodnje (Malorny in sodelavci, 2004). Za določitev bakterij rodu *Salmonella* potrebujemo le od 5 do 24 ur, kar je odvisno od lastnosti PCR ter vključitve predhodne obogatitve (Lazcka in sod., 2007). Metoda PCR temelji na podvajanju tarčnega dela molekule DNA, zato je to idealna metoda za iskanje določenega cilja (Cocolin in sod., 1998).

V preglednici 1 Lazcka s sodelavci (2007) navaja primerjavo različnih metod določanja bakterij rodu *Salmonella* v živilih tako, da primerjajo čas preiskave, območje v katerem je metoda uporabna ter občutljivosti za določitev omenjenih bakterij.

Preglednica 1: Lastnosti različnih metod za določanje bakterij rodu *Salmonella* (Lazcka in sod., 2007).

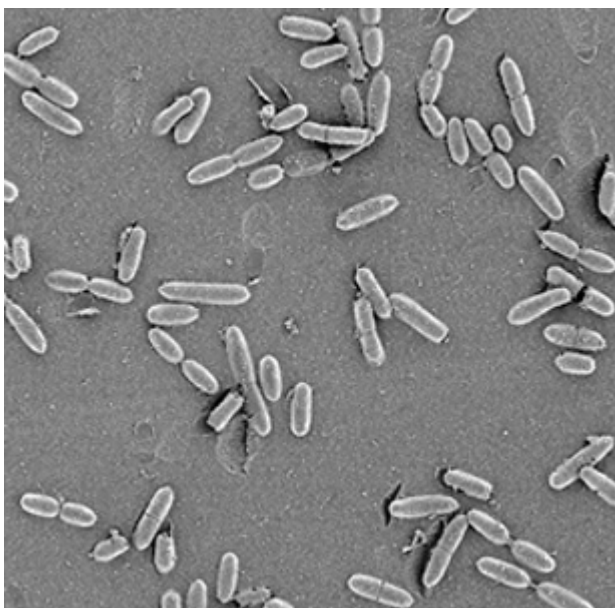
Uporabljena metoda	Vzorec	Potreben čas do rezultata	Območje (cfu/ml)	Občutljivost (cfu/ml)
IMS-»plating«	Surovi piščanec	Naslednji dan	/	1-10
IMS-ELISA	/	Naslednji dan	10^6 - 10^9	10^6
Elektrokemični sendvič ELISA	Meso	Isti dan	/	1-10 cfu/25g
PCR-ELISA	Mleko	Naslednji dan	1 - 10^8	10^3
QCM	Fosfatni pufer	60 min	10^5 - 5×10^8	10^4
Amperometrični biosenzorji	Voda	1-2 uri	/	5×10^4

Legenda: »plating« klasična mikrobiološka gojitvena metoda, /- ni podatkov, QCM- piezoelektrični biosenzor, ELISA-encimskoimunski test, IMS- imunomagnetno ločevanje, PCR- verižna reakcija s polimerazo

2.1.2 Bakterije rodu *Listeria*

2.1.2.1 Lastnosti bakterij rodu *Listeria*

Bakterije rodu *Listeria* vsebujejo 6 vrst, in sicer *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri* in *L. grayi*. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so patogene tako za ljudi kot tudi za živali, medtem ko so bakterije vrste *L. ivanovii* patogene samo za živali. Preostale vrste niso patogene (Brenner in sod., 2005). Omenjene bakterije med seboj ločimo s pomočjo biokemijskih testov kot so: hemoliza, proizvodnja kisline iz D-ksiloze, L-ramnoze, α -metil-D-manozida in D-manitola. Izmed listerij so bakterije vrste *L. monocytogenes* zelo pogosto prisotne in najnevarnejše bakterije, ki povzročajo zastrupitve s kontaminirano hrano (Aznar in Alarcon, 2001; Allerberger, 2003).



Slika 5: Bakterije rodu *Listeria* (Joerger, 2009)

Bakterije rodu *Listeria* so aerobne do mikroaerofilne, katalaza-pozitivne in citokromoksidaza-negativne. Sladkorje razgrajujejo do kislin brez nastanka plina (Adamič in sod., 2003). Omenjene bakterije so majhne grampozitivne, kokoidne do paličaste oblike, gibljive, sicer nesporogene, a zelo odporne proti neugodnim dejavnikom okolja. Pri temperaturi med 20 in 25 °C so gibljive, medtem ko so pri temperaturi 37 °C zelo slabo gibljive (Hein in sod., 2000).

Bakterije rodu *Listeria* se razmnožujejo v širokem temperaturnem območju od 1 °C do 45 °C, kar zajema tudi temperature hladilnika. Optimalna temperatura rasti je med 30 °C in 37 °C. Rastejo pri vrednostih pH od 4,5 do 9,6 in pri vrednosti a_w do 0,92 (Yang in sod., 2007). Za to vrsto je značilno, da tvori β -hemolizo na krvnem agarju, izkorišča ramnozo in ne ksilozo, ter ima pozitiven test CAMP (Adamič in sod., 2003). Listerije uspevajo tudi v ekstremnih razmerah, to je pri pH od 4,5 do 9, pri koncentraciji soli do 10 % in pri temperaturah hladilnika (Hein in sod., 2000). Bakterije rodu *Listeria* uniči pasterilizacija pri temperaturi 60 °C (Adamič in sod., 2003). Ena izmed lastnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* je, da za rast potrebujejo aminokislino, kot so levcin, glutamin, izolevcin, valin, cistein ter ogljikove

hidrate. Pomembni so tudi železo in nekateri vitamini, predvsem biotin, riboflavin, tiamin in lipojska kislina (Hein in sod., 2000).

Bakterije rodu *Listeria* so razmeroma pogosto prisotne v okolju, npr. na rastlinah, v zemlji, v človeških in živalskih odpadkih, na živalski krmi, v površinskih in odpadnih vodah (Adamič in sod., 2003). Omenjene bakterije lahko najdemo tudi v surovi hrani živalskega izvora, kot so mleko, meso, perutnina in ribe. Pasterizacija in kuhanje hrane uniči listerije. Nemalokrat so bakterije vrste *L. monocytogenes* izolirali tudi iz hrane, pripravljene za uživanje, kot so siri, sladoled, meso in mesni izdelki. Včasih so prisotne v svežem sadju in zelenjavi (Rantsiou in sod., 2008). Približno 5 % - 10 % ljudi ima bakterije vrste *L. monocytogenes* v prebavnem traktu (Jeršek, 2006). Vzrok za pogosto prisotnost bakterij rodu *Listeria* v živilih je tudi navzkrižna kontaminacija živil med samo proizvodnjo. Bakterije vrste *L. monocytogenes* so nevarne takrat, ko so prisotne v velikem številu, kar pa je povezano z neustreznimi postopki proizvodnje.

2.1.2.2 Patogenost bakterij vrste *Listeria monocytogenes*

Listerioza pri ljudeh je poznana že 70 let. Povzročajo jo bakterije vrste *L. monocytogenes* in smrtnost je kar 30 % - 50 %. Najbolj občutljivi ljudje so nosečnice in njihovi otroci, starejši ljudje in ljudje, ki s slabim imunskim sistemom (Rossmannith in sod., 2006; Yang in sod., 2007; Rantsiou in sod., 2008). Znanstveniki poročajo o dveh oblikah listerioze. Prva oblika listerioze povzroča vročinski gastroenteritis pri tisti skupini ljudi, ki niso dovzetni za spremembo zdravstvenega stanja. Druga, invazivna oblika, pa se kaže kot meningitis, sepsa, vnetje srčne opne, okužba centralnega živčnega sistema, vnetje očesne veznice in kot gripi podobna bolezen (Rossmannith in sod., 2006). Pri nosečnicah listerioza povzroča prezgodnji porod, splav ali številne zdravstvene težave pri novorojenčku (Rossmannith in sod., 2006). Inkubacijska doba pred nastopom bolezni je lahko dolga do 10 tednov, kar močno oteži določanje teh bakterij in iskanje povezav s potencialno kontaminirano hrano.

O listeriozah so v Ameriki poročali tudi v letu 2004. Znanstveniki ocenjujejo, da je bilo v severni Ameriki izmed 2500 prijavljenih primerov okužb z bakterijami vrste *L. monocytogenes* kar 500 primerov s smrtnim izidom (Berrada in sod., 2006). Zato dandanes predpisi določajo, da v predpripravljeni hrani ne sme biti omenjenih patogenih bakterij (Berrada in sod., 2006; Uredba komisije (ES) št. 2073/2005; Uredba komisije (ES) št. 1441/2007). Tudi v Avstriji je bila leta 2004 incidenca listerioze 0,24/100.000 prebivalcev in kar 21 % smrtnost (Rossmannith in sod., 2006). Evropska agencija za varno hrano EFSA poroča, da je bilo leta 2007 v državah članicah EU 1558 ljudi obolelih za listeriozo, od katerih so bili skoraj vsi tudi laboratorijsko potrjeni. Skupna incidenca v EU je bila 0,3 primera na 100.000 prebivalcev. Tudi v Sloveniji so poročali o okužbah z omenjeno bakterijo. V letu 2007 so bili potrjeni 4 primeri, kar znaša 0,2 primera na 100.000 prebivalcev. V letu 2006 je bili potrjenih 7 primerov. Leta 2005 ni bilo zaznanih okužb. V letu 2004 je bil potrjen 1 primer in leta 2003 6 primerov. Na splošno se je skupno število potrjenih primerov med leti 2004 in 2006 povečalo, le leta 2007 je bilo opaženo rahlo zmanjšanje. Komisija Evropske unije je 1. 1. 2006 postavila zahtevo, da predpripravljena živila ne smejo vsebovati več kot 100 bakterij vrste *L. monocytogenes* na gram ali mililiter živila. Hrana, katero pripravljamo za specifične skupine ljudi, pa v 25 gramih ali mililitrih živila ne sme vsebovati omenjenih bakterij (Rantsiou in sod., 2008). V Sloveniji je po Zakonu o zdravstveni ustreznosti živil in

izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilom (2000) predpisano, da so živila zdravstveno ustrezna takrat, ko ne vsebujejo mikroorganizmov in parazitov oziroma njihovih razvojnih oblik ali izločkov, ki lahko škodljivo vplivajo na zdravje ljudi. To pomeni, da v živilih ne smejo biti prisotne bakterije vrste *L. monocytogenes*. Veterinarska uprava republike Slovenije -VURS (2009) poroča o prisotnosti bakterij vrste *L. monocytogenes* v naključno odvzetih vzorcih živil v obdobju od 2004 do 2007 (Preglednica 2). V letih 2004-2006 je bilo najbolj pogosto kontaminirano mleto meso, medtem ko je bila prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* letu 2007 ugotovljena najbolj pogosto v delikatesnih mesnih izdelkih (tatarski biftek, mesni karpačo in podobni izdelki) – 20 % in v delikatesnih živilih z dolgim rokom uporabe (mesna zaseka, tlačanka,...) – 14 %. VURS poroča tudi, da je bilo leta 2007 v okviru uradnega nadzora mesnic odvzetih 78 vzorcev mesnih pripravkov oziroma mesnih izdelkov. Listerije so bile ugotovljene v 6 vzorcih in sicer v vzorcu pečenice, tatarskega bifteka, suhe klobase, zaseke, tlačanke in tunke. V letu 2008 je bilo na prisotnost listerije (v 25 g) preiskano 83 vzorcev mleka in mlečnih izdelkov iz surovega, termiziranega oziroma pasteriziranega mleka. Vsak vzorec je sestavljalo pet enot, vsaka enota je bila preiskana posebej. Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* je bila ugotovljena v enem vzorcu kisle smetane iz surovega mleka (1,2 %).

Preglednica 2: Prisotnost bakterij vrste *L. monocytogenes* v vzorcih živil 2004 – 2007 (VURS, 2009)

Leto	Št. vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev	% pozitivnih vzorcev	Najbolj pogosto živilo	Št. vzorcev	Št. pozitivnih vzorcev	% pozitivnih vzorcev
2004	1084	83	7,6	Mleto meso	114	44	36
2005	1385	46	4,7	Mleto meso	101	41	41
2006	1220	65	5,3	Mleto meso	100	35	35
2007	770	39	5,1	Delikatesni mesni izdelki	50	10	20
				Delikatesni mesni izdelki z daljšim rokom uporabe	50	7	14

2.1.2.5 Določanje bakterij rodu *Listeria* v živilih

Odkrivanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilih poteka z metodo po standardu ISO 10560 (1993) za mleko in mlečne izdelke in z novejšo metodo po standardu EN ISO 11290-1 (2005), ki pa je precej dolgotrajnejša in traja od 4 do 6 dni (Karpiškova in sod., 2000). Pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* po standardu ISO 11290-1 (2005) je najprej potrebna primarna obogatitev v obogatitvenem gojišču Half Fraser (HF), ker lahko živilo vsebuje nizko število bakterij vrste *L. monocytogenes* in visoko skupno število bakterij. Primarni obogatitvi sledi sekundarna v gojišču Fraser. Za izolacijo listerij je predpisano selektivno trdno gojišče *Listeria* Ottavani & Agosti (ALOA), drugo selektivno gojišče pa je prepuščeno naši izbiri. Za potrditev bakterij rodu *Listeria* vzamemo iz vsake plošče selektivnega gojišča po 5, za listerije značilnih kolonij in jih precepimo na gojišče triptični soja agar s kvasnim ekstraktom (TSYEA). Če zrastejo 1-2 mm velike, konveksne, brezbarvne, za listerije značilne kolonije, naredimo identifikacijo s testi : določitev katalaze in gibljivosti ter barvanje po Gramu. Za identifikacijo bakterij vrste *L. monocytogenes* naredimo še določitev hemolize, izkoriščanje ogljikovih hidratov (ramnoza in ksiloza) in test CAMP.



Slika 6: Identifikacija bakterije vrste *L. monocytogenes* na selektivnem kromogenem gojišču (Listeria..., 2009)

Ena od novejših metod za odkrivanje bakterij rodu *Listeria* temelji na verižni reakciji s polimerazo (PCR). Uporaba omenjene molekularne metode sega tja do leta 1990. Največji napredek je bil dosežen v zadnjih desetih letih. Glavni cilj številnih raziskav je bil postaviti protokol za določanje in kvantifikacijo bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilu (Rantsiou in sod., 2008). Številni znanstveniki poročajo o PCR-tehnologiji ter o tem, da je omenjena metoda specifična in zelo občutljiva za določanje omejenega števila ali posameznih organizmov. To ima velik vpliv na preiskave živil, ki so lahko kontaminirana z bakterijami rodu *Listeria*. Omenjene bakterije v živilu predstavljajo navadno manj kot 1 % vseh prisotnih mikroorganizmov, kar še dodatno otežuje njihovo določanje. Prednost PCR v realnem času je hitrejše odkrivanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilu v primerjavi s klasičnimi metodami, kajti njihovo odkrivanje temelji na uporabi fluorescenčnega barvila (O'Grady in sod., 2008). V preglednici 3 so navedene različne metode določanja bakterij rodu *Listeria* ter čas in meja občutljivosti pri posamezni metodi.

Preglednica 3: Lastnosti različnih metod za določanje bakterij rodu *Listeria* (Lazcka in sod., 2007)

Uporabljena metoda	Vzorec	Potreben čas do rezultata	Območje cfu/ml	Občutljivost cfu/ml
PCR	meso	Naslednji dan	/	1-10
PCR v realnem času	Sveže živilo-solata	Isti dan	100–1000	1000
IMS - PCR	Mleko	7 ur	1– 10 ⁵	10
QCM	kultura	30–60 min	10 ⁷ –10 ⁸	10 ⁷
Amperometrija	Fosfatni pufer in mleko	3–4 ure	10 ³ -10 ⁶	9×10 ²
Amperometrični imunosenzor	kultura	<2 uri	10 ⁴ -10 ⁷	/

Legenda: PCR- verižna reakcija s polimerazo, IMS-imunomagnetno ločevanje, / - ni podatka, QCM-piezoelektrični biosenzor,

2.2 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO

Verižna reakcija s polimerazo (PCR) je novejša priročna metoda v molekularni biologiji, ki omogoča pomnožitev enega ali več delov tarčne molekule DNA, označene s specifičnimi oligonukleotidnimi začetniki, v *in vitro* razmerah s pomočjo termostabilnega encima DNA polimeraza (Li in sod., 1999; Jeršek, 2003).

Metoda PCR je uspešna, če reakcijska mešanica vsebuje naslednje sestavine: tarčno dvovijačno DNA, dva oligonukleotidna začetnika, encim DNA polimeraza, deoksinukleotidtrifosfate vseh štirih baz (dNTP) v enakih koncentracijah, pufer z optimalnim pH in ionsko jakostjo, kjer je najpomembnejša koncentracija ionov Mg^{2+} , saj vpliva na encimsko aktivnost in natančnost (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000).

Standardni PCR poteka v 3 stopnjah (Jakše, 2007; Jeršek, 2003), ki so prikazane na sliki 3:

1. Denaturacija DNA

Denaturacija dvojne vijačnice molekule DNA, ki postane enojna in tako lahko oligonukleotidna začetnika najdejo komplementarna mesta prileganja. Korak traja od 20 sekund do 1 minute pri temperaturi 95 °C.

2. Prileganje oligonukleotidnih začetnikov

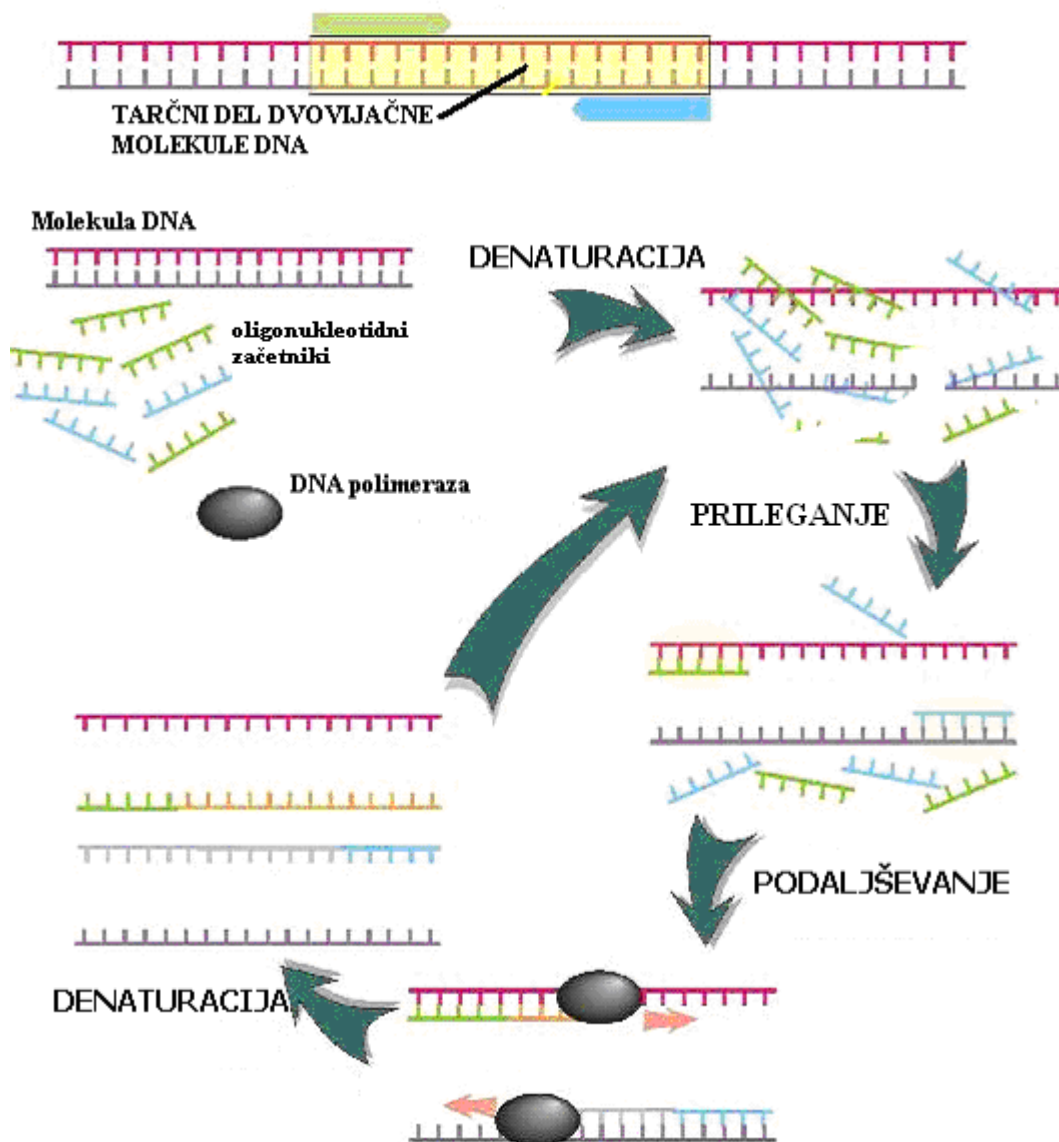
Prileganje specifičnih oligonukleotidnih začetnikov na komplementarno mesto tarčne molekule DNA poteka tako, da oligonukleotidni začetniki najdejo komplementarno mesto na DNA matrici. Po prileganju oligonukleotidnega začetnika je del DNA zopet dvoverižen. Ta korak poteka pri temperaturi, ki je odvisna od sestave oligonukleotidnih začetnikov, to je 55 – 72 °C in traja 5 – 60 sekund.

3. Podaljševanje DNA

Pri podaljševanju molekule DNA z encimom DNA polimeraza gre za nastanek komplementarne verige. Sinteza poteka pri temperaturi 72 °C. To je optimalna temperatura delovanja termostabilnega encima DNA polimeraze. Svojo aktivnost pa ohranja tudi pri višjih temperaturah, ki so potrebne za denaturacijo dvoverižne molekule DNA. Podaljševanje traja od 30 sekund do več minut, kar je odvisno od dolžine pomnožka.

V vsakem ciklu se število tarčnih kopij podvoji. Celoten proces pa se navadno ponovi od 20 do 40-krat (20-40 ciklov). Število ciklov je odvisno od količine produkta, ki ga želimo (Jakše, 2007) in od začetne količine DNA v vzorcu (Herzog-Velikonja in Gruden, 2000). Pomnožke PCR je najenostavneje dokazati z agarozno gelsko elektroforezo kjer primerjamo velikost pomnožkov z molekularnim označevalcem z znanimi velikostmi DNA fragmentov. Specifičnost pomnožitve je potrebno kontrolirati s hibridizacijo z interno DNA sondo, z restrikcijo ali s sekveniranjem pomnožka (Jeršek, 2003).

Verižna reakcija s polimerazo je nadvse uporabna tehnika, ki je v kratkem času postala ena najbolj razširjenih orodij molekularne biologije (Jakše, 2007).



Slika 7: Princip PCR (Polymerase..., 2009)

Bistvena prednost PCR pred klasičnimi tehnikami molekularne biologije je, da za analizo zadostuje že zelo majhna količina vzorca (Jakše, 2007), da je metoda hitra in občutljiva z enostavno izvedbo in visoko specifičnostjo ter občutljivostjo (Aabo in sod., 1993), da obstaja možnost avtomatizacije, da je možna mnogokratna karakterizacija ter sposobnost specifičnega določevanja genetsko modificiranih organizmov (Jakše, 2007).

Tako kot tudi druge metode ima tudi PCR svoje pomanjkljivosti. Izvedba PCR je v primerjavi s klasičnimi metodami dražja, poleg tega pa z omenjeno metodo ne moremo razlikovati med živimi in mrtvimi organizmi. Njena slabost je tudi možnost pojavljanja lažno pozitivnih ali lažno negativnih rezultatov (Logan in Edwards, 2005).

2.3 VERIŽNA REAKCIJA S POLIMERAZO V REALNEM ČASU

PCR v realnem času je novejša metoda, katero so razvili kot nadgradnjo klasične metode PCR (Klein, 2002; Richards in sod., 2004; Weng in sod., 2005). Reakcija poteka v cikličnem termostatu, kjer se temperatura zvezno spreminja v ponavljajočih se ciklih, podobno kot pri klasičnem PCR. Vsak cikel poteka v dveh korakih:

- Denaturacija dvoverižne DNA pri temperaturi, višji od 90 °C,
- Prileganje oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde pri temperaturi 50-60 °C ter podaljševanje (Mackay, 2004).

Ta metoda se od klasične oblike PCR razlikuje v odkrivanju nastalih pomnožkov. Pri klasičnem PCR določamo pomnožke s pomočjo gelske elektroforeze, s hibridizacijo ali ELISA, medtem ko poteka dokazovanje produktov pri PCR v realnem času med samim pomnoževanjem dela DNA (Klein, 2002; Mackay, 2004). Pomnoževanje in dokazovanje pomnožkov potekata sočasno. Spremljanje pomnoževanja DNA omogoča dodatek fluorescentnega barvila, ki ga poleg para oligonukleotidnih začetnikov dodamo v reakcijsko mešanico (Mackay in sod., 2002). Povečanje količine pomnožka zaznamo kot povečanje fluorescentnega signala, ki je posledica povezave med fluoregenim barvilom in pomnožkom oziroma njune hibridizacije (Mackay, 2004).

2.3.1 Glavne metode določanja pomnožkov

Za določanje pomnožkov pri PCR v realnem času lahko uporabimo nespecifične in specifične metode (Mackay in sod., 2002).

2.3.1.1 Nespecifične metode

Za nespecifično določanje pomnožkov uporabljamo fluorescentna barvila, ki se nespecifično vgradijo v dvoverižno molekulo DNA. Primer je barvilo SYBRGreen, ki je nadomestilo etidijev bromid, katerega se uporablja pri klasičnem PCR, kjer pomnožke določimo z agarozno elektroforezo in nato agarozni gel oziroma DNA barvamo z etidijevim bromidom. Danes se etidijev bromid zaradi strupenosti skoraj ne uporablja več (Mackay in sod., 2002).

Barvilo SYBRGreen samo po sebi ne fluorescira. Ko se vgradi v dvojno vijačnico molekule DNA, oddaja fluorescenco. Splošno je indikator pomnožkov (Kesanopoulos in sod., 2005; Liu in Zhang, 2007). Fluorescentni signal je po vgraditvi v dvoverižno strukturo DNA nespecifičen, kar pomeni, da se lahko vgradi tudi med dimere oligonuklotidnih začetnikov, če le ti nastajajo. To je slaba lastnost barvila SYBRGreen, saj je tako verjetnost lažno pozitivnih produktov večja (Giulietti in sod., 2001).

Uporaba barvila SYBRGreen pri PCR v realnem času narašča zaradi svoje preprostosti in nizke cene. V številnih primerih omenjeno barvilo uporabljajo za določanje patogenih bakterij kot so *Escherichia coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* (Nam in sod., 2004; Murphy in sod., 2007) in virusov (Santhosh in sod., 2007; Dhar in sod., 2008).

2.3.1.2 Specifične metode

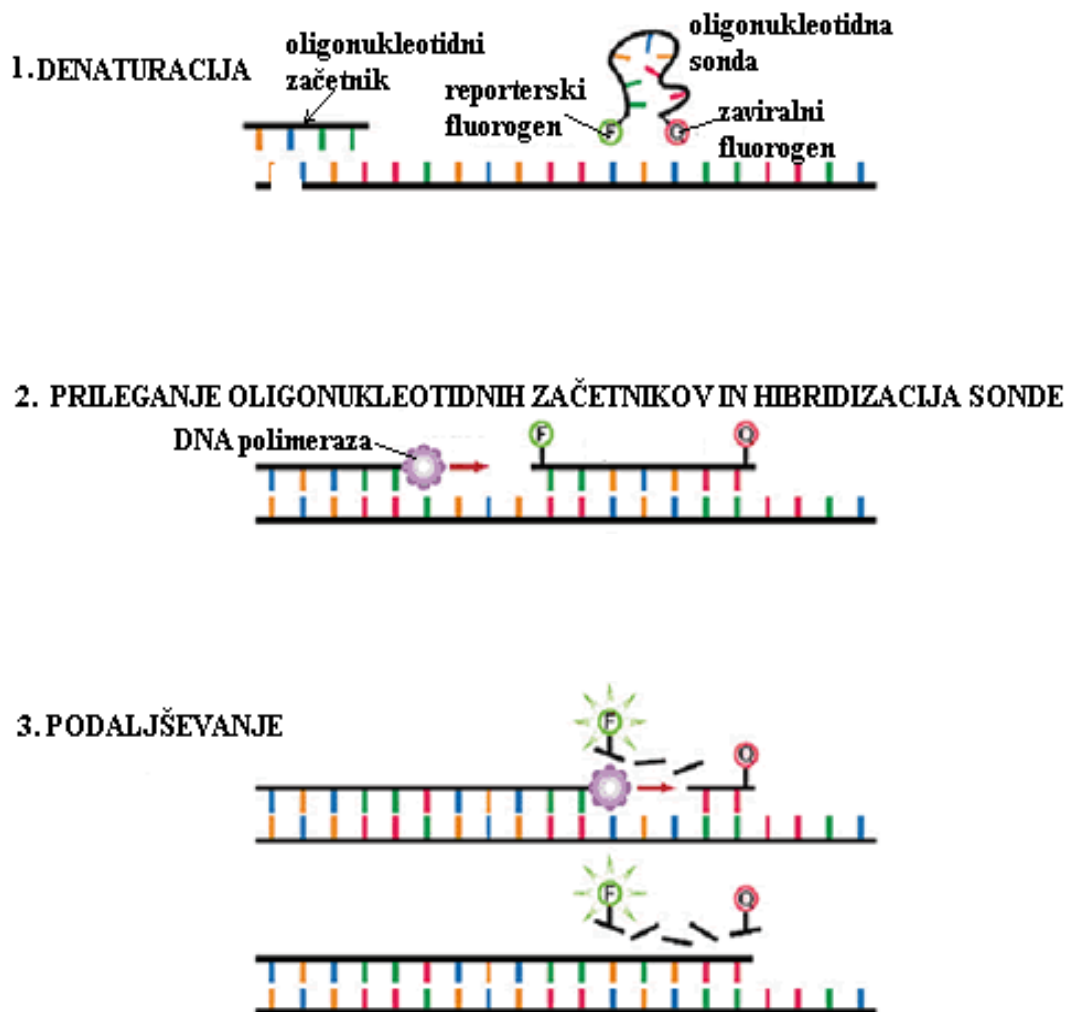
Specifičnost nastalih pomnožkov lahko odkrivamo z oligonukleotidnimi sondami, ki so označene s fluorofori. Oligonukleotidna sonda se veže na odsek tarčne DNA med obema oligonukleotidnima začetnikoma (Hein in sod., 2006). Najpogosteje se uporablja *TaqMan*-sonda. *TaqMan*-sonda je 5' nukleazna sonda, ki je na 5' koncu označena z reporterskim fluorogenom, ki je ponavadi 6-karboksi-fluorescein (6-FAM), na 3' koncu pa se nahaja zaviralni fluorogen, ki pa je največkrat 6-karboksi-tetrametil-rodamin (TAMRA). V preglednici 3 so podani absorpcijski in emisijski maksimumi različnih reporterskih fluorogenov (Mackay, 2004).

Preglednica 4: Absorpcijski in emisijski maksimumi različnih reporterskih fluorogenov (Lee in sod., 2004)

Reporterski fluorogen	Absorpcijski maksimum (nm)	Emisijski maksimum (nm)
fluorescein	492	520
FAM	494	518
TAMRA	565	605
ROX	585	605
SYBR Gold	495	537
SYBR Green I	494	521
Texas Red	583	603

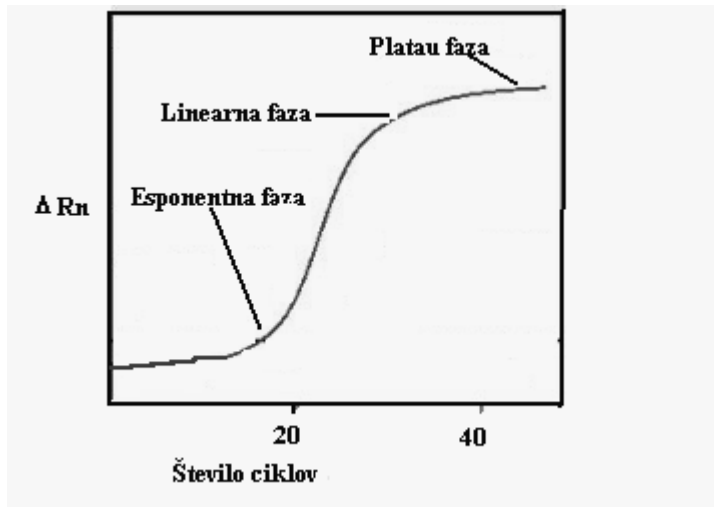
V molekuli oligonukleotidne sonde sta reporterski in zaviralni fluorogen blizu skupaj zato, da zaviralni fluorogen uspešno zavira fluoresciranje reporterskega fluoregena (Mackay, 2004). V stopnji prileganja in podaljševanja (slika 7) se sonda veže na enoverižne molekule DNA skupaj z oligonukleotidnim začetnikom. Ob podaljševanju oligonukleotidnega začetnika z encimom *Taq* DNA-polimeraza, ki ima 5'-eksonukleazno aktivnost, pride do hidrolize sonde in se na ta način reporterski fluorogen odcepi. Ker se fluorogena ločita, se razdalja med reporterskim in zaviralnim fluorogenom povečuje in zato zaznamo povečanje fluorescentnega signala, ki ga sproti merimo, torej v realnem času (Mackay, 2004).

Osnova merjenju intenzitete fluorescence z metodo dvojno označenih oligonukleotidnih sond je proces FRET (fluorescentni resonančni prenos energije). FRET je spektroskopski proces, pri katerem gre za prenašanje energije med molekulami, ki so oddaljene za 10-100 Å in imajo prekrivajoče emisijske in absorpcijske spektre. Prenos energije poteka od reporterskega k zaviralnemu fluorogenu, ki oddaja energijo pogosteje v obliki toplote kot pa fluorescence (Mackay, 2004). Z uporabo oligonukleotidnih sond se je specifičnost metode PCR v realnem času povečala, saj poleg specifičnih oligonukleotidnih začetnikov uporabljamo tudi specifične sonde (Lee in sod., 2004). Slika 7 prikazuje potek PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo.



Slika 8: Princip PCR v realnem času z dvojno označeno oligonukleotidno sondo (Guedry, 2009)

Rezultat PCR v realnem času predstavlja fluorescentni signal, ki se meri v ciklih, v katerih je podvojevanje linearno (Mackay, 2004; Richards in sod., 2004). Nepretrgano spremljanje poteka reakcije v vsakem ciklu omogoči, da izmerimo količino pomnožka, ko je reakcija še v eksponentni fazi. To naredimo tako, da na osnovi izmerjenih podatkov narišemo krivuljo, katera podaja odvisnost intenzitete fluorescence (ΔR_n) posameznih vzorcev od števila ciklov. Krivulja je sestavljena iz eksponentne, linearne in plato faze (slika 9). Na eksponentnem delu krivulje določimo linijo fluorescenčnega praga, ki predstavlja tisto intenziteto fluorescence, ki je večja od fluorescence ozadja. To točko izrazimo kot vrednost Ct (Klein, 2002). Linearni fazi sledi plato faza, kjer se zaradi zmanjšanja koncentracije oligonukleotidnih začetnikov ter akumulacije inhibitorjev reakcija upočasni in intenziteta fluorescentnega se ne povečuje več. Natančnost vrednosti Ct je odvisna od fluorogena in njegove koncentracije, začetne količine tarčne DNA, občutljivosti sistema in sposobnosti sistema, da razloči med specifičnim fluorescentnim signalom in fluorescentnim signalom ozadja (Mackay, 2004).



Slika 9: Emisija fluorescence pri PCR v realnem času (What is..., 2009)

PCR v realnem času se od klasičnega PCR razlikuje tudi po tem, da je izvedbeno manj zahteven in časovno manj zamuden. PCR v realnem času ima večjo občutljivost kot klasična oblika PCR, kar je povezano z manjšo začetno količino DNA, to pa je zelo uporabno takrat, ko delamo z omejeno količino tkiva oziroma vzorca (Dhar in sod., 2008). Za PCR v realnem času je značilno tudi, da ima dobro ponovljivost, omogoča kvantitativno merjenje, ima majhno možnost kontaminacije zaradi poteka v popolnoma zaprtem sistemu, je zelo specifična metoda zaradi uporabe specifičnih sond, lahko se hkrati analizira veliko število vzorcev (Logan in Edwards, 2005; Santhosh in sod., 2007).

2.3.1 PCR v realnem času za določanje bakterij rodu *Salmonella* v živilih

Chiu in sodelavci (2005) so s PCR v realnem času določali bakterije rodu *Salmonella* (*S. Trphimurium*, *S. Typhi* in *S. Enteritidis*) v piščančjem mesu in polnomastnem mleku. Za določanje so uporabili oligonukleotidna začetnika ITSF in ITSr. Pri 40 sevih bakterij rodu *Salmonella* so z omenjenima oligonukleotidnima začetnikoma dobili pozitivne rezultate, medtem ko so pri 48 vzorcih, ki so vsebovali druge vrste bakterij, dobili negativne rezultate. Izkazalo se je, da sta omenjena oligonukleotidna začetnika zelo uporabna za določanje bakterij rodu *Salmonella* v predhodno kontaminirani hrani. Občutljivost analize je znašala $1-9 \times 10^3$ cfu na gram vzorca. Ko pa so izvedli predhodno 8 urno obogatitev, pa je bila občutljivost nižja, to je 1-9 cfu na gram oziroma mililiter vzorca.

Malorny in sodelavci (2004) so izvedli analizo s PCR v realnem času, v katero so vključili 110 sevov bakterij rodu *Salmonella* in 87 drugih vrst bakterij v hrani. Za določanje bakterij rodu *Salmonella* so uporabili oligonukleotidna začetnika ttrC in ttrA ter oligonukleotidno TaqMan-sondo. Detekcija pri koncentraciji 10^4 cfu/ml je bila 100 %, medtem ko je bila pri koncentraciji 10^3 cfu/ml 70 %. Izvedli so tudi analizo s predhodno obogatitvijo vzorcev hrane, kjer so uporabili 110 različnih vzorcev hrane, kot so mleto meso, perutnina, ribe in surovo mleko. Natančnost pri izvedbi analize s PCR v realnem času je bila 100 % v primerjavi s klasičnimi metodami. Celoten postopek z inkubacijo je trajal le 24 ur.

Made in sodelavci (2004) so z metodo PCR v realnem času analizirali 1293 naravno kontaminiranih vzorcev hrane. 55 vzorcev hrane je vsebovalo salmonele. Izmed njih so kar v 45 vzorcih hrane salmonele potrdili tudi s klasično mikrobiološko metodo. Specifičnost preiskave je znašala 99,2 %, občutljivost je bila 100 % in natančnost je bila 99,2 %. Za izvedbo celotne analize so potrebovali 27 ur.

Piknova in sodelavci (2005) navajajo, da so za določitev bakterij rodu *Salmonella* uporabili gen *finC*. Omenjeni gen se uspešno uporablja kot tarčni del molekule DNA za detekcijo bakterij rodu *Salmonella* s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov in oligonukleotidne sonde. Uspešno so določili 53 izolatov bakterij rodu *Salmonella*, od tega kar 38 različnih sevov.

Ledinek (2006) je v diplomskem delu določal občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica*. Za določanje je uporabil oligonukleotidna začetnika ST11/ST15. Dokazal je, da je občutljivost PCR v realnem času boljša od klasičnega PCR. Določil je tudi optimalno koncentracijo oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15, ki je bila 600 nM. Pri omenjeni koncentraciji ST11/ST15 je določil naklon standardne krivulje, ki je znašal -2,69. Za oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 je izvedel primerjavo med programom pomnoževanja Sallis2b za klasični PCR in univerzalnim programom aparata Real-time 7500. Pri tem poizkusu je ugotovil, da je količina nastalih dimerov pri PCR v realnem času manjša, kadar je uporabil program Sallis2b, kar pomeni bolj natančne rezultate kot jih dobimo po pomnoževanju z univerzalnim programom aparata Real-time 7500. Izvedel je tudi primerjavo priprave DNA s toplotno in alkalno lizo. Pri obeh lizah je uspešno določil bakterij vrste *S. enterica* do koncentracije $2,0 \times 10^2$ cfu/ml. Odločil se je za toplotno lizo, ker je v primerjavi z alkalno lizo dobil več pomnožka. Pri določanju bakterij vrste *S. enterica* s PCR v realnem času v mešanih kulturah, kjer je dodal vzorcem bakterije vrste *L. monocytogenes* in *E. coli*, je določil občutljivost za bakterije vrste *S. enterica*, ki je bila 10^4 cfu/ml.

2.3.2 PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilih

O'Grady in sodelavci (2008) so določili bakterije vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času v različnih živilih kot so sveži sir, meso, mleko zelenjava in ribe, pri katerih so izvedli predhodno obogatitev živila. Za določitev omenjenih bakterij so uporabili sekvence gena *ssrA*. Dosežena občutljivost PCR v realnem času je bila 1-5 cfu v 25 ml/g vzorca hrane, za določitev pa so potrebovali 30 ur.

Berrada in sodelavci (2006) so s PCR v realnem času in s klasičnimi mikrobiološkimi tehnikami določali bakterije rodu *Listeria* v različnih vrstah solate. V analizo so vključili 77 vzorcev. V vzorcih solate so tako s PCR kot tudi s klasičnimi metodami trikrat določili bakterije rodu *Listeria*, in sicer so našli v solatah Valencia in v Poletni solati bakterije vrst *L. grayi* (2) in *L. innocua* (1). Koncentracija bakterij vrst *L. grayi* in *L. innocua* je znašala 139 cfu/g.

Berrada in sodelavci (2006) so v umetno kontaminiranih vzorcih živil določali tudi bakterije vrste *L. monocytogenes*. Uporabili so koncentracije celic od 10^1 - 10^5 cfu/ml. Za določitev so uporabili specifične oligonukleotidne začetnike in specifično sondo. Iz standardne krivulje so odčitali vrednost R^2 , ki je znašala 0,98 in naklon premice, ki je bil enak 3,25. Zmogljivost so izračunali po formuli $E = 10^{+1/-m} - 1$, kjer je m naklon standardne krivulje. Koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* določeno s PCR v realnem času so opisali z enačbo $C_T = -3,25 \log cfu + 33,94$, kjer je $cfu = 10^{[(C_T - 33,94) / -3,25]}$. Določili so, da je meja detekcije 10 cfu/ml.

Ledinek (2006) je v svojem diplomskem delu preverjal specifičnost novih parov oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2. Specifičnost je ugotavljal na 28 različnih sevih bakterij vrste *L. monocytogenes*. Razen pri sevu *L. monocytogenes* ŽM63 je dobil pozitivne rezultate. Izračunal je, da je specifičnost za oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 92% in za SBF1/SBR2 88%. Občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 je bila po optimiranju reakcije v obeh primerih enaka in je znašala 10^3 cfu/ml.

Rossmann in sodelavci (2006) navajajo, da so za določitev bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času uporabili tarčni gen *prfA* s specifično sekvenco dolgo 274 bp. Določali so 100 različnih sevov bakterij *L. monocytogenes*, 30 drugih bakterij rodu *Listeria* in 29 bakterij, ki niso bile listerije. Za določanje so uporabili specifične oligonukleotidne začetnike in TaqMan-sondo. Postopku PCR v realnem času so dodali še predhodno obogatitev vzorcev. Ugotovili so, da predstavlja teoretična meja detekcije ena kopija tarčnega gena, medtem ko so praktično določili s pomočjo PCR v realnem času, da je meja detekcije pri 5 kopijah tarčnega gena. V primeru, ko so izvedli še predhodno obogatitev, so določili občutljivost 7,5 cfu/25 ml.

Nogva in sodelavci (2000) so določili občutljivost PCR v realnem času za bakterije vrste *L. monocytogenes* v območju 6-10 cfu/ml.

2.3.3. PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* v živilih

Wang in sodelavci (2004) so izvedli PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij rodu *Salmonella* v surovem mesu. Za preiskavo so uporabili dva para oligonukleotidnih začetnikov. Za določitev bakterij rodu *Salmonella* so uporabili oligonukleotidna začetnika SF in SR, ki sta specifična za gen *invA* in pomnožita 85 bp velik pomnožek. Pri določitvi bakterij vrste *L. monocytogenes* so uporabili gen *hlyA* in zanj značilni par oligonukleotidnih začetnikov, to je LF in LR. Pomnožek je velik 98 bp. PCR so izvajali v aparatu LightCycler na osnovi različnih fluorescenc in temperatur taljenja (T_m). Za pripravo DNA so uporabili tri različne postopke. V prvem postopku so 100 μ l komercialne kemikalije (Genereleaser) dodali k 100 μ l obogatitvene suspenzije, v kateri so namnožili salmonele in listerije. Mešanico so nato 10 minut segrevali v vodni kopeli ter jo nato 5 minut ohlajali na ledu. V nadaljnjem postopku so mešanico 5 minut centrifugirali na 12.000 obratih na minuto. Za analizo so uporabili 100 μ l supernatata, ki so ga centrifugirali 2 min na 12.000 obratih (QIAprep Spin Miniprep Kit). Pelet so nato dvakrat sprali s 70 % etanolom in supernatant zavrgli. Peletu so dodali 10 μ l destilirane vode in 1 μ l vzorca uporabili za PCR v realnem času.

Pri drugem postopku so 200 μ l predhodno obogatene kulture dodali 400 μ l pufra za lizo in vsebino nato 1 min mešali na namiznem mešalu. Temu je sledilo 5 minutno centrifugiranje na 12.000 obratih na minuto. Za analizo so uporabili pelet, ki so ga raztopili v 200 μ l pufra za lizo, ki je vseboval glikogen in v 4 μ l proteinaze K. Vse skupaj so premešali in inkubirali 1 uro na 37 °C. Nato so suspenziji dodali 300 μ l NaI in 500 μ l izopropanola ter centrifugirali 5 minut pri 12.000 obratih. Pelet so izpirali z 35 % izopropanolom, ga sušili in nato raztopili v 20 μ l sterilne vode in uporabili za PCR v realnem času.

Pri tretjem postopku so 400 μ l pufra za lizo so dodali 200 μ l predhodno obogatene kulture in 1 minuto mešali na namiznem mešalu ter nato 5 minut centrifugirali pri 12.000 obratih na minuto. Pelet so nato raztopili v 200 μ l pufra za lizo, ki je vseboval glikogen. Suspenzijo so 10 minut segrevali v vodni kopeli in nato 5 minut ohlajali na ledu. Ohlajeni suspenziji so dodali 300 μ l raztopine natrijevega jodida, 500 μ l izopropanola in nato vse skupaj centrifugirali 2 min na 12.000 obratih. Pelet so nato dvakrat sprali z 70 % etanolom in supernatant zavrgli. Peletu so dodali 10 μ l destilirane vode in 1 μ l vzorca uporabili za PCR v realnem času.

Ugotovili so, da lahko s prvim postopkom določijo bakterije vrste *L. monocytogenes* in bakterije rodu *Salmonella* v manj kot 10 urah. Burtscher in sodelavci (1999) navajajo, da lahko s tretjim postopkom zaznamo že zelo majhno koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij rodu *Salmonella* zaradi uporabe NaI. Omenjeni avtorji trdijo, da lahko dosežejo občutljivost, ki je nižja od 10 celic na ml vzorca, vendar omenjen postopek traja od 1-2 dni. Wang in sodelavci (2004) so po prvem postopku priprave DNA določili v 10 urah 3-4 cfu/g vzorca surovega mesa za bakterije vrst *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis*.

Bhagwat (2003) navaja postopek, s katerim lahko sočasno določimo tri patogene vrste bakterij (*E. coli*, *L. monocytogenes* in *Salmonella*) v umetno kontaminiranih vzorcih zelenjave (zeleno zelje, brokoli, cvetača, koriander). Za umetno kontaminacijo so uporabili 1 – 1000 cfu

posamezne vrste bakterij, ki so jih dodali v vodo, s katero so pred pakiranjem prali zelenjavo. Vse vzorce so obogatili v gojišču UPB (16 ur pri 37 °C). DNA so pripravili komercialnim setom reagentov za lizo bakterijskih celic. Občutljivost sočasnega določanja patogenih bakterij s PCR v realnem času je bila 1-10 cfu/25 g za bakterije *E. coli* in *Salmonella* ter za *L. monocytogenes* 1000 cfu/25 g. Pravilnost oziroma specifičnost pomnožkov so določali iz temperature taljenja (T_m) posameznega pomnožka.

D'Urso in sodelavci (2009) so s pomočjo nove filtracijske metode in PCR v realnem času določili bakterije vrst *L. monocytogenes* in *S. enterica* v vzorcih hrane. Nova filtracijska metoda omogoča odstranjevanje mrtvih ali poškodovanih celic bakterij vrst *L. monocytogenes* in *S. enterica*. Za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času so uporabili tarčni gen *prfA*, za *S. enterica* pa gen *invA*. V obeh eksperimentih so dobili približno enake rezultate. Določili so, da je standardni naklon pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* -3,3094 ter za bakterije vrste *S. enterica* -3,3824, kar je v obeh primerih blizu idealnega, ki znaša -3,32. Učinkovitost encimske reakcije za bakterije vrst *S. enterica* je znašala 0,9754 in za *L. monocytogenes* 1,0053. Tudi korelacijska koeficienta sta bila blizu idealnemu, za *S. enterica* 0,9975, za *L. monocytogenes* pa 0,9969.

Jofre in sodelavci (2005) so določali bakterije vrste *L. monocytogenes* in bakterije rodu *Salmonella* v kuhanem pršutu. Da bi zagotovili uspešno detekcijo omenjenih bakterij, so izvedli predhodno obogatitev v BPW in HF. Za določanje bakterij rodu *Salmonella* so uporabili gen *invA*, ki da pomnožek velikosti 284 bp, za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* pa gen *prfA*, katerega pomnožek je velik 274 bp. Zaradi podobnosti pomnožkov obeh bakterij, so želeli uvesti nov par oligonukleotidnih začetnikov.

Oligonukleotidni začetniki Lip1-Lip3 se uporablja za določanje *L. monocytogenes* in daje pomnožek velik 215 bp. Ugotovili so, da se njihova pomnožka ne ujemata z nobeno bakterijsko sekvenco DNA, razen s tarčno molekulo DNA bakterij vrste *L. monocytogenes*. Praktično so to specifičnost preverili s testiranjem različnih sevov bakterij vrste *L. monocytogenes* in potrdili 100% specifičnost.

2.4 SPLOŠNE LASTNOSTI MLEKA

Mleko je biološka tekočina, izloček mlečne žleze sesalcev in je po porodu prva, popolna in lahko prebavljiva hrana novorojenega sesalca (Spreer, 1998; Bajt, 2002). Mleko je sestavljeno tako, da pokriva prehranske potrebe mladičev svoje vrste toliko časa, da ti začno zauživati drugo hrano (Bajt, 2002).

Mleko je pridobljeno z molžo živali in je namenjeno za neposredno uporabo ali za predelavo v različne mlečne izdelke. Je edinstveno živilo, ki nam ga je dala narava in ga lahko uživamo nespremenjenega (Bajt, 2002). Mavrin in Oštir (2002) navajata, da se mleko posameznih sesalcev med seboj razlikuje. Vsebuje več kot 200 sestavin, katerih deleži lahko zelo variirajo, saj so odvisni od mnogih dejavnikov: pasme in vrste živali, sestave in količine krme, zdravstvene kondicije živali, laktacijskega obdobja (Spreer, 1998). V preglednici 5 je predstavljena sestava kravjega mleka in mleka drugih živali.

Preglednica 5: Povprečne sestave različnih vrst mleka (Spreer, 1998)

	Suha snov (%)	Maščobe (%)	Celotne beljakovine (%)	Kazein (%)	Sirotkine beljakovine (%)	Laktoza (%)
Človek	12,4	3,8	1,0	0,4	0,6	7,0
Krava	13,0	4,0	3,4	2,8	0,6	4,8
Koza	13,2	4,5	2,9	2,5	0,4	4,1
Ovca	19,3	7,3	5,5	4,6	0,9	4,8
Oslica	8,5	0,6	1,4	0,7	0,7	6,1
Kobila	11,2	1,9	2,5	1,3	1,2	6,2
Bivol	17,2	7,4	3,6	-	-	5,5
Kamela	13,6	4,5	3,6	2,7	0,9	5,0
Lama	16,2	2,4	7,3	6,2	1,1	6,0
Jak	17,3	6,5	5,8	-	-	4,6
Los	21,5	10,0	8,4	-	-	3,8
Severni jelen	33,1	16,9	11,5	-	-	2,8

Z oznako mleko razumemo kravje mleko, ki ima nespremenjeno sestavo in je pridobljeno z redno, neprekinjeno, popolno molžo zdravih, pravilno krmljenih krav, ne glede na to, ali je namenjeno za neposredno porabo ali za predelavo. Z izrazom mleko označujemo surovo mleko in tudi predpakirano mleko za pitje, ki je toplotno obdelano (Bajt, 2002).

V mleku se nahaja več kot 90 sestavin. Najpomembnejše med njimi navajata Bajt (2002) in Tratnik (1998) (preglednica 6).

Preglednica 6: Najpomembnejše sestavine kravjega mleka (Bajt, 2002; Tratnik, 1998)

Sestavina	%
Maščoba	11-14
Beljakovine	2,6-4,2
Laktoza	4,6-4,9
Minerali	0,6-0,8
Suha snov	11-14
Voda	86-89

Razen navedenih sestavin vsebuje mleko tudi zelo majhne količine vitaminov, encimov, prostih kislin, plinov, barvil in aromatičnih spojin (Mavrin in Oštir, 2002).

Voda predstavlja največji delež mleka, to je od 86 % do 89 %. Nahaja se v dveh oblikah, in sicer kot prosta voda, katere je med 82,5 % in 87 % ter vezana ali hidratacijska voda, ki jo je med 1,75 % in 3,5 % (Mavrin in Oštir, 2002). Tratnik (1998) opisuje, da se vezana voda nahaja absorbirana v hidratacijskem sloju sestavin suhe snovi, ki so kazein, (kjer je je okoli 50 %), albumini in globulini (okoli 30 %), membrane maščobnih kroglic (okoli 15 %), laktoza in ostale sestavine, ki je vsebujejo okoli 5 %.

Beljakovine so najpomembnejša sestavina mleka. To so visokomolekularne spojine, ki so večinoma občutljive za kemijske in fizikalne vplive, zaradi česar hitro spremenijo svojo zgradbo in lastnosti. Mleko vsebuje več sto različnih vrst beljakovin, vendar jih je večina samo v sledovih oziroma v zelo majhnih količinah (Mavrin in Oštir, 2002). Mavrin in Oštir (2002) ter Spreer (1998) navajajo najpomembnejše beljakovine mleka, katere so predstavljene v preglednici 7.

Preglednica 7: Deleži najpomembnejših beljakovin mleka (Mavrin in Oštir, 2002) in njihove specifične karakteristike (Spreer, 1998)

Beljakovine	Delež od skupne količine (%)	pH	Molekulska teža (Dalton)
Kazeini skupno	79,5	4,6	2-18 x 10⁸
α-kazein	45-55	5,1	22500
κ-kazein	8-15	4,1-4,5	19000
β-kazein	23-35	5,3	24000
γ-kazein	3-7	5,8-6,4	11-20 x 10³
Sirotkini proteini skupno	19,3	/	/
β-laktoglobulini	7-12	5,2	18300
Albumini krvnega seruma	0,7-1,3	4,8	69000
α-laktoalbumini	2-5	5,1	14000
Imunoglobulini	1,9-3,3	4,6-6,0	15-100 x 10⁴
Proteoze-peptoni	2-6	3,7	4-40 x 10³

Beljakovine mleka niso samo pomembne pri izdelavi tradicionalnih mlečnih izdelkov, temveč so nosilci funkcionalnih značilnosti in imajo visoko hranilno vrednost. Primer je kazein, ki je glavna komponenta sira (Spreer, 1998). Kot smo že omenili, je kazein najpomembnejša beljakovina mleka, katero najdemo v mleku v več oblikah kot so: α-kazein, κ-kazein, β-kazein in γ-kazein. Te oblike se med seboj razlikujejo po molekulskih masah ter se med seboj povezujejo v manjše ali večje kroglaste strukture, katere imenujemo kazeinske podmicele (Mavrin in Oštir, 2002). Kazeinske podmicele se s pomočjo kalcijevega fosfata povezujejo v kazeinske micle. Velikost teh micel je odvisna od vsebnosti kalcija v mleku vse skupaj pa je zelo povezano s tehnologijo in načinom izdelave sirov, saj je kazein sirarska beljakovina in je namen vsakega sirarja, da ga iz mleka čim bolj izloči (Bajt, 2002).

Poleg kazeina, so tehnološko najpomembnejše beljakovine mleka tudi sirotkine beljakovine. V to skupino beljakovin uvrščamo β -laktoglobuline, α -laktoalbumine, imunoglobuline, proteaza peptone, albumine krvnega seruma (Mavrin in Oštir, 2002). Od skupnih beljakovin sirotke v mleku prevladujejo α -laktoalbumini in β -laktoglobuline, katerih vsebnost je genetsko pogojena (Tratnik, 1998).

Sirotkine beljakovine so izrazito hidrofилne, zato so neobčutljive za učinkovanje kisline ali sirišča in ostajajo pri usirjanju kazeina nespremenjene ter raztopljene v sirotki. Razen proteaza peptonov so vse beljakovine sirotke občutljive na povišano temperaturo in se začnejo iz mleka izločati že pri 60 °C. V mleku se to izločanje ne opazi, vežejo se namreč na kazeinske micelle ter tako preprečijo učinkovito delovanje sirišča in povezovanje parakazeinskih micel s kalcijem. Koagulum je zaradi tega rahlejši in slabše izloča sirotko, saj v tridimenzionalni parakazeinski mreži nastane med parakazeinskimi micelami manjše število kalcijevih mostičkov. Kapilarni sistem v koagulumu ni ne dovolj čvrst in ne prepusten, zato sirotka ostaja v njem ujeta. Najbolj izrazito izločanje sirotkinih beljakovin ali njihova denaturacija je pri 10- do 20-minutnem segrevanju sirotke na 90 °C do 95 °C, kar sirarji s pridom uporabljajo pri izdelavi albuminske skute.

Te beljakovine v okolju s primerno temperature in kislostjo ohranjajo svoje naravne lastnosti, ko pa se temperature in kislost povišata, se tudi njihove lastnosti spremenijo. Izgubijo namreč svojo naravno topnost. Pravimo, da beljakovine denaturirajo (Mavrin in Oštir, 2002).

β -laktoglobulin je najpomembnejša beljakovina, katero najdemo v mleku večine prežvekovalcev, ni pa prisotna v mleku doječih žensk. Dereck in sodelavci (2006) navajajo njeno antimikrobno aktivnost, kamor uvrščamo protibakterijski učinek, protivirusni učinek in učinek na patogene bakterije. Poleg antimikrobne aktivnosti pa so β -laktoglobulini tudi nosilci antikarcerogene aktivnosti in hipoholesteroličnega učinka.

α -laktoalbumin je značilna sirotkina beljakovina in jo je v sirotki bistveno manj kot β -laktoglobulina. Ima zelo pomembno vlogo pri sintezi laktoze v vimenu (Mavrin in Oštir, 2002). Tratnik (1998) navaja, da je to najbolj temperaturno odporna beljakovina sirotke.

Imunoglobulinov je v mleku malo, največ pa jih vsebuje kolostrum. Med vsemi sirotkinimi proteini so to najbolj termolabilne beljakovine (Tratnik, 1998). Uvrščamo jih med glikoproteine, ker vsebujejo tudi ogljikove hidrate, kot so heksoze in heksozamini. Te beljakovine predstavljajo naravno zaščito pred boleznimi oziroma patogenimi mikroorganizmi (Mavrin in Oštir, 2002).

3 MATERIAL IN METODE

3.1 MATERIAL

3.1.1 Bakterije

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili bakterije vrst *Listeria monocytogenes* ŽM58 in *Salmonella* Enteritidis ŽM348, ki sta del zbirke Laboratorija za živilsko mikrobiologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete.

3.1.2 Mikrobiološka gojišča

- Gojišče TSA (Tryptone Soya Agar, Oxoid CM 0131, Anglija)
- Gojišče UPB (Universal Preenrichment Broth, Difco 223510, ZDA)
- Gojišče HF (Half Fraser, Merck 1.10398.0500, Nemčija)
- Gojišče BPW (Buffered Peptone Water, Oxoid CM 0509, Anglija)
- Gojišče NA (Nutrient Agar, Oxoid CM3, Anglija)
- Gojišče XLD (Xylose Lysine Deoxycholate agar, Biolife 402206, Italija)
- Gojišče ALOA (Biolife 4016052, Italija)
- Fosfatni pufer (42,5 mg KH₂PO₄/l), (pH 7,2), (11161 Kemika, Zagreb)

Gojišča so bila pripravljena po navodilih proizvajalcev.

3.1.3 Reagenti

3.1.3.1 Reagenti za toplotno lizo bakterijskih celic

- Bi-destilirana sterilna voda (H₂O_{KEM})

3.1.3.2 Reagenti za lizo bakterijskih celic po postopku ABI

- Reagent PrepMan® Ultra Sample Preparation (Applied Biosystems 4322547, ZDA)

3.1.3.3 Reagenti za čiščenje bakterijskih celic

- Reagent PrepMan® Ultra Sample Preparation (Applied Biosystems 4322547, ZDA)
- Pufer TE (EDTA: Sigma E-5134; Tris: Promega H5131)
- 3M natrijev acetat (Sigma S-2889)
- Izopropanol (Merck 1.09634)
- Bi-destilirana sterilna voda (H₂O_{KEM})

3.1.3.4 Reagenti za PCR v realnem času

- SYBR® Green PCR Master Mix 2x (Applied Biosystems 4309155, ZDA):
 - Barvilo SYBR Green 1
 - AmpliTaq Gold DNA-polimeraza
 - Mešanica deoksinukleotid trifosfatov – dNTP (dATP, dTTP, dCTP, dGTP) z dUTP

- Pasivna Referenca 1 ROX
- Optimizirane komponente puфра
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije rodu *Salmonella* ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993):
 - ST11 (5` - AGC CAA CCA TTG CTA AAT TGG CGC A - 3`): 100 pmol/μl
 - ST15 (5` - GGT AGA AAT TCC CAG CGG GTA CTG -3`): 100 pmol/μl
- Par oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 za bakterije vrst *L. monocytogenes* (Ledinek, 2006):
 - SBF1 (5` - CAT AAA AAC TGG AGC GAA AAC AAT AA -3`): 10 pmol/μl
 - SBR1 (5` -TAA AGT GTA CCC CAG ATG GA -3`): 10 pmol/μl
- H₂O_{PCR} (Eppendorf 0032 006.159, Nemčija)

3.1.4 Živilo

Kot živilo smo uporabili surovo, polnomastno kravje mleko (domača proizvodnja) in sterilizirano mleko z 1,6 % mlečne maščobe (Alpsko mleko, Ljubljanske mlekarne).

3.1.5 Laboratorijska oprema

Laboratorijska oprema, ki smo jo uporabljali pri raziskovalnem delu, je navedena v preglednici 8.

Preglednica 8: Laboratorijska oprema

APARAT	OZNAKA	PROIZVAJALEC
PCR v realnem času	ABI Prism 7500	Applied Biosystems, ZDA
Avtomatske pipete in nastavki	P10, P100, P1000	Gilson, Francija
Avtoklav	Tip 250	Sutjeska, Jugoslavija
Centrifuga	Mini spin PLUS	Eppendorf, Francija
Hladilnik	/	LTH, Slovenija
	/	Gorenje, Slovenija
Inkubator	I-115C	Kambič, Slovenija
Mikrovalovna pečica	Cookgrill 1300	Sanyo, Japonska
Stresalnik	Vibromix 104EV	Tehtnica, Slovenija
Tehtnica	Mono Bloc PB 1502-S	Mettler Toledo, Švica
Vodna kopel	E7805028	Sutjeska, Jugoslavija
Zamrzovalnik (-20°C)	/	Gorenje, Slovenija

Poleg laboratorijske opreme, ki je navedena v preglednici 8, smo pri raziskovalnem delu uporabili tudi splošno laboratorijsko opremo: gorilnik, čaše, Eppendorfove mikrocentrifugirke (1,5 ml, 2 ml), epruvete, erlenmajerice, merilne valje, petrijevke, steklene palčke, stojala, Al folijo, pinceto, žlice.

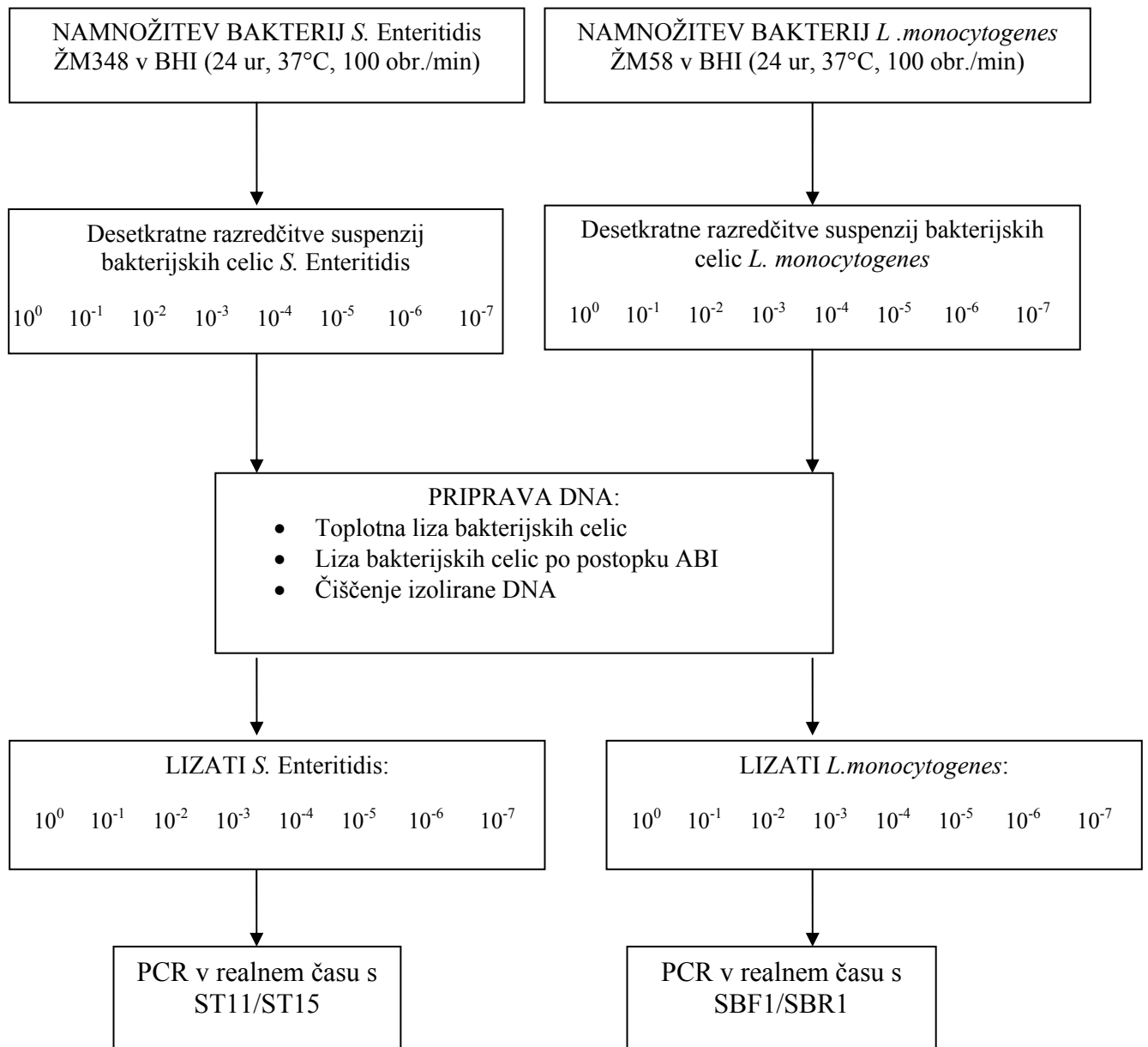
3.2 METODE

3.2.1 Potek eksperimentalnega dela

Za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* smo uporabili PCR v realnem času s specifičnima paroma oligonukleotidnih začetnikov ST11/ST15 (Aabo in sod., 1993) in SBF1/SBR1 (Ledinek, 2006). Namesto modificiranega programa SALLIS2b (Ledinek, 2006) smo za pomnoževanje specifičnih delov DNA obeh vrst bakterij uporabili univerzalni program aparata ABI Prism 7500 zato, da bi skrajšali čas preiskav. Ker na občutljivost PCR v realnem času vpliva način priprave DNA in prisotnost živila v izhodiščnem vzorcu, v katerem želimo določiti bakterije vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*, je naš eksperiment je potekal v več delih:

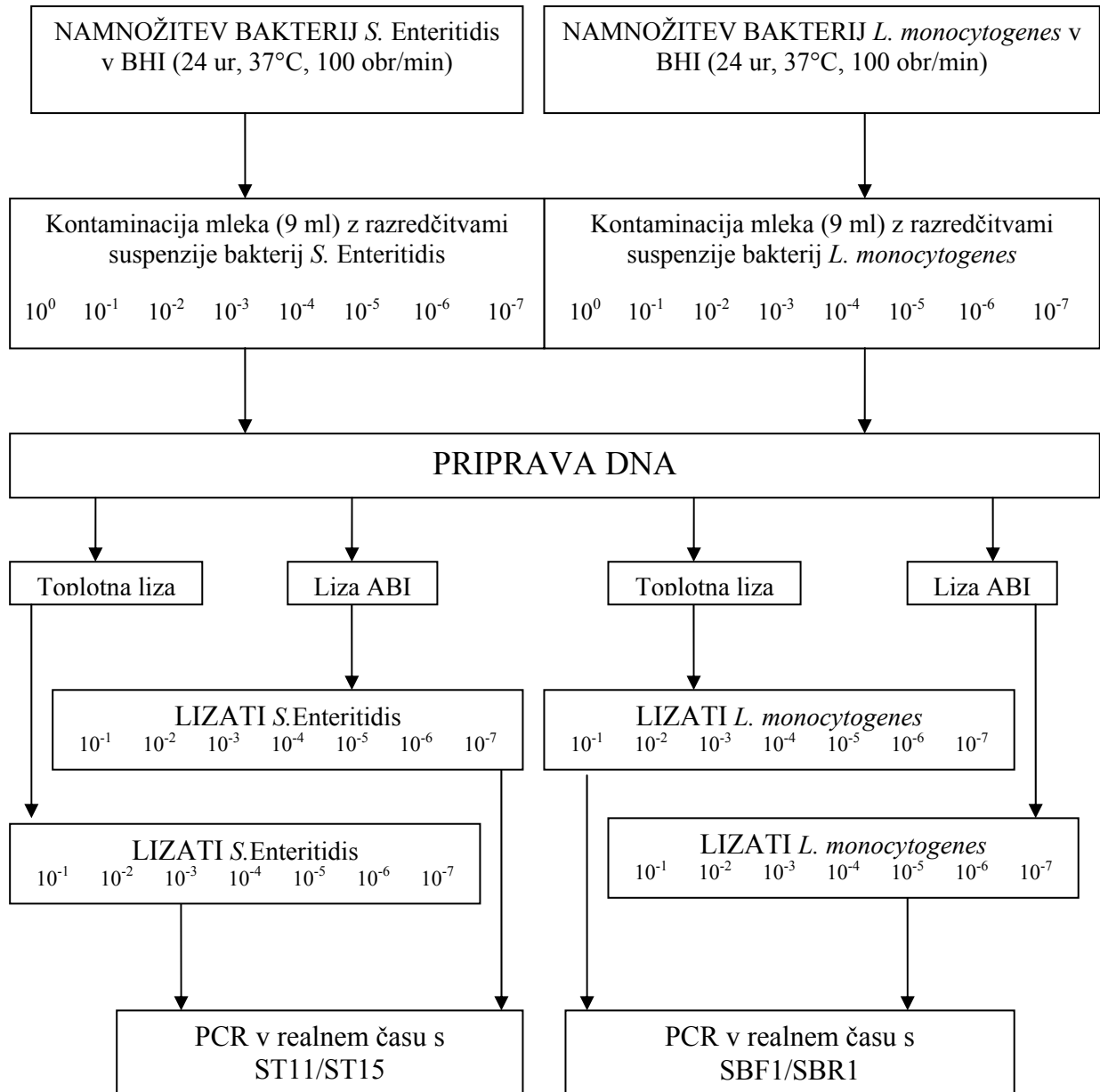
- V prvem delu smo DNA bakterij vrste *S. enterica* pripravili s toplotno lizo, z lizo bakterijskih celic po postopku ABI ter s čiščenjem bakterijske DNA po protokolu ABI. Določili smo občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15 po različnih načinih priprave DNA.
- V drugem delu smo DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* pripravili s toplotno lizo, z lizo bakterijskih celic po postopku ABI ter s čiščenjem bakterijske DNA po protokolu ABI. Določili smo občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1 po različnih načinih priprave DNA.
- V tretjem delu smo s PCR v realnem času določali bakterije vrste *S. enterica* v umetno kontaminiranem živilu in nato še po obogatitvi živila v različnih obogatitvenih suspenzijah. Bakterijsko DNA smo pripravili s toplotno lizo in z lizo bakterijskih celic po postopku ABI. Določili občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *S. enterica* v živilu in po obogatitvi živila po dveh načinih priprave DNA.
- V četrtem delu smo s PCR v realnem času določali bakterije vrste *L. monocytogenes* v umetno kontaminiranem živilu in nato še po obogatitvi živila v različnih obogatitvenih suspenzijah. Bakterijsko DNA smo pripravili s toplotno lizo in z lizo bakterijskih celic po postopku ABI. Določili smo občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v živilu in po obogatitvi živila po dveh načinih priprave DNA.
- V zaključnem delu smo s PCR v realnem času in sočasno določili bakterije vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* v umetno kontaminiranem živilu ob naravno v živilu prisotnih mikroorganizmih po obogatitvi živila. Bakterijsko DNA smo pripravili z lizo bakterijskih celic po postopku ABI. Določili smo občutljivost in specifičnost PCR v realnem času.

Na sliki 10 so prikazane glavne stopnje eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* kot čistih kultur po različnih načinih priprave DNA z univerzalnim programom aparata ABI Prism 7500.



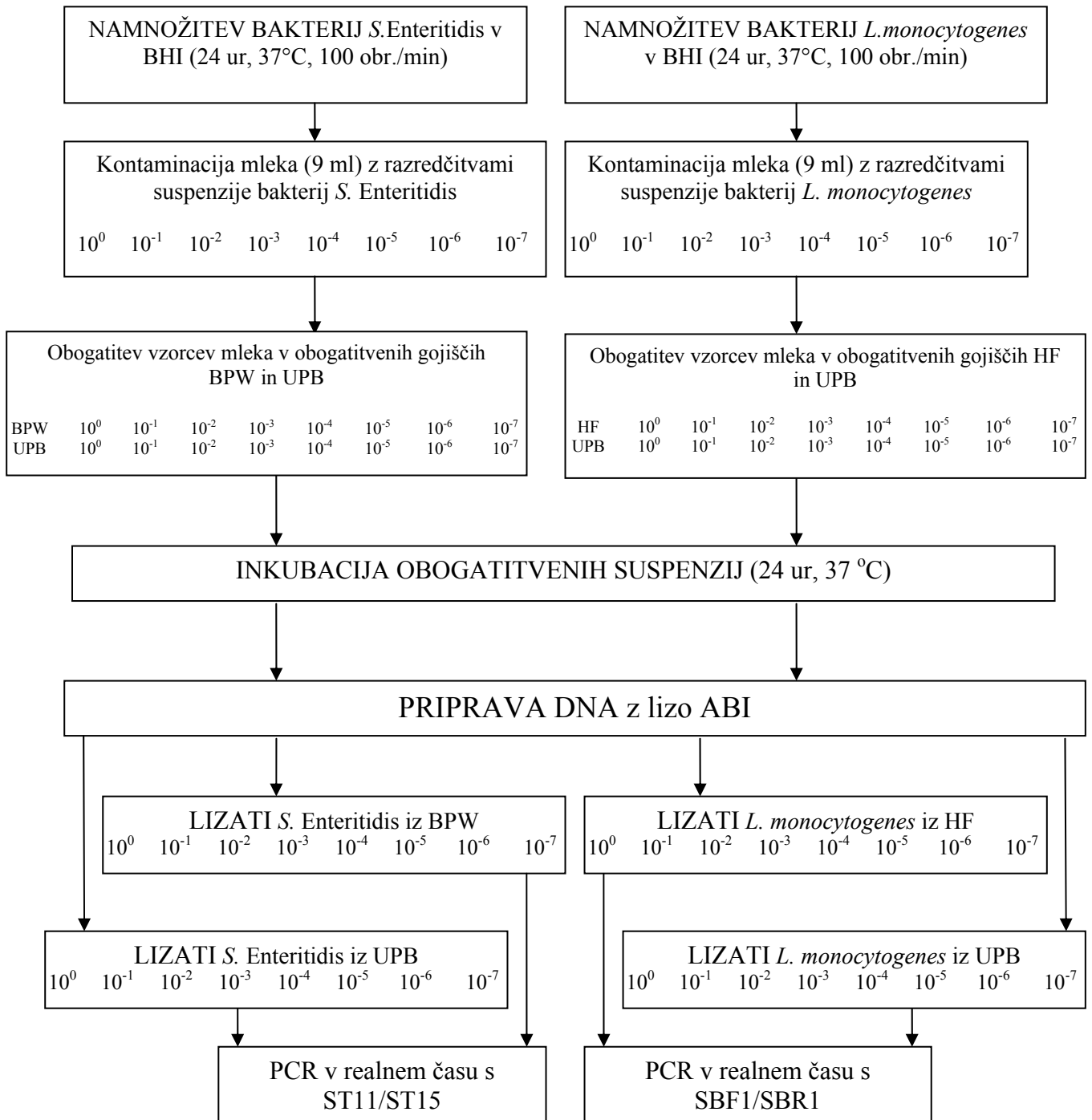
Slika 10: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes*

Na sliki 11 so prikazane glavne stopnje eksperimentalnega dela določitve občutljivosti in PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* direktno v živilu po različnih načinih priprave DNA z univerzalnim programom aparata ABI Prism 7500.



Slika 11: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* v umetno kontaminiranem živilu

Na sliki 12 so prikazane glavne stopnje eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za določanje bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* po obogatitvi živila v različnih obogatitvenih suspenzijah.



Slika 12: Shema glavnih stopenj eksperimentalnega dela določitve občutljivosti PCR v realnem času za čiste kulture bakterij vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* po obogatitvi živila

3.2.2 Namnožitev bakterijskih kultur

V 4 ml neselektivnega gojišča BHI smo suspendirali kolonijo bakterij vrste *S. enterica* ali *L. monocytogenes* in vsebino premešali z namiznim mešalom. Suspenzijo smo 24 ur inkubirali na stresalniku (100 obratov/min) pri 37 °C.

3.2.3 Določitev števila bakterij z metodo štetja kolonij na trdnem gojišču

V vsaki 24-urni kulturi smo število bakterij določili po postopku, opisanem v standardu SIST EN ISO 4833 (2003). Uporabili smo trda gojišča TSA, ALOA, NA in XLD. Kulturo smo po 24-urni inkubaciji v BHI razredčili po Kochu, tako da smo 1 ml kulture prenesli v 9 ml fiziološke raztopine in vsebino premešali na namiznem mešalu. 0,1 ml razredčenega vzorca smo cepili na omenjena gojišča. Vsako razredčitev vzorca smo nacepili na gojišče v dveh paralelkah. Nacepljena gojišča smo nato inkubirali 24 ur pri 37 °C.

Po inkubaciji smo na gojišču prešteli kolonije ter izračunali število bakterij N (cfu/ml). Za gojišča z od 15-300 kolonijami smo uporabili enačbo 3.1:

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 n_2)d} \quad \dots(3.1)$$

Legenda: $\sum C$ – seštevek vseh kolonij na števni plošči, n_1 – število kolonij pri prvi razredčitvi, n_2 – število zraslih kolonij pri drugi razredčitvi, d – faktor razredčitve pri prvi upoštevani razredčitvi in N – število mikroorganizmov v cfu/ml.

Za gojišča z 1 do 15 zraslimi kolonijami smo uporabili enačbo 3.2:

$$N_E = m d \quad \dots(3.2)$$

Legenda: N_E - število mikroorganizmov v 1 ml živila, m – aritmetična sredina števila kolonij na dveh ploščah, d – faktor razredčitve pri upoštevani razredčitvi.

Rezultate smo podali kot število bakterij vrste *S. enterica* ali *L. monocytogenes*, pomnoženih z 10^x , pri čemer je x faktor razredčitve vzorca.

3.2.4 Priprava bakterijske DNA za PCR v realnem času

Bakterijsko DNA smo pripravili na tri različne načine, in sicer s toplotno lizo, z lizo po postopku ABI in čiščenjem DNA (PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent Protocol, 2001-2005).

3.2.4.1 Priprava bakterijske DNA s toplotno lizo celic

Po 24 urni inkubaciji bakterij v neselektivnem gojišču BHI smo 1 ml suspenzije prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Suspenzijo smo centrifugirali 5 minut pri hitrosti 13000 obratov na minuto. Nato smo odstranili supernatant in dodali 100 µl sterilne deionizirane vode ter ponovno centrifugirali 5 minut pri hitrosti 13000 obratov na minuto. Po končanem centrifugiranju smo ponovno odstranili supernatant in dodali 100 µl sterilne deionizirane vode. Vzorce smo nato segrevali 15 minut v vodni kopeli pri 95 °C ter jih nato ohladili na ledu.

3.2.4.2 Priprava bakterijske DNA z lizo celic po postopku ABI

Po 24 urni inkubaciji bakterij v neselektivnem gojišču BHI smo 1 ml suspenzije prenesli v 2 ml mikrocentrifugirko. Vsebinsko smo centrifugirali 3 minute pri najvišji hitrosti, to je 14500 obratov na minuto. Nato smo odstranili supernatant ter peletu dodali 100 µl reagenta PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent. Vsebinsko smo 10-30 sekund stresali in jo nato segrevali 10 minut v vodni kopeli pri 100 °C. Nato smo jo ponovno centrifugirali 3 minute pri hitrosti 14500 obratov na minuto. Supernatant smo prenesli v novo 1,5 ml mikrocentrifugirko in ga uporabili za PCR v realnem času.

3.2.4.3 Priprava bakterijske DNA s čiščenjem

Bakterijsko DNA smo v začetnem delu pripravili po enakem postopku, kot je opisan pod točko 3.2.4.2. Nato smo 50 µl lizata bakterijskih celic prenesli v 1,5 ml mikrocentrifugirko. Vsebinsko smo dodali 400 µl pufra TE, 50 µl 3 M natrijevega acetata in 500 µl izopropanola. Vzorce smo nato inkubirali na sobni temperaturi 15 minut. Nato smo jih centrifugirali 10 minut pri hitrosti 13000 obratov na minuto. Supernatant smo odstranili in pelet posušili na sobni temperaturi. Posušen pelet smo raztopili v 50 µl sterilne deionizirane vode in 2,5 µl vzorca smo uporabili za PCR v realnem času.

3.2.5 Priprava reakcijske mešanice za PCR v realnem času

Za vsak PCR v realnem času smo pripravili novo reakcijsko mešanico. Reakcijske mešanice so se razlikovale po vrsti oligonukleotidnih začetnikov, ki so bili specifični za posamezno vrsto bakterij. Volumen reakcijske mešanice z dodano DNA za en vzorec je vedno znašal 25 µl. Za vsak vzorec smo vedno delali dve paralelki. Za vsako serijo vzorcev smo naredili dve ali tri negativne kontrole (NTC), kar je bilo odvisno od števila vzorcev. V vzorce za negativno kontrolo smo v reakcijsko mešanico namesto lizatov DNA dodali enako količino sterilne, deionizirane, DNA proste vode (H₂O_{PCR}).

3.2.5.1 Reagenti reakcijske mešanice za določanje bakterij vrste *S. enterica*

- 12,5 µl SYBR® Green PCR Master Mix 2x
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *S. enterica*:
 - 1,5 µl ST11
 - 1,5 µl ST15.

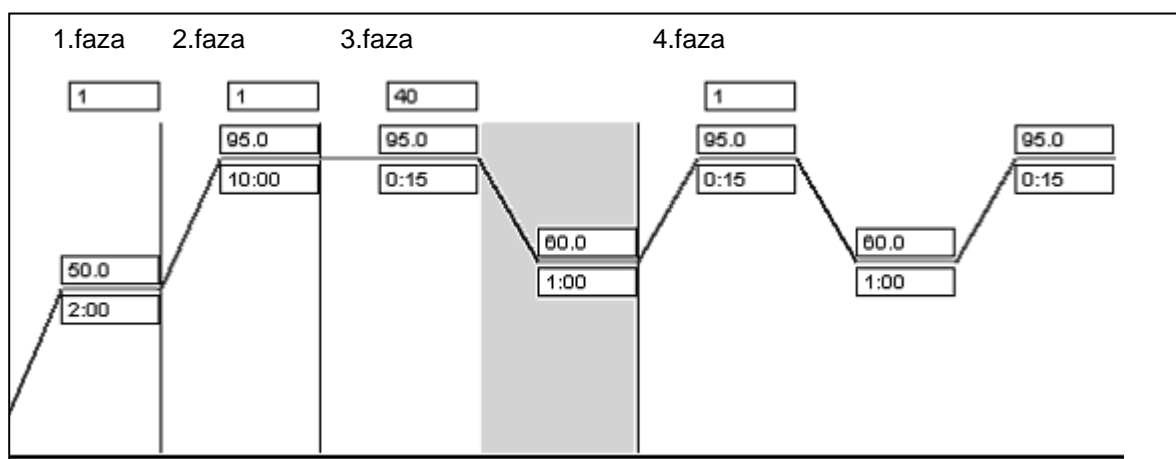
3.2.5.2 Reagenti reakcijske mešanice za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

- 12,5 µl SYBR® Green PCR Master Mix 2x
- Par oligonukleotidnih začetnikov za bakterije vrste *L. monocytogenes*:
 - 2,25 µl SBF1
 - 2,25 µl SBR1.

3.2.6 Potek PCR v realnem času

Bakterije vrst *S. enterica* in *L. monocytogenes* smo določali s PCR v realnem času z univerzalnim programom aparata ABI Prism 7500, ki vsebuje enoten temperaturno-časovni profil za določanje različnih pomnožkov in je prikazan na sliki 13. Za določanje obeh vrst bakterij smo uporabljali univerzalni program.

PCR v realnem času smo izvedli tako, da smo v ploščico s 96 prostori v vsak prostor dali 22,5 µl reakcijske mešanice in 2,5 µl lizata DNA. Ploščico smo nato postavili na posebno držalo v aparat ABI Prism 7500 in izvedli pomnoževanje DNA z univerzalnim programom. Program je sestavljen iz več faz. Prvi dve fazi sta 2 minutna in 10 minutna aktivacija DNA-polimeraze. Sledi tretja faza, ki vsebuje 40 ciklov sestavljenih iz 15 sekundne denaturacije DNA pri 95 °C, 1 minutnega prileganja oligonukleotidnih začetnikov na specifične dele DNA ter podaljševanja specifičnih oligonukleotidnih začetnikov pri 60 °C. Na koncu je sledila še četrta faza disociacije DNA, ki je sestavljena iz 15 sekundne denaturacije pri 95 °C, 1 minutnega prileganja pri 60 °C in 15 sekundne denaturacije pri 95 °C.



Slika 13: Temperaturno-časovne faze pomnoževanja DNA in disociacije pomnožkov v aparatu ABI Prism 7500

3.2.7 Vrednotenje rezultatov PCR v realnem času

Rezultate PCR v realnem času smo vrednotili z naslednjimi parametri:

Vrednost C_t :

- Vrednost C_t je točka na eksponentnem delu krivulje pomnoževanja DNA, kjer je fluorescenca pomnožka večja od fluorescence ozadja. Pozitiven rezultat pri naših eksperimentih je bila vrednost C_t , ki je bila manjša od vrednosti C_t za negativne kontrole (NTC), negativen rezultat pa vsaka vrednost C_t , ki je bila enaka ali večja od vrednosti C_t za NTC.

Učinkovitost encimske reakcije:

- Učinkovitost encimske reakcije smo razbrali iz enačbe standardne krivulje, ki smo jo dobili tako, da smo na os x nanašali logaritem števila bakterij ($\log N$), na os y pa vrednosti C_t . Učinkovitost encimske reakcije ustreza vrednosti naklona standardne krivulje. Naklon premice mora biti čim bližje vrednosti -3,2, kar je idealna vrednost.

Občutljivost PCR:

- Občutljivost PCR je bila določena kot najnižja koncentracija celic, ki smo jo lahko določili v izbranih razmerah priprave vzorca in izvedbe PCR.

Specifičnost PCR:

- Specifičnost PCR smo določali v mešanici bakterij vrst *L. monocytogenes* in *S. enterica* oziroma v vzorcih surovega mleka in smo jo podali s specifičnostjo PCR v realnem času za posamezno vrsto bakterij v mešani kulturi oziroma v surovem mleku.

4 REZULTATI

4.1 DOLOČANJE BAKTERIJ SEVA *S. Enteritidis* S PCR V REALNEM ČASU

4.1.1 Vpliv načina priprave DNA bakterij seva *S. Enteritidis* na občutljivost PCR v realnem času

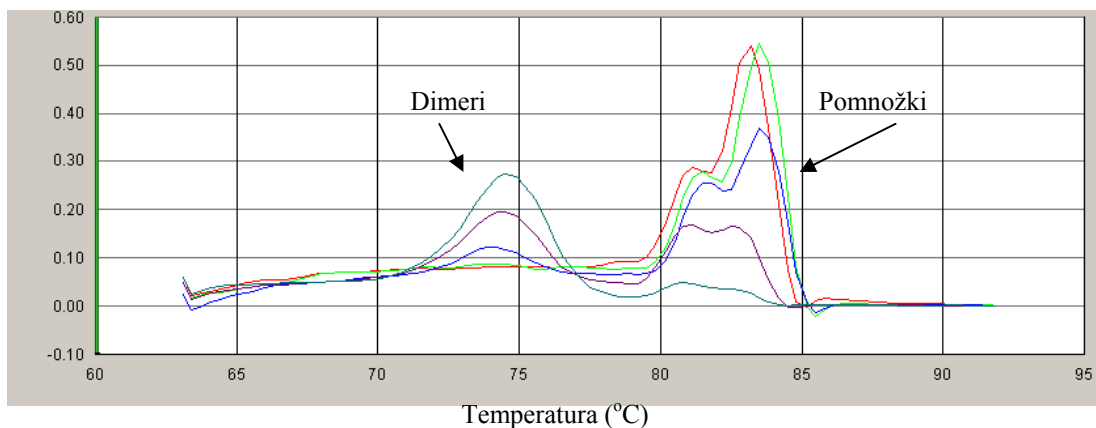
Občutljivost PCR v realnem času za določanje salmonel smo določili z oligonukleotidnima začetnikoma ST11 in ST15, ki sta specifična za bakterije rodu *Salmonella*. Za pripravo DNA smo uporabili tri različne postopke, in sicer toplotno lizo, lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. V preglednici 9 so prikazani rezultati določanja čiste kulture bakterij seva *S. Enteritidis*.

Preglednica 9: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* po različnih načinih priprave DNA

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)	Naklon, R ²		
1	1	Toplotna liza	3,5x 10 ⁸	22,13	+	-4,23 0,92		
	2			18,10	+			
2	1		3,5 x 10 ⁷	21,96	+			
	2			22,06	+			
3	1		3,5 x 10 ⁶	28,25	+			
	2			28,29	+			
4	1		3,5 x 10 ⁵	32,42	+			
	2			32,75	+			
5	1		3,5 x 10 ⁴	35,19	-			
	2			37,51	-			
6	1		Liza ABI	3,5 x 10 ⁸	22,37		+	-3,06 0,82
	2				23,04		+	
7	1	3,5 x 10 ⁷		26,87	+			
	2			25,52	+			
8	1	3,5 x 10 ⁶		30,99	+			
	2			35,62	+			
9	1	3,5 x 10 ⁵		32,45	+			
	2			33,41	+			
10	1	3,5 x 10 ⁴		35,74	-			
	2			35,05	-			
11	1	Čiščenje DNA		3,5 x 10 ⁸	24,14	+	-2,82 0,82	
	2				24,33	+		
12	1		3,5 x 10 ⁷	24,29	+			
	2			24,26	+			
13	1		3,5 x 10 ⁶	31,15	+			
	2			29,62	+			
14	1		3,5 x 10 ⁵	31,95	+			
	2			33,37	+			
15	1		3,5 x 10 ⁴	34,18	-			
	2			34,16	-			
NTC	1		/	0	34,26	-		/
	2				34,70	-		

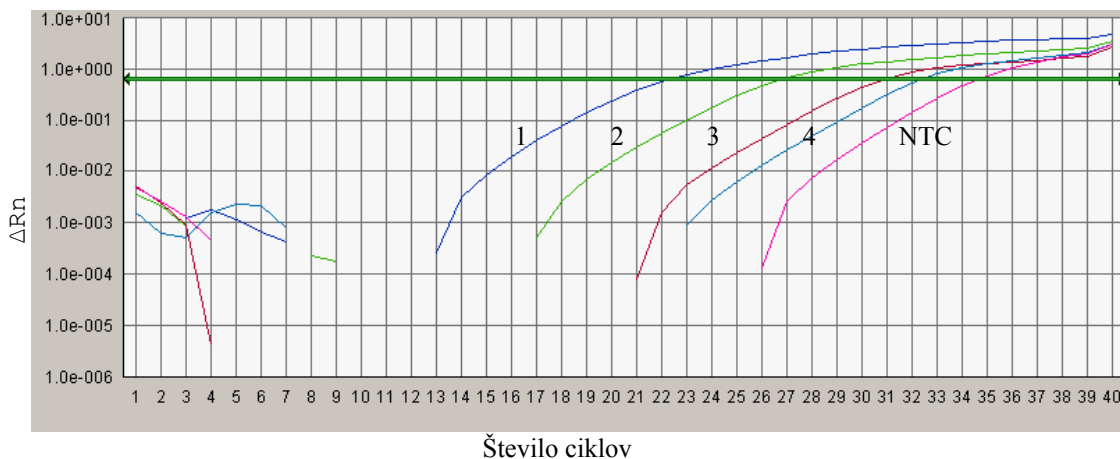
Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Pri bakterijah seva *S. Enteritidis* so bili rezultati PCR pri vzorcih, dobljenih s toplotno lizo pozitivni, razen vzorca z oznako 5, v katerem je bilo $3,5 \times 10^4$ cfu/ml salmonel, ki je bil negativen. Pri vzorcu številka 5 je prišlo do povečane tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov (slika 14). Tvorijo se med samimi oligonukleotidnimi začetniki predvsem takrat, ko je koncentracija bakterij oziroma DNA nizka in takrat, ko je previsoka koncentracija oligonukleotidnih začetnikov. Občutljivost PCR v realnem času za DNA pripravljeno s toplotno lizo, je 10^5 cfu/ml.



Slika 14: Temperature taljenja pomnožkov in dimerov, dobljenih s PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis*

Pri vzorcih, pri katerih smo DNA pripravili z lizo celic po postopku ABI, z oznakami 6, 7, 8 in 9 so bili rezultati PCR pozitivni (slika 15), medtem ko je bil vzorec z oznako 10, kjer je koncentracija celic enaka ali manjša od $3,5 \times 10^4$, negativen. Negativen rezultat je posledica povečane tvorbe dimerov oligonukleotidnih začetnikov. Občutljivost PCR v realnem času za DNA, pripravljeno po postopku ABI, je 10^5 cfu/ml.



Slika 15: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* po pripravi DNA z lizo po postopku ABI

Legenda:

1- $3,5 \times 10^8$ cfu/ml, **2**- $3,5 \times 10^7$ cfu/ml, **3**- $3,5 \times 10^6$ cfu/ml, **4**- $3,5 \times 10^5$ cfu/ml, **NTC**-negativna kontrola

Rezultati PCR v realnem času pri vzorcih, kjer smo DNA pripravili s čiščenjem, so bili pozitivni, če je bilo v začetnem vzorcu vsaj 10^5 cfu/ml (vzorci z oznakami 11, 12, 13 in 14), medtem ko so bili rezultati negativni pri vzorcih v katerih je bila koncentracija celic enaka ali manjša od $3,5 \times 10^4$ cfu/ml. Pri negativnih vzorcih je prišlo do zlepljanja oligonukleotidnih začetnikov v dimere. Zaradi slabe učinkovitosti encimske reakcije po pripravi bakterijske DNA s čiščenjem DNA, smo postopek v nadaljnjem izločili.

Glede na rezultate, ki so podani v preglednici 9, smo postopek priprave DNA z lizo po postopku ABI ponovili in kot vzorce dodali tudi nižje koncentracije celic. Ponovno smo določili bakterije seva *S. Enteritidis* s PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma ST11 in ST15. Rezultati so podani v preglednici 10.

Preglednica 10: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* po pripravi DNA z lizo celic po postopku ABI

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N_0 (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)	Naklon, R^2
1	1	Liza ABI	$2,7 \times 10^9$	17,00	+	-2,99 0,95
	2			16,24	+	
2	1		$2,7 \times 10^8$	18,63	+	
	2			18,73	+	
3	1		$2,7 \times 10^7$	20,91	+	
	2			26,16	+	
4	1		$2,7 \times 10^6$	24,63	+	
	2			24,96	+	
5	1		$2,7 \times 10^5$	28,38	+	
	2			28,46	+	
6	1		$2,7 \times 10^4$	32,31	+	
	2			32,98	+	
7	1		$2,7 \times 10^3$	33,97	+	
	2			33,03	+	
NTC	1	/	0	35,92	-	/

Legenda: N_0 začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Ugotovili smo, da je liza po postopku ABI zelo primeren postopek priprave DNA. Občutljivost PCR je 10^3 cfu/ml, izračunana učinkovitost encimske reakcije je bila -2,99 kar je zelo blizu idealni učinkovitosti -3,2.

4.1.2 Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v obogatitvenih gojiščih BPW in UPB

V gojišči BPW in UPB smo dodali različne koncentracije čiste kulture *S. Enteritidis* (N_0), in sicer od 10^1 cfu/ml do 10^8 cfu/ml ter vzorce 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo določili bakterije seva *S. Enteritidis* s PCR v realnem času po pripravi DNA z lizo po postopku ABI. Tako smo želeli preveriti vpliv obogatitvenih gojišč BPW in UPB na potek encimske reakcije. Rezultati so podani v preglednici 11.

Preglednica 11: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v gojiščih BPW in UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	N_0 (cfu/ml)	BPW		UPB	
			C_t	PCR (+/-)	C_t	PCR (+/-)
1	1	$2,7 \times 10^8$	19,21	+	21,33	+
	2		18,44	+	19,42	+
2	1	$2,7 \times 10^7$	16,10	+	16,12	+
	2		16,09	+	16,14	+
3	1	$2,7 \times 10^6$	15,67	+	17,16	+
	2		14,12	+	16,99	+
4	1	$2,7 \times 10^5$	15,17	+	15,14	+
	2		14,50	+	15,36	+
5	1	$2,7 \times 10^4$	15,53	+	15,44	+
	2		15,66	+	15,26	+
6	1	$2,7 \times 10^3$	16,68	+	15,63	+
	2		18,00	+	16,74	+
7	1	$2,7 \times 10^2$	15,93	+	15,35	+
	2		15,65	+	14,79	+
8	1	$2,7 \times 10^1$	14,78	+	15,05	+
	2		15,04	+	14,46	+
NTC	1	0	32,47	-	32,47	-
	2	0	32,86	-	32,86	-

Legenda: N_0 začetno število bakterij; BPW gojišče puferirana peptonska voda, UPB univerzalno obogatitveno gojišče, NTC negativna kontrola

Predvidevali smo, da se bakterije seva *S. Enteritidis* v času inkubacije v obogatitvenem gojišču BPW in UPB namnožijo do koncentracije, ki je enaka ali večja kot 10^3 cfu/ml in da gojišči nimata vpliva na potek encimske reakcije. Rezultati v preglednici 11 kažejo, da gojišči BPW in UPB nimata inhibitornega vpliva na encimsko reakcijo.

4.1.3 Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v mleku

Sterilno kravje mleko smo umetno kontaminirali z različnimi koncentracijami čiste kulture *S. Enteritidis*, in sicer od 10^1 cfu/ml do 10^8 cfu/ml. Za pripravo DNA smo uporabili lizo po postopku ABI in izvedli PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma ST11/ST15. Rezultati so podani v preglednici 12.

Preglednica 12: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v mleku

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N_o (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)
1	1	liza ABI	$2,7 \times 10^8$	34,55	-
	2			32,23	-
2	1		$2,7 \times 10^7$	34,78	-
	2			33,48	-
3	1		$2,7 \times 10^6$	32,67	-
	2			36,00	-
4	1		$2,7 \times 10^5$	Nezaznavno	-
	2			31,68	-
5	1		$2,7 \times 10^4$	35,24	-
	2			33,75	-
6	1		$2,7 \times 10^3$	32,71	-
	2			32,71	-
7	1		$2,7 \times 10^2$	34,69	-
	2			34,97	-
8	1		$2,7 \times 10^1$	33,28	-
	2			33,38	-
NTC	1	/	0	32,63	-
	2		0	31,75	-

Legenda: N_o začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Pri PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v mleku so bili vsi rezultati negativni ne glede na koncentracijo dodanih celic. Bakterije seva *S. Enteritidis* se direktno v mleku po pripravi DNA z lizo po postopku ABI ni dalo določiti, ker imajo sestavine mleka prevelik inhibitorski učinek na encimsko reakcijo.

4.1.4 Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih BPW in UPB

V vzorce mleka smo dodali različne koncentracije čiste kulture *S. Enteritidis*, in sicer od 10^1 cfu/ml do 10^8 cfu/ml. Posamezen vzorec smo nato prenesli v obogatitveni gojišči BPW in UPB ter suspenzije 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo določili bakterije seva *S. Enteritidis* s PCR v realnem času po pripravi DNA z lizo po postoku ABI.

Glede na rezultate v preglednici 11, ki kažejo na to, da obogatitveni gojišči UPB in BPW nimata inhibitornega vpliva na PCR, smo preiskusili obogatev vzorcev živila v omenjenih gojiščih. Predvidevali smo, da se sestavine mleka pri obogatitvi razredčijo in mleko tako nima več inhibitornega vpliva na encimsko reakcijo. Rezultati teh eksperimentov so podani v preglednici 13.

Preglednica 13: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* po obogatitvi vzorcev mleka v gojiščih BPW in UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	BPW			UPB		
		N_0 (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)	N_0 (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)
1	1	$2,7 \times 10^8$	17,15	+	$8,6 \times 10^8$	19,03	+
	2		16,12	+		18,39	+
2	1	$2,7 \times 10^7$	16,21	+	$8,6 \times 10^7$	16,84	+
	2		16,34	+		16,72	+
3	1	$2,7 \times 10^6$	15,55	+	$8,6 \times 10^6$	16,16	+
	2		15,21	+		16,56	+
4	1	$2,7 \times 10^5$	16,00	+	$8,6 \times 10^5$	17,33	+
	2		16,79	+		17,63	+
5	1	$2,7 \times 10^4$	16,08	+	$8,6 \times 10^4$	16,25	+
	2		17,57	+		16,15	+
6	1	$2,7 \times 10^3$	21,14	+	$8,6 \times 10^3$	17,14	+
	2		25,91	+		18,87	+
7	1	$2,7 \times 10^2$	18,05	+	$8,6 \times 10^2$	18,50	+
	2		18,53	+		17,44	+
8	1	$2,7 \times 10^1$	17,90	+	$8,6 \times 10^1$	16,65	+
	2		17,27	+		16,28	+
NTC	1	0	30,74	-	/	30,74	-
	2		30,90	-		30,90	-

Legenda: N_0 , začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

V preglednici 13 so vsi dobljeni rezultati PCR v realnem času pozitivni, ne glede na dodano koncentracijo bakterij *S. Enteritidis* in ne glede na vrsto obogatitvenega gojišča. Iz dobljenih vrednosti C_t lahko sklepamo, da so se omenjene bakterije po 24 urni inkubaciji pri 37° C v gojiščih BPW in UPB namnožile do koncentracije, enake ali večje od 10^3 cfu/ml. Tako smo dokazali, da se bakterije seva *S. Enteritidis* lahko določi v živilu po predhodni obogatitvi.

4.2 DOLOČANJE BAKTERIJ VRSTE *L. monocytogenes* S PCR V REALNEM ČASU

4.2.1 Vpliv načina priprave DNA bakterij vrste *L. monocytogenes* na občutljivost PCR v realnem času

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo določali s specifičnima oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1. Za pripravo DNA smo 24-urno kulturo razredčili po Kochu in nato uporabili tri različne načine priprave DNA, in sicer toplotno lizo, lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. Začetno število bakterij v 24-urni kulturi smo določili s klasično gojitveno metodo štetja kolonij na ploščah. V preglednici 14 so zbrani rezultati določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času.

Preglednica 14: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* po različnih načinih priprave DNA

Oznaka vzorca	Paralelka	Način priprave DNA	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)	Naklon premice in R ²		
1	1	Toplotna liza	2,9 x 10 ⁸	18,72	+	-3,42 0,96		
	2			1835	+			
2	1		2,9 x 10 ⁷	24,34	+			
	2			23,71	+			
3	1		2,9 x 10 ⁶	25,14	+			
	2			25,08	+			
4	1		2,9 x 10 ⁵	30,11	+			
	2			30,15	+			
5	1		2,9 x 10 ⁴	33,00	+			
	2			33,21	+			
NTC	1		/	0	34,69		-	/
6	1		Liza ABI	2,9 x 10 ⁸	21,23		+	-2,57 0,92
	2	20,38			+			
7	1	2,9 x 10 ⁷		21,44	+			
	2			21,30	+			
8	1	2,9 x 10 ⁶		23,39	+			
	2			23,43	+			
9	1	2,9 x 10 ⁵		27,03	+			
	2			27,02	+			
10	1	2,9 x 10 ⁴		30,75	+			
	2			30,85	+			
NTC	1	/		0	33,31	-	/	
	2				33,36			
11	1	Čiščenje DNA	2,9 x 10 ⁸	21,86	+	-2,25 0,94		
	2			20,12	+			
12	1		2,9 x 10 ⁷	23,42	+			
	2			23,59	+			
13	1		2,9 x 10 ⁶	24,28	+			
	2			24,95	+			
14	1		2,9 x 10 ⁵	26,52	+			
	2			27,01	+			
15	1		2,9 x 10 ⁴	30,25	+			
	2			31,00	+			
NTC	1		/	0	33,31		-	/
	2				33,36			

Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Pri vzorcih, ki so vsebovali $2,9 \times 10^4$ cfu/ml bakterij vrste *L. monocytogenes*, so bili vsi rezultati PCR v realnem času pozitivni ne glede na način priprave DNA. Določena občutljivost PCR v realnem času za čisto kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* je 10^4 cfu/ml. Vzorcev, ki so vsebovali nižjo koncentracijo celic od $2,9 \times 10^4$ cfu/ml, nismo testirali. Naklon premice, ki ponazarja učinkovitost encimske reakcije, se pri vseh treh različnih načinih priprave DNA giblje blizu idealnega, ki znaša -3,2; najboljšo učinkovitost smo dosegli pri pripravi DNA s toplotno lizo. Ravno tako velja tudi za R^2 , njegova idealna vrednost naj bi bila 1, tej vrednosti se najbolj približa PCR, izveden po pripravi DNA s toplotno lizo. Če primerjamo vrednosti C_t pri vzorcih z najnižjimi koncentracijami listerij, so bile le-te najnižje pri vzorcih, ki so bili pripravljene z lizo po postopku ABI.

4.2.2 Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v obogatitvenih gojiščih HF in UPB

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo določali v različnih koncentracijah v obogatitvenih gojiščih HF in UPB. Želeli smo se prepričati, da omenjena obogatitvena gojišča nimajo inhibitornega učinka na encimsko reakcijo. Za pripravo DNA smo 24-urno kulturo (1 ml) prenesli v 9 ml obogatitvenega gojišča HF in UPB. Po razredčevanju obogatitvene suspenzije s sterilno destilirano vodo v različnih razmerjih (1:2, 1:4,...) smo določili bakterije vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času po pripravi DNA z lizo po postopku ABI in čiščenjem DNA. Rezultati teh eksperimentov so prikazani v preglednici.

Vsi rezultati v preglednici 15 so bili pozitivni. Tako smo ugotovili, da obogatitveni gojišči HF in UPB nimata inhibitornega učinka na encimsko reakcijo in da lahko namesto standardnega gojišča uporabljamo gojišče UPB, ki omogoča dobro rast tudi bakterijam rodu *Salmonella*. Učinkovitost encimske reakcije je bila boljša, ko smo za obogatitev uporabili gojišče UPB, poleg tega pa je bila boljša priprava DNA po postopku ABI, saj so bile vse vrednosti C_t nižje kot pri rezultatih, ko je bila DNA pripravljena s čiščenjem.

Preglednica 15: Občutljivost PCR za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* po razredčitvi obogatitvenih gojišč HF in UBP

Oznaka vzorca	Paralelka	Obogatitveno gojišče	Priprava DNA	Razredčitev	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)		
1	1	HF	Liza ABI	1:2	2,3 x 10 ⁸	19,51	+		
	2					19,34	+		
2	1			1:4	1,2 x 10 ⁸	22,57	+		
	2					22,76	+		
3	1			1:8	5,8 x 10 ⁷	24,06	+		
	2					23,85	+		
4	1			1:16	2,9 x 10 ⁷	24,56	+		
	2					24,34	+		
5	1			1:32	1,5 x 10 ⁷	25,14	+		
	2					25,24	+		
NTC	1			/	/	/	28,16	-	
	2			/	/	/	28,60	-	
6	1			HF	Čiščenje DNA	1:2	2,3 x 10 ⁸	24,62	+
	2							25,12	+
7	1					1:4	1,2 x 10 ⁸	30,24	+
	2							30,16	+
8	1	1:8	5,8 x 10 ⁷			32,41	+		
	2					32,56	+		
9	1	1:16	2,9 x 10 ⁷			31,31	+		
	2					31,21	+		
10	1	1:32	1,5 x 10 ⁷			31,39	+		
	2					31,98	+		
NTC	1	/	/			/	39,31	-	
	2	/	/			/	28,60	-	
11	1	UBP	Liza ABI			1:2	3,3 x 10 ⁸	19,49	+
	2							19,49	+
12	1					1:4	1,6 x 10 ⁸	19,58	+
	2							19,37	+
13	1			1:8	8,2 x 10 ⁷	20,99	+		
	2					20,40	+		
14	1			1:16	4,1 x 10 ⁷	21,00	+		
	2					21,01	+		
15	1			1:32	2,0 x 10 ⁷	22,23	+		
	2					23,98	+		
NTC	1			/	/	/	28,16	-	
	2			/	/	/	28,60	-	
16	1			UBP	Čiščenje DNA	1:2	3,3 x 10 ⁸	28,12	+
	2							28,62	+
17	1					1:4	1,6 x 10 ⁸	27,82	+
	2							27,55	+
18	1	1:8	8,2 x 10 ⁷			28,65	+		
	2					28,60	+		
19	1	1:16	4,1 x 10 ⁷			29,15	+		
	2					29,53	+		
20	1	1:32	2,0 x 10 ⁷			29,59	+		
	2					29,64	+		
NTC	1	/	/			/	39,31	-	
	2	/	/			/	28,60	-	

Legenda: N₀ začetno število bakterij; UBP univerzalno obogatitveno gojišče; HF gojišče Half Fraser, NTC negativna kontrola

4.2.3 Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* po razredčitvi lizatov iz gojišč HF in UPB

Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo določali tudi v različnih razredčitvah celičnih lizatov iz gojišč HF in UPB. S temi eksperimenti smo želeli preveriti, ali tako pripravljena DNA vsebuje snovi, ki bi lahko imele inhibitorni učinek na encimsko reakcijo. Za pripravo DNA smo 24-urno kulturo razredčili po Kochu in 1 ml omenjene kulture prenesli v 9 ml obogatitvenega gojišča HF in UPB. Vzorce smo 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po inkubaciji smo pripravili DNA z lizo po postopku ABI in DNA čiščenjem. Nato smo naredili razredčitve pripravljene DNA tako, da smo 10 µl DNA dodali 90 µl destilirane vode. Bakterije vrste *L. monocytogenes* smo določili s PCR v realnem času. Rezultati teh eksperimentov so prikazani v preglednici 16.

Preglednica 16: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* po razredčitvi lizatov iz gojišč HF in UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	Obogatitveno gojišče	Priprava DNA	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)		
1	1	HF	Liza ABI	4,7 x 10 ⁷	21,26	+		
	2				21,37	+		
2	1			4,7 x 10 ⁶	22,13	+		
	2				22,14	+		
NTC	1			/	/	/	28,60	-
	2			/	/	/	28,16	-
7	1	HF	Čiščenje DNA	4,7 x 10 ⁷	25,11	+		
	2				25,70	+		
8	1			4,7 x 10 ⁶	23,97	+		
	2				23,98	+		
NTC	1			/	/	/	39,31	-
9	1			UPB	Liza ABI	6,5 x 10 ⁷	15,74	+
	2	15,51	+					
10	1	6,5 x 10 ⁶	15,90			+		
	2		15,89			+		
NTC	1	/	/			0	28,60	-
	2	/	/			0	28,16	-
11	1	UPB	Čiščenje DNA	6,5 x 10 ⁷	22,24	+		
	2				24,13	+		
12	1			6,5 x 10 ⁶	22,28	+		
	2				24,07	+		
NTC	1			/	/	/	39,31	-

Legenda: N₀ začetno število bakterij; UPB univerzalno obogatitveno gojišče; HF gojišče Half Fraser, NTC negativna kontrola

Vsi rezultati, zbrani v Preglednici 16, so bili pozitivni. S tem eksperimentom smo ugotovili, da v lizatu niso prisotne snovi, ki bi imele inhibitorni učinek na encimsko reakcijo.

4.2.4 Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku

Sterilno kravje mleko smo umetno kontaminirali z različnimi koncentracijami čiste kulture *L. monocytogenes*, in sicer smo v epruvete s po 9 ml mleka dodali od $3,2 \times 10^3$ cfu/ml do $3,2 \times 10^8$ cfu/ml. Za pripravo bakterijske DNA smo uporabili lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. Rezultati določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času so prikazani v preglednici 17.

Preglednica 17: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v vzorcih mleka po različnih načinih priprave DNA

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N_0 (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)	Naklon Premice, R^2
1	1	Liza ABI	$3,2 \times 10^8$	24,09	+	-3,81 0,90
	2			21,83	+	
2	1		$3,2 \times 10^7$	27,18	+	
	2			25,83	+	
3	1		$3,2 \times 10^6$	27,95	+	
	2			27,44	+	
4	1		$3,2 \times 10^5$	35,92	-	
	2			36,09	-	
5	1		$3,2 \times 10^4$	36,83	-	
	2			nezaznavno	-	
6	1		$3,2 \times 10^3$	nezaznavno	-	
	2			nezaznavno	-	
7	1	Čiščenje DNA	$3,2 \times 10^8$	23,00	+	** 0,43
	2			23,41	+	
8	1		$3,2 \times 10^7$	nezaznavno	-	
	2			nezaznavno	-	
9	1		$3,2 \times 10^6$	27,65	+	
	2			27,83	+	
10	1		$3,2 \times 10^5$	nezaznavno	-	
	2			39,31	-	
11	1		$3,2 \times 10^4$	29,05	-	
	2			29,93	-	
12	1		$3,2 \times 10^3$	nezaznavno	-	
	2			nezaznavno	-	
NTC	1	/	0	29,24	-	/
	2			29,07		

Legenda: N_0 začetno število bakterij, ** ni določen, NTC negativna kontrola

Pri vzorcih z oznako 1 do 6, kjer smo bakterijsko DNA pripravili z lizo po postopku ABI, smo bakterije vrste *L. monocytogenes* določili v prvih treh vzorcih, medtem ko so bili rezultati negativni pri vzorcih, v katerih je bila koncentracija celic enaka ali manjša od $3,2 \times 10^5$ cfu/ml. Predvidevamo, da je pri vzorcih z negativnimi rezultati, kjer je bila koncentracija bakterij vrste *L. monocytogenes* manjša od $3,2 \times 10^5$ cfu/ml, prišlo do inhibicije encimske reakcije zaradi prisotnosti živila, ki je bil v našem primeru kravje mleko. Iz dobljenih vrednosti C_t smo izračunali naklon standardne krivulje, ki nam poda učinkovitost PCR. Pri izvedbi PCR v realnem času po pripravi DNA z lizo po postopku ABI smo izračunali naklon

standardne krivulje -3,81, kar je relativno blizu idealnemu naklonu, ki je -3,2 in pomeni dobro učinkovitost encimske reakcije v ozkem območju od 10^6 do 10^8 cfu/ml.

Pri vzorcih 7 do 12 smo bakterijsko DNA pripravili tako, da smo lizate bakterijskih celic dodatno čistili (3.2.3) oziroma izolirali bolj čisto DNA. Predvidevali smo, da bo ta dodaten postopek osamitve DNA izboljšal občutljivost encimske reakcije. Rezultati PCR v realnem času naših predvidevanj niso potrdili, saj v preglednici 17 vidimo, da so rezultati pozitivni ali negativni ne glede na koncentracijo bakterij vrste *L. monocytogenes* v vzorcu.

4.2.5 Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih HF in UPB

Ker so bili rezultati določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* direktno v vzorcih mleka s PCR v realnem času slabi, saj je bila občutljivost le $3,2 \times 10^6$ cfu/ml, smo izvedli obogatitev umetno kontaminiranih vzorcev mleka. Za obogatitveno gojišče smo uporabili gojišči UPB in HF in suspenzije 24 ur inkubirali pri 37 °C. Bakterijsko DNA smo nato pripravili z lizo po postopku ABI in s čiščenjem.

Preglednica 18: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojiščih HF

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)
1	1	Liza ABI	$4,7 \times 10^8$	26,50	+
	2			Nezaznavno	-
2	1		$4,7 \times 10^7$	23,41	+
	2			21,79	+
3	1		$4,7 \times 10^6$	21,64	+
	2			23,03	+
4	1		$4,7 \times 10^5$	22,00	+
	2			20,37	+
5	1		$4,7 \times 10^4$	19,32	+
	2			20,28	+
6	1		$4,7 \times 10^3$	20,18	+
	2			21,07	+
7	1		$4,7 \times 10^2$	21,64	+
	2			20,31	+
8	1		$4,7 \times 10^1$	20,30	+
	2			19,98	+
NTC	1	/	/	28,16	-
	2			28,60	-
9	1	Čiščenje DNA	$4,7 \times 10^8$	17,89	+
	2			17,06	+
10	1		$4,7 \times 10^7$	17,35	+
	2			18,37	+
11	1		$4,7 \times 10^6$	19,59	+
	2			19,04	+
12	1		$4,7 \times 10^5$	17,13	+
	2			18,85	+
13	1		$4,7 \times 10^4$	20,02	+
	2			19,82	+
14	1		$4,7 \times 10^3$	22,40	+
	2			22,84	+
15	1		$4,7 \times 10^2$	23,61	+
	2			23,50	+
16	1		$4,7 \times 10^1$	24,07	+
	2			26,43	+
NTC	1	/	0	31,11	-

Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Preglednica 19: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	Priprava DNA	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)
1	1	Liza ABI	6,5 x 10 ⁸	13,15	+
	2			13,14	+
2	1		6,5 x 10 ⁷	14,44	+
	2			14,56	+
3	1		6,5 x 10 ⁶	16,72	+
	2			15,53	+
4	1		6,5 x 10 ⁵	15,23	+
	2			16,07	+
5	1		6,5 x 10 ⁴	16,91	+
	2			15,10	+
6	1		6,5 x 10 ³	14,35	+
	2			15,28	+
7	1		6,5 x 10 ²	16,28	+
	2			16,33	+
8	1		6,5 x 10 ¹	16,90	+
	2			17,16	+
NTC	1	/	0	28,16	-
	2			28,60	-
9	1	Čiščenje DNA	6,5 x 10 ⁸	21,31	+
	2			21,53	+
10	1		6,5 x 10 ⁷	21,63	+
	2			20,61	+
11	1		6,5 x 10 ⁶	21,52	+
	2			21,36	+
12	1		6,5 x 10 ⁵	23,09	+
	2			24,71	+
13	1		6,5 x 10 ⁴	26,26	+
	2			28,09	+
14	1		6,5 x 10 ³	24,68	+
	2			27,72	+
15	1		6,5 x 10 ²	25,33	+
	2			24,75	+
16	1		6,5 x 10 ¹	27,14	+
	2			27,43	+
NTC	1	/	0	39,31	-

Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

Po obogatitvi vzorcev mleka v gojišču HF in UPB smo dobili vse rezultate PCR (preglednici 18 in 19) pozitivne, ne glede na vrsto obogatitvenega gojišča. Vrednosti C_t, dobljene za vzorce po obogatitvi v gojišču HF, so bile med 19 in 26, če smo DNA pripravili z lizo po postopku ABI in med 17 in 26, če smo DNA še dodatno čistili, medtem ko so bile vrednosti C_t za vzorce po obogatitvi v gojišču UPB med 13 in 17 po lizi in med 21 in 28 po čiščenju DNA. Izmed preiskanih parametrov je bil najboljši postopek obogatitev vzorcev v gojišču UPB in liza bakterijskih celic.

4.3 SOČASNO DOLOČANJE BAKTERIJ SEVA *S. Enteritidis* IN VRSTE *L. monocytogenes* S PCR V REALNEM ČASU

4.3.1 Sočasno določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v mleku

S tem eksperimentalnim delom smo želeli določiti občutljivost PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v živilu. Vzorce smo pripravili tako, da smo pripravili 10-kratne razredčitve bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* dodali v sterilno mleko (0,5 ml bakterij vrste *L. monocytogenes* in 0,5 ml bakterij seva *S. Enteritidis* prenesli v 9 ml mleka).

Preglednica 20: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v mleku

Oznaka vzorca	Paralelka	Bakterije	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)
1	1	<i>S. Enteritidis</i>	3,6 x 10 ⁸	32,15	-
	2			30,77	-
2	1		3,6 x 10 ⁷	30,89	-
	2			30,41	-
3	1		3,6 x 10 ⁶	30,70	-
	2			29,92	+
4	1		3,6 x 10 ⁵	30,74	-
	2			31,63	-
5	1		3,6 x 10 ⁴	32,24	-
	2			31,39	-
6	1		3,6 x 10 ³	32,00	-
	2			32,94	-
7	1		3,6 x 10 ²	30,78	-
	2			29,68	+
8	1		3,6 x 10 ¹	29,38	+
	2			30,14	-
NTC	1	/	0	30,36	-
	2			30,17	-
9	1	<i>L. monocytogenes</i>	1,0 x 10 ⁸	nezaznavno	-
	2			nezaznavno	-
10	1		1,0 x 10 ⁷	39,99	-
	2			38,99	-
11	1		1,0 x 10 ⁶	35,67	-
	2			31,44	-
12	1		1,0 x 10 ⁵	36,44	-
	2			39,56	-
13	1		1,0 x 10 ⁴	nezaznavno	-
	2			nezaznavno	-
14	1		1,0 x 10 ³	nezaznavno	-
	2			nezaznavno	-
15	1		1,0 x 10 ²	nezaznavno	-
	2			nezaznavno	-
16	1		1,0 x 10 ¹	nezaznavno	-
	2			nezaznavno	-
NTC	1	/	/	33,47	-
	2			32,81	-

Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

DNA bakterij smo pripravili s lizo po postopku ABI. Nato smo pripravili dve reakcijski mešanici in 2,5 µl lizata smo prenesli v 22,5 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 in 2,5 µl lizata v drugih 22,5 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1. Pri vsaki reakcijski mešanici smo pripravili dve negativni kontroli, ki sta namesto tarčne DNA vsebovali vodo (H_2O_{PCR}).

Večina rezultatov, prikazanih v preglednici 19, je negativnih, kar pomeni, da bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* direktno v mleku po pripravi DNA z lizo po postopku ABI ne moremo določati s PCR v realnem času, ker pride do inhibicije encimske reakcije s sestavinami živila.

4.3.2 Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v mleku po sočasni obogatitvi vzorcev v gojišču UPB

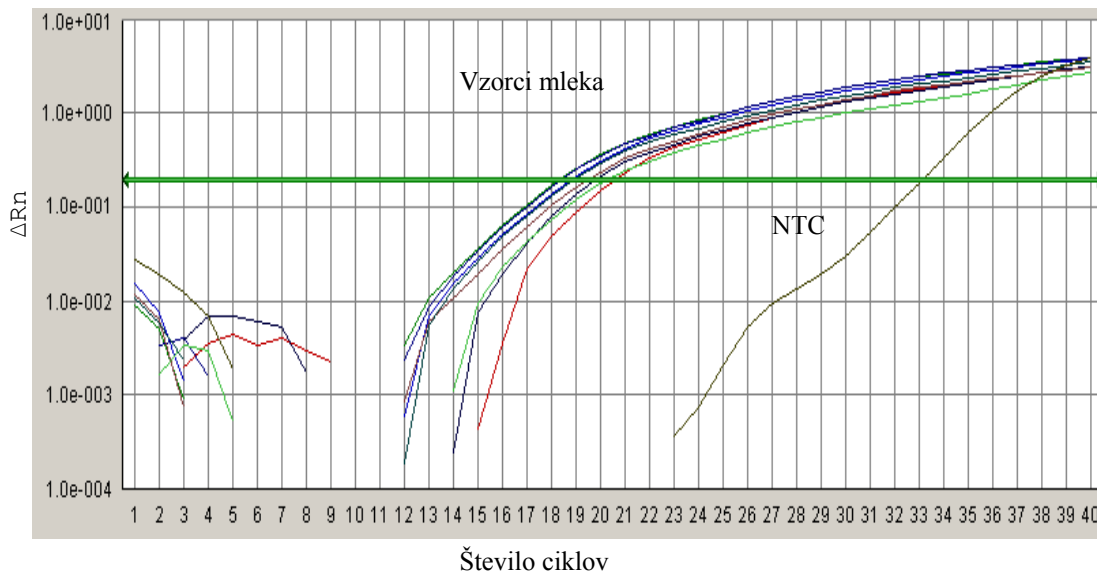
Vzorci mleka, v katere smo dodali bakterije seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* (točka 4.3.1) smo nato uporabili za pripravo obogatitev. 1 ml vsakega vzorca smo prenesli v 9 ml gojišča UPB in jih 24 ur inkubirali pri 37 °C. Po končani inkubaciji smo pripravili DNA bakterij z lizo po postopku ABI. V nadaljevanju smo pripravili dve reakcijski mešanici. 2,5 µl posameznega lizata smo prenesli v 22,5 µl reakcijske mešanice, ki je vsebovala oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 in 2,5 µl lizata v drugih 22,5 µl reakcijske mešanice z oligonukleotidnima začetnikoma SBF1/SBR1. Pri vsaki reakcijski mešanici smo pripravili dve negativni kontroli, ki sta namesto tarčne DNA vsebovali vodo (H₂O_{PCR}). Rezultati so prikazani v preglednici 21.

Preglednica 21: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v mleku po obogatitvi vzorcev v UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	Vrsta bakterij	N ₀ (cfu/ml)	C _t	PCR (+/-)
1	1	<i>S. Enteritidis</i>	7,6 x 10 ⁷	19,02	+
	2			17,93	+
2	1		7,6 x 10 ⁶	17,06	+
	2			17,44	+
3	1		7,6 x 10 ⁵	16,62	+
	2			16,70	+
4	1		7,6 x 10 ⁴	21,96	+
	2			17,18	+
5	1		7,6 x 10 ³	18,17	+
	2			17,42	+
6	1		7,6 x 10 ²	18,36	+
	2			19,82	+
7	1		7,6 x 10 ¹	17,67	+
	2			17,21	+
8	1		7,6	18,02	+
	2			17,15	+
NTC	1	/	/	33,00	-
	2	/	/	31,79	-
9	1	<i>L. monocytogenes</i>	4,4 x 10 ⁶	18,21	+
	2			18,63	+
10	1		4,4 x 10 ⁵	20,04	+
	2			18,58	+
11	1		4,4 x 10 ⁴	20,01	+
	2			19,47	+
12	1		4,4 x 10 ³	19,89	+
	2			19,34	+
13	1		4,4 x 10 ²	20,74	+
	2			21,55	+
14	1		4,4 x 10 ¹	21,07	+
	2			21,82	+
15	1		4,4 x 10 ⁰	20,73	+
	2			20,52	+
16	1		4,4 x 10 ⁻¹	21,78	+
	2			21,79	+
NTC	1	/	/	34,55	-

Legenda: N₀ začetno število bakterij, NTC negativna kontrola

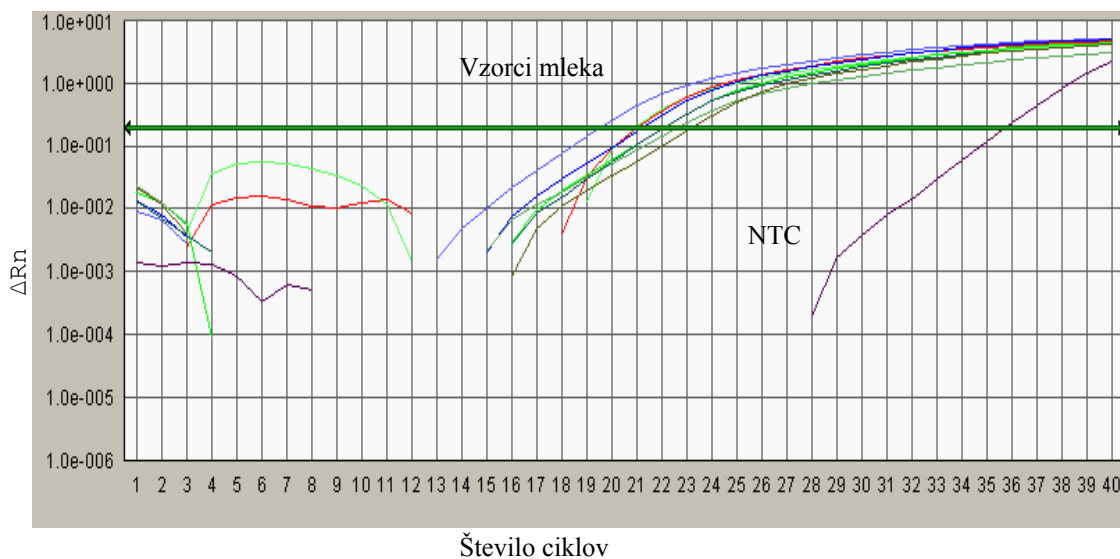
Vsi rezultati določanja bakterij vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* v sterilnem mleku po sočasni obogatitvi v gojišču UPB so pozitivni.



Slika 16: Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB s PCR v realnem času

Legenda: ΔRn intenziteta fluorescence, NTC negativna kontrola

Sliki 16 in 17 prikazujeta, da so se v vzorcih mleka po obogatitvi v gojišču UPB (24 ur pri 37°C), bakterije seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* uspešno namnožile in smo jih s PCR v realnem času lahko po sočasni obogatitvi sočasno določili.



Slika 17: Določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* v mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB s PCR v realnem času

Legenda: ΔRn intenziteta fluorescence, NTC negativna kontrola

4.3.3 Določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v surovem kravjem mleku po sočasni obogatitvi vzorcev v gojišču UPB

Vzorci smo pripravili enako kot je opisano pod točko 4.3.1 in 4.3.2. Namesto steriliziranega mleka smo uporabili surovo polnomastno kravje mleko, ki je vsebovalo naravno prisotne bakterije v koncentraciji $1,35 \times 10^4$ cfu/ml. S tem eksperimentalnim delom smo želeli dokazati, da njegova naravna mikroflora nima inhibitornega učinka na rast tarčnih bakterij in na potek encimske reakcije. Rezultati so prikazani v preglednici 22.

Preglednica 22: Občutljivost PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v surovem, polnomastnem kravjem mleku po obogatitvi vzorcev v UPB

Oznaka vzorca	Paralelka	Vrsta bakterij	N_0 (cfu/ml)	C_t	PCR (+/-)
1	1	<i>S. Enteritidis</i>	$5,6 \times 10^8$	18,89	+
	2			16,55	+
2	1		$5,6 \times 10^7$	16,62	+
	2			17,41	+
3	1		$5,6 \times 10^6$	18,18	+
	2			19,74	+
4	1		$5,6 \times 10^5$	21,92	+
	2			19,20	+
5	1		$5,6 \times 10^4$	17,63	+
	2			17,44	+
6	1		$5,6 \times 10^3$	17,36	+
	2			18,81	+
7	1		$5,6 \times 10^2$	19,12	+
	2			18,63	+
8	1		56	18,22	+
	2			17,15	+
NTC	1	/	/	32,45	-
	2	/	/	30,89	-
9	1	<i>L. monocytogenes</i>	$8,5 \times 10^6$	20,74	+
	2			18,88	+
10	1		$8,5 \times 10^5$	20,54	+
	2			19,98	+
11	1		$8,5 \times 10^4$	21,41	+
	2			19,41	+
12	1		$8,5 \times 10^3$	19,57	+
	2			19,89	+
13	1		$8,5 \times 10^2$	20,02	+
	2			20,33	+
14	1		$8,5 \times 10^1$	21,45	+
	2			21,80	+
15	1		$8,5 \times 10^0$	20,47	+
	2			20,87	+
16	1		$8,5 \times 10^{-1}$	19,54	+
	2			20,56	+
NTC	1	/	/	28,12	-

Legenda: N_0 (cfu/ml) začetno število bakterij v mleku, NTC negativna kontrola

Bakterije vrste *L. monocytogenes* in seva *S. Enteritidis* so v obogatitvenem gojišču UPB pričakovano dobro rasle tudi, če so bile nacepljene v surovem polnomastnem kravjem mleku, ki je vsebovalo naravno prisotne bakterije. Rezultati tega eksperimentalnega dela so pozitivni, kar pomeni, da smo lahko določili bakterije seva *S. Enteritidis* in *L. monocytogenes* po sočasni obogatitvi v gojišču UPB s PCR v realnem času.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

5.1 RAZPRAVA

5.1.1 PCR v realnem času za določanje bakterij seva *S. Enteritidis*

Občutljivost PCR v realnem času za določanje salmonel smo določili z oligonukleotidnima začetnikoma ST11 in ST15. Za pripravo DNA smo uporabili tri različne postopke, in sicer toplotno lizo, lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. Zaradi slabe učinkovitosti encimske reakcije po pripravi bakterijske DNA s čiščenjem DNA smo postopek izločili.

Glede na rezultate, ki so podani v preglednici 7, smo postopek priprave DNA z lizo po postopku ABI ponovili in kot vzorce dodali tudi nižje koncentracije celic. Ponovno smo določili bakterije seva *S. Enteritidis* s PCR v realnem času z oligonukleotidnima začetnikoma ST11 in ST15. Ugotovili smo, da je liza po postopku ABI zelo primeren postopek priprave DNA. Občutljivost PCR je bila 10^3 cfu/ml. Naklon stadardne krivulje je znašal -2,99 (preglednica 9) in je bil najbližje idealnemu naklonu, ki je -3,32. To pomeni, da smo v danih razmerah encimske reakcije dosegli najboljšo učinkovitost pomnoževanja DNA.

Ledinek (2006) je preverjal vpliv priprave DNA, alkalne in toplotne lize, na reakcijo PCR v realnem času. Pri obeh analizah je uspešno določil bakterije vrste *S. enterica* do koncentracije $2,0 \times 10^2$ cfu/ml, vendar je uporabljal drugačen časovno temperaturni program pomnoževanja DNA. Ker je pri istih vzorcih v primerjavi z alkalno lizo dobil več pomnožka, se je odločil, da uporablja toplotno lizo.

Preverjali smo, ali imata obogatitveni gojišči BPW in UPB ter prisotnost živila vpliv na potek encimske reakcije. Predvidevali smo, da se bakterije seva *S. Enteritidis* v času inkubacije v obogatitvenem gojišču BPW in UPB namnožijo do koncentracije, ki je enaka ali večja kot 10^3 cfu/ml in da gojišči nimata vpliva na potek encimske reakcije, kar smo tudi dokazali. Predvidevali smo tudi, da se sestavine mleka pri obogatitvi razredčijo in mleko tako nima več inhibitornega vpliva na encimsko reakcijo. Tako smo dokazali, da se bakterije seva *S. Enteritidis* lahko določi v živilu po predhodni obogatitvi. Tudi Chiu in sodelavci (2005) so z metodo PCR v realnem času določali bakterije rodu *Salmonella* (*S. Typhimurium*, *S. Typhi* in *S. Enteritidis*) v piščančjem mesu in polnomastnem mleku. Občutljivost njihove metode je znašala $1-9 \times 10^3$ cfu na gram vzorca. Ko pa so izvedli predhodno 8 urno obogatitev, pa je bila občutljivost nižja, to je 1-9 cfu na gram oziroma mililiter vzorca.

5.1.2 PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes*

Preizkušali smo različne postopke priprave bakterijske DNA za PCR v realnem času. Za pripravo DNA smo 24-urno kulturo razredčili po Kochu in nato uporabili tri različne načine priprave DNA, in sicer toplotno lizo, lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. Začetno število bakterij v 24-urni kulturi smo določili s klasično gojitveno metodo štetja kolonij na ploščah. Določili smo, da je občutljivost PCR v realnem času za čisto kulturo bakterij vrste *L. monocytogenes* 10^4 cfu/ml. Naklon premice, ki ponazarja učinkovitost encimske reakcije, se je pri vseh treh različnih načinih priprave DNA gibal blizu idealnega, ki znaša -3,2. Najboljšo učinkovitost smo dosegli pri pripravi DNA s toplotno lizo. Ravno tako velja tudi za R^2 , njegova idealna vrednost naj bi bila 1, tej vrednosti se zopet najbolj približa PCR izveden po pripravi DNA s toplotno lizo. Tudi pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* smo ugotovili, da je liza po postopku ABI zelo primeren postopek priprave DNA.

Za določanje občutljivosti PCR v realnem času za bakterije vrste *L. monocytogenes* smo uporabili specifična oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1. Ledinek (2006) je v svojem diplomskem delu preverjal specifičnost oligonukleotidnih začetnikov SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2. Izračunal je, da je specifičnost za oligonukleotidna začetnika SBF1/SBR1 92% in za SBF1/SBR2 88%. Ker je specifičnost oligonukleotidnega začetnika SBF1/SBR1 večja, smo se tekom naše raziskave poslužili uporabi le teh. Ledinek (2006) je določal tudi občutljivost PCR v realnem času z oligonukleotidnimi začetniki SBF1/SBR1 in SBF1/SBR2 in je bila v obeh primerih enaka, in sicer je znašala 10^3 cfu/ml.

Nogva in sodelavci (2000) so določili občutljivost PCR v realnem času za bakterije vrste *L. monocytogenes* v območju 6-10 cfu/ml. Eden od razlogov za boljšo občutljivost je ta, da so za določanje pomnožka poleg specifičnih oligonukleotidnih začetnikov uporabili tudi specifično sondo, ki jo mi v encimski reakciji nismo imeli.

Z določanjem bakterij vrste *L. monocytogenes* v različnih razredčitvah obogatitvenih gojišč HF in UPB, smo se želeli prepričati, da omenjena obogatitvena gojišča nimajo inhibitornega učinka na encimsko reakcijo. Za pripravo DNA smo uporabili lizo po postopku ABI in čiščenje DNA. Ugotovili smo, da je liza po postopku ABI zelo primeren postopek priprave DNA, saj je bil naklon standardne krivulje za obogatitveno gojišče HF -4,42 in za UPB -2,91, medtem ko je bil pri čiščenju DNA -4,88 za HF in -1,38 za UPB (preglednica 13). Preverjali smo tudi vpliv sestavin lizata na potek encimske reakcije in smo ugotovili, da v lizatu ni prisotnih snovi, ki bi imele inhibitorni učinek na encimsko reakcijo.

Pri določanju bakterij vrste *L. monocytogenes* s PCR v realnem času direktno v mleku je bila občutljivost le $3,2 \times 10^6$ cfu/ml. Zato smo izvedli obogatitev umetno kontaminiranih vzorcev mleka v obogatitvenih gojiščih HF in UPB. Glede na dobljene rezultate lahko sklepamo, da so se bakterije vrste *L. monocytogenes* po 24 urni inkubaciji pri 37 °C v gojiščih UPB in HF namnožile do koncentracije, enake ali večje 10^4 cfu/ml in da se lahko določijo v živilu s PCR v realnem času. O'Grady in sodelavci (2008) so določali bakterije vrste *L. monocytogenes* v različnih živilih kot so sveži sir, meso, mleko zelenjava in ribe. S PCR v realnem času so določili koncentracijo bakterij 1-5 cfu na 25 ml/g vzorca hrane. Rossmannith in sodelavci (2006) navajajo, da so za določitev bakterij *L. monocytogenes* s PCR v realnem času po predhodni obogatitvi določili občutljivost 7,5 cfu/25 ml.

5.1.3 PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij vrst *L. monocytogenes* in *S. Enteritidis*

Pri določanju občutljivosti za PCR v realnem času za sočasno določanje bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* v mleku smo uporabili oligonukleotidna začetnika ST11/ST15 za *S. Enteritidis* in SBF1/SBR1 za *L. monocytogenes*. Vsi rezultati (preglednica 19) so bili negativni, kar pomeni, da bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* direktno v mleku ne moremo določati s PCR v realnem času, ker pride do inhibicije encimske reakcije s sestavinami živila. Zaradi slabih rezultatov pomnoževanja bakterijske DNA neposredno iz živila smo izvedli obogatitev vzorcev mleka v gojišču UPB. Po obogatitvi so se bakterije seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* namnožile do dovolj visoke koncentracije, da smo jih lahko določili s PCR v realnem času. Enako uspešna je bila tudi določitev omenjenih bakterij v surovem polnomastnem kravjem mleku, ki je vsebovalo naravno prisotne bakterije v koncentraciji $1,35 \times 10^4$ cfu/ml. S tem eksperimentalnim delom smo dokazali, da sestavine mleka in njegova naravna mikroflora nimajo inhibitornega učinka na potek encimske reakcije (preglednica 20). Tudi Wang in sodelavci (2004) so izvedli PCR v realnem času za določanje bakterij vrste *L. monocytogenes* in bakterij rodu *Salmonella* v surovem mesu. Za določitev bakterij rodu *Salmonella* so uporabili oligonukleotidna začetnika SF in SR, za bakterij vrste *L. monocytogenes* pa LF in LR. Določili so občutljivost za bakterije *L. monocytogenes* in *Salmonella* Enteritidis, ki je znašala 3-4 cfu/g vzorca surovega mesa. V našem primeru je bila dosežena občutljivost primerljiva s tem rezultatom-za listerije nekoliko boljše, za salmonele pa nekoliko slabša.

Bhagwat (2003) je v vzorcih zelenjave uspešno sočasno določil bakterije vrst *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes* in *Salmonella*. Postavil je protokol PCR v realnem času s katerim je določil te bakterije po umivanju zelenjave s kontaminirano vodo, v kateri so se nahajale omenjene vrste bakterij. Njegova metoda je vsebovala analizo temperatur taljenja pomnožkov. Občutljivost je bila 1-10 celic/ml za bakterije vrst *E. coli* O157:H7 in *Salmonella*, medtem ko je bila za bakterije vrste *L. monocytogenes* 1000 celic/ml. Glavna razlika v primerjavi z našim delom je bila v živilu, saj smo mi za eksperimente uporabili mleko, medtem, ko je Bhagwat uporabil vodo, iz katere je lahko direktno določal omenjene bakterije, saj ni vsebovala inhibitornih sestavin za pomnoževanje DNA.

Jofre in sod. (2005) so razvili multipli PCR v realnem času s katerim so lahko sočasno določili bakterije rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* v kuhani šunki. Za obogatitev so uporabili dve gojišči, BPW za salmonele in HF za listerije. Nato so iz vsake suspenzije vzeli po 1 ml in sočasno pripravili bakterijsko DNA s Biorad-ovim kitom za izolacijo DNA. Z multiplim PCR v realnem času so po obogatitvi lahko določili vse koncentracije dodanih celic bakterij rodu *Salmonella* in vrste *L. monocytogenes* ($1 \text{ cfu}/25 \text{ g}$, $10^1 \text{ cfu}/\text{g}$ in $10^2 \text{ cfu}/\text{g}$) ne glede na razmerje. Dosežena občutljivost je bila zelo dobra, vendar naša sočasna obogatitvena kultura bakterij predstavlja enostavnejši in cenejši način dela, s katerim prav tako dosežemo zadovoljivo občutljivost reakcije.

5.2 SKLEPI

Z uvedbo PCR v realnem času za določanje bakterij seva *Salmonella* Enteritidis in vrste *Listeria monocytogenes* v živilu smo:

- uspešno uporabili in prilagodili protokol, ki je bil predhodno postavljen za določanje čistih bakterijskih kultur *S. enterica* in *L. monocytogenes* s PCR v realnem času,
- glede na različne postopke priprave bakterijske DNA za PCR v realnem času ugotovili, da je najprimernejši postopek priprave DNA liza po postopku ABI,
- določili občutljivost PCR v realnem času za čiste bakterijske kulture, ki je bila za bakterije seva *S. Enteritidis* $2,7 \times 10^3$ cfu/ml in vrste *L. monocytogenes*: $2,9 \times 10^4$ cfu/ml),
- določili, da je za sočasno obogatitev bakterij seva *S. Enteritidis* in vrste *L. monocytogenes* primerno gojišče UPB, ker omogoča njihovo dobro rast in nima inhibitornega vpliva na encimsko reakcijo,
- sočasno določili obe vrsti bakterij v sterilnem in surovem mleku po obogatitvi vzorcev v gojišču UPB; občutljivost v živilu je bila za bakterije seva *S. Enteritidis* $5,6 \times 10^1$ cfu/ml in $8,5 \times 10^{-1}$ cfu/ml za bakterije vrste *L. monocytogenes*

6 VIRI

Aabo S., Rasmussen O.F., Sorensen P.D., Olsen J.E. 1993. *Salmonella* identification by polymerase chain reaction. *Molecular and Cellular Probes*, 7:171-178

Adamič J., Smole Možina S., Jeršek B. 2003. Vloga in pomen mikroorganizmov v živilih in taksonomija. V: *Mikrobiologija živil živalskega izvora*. Bem Z., Adamič J., Žlender B., Možina Smole S., Gašperlin L. (ur.). Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 1-47

Allerberger F. 2003. *Listeria*: Growth, phenotypic differentiation and molecular microbiology. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 35: 183-189

Applied Biosystems. 2004. *Real-Time PCR Systems: Applied Biosystems 7900HT Fast Real-time PCR System and 7300/7500/7500 Fast: Chemistry guide*. Foster City, Applied Biosystems: 2-1 – 2-7.

Aznar R., Alarcon B. 2001. On the specificity of PCR detection of *Listeria monocytogenes* in Food: A Comparison of published primers. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 109-119

Bajt N., Golc-Teger S. 2002. *Izdelava jogurta, skute in sira*. Ljubljana, Kmečki glas: 37-42

Bansal N.S., McDonell F.H.Y., Smith A., Arnold G., Ibrahim G.F.. 1996. Multiplex PCR assay for the routine detection of *Listeria* in food. *International Journal of Food Microbiology*, 33: 293-300

Bismuth sulphite agar CM201. 1999. Leeds, PMS Microbiological Services Laboratories <http://www.psmicro.co.uk/1222.htm> (15.12.2009):1 str.

Bennett A. R., Greenwood D., Tennant C., Banks J.G., Betts R.P.. 1998. Rapid and definitive detection of *Salmonella* in foods by PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 26: 437-441

Berrada H., Soriano J.M., Pico Y., Manes J. 2006. Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 107: 202-206

Bhagwat A.A. 2003. Simultaneous detection of *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* strains by real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 84: 217-224

Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T., Garrity G.M. 2005. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2. 2nd ed. New York, Springer: 166-167, 178-180

Burtscher C.P., Fall P.A., Wilderer P.A., Wuertz S. 1999. Detection of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in suspended organic waste by nucleic acid extraction and PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 65: 2235-2237

Chen S., Yee A., Griffiths M., Larkin C., Yamashiro C.T, Behari R., Paszko-Kolva C., Rahn K., De Grandis S.A. 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

Chiu T.H., Chen T.R., Hwang W.Z., Tsen H.Y. 2005. Sequencing of an internal transcribed spacer region of 16S–23S rRNA gene and designing of PCR primers for the detection of *Salmonella* spp. in food. *International Journal of Food Microbiology*, 97: 259– 265

Clark D. 2005. *Molecular biology*. Amsterdam, Elsevier Science: 634-660

Cocolin L., Manzano M., Cantoni C., Comi G. 1998. Use of polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis to directly detect and identify *Salmonella typhimurium* in food. *Journal of Applied Microbiology*, 85: 673-677

Dereck E., Chatterton W., Smithers G., Roupas P., Brodkorb A. 2006. Bioactivity of β -lactoglobulin and α -lactalbumin—Technological implications for processing. *International Dairy Journal*, 16: 1229-1240

Dhar A.K., Bowers R.M., Licon K.S., LaPatra S.E. 2008. Detection and quantification of infectious hematopoietic necrosis virus in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by SYBR Green real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, 147: 157-166

D'Urso O.F., Poltronieri P., Marsigliante S., Storelli C., Hernandez M., Rodriguez-La' zaro D. 2009. A filtration-based real-time PCR method for the quantitative detection of viable *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in food samples. *Food Microbiology*, 26: 311–316

EFSA. 2009. Community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents in the European Union in 2007. Parma, EFSA-European Food Safety Authority: 312 str. http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753812_1211902269834.htm (10.10.2009)

Giulietti A., Overbergh L., Valckx D., Decallonne B., Bouillon R., Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*, 25: 356-401

Guedry T. 2009. Real-time quantitative PCR. V: *Biommed database*. Lusiana, Lusiana State University <http://biommed.lsu.edu/staticpages/index.php?page=RQPCR> (november 2009): 1 str.

Hein I., Klein D., Lehner A., Bubert A., Brandl E., Wagner M. 2000. Detection and quantification of the *iap* gene of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by a new real-time quantitative PCR assay. *Research in Microbiology*, 152: 37-46

Hein I., Flekna G., Krassnig M., Wagner M. 2006. Real-time PCR for detection of *Salmonella* ssp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the Food-PCR project. *Journal of Microbiological Methods*, 66: 538-547

Herzog-Velikonja B., Gruden K. 2000. Praktikum iz molekularne biologije. Ljubljana, Študentska založba: 104 str.

Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije. 2009. Epidemiološko spremljanje nalezljivih boleznih v Sloveniji v letu 2008. Ljubljana, Ministrstvo za zdravje Republike Slovenije: 102 str.

ISO 10560. International standard. ISO 10560, Milk and milk products - detection of *Listeria monocytogenes*. 1st ed. 1993: 12 str.

Jakše J. 2007. Rastlinska biotehnologija: Vaje 2006/2007: Vaja 4: Verižna reakcija s polimerazo (PCR), PCR ITS regije in RAPD markerji. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za agronomijo: 1-19
(www.genetika.si/slike/vsebina/File/Rastlinska%20B/.../vaja4_PCR_tekst.pdf (15.12.2009))

Jeršek B., 2003. Higiena živil: laboratorijske vaje za predmet Higiena živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 60 str.

Jeršek B. 2006. Praktikum mikrobiološke analize živil. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 19-20

Jofre' A., Martin B., Garriga M., Hugas M., Pla M., Rodriguez-Lazaro D., Aymerich T. 2005. Simultaneous detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by multiplex PCR in cooked ham. *Food Microbiology*, 22: 109-115

Joerger R. 2009. *Listeria monocytogenes* can cause serious food-borne illness. V: How do we study microbes?. Delaware, University of Delaware, Delaware Biotechnology Institute
<http://www.epscor.dbi.udel.edu/outreach/science/article.php?id=33#1>(15.12.2009): 1str.

Karpiškova R., Pejchalova M., Mokrošova J., Vytrasova J., Šmuharova P., Ruprich J. 2000. Application of chromogenic medium and the PCR method for the rapid confirmation of *L. monocytogenes* in foodstuffs. *Journal of Microbiological Methods*, 41: 267-271

Kesanopoulos K., Tzanakaki G., Levidiotou S., Blackwell C., Kremastinou J. 2005. Evaluation of touch-down real-time PCR based on SYBR Green I fluorescent dye for the detection of *Neisseria meningitidis* in clinical samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 43: 419-424

Klein D. 2002. Quantification using real-time PCR technology: Applications and limitation. *Trends in Molecular Medicine*, 8, 6: 257-260

Krop D.J.J.P. 2002. Taxonomie von *Salmonella*. Leeuwarden, Hogeschool van Hall Larenstein
<http://www.fooddata.nl/Fooddata/content/content.asp?catid=90&topicid=216> (15.12.2009):1 str.

Lazcka O., Javier Del Campo F., Xavier Munoz F. 2007. Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22: 1205–1217

Lee M.A., Squirrell D.J., Leslie D.L., Brown T. 2004. Homogeneous fluorescent chemistries for real-time PCR. V: *Real-time PCR and essential guide*. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). London, Health Protection Agency: 31-70

Ledinek S. 2006. Določanje bakterij vrst *Salmonella enterica* in *Listeria monocytogenes* s PCR v realnem času. Diplomsko delo. Ljubljana, Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo: 6-14

Li X., Boudjellab N., Zhao X. 1999. Combined PCR and slot blot assay for detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*, 56: 67-177

Listeria images. 2009. Milwaukee, Defending Food Safety
<http://www.defendingfoodsafety.com/2008/12/food-safety-law/common-food-borne-pathogens/listeria-1/listeria-images/> (december 2009):1 str.

Liu J., Zhang Z. 2007. Development of SYBR Green I-based real-time PCR assay for detection of drug resistance mutations in cytomegalovirus. *Journal of Virological Methods*, 46: 129-135

Logan J.M.J., Edwards K.J. 2005. An overview of realtime PCR platforms. V: *Real-time PCR: An essential guide*. Edwards K., Logan J., Saunders N. (eds.). Norfolk, Horizon Bioscience: 13-30

Mackay I.M. 2004. Real-time PCR in the microbiological laboratory. *Clinical Microbiology and Infection*, 10, 3: 190-212

Mackay I.M., Arden E.K., Nitsche A. 2002. Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research*, 30, 6:1292-1305

Made D., Petersen R., Trumper K., Stark R., Grohmann L. 2004. In-house validation of a real-time PCR method for rapid detection of *Salmonella* ssp. in food products. *European the Food Research and Technology*, 219: 171-177

Makino S.I., Okada Y., 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 2004. Diagnostic Real-time PCR for detection of *Salmonella* in food. *Applied and Environmental Microbiology*, 70: 7046–7052

Mavrin D., Oštir Š. 2002. Tehnologija mleka in mlečnih izdelkov. 1. izd. Ljubljana, Tehniška založba Slovenije: 27-49

Murphy N.M., McLauchlin J., Ohai C., Grant K.A. 2007. Construction and evaluation of microbiological positive process internal control for PCR-based examination of food samples for *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enterica*. International Journal of Food Microbiology, 120: 110-119

Nam H. M., Srinivasan V., Gillespie B. E., Murinda S.E., Oliver S. P. 2004. Application of SYBR green real-time PCR assay for specific detection of *Salmonella* spp. in dairy farm environmental samples. International Journal of Food Microbiology, 102: 161-171

Nogva H.K., Knut R., Naterstad K., Holck A., Lillehaug D. 2000. Application of 5'-nuclease PCR for quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in pure cultures, water, skim milk and unpasteurized whole milk. Applied and Environmental Microbiology, 66: 4266-4271

O' Grady J., Sedano-Balbas S., Maherb M., Smith T., Barry T. 2008. Rapid real-time PCR detection of *Listeria monocytogenes* in enriched food samples based on the *ssrA* gene, a novel diagnostic target. Food Microbiology, 25: 75-84

Oravcova K., Kaclikova E., Trncikova T. 2007. Comparison of commercially available methods and in-house real-time PCR-based method for the detection of food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. International Journal of Antimicrobial Agents, 29, Suppl. 2: S132-S132

Piknova L., Kaclikova E., Pangallo D., Polek B., Kuchta T. 2005. Quantification of *Salmonella* by 5'-nuclease real-time polymerase chain reaction targeted to *fimC* gene. Current Microbiology, 50: 38-42

Polymerase chain reaction (PCR). 2009. Krishna IVF clinic, Visakhapatnam (India)
<http://www.krishnaivf.com/clinic/facilities/12/05/2008/> (15.12.2009): 1 str.

Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2009. 2009. Ljubljana, Veterinarska uprava Republike Slovenije: 130 str.
(www.vurs.gov.si/.../Monitoring_zoonoz_za_leto_2009_s_podpisi.pdf) (10.10.2009)

Rantsiou K., Alessandria V., Urso R., Dolci P., Cocolin L. 2008. Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. International Journal of Food Microbiology, 121: 99-105

Richards G. P., Watson M. A., Kingsley D. H.. 2004. A SYBR green, real-time RT-PCR method to detect and quantitate Norwalk virus in stools. Journal of Virological Methods, 116: 63-70

Rossmann P., Krassnig M., Wagner M., Hein I. 2006. Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene. Research in Microbiology, 157: 763-771

Rožman T., Ledinek S., Paternoster H., Kum K., Smole Možina S., Jeršek B. 2008. Real-Time PCR for detection of spoilage and pathogenic bacteria in food. V: Microbiology for today. 4th Congress of the Slovenian Microbiological Society with international participation. Portorož, November 2008. Book of abstract. Barbič-Maganja D., Raspor P. (eds.). Ljubljana, Slovensko mikrobiološko društvo: 156-156

Santhosh S.R., Parida M.M., Dash P.K., Pateriya A., Pradhan H.K., Tripathi N.K., Ambuj S., Gupta N., Saxena P., Lakshmana Rao P.V. 2007. Development and evaluation of SYBR Green I-based one-step real-time RT-PCR assay for detection and quantification of Chikungunya virus. Journal of Clinical Virology, 39: 188-193

SIST EN ISO 4833. Mikrobiologija živil in krme–Horizontalna metoda za ugotavljanje števila mikroorganizmov –Tehnika štetja kolonij pri 30 °C (ISO 4833: 2003). 3 izd. = ISO 4833. Microbiology of food and animal feedingstuffs-Horizontal method for the enumeration of microorganisms-Colony count technique at 30 (degree) C. 3rd ed. 2003. 9 str.

SIST EN ISO 6579:2003/AC:2004. Mikrobiologija živil in krme-Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti *Salmonella* spp. (ISO 6579: 2002). 2004: 6. str.

SIST EN ISO 11290-1: 1997/A1: 2005. Mikrobiologija živil in krme-Horizontalna metoda za ugotavljanje prisotnosti in števila *Listeria monocytogenes*. Del 2, Metoda za ugotavljanje števila. Dopolnilo 1, Modifikacija medija za ugotavljanje števila (ISO 11290-2:1998/AM1:2004). 2005: 13 str.

Spreer E. 1998. Milk and dairy product technology. New York, M. Dekker: 483 str.

Smole Možina S., Lenček A., Jeršek B. 2005. Vrednotenje metode PCR za sočasno določanje bakterij rodu *Salmonella* in vrste *Listeria monocytogenes* v živilih. Acta Agriculturae Slovenica, 85, 2:187 – 197

Suresh K. D., Anil K. T., Siddh N. U. 2006. Exploration of soil bacterial communities for their potential as bioresource. Bioresource Technology, 97: 2217–2224

Tratnik L. 1998. Mlijeko - tehnologija, biokemija i mikrobiologija. Zagreb, Hrvatska mljekarska udruga: 391 str.

Uredba komisije (ES) št. 1441/2007 z dne 5. decembra 2007 o spremembi Uredbe (ES) št. 2073/2005 o mikrobioloških merilih za živila. 2007. Uradni list Evropske unije, 50, L322: 12-29

Uredba komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila. 2005. Uradni list Evropske unije, 48, L338: 1-26

Vazquez-Boland J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Domínguez-Bernal G., Goebel W., González-Zorn B., Wehland J., Kreft J. 2001. *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. Clinical Microbiology Reviews, 14, 3: 584-640

VURS. 2009. Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev za leto 2009. Ljubljana, VURS-Veterinarska uprava Republike Slovenije: 130 str.

Wang X., Jothikumar N., Griffiths M.W. 2004. Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *Journal of Food Protection*, 67: 189-192

Weng T., Jin N., Liu L. 2005. Differentiation between amplicon polymerization and nonspecific product in SYBR green I real-time polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry*, 342: 167-169

What is real time PCR?. 2009. Free Real Time PCR Newsletter (Montreal)
<http://www.rt-pcr.com> (december 2009):1 str.

Yang H., Qu L., Wimbrow A. N., Jiang X., Sun Y. 2007. Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by nanoparticle-based immunomagnetic separation and real-time PCR. *International Journal of Food Microbiology*, 118: 132–138

Zakon o zdravstveni ustreznosti živil in izdelkov ter snovi, ki prihajajo v stik z živilo. 2000. Uradni list Republike Slovenije, 10, 52: 6949-6958

ZAHVALA

Ob tej priložnosti bi se posebno rada zahvalila mentorici doc. dr. Barbari Jeršek. Hvala za strokovno pomoč in nasvete, ter za natančen in skrben pregled diplomske naloge. Hvala za vso potrpežljivost in hvala, ker ste me razumeli.

Hvala recenzentki prof. dr. Sonji Smole Možina za natančen pregled diplomske naloge.

Hvala tudi Ani, Anji, Mariji, Saši in ge. Jani, ki so bile takrat prisotne v laboratoriju za živilsko mikrobiologijo

Hvala ge. Lini Burkan in ge. Barbari Slemenik za vso pomoč in nasvete pri iskanju literature. Hvala tudi ge. Ivici Hočevar za pregled diplomskega dela.

Hvala mojim fantom. Damjan, hvala, ker si mi ves čas stal ob strani, me podpiral,....., včasih tudi tolažil. Še enkrat hvala. Tudi mojim trem sončkom: Matevžu, Jakobu in malemu Blažu hvala. Hvala, ker ste me spustili, da sem prišla do računalnika in mi dali malo miru za pisanje.

Hvala tudi vsem neimenovanim, ki ste mi stali ob strani.

Ni bilo lahko in trajalo je dolgo, vendar mi je uspelo priti do konca.