

ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΙΩΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ ΤΡΟΦΙΜΟΓΕΝΩΝ ΠΑΘΟΓΟΝΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ DNA

Σ. Α. Παπαθεοδώρου¹, Φ. Παπαλάμπρου¹, Ρ. Ρέτζο¹, Β. Στεφάνου¹, Γ. Κούζηλος¹,
Δ. Αντωνόπουλος¹, Α. Μπατρίνου¹, Ε. Τσάκαλη¹, Μ. Γιαννακούρου¹, Κ. Τζιά², Δ. Χούχουλα^{1*}

¹Σχολή Επιστημών Τροφίμων, Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας τροφίμων, ΠΑΔΑ, Αθήνα, Ελλάδα

²Σχολή Χημικών Μηχανικών, ΕΜΠ, Αθήνα, Ελλάδα

(*dhouhoula@uniwa.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι τροφιμογενείς λοιμώξεις αποτελούν ένα από τα σημαντικότερα θέματα που αφορούν τόσο τη βιομηχανία τροφίμων όσο και την παγκόσμια υγεία κάθε χρόνο^[1]. Ωστόσο, οι παραδοσιακές μέθοδοι ανίχνευσης των παθογόνων μικροοργανισμών είναι χρονοβόρες και απαιτούν πολύ κόπο^[2,3].

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν κατ' αρχάς η αξιολόγηση και στη συνέχεια η βελτιστοποίηση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA σε *S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αρχική συγκέντρωση 10⁸ CFU/mL. Οι τρεις μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν για την εκχύλιση του DNA ήταν: α) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού ΚΙΤ Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. β) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού ΚΙΤ QIAGEN DNease Blood & Tissue kit και γ) με βρασμό των δειγμάτων σε υδατόλουτρο, κατάψυξή τους και τέλος επανάληψη της διαδικασίας βρασμού σε υδατόλουτρο^[3]. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν σε υποδεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι αρνητικοποίησης της PCR.

Από τις 7 υποδεκαπλάσιες αραιώσεις, τα όρια ανίχνευσης ήταν 10⁶ CFU/ml, 10⁴ CFU/ml και 10³ CFU/ml για τις εκχυλίσεις με βρασμό-κατάψυξη, Invitrogen kit και Qiagen kit αντίστοιχα. Τα όρια ανίχνευσης βρέθηκαν ίδια και για τα δύο παθογόνα βακτήρια (*S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes*). Η ευαισθησία της μεθόδου εκχύλισης με βρασμό και κατάψυξη αυξήθηκε με την εξέταση των δειγμάτων σε αραιώση 1:10, φτάνοντας ένα όριο 10⁵CFU/ml.

Συμπερασματικά, όλες οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν ήταν εύχρηστες και με 100% επαναληψιμότητα. Ωστόσο παρατηρείται ότι επηρέασαν σημαντικά την ευαισθησία της PCR. Πιο ευαίσθητη παρουσιάστηκε η μέθοδος εκχύλισης με το kit Qiagen, ενώ χαμηλότερη ευαισθησία παρουσίασε αυτή με την εφαρμογή βρασμού και κατάψυξης. Η τελευταία μέθοδος όμως απαιτεί ελάχιστο χρόνο και κόστος σε σχέση με τις υπόλοιπες εμπορικές μεθόδους.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι μοριακές τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως σήμερα στην ταυτοποίηση και ταξινόμηση των βακτηρίων^[1,2]. Πολλά στελέχη βακτηρίων ταξινομούνται με βάση μόνο τα μοριακά χαρακτηριστικά^[2,3]. Συνήθως οι μοριακές τεχνικές ξεκινούν με την εκχύλιση και τον καθαρισμό του DNA.

Τα τελευταία χρόνια, πολυάριθμες μέθοδοι που αναπτύχθηκαν από τη μοριακή βιολογία έχουν εφαρμοστεί στην επιστημονική έρευνα και βασίζονται σε διαφορετικές αρχές^[4]. Ωστόσο η κάθε μέθοδος διαφέρει ως προς την ποσότητα και την ποιότητα του DNA που λαμβάνεται. Επιπλέον, για να ληφθεί το βακτηριακό DNA πρέπει πρώτα να διασπαστεί το κυτταρικό τοίχωμα, το οποίο παρουσιάζει διακριτές διαφορές μεταξύ των διαφόρων τύπων μικροοργανισμών.

Η χημική σύσταση του κυτταρικού τοιχώματος των θετικών κατά Gram μικροοργανισμών είναι πιο σύνθετη^[5]. Αντίθετα η κυτταρική μεμβράνη των αρνητικών κατά Gram μικροοργανισμών, όπως η *Salmonella Typhimurium*, είναι πιο λεπτή και λιγότερο σύνθετη^[6].

Για το λόγο αυτό, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται στα gram αρνητικά βακτήρια δεν είναι πάντοτε επιτυχείς με gram θετικά^[5,6,7]. Έτσι, καθώς μία από τις σημαντικότερες προϋποθέσεις για τις μοριακές μελέτες είναι η κατάλληλη μέθοδος απομόνωσης και ανάκτησης του DNA, η επιλογή μεθόδου, θεωρείται πολύ σημαντική πρόκληση^[8,9].

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν κατ' αρχάς η αξιολόγηση και στη συνέχεια η βελτιστοποίηση διαφορετικών μεθόδων εκχύλισης DNA σε *S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes* με τη μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Αυτό πραγματοποιήθηκε με σύγκριση της μεθόδου απομόνωσης του βακτηριακού DNA με βρασμό, με εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit και εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT QIAGEN DNease Blood & Tissue kit. Τα όρια ανίχνευσης των τριών μεθόδων προσδιορίστηκαν με τη χρήση της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) σε γνωστές αρχικές συγκεντρώσεις παθογόνων βακτηρίων.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Πολυδύναμο εργαστήριο του Τμήματος Επιστήμης & Τεχνολογίας Τροφίμων της σχολής Επιστημών Τροφίμων του Πανεπιστημίου Δυτικής Αττικής.

Τα πρότυπα στελέχη που χρησιμοποιήθηκαν είχαν αρχική συγκέντρωση 10^8 CFU/mL. Οι τρεις μέθοδοι που πραγματοποιήθηκαν για την εκχύλιση του DNA ήταν: α) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. β) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT QIAGEN DNease Blood & Tissue kit και γ) με βρασμό των δειγμάτων σε υδατόλουτρο, κατάψυξή τους και τέλος επανάληψη της διαδικασίας βρασμού σε υδατόλουτρο^[2,3]. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν σε υποδεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι αρνητικοποίησης της PCR

ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα στελέχη των παθογόνων βακτηρίων *S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes*. Οι αρχικές συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 10^8 CFU/mL, και στη συνέχεια έγιναν υποδεκαπλάσιες αραιώσεις μέχρι 10^2 CFU/mL.

ΜΕΘΟΔΟΣ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ DNA

Για την απομόνωση του DNA πραγματοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μέθοδοι: α) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. β) εκχύλιση με τη χρήση εμπορικού KIT QIAGEN DNease Blood & Tissue kit και γ) με βρασμό των δειγμάτων για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο, και κατάψυξή στους -20°C για 30 λεπτά και τέλος επανάληψη της διαδικασίας βρασμού στο υδατόλουτρο για ακόμη 15 λεπτά^[3]. Στις πρώτες δύο μεθόδους απομόνωσης DNA με τη χρήση εμπορικών Kit η μεθοδολογία πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το πρωτόκολλο. Η τρίτη μέθοδος

PCR

Σε όλα τα δείγματα DNA πραγματοποιήθηκε PCR ώστε να μελετηθεί το όριο ανίχνευσης (αναλυτική ευαισθησία) της κάθε μία μεθόδου εκχύλισης ξεχωριστά. Για την πραγματοποίηση της μελέτης 15μL του DNA των δειγμάτων αναμείχθηκαν με 35 μL προπαρασκευασμένου mix PCR (25μL DreamTaq™ Hot Start PCR Master mix - Thermo Scientific, 8.5 μL απεσταγμένο νερό gibco Distilled Water DNase/RNase Free -Life Technologies ελεύθερο από RNάση και 0.75μL από κάθε εκκινητή 100μM που χρησιμοποιήθηκε). Τα αναμενόμενα μεγέθη των προϊόντων της PCR για τα ζεύγη εκκινητών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 915bp και 454bp για τις *S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes* αντίστοιχα (πίνακας 1).

Πίνακας 1: Εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη

Εκκινητής	Αλληλουχία	Αναμενόμενο μέγεθος του προϊόντος της PCR
<i>S. Typhimurium-1</i>	5'-GGTGGCAAGGGAATGAA -3'	915bp
<i>S. Typhimurium-2</i>	3'-CGCAGCGTAAAGCAACT-5'	
<i>L. Monocytogenes-1</i>	5'-CTGGCACAAAATTACTTACAACGA-3'	454 bp
<i>L. Monocytogenes-2</i>	3'-AACTACTGGAGCTGCTTGTITTTTC-5'	

Η μέθοδος της PCR πραγματοποιήθηκε ως εξής:

Αρχικά στους 95°C για 7min.

Στη συνέχεια για 40 κύκλους 94°C για 1min με σκοπό την αποδιάταξη της νουκλεοτιδικής αλυσίδας του DNA, 52°C και 58°C για 1min (υβριδισμός των εκκινητών *S. Typhimurium* και *L. Monocytogenes* αντίστοιχα) και 72°C για 1min. Το τελικό στάδιο της επιμήκυνσης πραγματοποιήθηκε στους 72°C για 7min.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όλα τα δείγματα του DNA εξετάστηκαν και σε τρεις διαφορετικές αραιώσεις με σκοπό την αποφυγή αναστολέων. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση των δειγμάτων ώστε να ταυτοποιηθούν τα προϊόντα που προέκυψαν από τη μέθοδο της PCR.

Τα προϊόντα που ελήφθησαν είχαν τα αναμενόμενα μεγέθη προϊόντων.

Πίνακας 2: Όρια ανίχνευσης παθογόνων μικροοργανισμών με διαφορετικές μεθόδους εκχύλισης DNA

Μέθοδος εκχύλισης DNA	<i>S. typhimurium</i>	<i>L. monocytogenes</i>
1	10 ⁴	10 ⁴
2	10 ³	10 ³
3	10 ⁵	10 ⁵

1: Μέθοδος εκχύλισης DNA με τη χρήση εμπορικού KIT Thermo Scientific Invitrogen™ PureLink™ Genomic DNA Mini Kit. 2: Μέθοδος εκχύλισης DNA με τη χρήση εμπορικού KIT QIAGEN DNease Blood & Tissue kit. 3: Μέθοδος εκχύλισης DNA με βρασμό-κατάψυξη.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τα ανωτέρω αποτελέσματα του πίνακα 2, παρατηρείται ότι η μέθοδος 3, που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση του DNA είναι από μόνη της επαρκής χωρίς την ανάγκη κάποιου εμπορικού kit με μικρότερη όμως ευαισθησία. Αυτό συμβαίνει διότι ακόμα και μετά τη ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης των παθογόνων βακτηρίων, το δείγμα δεν περιέχει καθαρή ποσότητα DNA, έτσι πιθανόν να υπάρχουν μόρια-αναστολείς στο προς ταυτοποίηση δείγμα. Από αυτό συμπεραίνεται ότι η μέθοδος του βρασμού ως μέθοδος εκχύλισης DNA, μπορεί να αντικαταστήσει κάποιες από τις εμπορικές μεθόδους σε περίπτωση που η ποσότητα του του βακτηριακού φορτίου που περιέχεται στο δείγμα είναι υψηλή.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Gross-Bellard M, Oudet P, Chambon P. Eur J Biochem (36) (1973) 32-38.
- Jodi Woan-Fei Law, Nurul-Syakima Ab Mutalib, Kok-Gan Chan, Learn-Han Lee. (2014). Front. Microbiol. 5: 770.

3. Ali A Dashti, Mehrez M Jadaon, Abdulsamad M Abdulsamad, Hussein M Dashti. (2009). Kuwait Med. Jour. 41 (2): 117-122.
4. Porteous LA, Armstrong JL, Seidler RJ, Watrud LS. Curr Microbiol (29) (1994) 301-307.
5. Zhu K, Jin H, Ma Y, et al. J. Biotechnol (118) (2005) 257-264.
6. Herman LM, De Block JH, Waes GM. Appl Environ Microbiol (61) (1995) 4141-4146.
7. Orsini M, Romano-Spica V. Lett Appl Microbiol (33) (2001) 17-20.
8. Dederich DA, Okwuonu G, Garner T, et al. Nucleic Acids Res (30) (2002) 32.
9. Smith K, Diggle MA, Clarke SC. J Clin Microbiol (41) (2003) 2440-2443.