

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Μεταπτυχιακή διατριβή

ΜΟΡΙΑΚΗ ΟΡΟΤΥΠΗΣΗ ΣΤΕΛΕΧΩΝ ΤΗΣ
LISTERIA MONOCYTOGENES ΠΟΥ
ΑΠΟΜΟΝΩΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΚΥΠΡΟ ΑΠΟ ΖΩΑ ΚΑΙ
ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΖΩΙΚΗΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ ΜΕΤΑ ΤΟ
2008.

Σωτήρης Σ. Χριστοφή

Λεμεσός 2013

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η *Listeria monocytogenes* αποτελεί ένα σημαντικό παθογόνο παράγοντα των τροφίμων που προκαλεί μια σοβαρή νόσο σε ανθρώπους και ζώα, τη λιστερίωση και ταυτόχρονα επιφέρει μεγάλες οικονομικές επιπτώσεις στη βιομηχανία τροφίμων, στη ζωική παραγωγή και σε εθνικά συστήματα δημόσιας υγείας. Για τον λόγο αυτό, είναι επιτακτικό να υπάρχουν αξιόπιστες, ταχείες, οικονομικές και προσιτές στο σύνολο των εργαστηρίων τροφίμων μέθοδοι ανίχνευσης, ώστε να μπορεί να ελέγχεται για την παρουσία του μικροβίου, μεγάλος αριθμός τροφίμων, έγκαιρα και ικανοποιητικά. Επίσης πρέπει να υπάρχουν τρόποι επιδημιολογικής διερεύνησης ομαδικών κρουσμάτων λιστερίωσης, για να συσχετιστούν με τα όποια τρόφιμα αποτελούν τις πηγές μόλυνσης, ώστε να απομακρυνθεί ο αιτιολογικός παράγοντας και να ληφθούν διορθωτικά μέτρα. Στην παρούσα διατριβή βελτιστοποιήθηκε και αναπτύχθηκε το πρωτόκολλο που πρώτοι περιέγραψαν οι Doumith και συνεργάτες (2004), που βασίζεται σε multiplex PCR για ανίχνευση της *Listeria monocytogenes* και ταυτόχρονη ταυτοποίηση του ορότυπου της, κατά τρόπο που να μπορεί να εφαρμοστεί εύκολα, γρήγορα και οικονομικά σε οποιοδήποτε εργαστήριο στην Κύπρο. Για τη διαδικασία αυτή χρησιμοποιήθηκαν γνωστά, πρότυπα στελέχη της *Listeria monocytogenes* ως θετικοί μάρτυρες και συγκρίθηκαν διάφορες συνθήκες στην αντίδραση PCR, αναλογίες αντιδραστηρίων και δείγματος και μέθοδοι εκχύλισης DNA. Μετά τη βελτιστοποίηση, η μέθοδος αυτή χρησιμοποιήθηκε για τη μοριακή οροτύπηση των απομονώσεων *Listeria monocytogenes* που ανιχνεύτηκαν σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης και ζώα, από το 2008 που άρχισε να διατηρεί αρχείο το Τμήμα Κτηνιατρικών Υπηρεσιών, μέχρι και το 2012, ώστε να καθοριστούν για πρώτη φορά οι ορότυποι του μικροβίου που ανιχνεύτηκαν στην Κύπρο, να συνδεθούν με διάφορα είδη τροφίμων ή πηγές και να δημιουργηθεί η βάση για επιδημιολογικές διερευνήσεις των κρουσμάτων λιστερίωσης σε μελλοντικά περιστατικά. Επίσης για πρώτη φορά επιχειρείται να συλλεχθούν στοιχεία από όλες τις διαθέσιμες πηγές, σχετικά με την γενική κατάσταση που επικρατεί στην Κύπρο σε σχέση με τη *Listeria monocytogenes*. Με βάση τα αποτελέσματα συντάχθηκε καταρχήν το βέλτιστο πρωτόκολλο για τη δοκιμή και διαπιστώθηκε ότι για τα κρούσματα σε ζωντανά ζώα, ευθυνόταν αποκλειστικά ο ορότυπος 4b, ενώ στα τρόφιμα ο ορότυπος 1/2a απαντιόταν συχνότερα με τον 1/2b να ακολουθεί. Ο ορότυπος 1/2c εντοπίστηκε μόνο μια φορά σε προϊόντα κρέατος, ενώ ο 4b δεν εντοπίστηκε σε κανένα τρόφιμο. Τα

αποτελέσματα αυτά συνάδουν με την κατάσταση που διαπιστώνεται σε παγκόσμιο επίπεδο ως προς την κατανομή των ορότυπων της *Listeria monocytogenes*, αλλά αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι δεν εντοπίστηκε ποτέ σε γαλακτοκομικά προϊόντα και πιθανότατα να σχετίζεται με την τεχνολογία που εφαρμόζεται στην παραγωγή των παραδοσιακών γαλακτοκομικών προϊόντων της Κύπρου.

Abstract

Listeria monocytogenes is an important foodborne pathogen which causes a serious disease in humans and animals, called listeriosis, and induces major economic losses on food industry, livestock production and national public health systems. For these reasons, it is imperative to exist reliable, fast, affordable and accessible to all food laboratories detection methods, so that a large number of samples can be tested promptly, and efficiently, for the presence of the microbe. In addition, there have to be available methods for epidemiological investigations of listeriosis outbreaks, in order to correlate them with the foods which are the sources of contamination, so that corrective actions can be taken. In the present study, a protocol described first by Doumith et al in 2004 for detection of *Listeria monocytogenes* and simultaneous identification of its serotype, based on multiplex PCR, was optimized, in order to be applied easily, quickly and economically by any food laboratory in Cyprus. For this, known reference strains of *Listeria monocytogenes* were used as positive controls and various PCR reaction conditions, ratios of reagents and sample, as well as DNA extraction methods, were compared. After optimization, the method was used for molecular serotyping of *Listeria monocytogenes* isolates, detected in food of animal origin and from animals, from 2008 until 2012, acquired from the database of Veterinary Services of Cyprus. The identified serotypes could then be correlated with various kinds of food of animal origin, or other sources in order to create the basis for future epidemiological studies. Also, data, on the general situation in Cyprus with regard to *Listeria monocytogenes*, was collected from all available sources. Based on the results, a laboratory protocol for the detection and identification of *Listeria monocytogenes*, using multiplex PCR, was developed. It was found that for the incidences of listeriosis on live animals, solely, serotype 4b was responsible, while in food, serotype 1/2a was most frequently found, with 1/2b following. Serotype 1/2c was detected only once in a meat product, whereas 4b was never detected in any food. These results are consistent with the pattern found worldwide, regarding the distribution of serotypes of *Listeria monocytogenes*, but noteworthy is the fact that the pathogen was never detected in dairy products. This is probably associated with the technology applied for the production of traditional dairy products in Cyprus, which always involves heat treatment.