

Nýsköpun & neytendur
Consumers & Products

Vinnsla & virðisaukning
Value Chain & Processing

Erfðir & eldi
Genetics & Aquaculture

Líftækni & lífefni
Biotechnology & Biomolecules

Mælingar & miðlun
Analysis & Consulting

Öryggi & umhverfi
Food Safety & Environment



Sólarhringsgreining óæskilegra örvera í matvælum

Eyjólfur Reynisson
Sveinn Haukur Magnússon
Árni Rafn Rúnarsson
Viggó Þór Marteinsson

Öryggi og umhverfi

Skýrsla Matís 42-09
Desember 2009

ISSN 1670-7192

Titill / Title	Sólarhringsgreining óæskilegra örvera í matvælum / 24 hour detection of undesirable microbes in food.		
Höfundar / Authors	<i>Eyjólfur Reynisson, Sveinn Haukur Magnússon, Árni Rafn Rúnarsson, Viggó Þór Marteinson</i>		
Skýrsla / Report no.	42-09	Útgáfudagur / Date:	Desember 2009
Verknr. / project no.	3222 1786		
Styrktaraðilar / funding:	<i>Tækniþróunarsjóður, AVS</i>		
Ágrip á íslensku:	<p>Markmið verkefnisins var að þróa og koma upp aðferðum fyrir hraðvirkar greiningar á óæskilegum bakteríum í landbúnaðar- og sjávarafurðum sem og öðrum matvælum. Með hefðbundnum aðferðum eins og notaðar eru í dag fást niðurstöður eftir 3 og allt upp í 7 daga en með þeim aðferðum sem þróaðar voru í þessu verkefni er hægt að fá niðurstöður á nokkrum klukkustundum eða innan sólarhrings. Aðferðin byggir á real-time PCR aðferðafræði og sértækri mögnun á erfðaeftni sjúkdómsvaldandi baktería og annarra óæskilegu baktería. Komið var upp greiningaraðferðum fyrir helstu sýkla (<i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>) í mjólk, kjöt- og fiskmeti sem og fyrir sértækar skemmdarbakteríur í matvælum.</p> <p>Niðurstöður verkefnisins koma til með að bæta þjónustu við matvælaíðnaðinn á Íslandi með því að greina miklu fyrr óæskilegar örverur svo hægt verði að grípa inn í framleiðsluferla og auka þar með öryggi neytenda á landbúnaðar- og fiskafurðum.</p>		
Lykilorð á íslensku:	<i>Hraðvirkar örverugreiningar, matvælasýklar, skemmdarörverur, öryggi, gæði, Pseudomonas, Photobacterium, Salmonella, Campylobacter, Listeria</i>		
Summary in English:	<p>The aim of this project was to develop and set up new methods for rapid identification of undesirable bacteria in food and feed. With today's conventional and accredited culture methods results can be expected after 3 and up to 7 days. With the new methods to be taken in use and was developed in this project, the time of diagnostic procedure will decrease to few hours or to one working day. The detection methods are based on real-time PCR technology and a specific amplification of genetic material of the undesired bacteria. Diagnostic methods for the most common pathogens (<i>Salmonella</i>, <i>Campylobacter</i>, <i>Listeria monocytogenes</i>, <i>Vibrio parahaemolyticus</i>) in meat-, milk and fish products was developed through as well as quantitative assays for the main spoilage bacteria in fish.</p> <p>The results of the project will be used to improve the service for the Icelandic food industry on the domestic- and overseas markets by having rapid diagnostic methods for bacterial contamination at hand.</p>		
English keywords:	<i>Rapid methods, food-borne pathogens, spoilage, quality, safety, Pseudomonas, Photobacterium, Salmonella, Campylobacter, Listeria,</i>		

EFNISYFIRLIT

1 INNGANGUR	1
2 FRAMKVÆMD	3
A hluti - Sjúkdómsvaldandi örverur	3
2.1 Salmonella	3
2.1.1 Real-time PCR uppsetning	3
2.1.2 DNA einangrun	3
2.1.3 Greiningarhæfni Salmonella real-time PCR í mismunandi hráefnum og hæsnasaur	3
2.1.4 Samanburður á greiningarhæfni Salmonella real-time PCR og hefðbundinnar ræktunar-greiningar	3
2.1.5 Real-time PCR á náttúrulega smituð sýni	4
2.2 Campylobacter	4
2.2.1 Campylobacter prímerar og þreifari (probe)	4
2.2.2 Innra PCR viðmiðunarsýni (IAC)	4
2.2.3 Greiningarhæfni Campylobacter real-time PCR í hæsnasaur	4
2.2.4 Samanburður á greiningarhæfni Campylobacter real-time PCR greiningar og hefðbundinna ræktunargreininga	5
2.2.5 Real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum	5
2.3 Listeria monocytogenes	5
2.3.1 L. monocytogenes prímerar og þreifari	5
2.3.2 Innra PCR kontról	5
2.3.3 DNA einangrun	5
2.3.4 Næmni og línuleiki	5
2.3.5 Greiningarhæfni L. monocytogenes real-time PCR í afurðum	5
2.4 Vibrio parahaemolyticus	6
2.4.1 Real-time PCR uppsetning	6
2.4.2 Sértekni	6
2.4.3 Real-time PCR á smituðum krækling	6
B hluti - Sérvirkar skemmdarörverur	6
2.5 Pseudomonas spp.	6
2.5.1 Bakteríustofnar	6
2.5.2 Hönnun Pseudomonas prímera	6
2.5.3 Sýnaundirbúningur og DNA einangrun	6
2.5.4 Real-time PCR uppsetning	7
2.5.5 Næmni og línuleiki	7
2.5.6 Sértekni	7
2.5.7 Kvörðun staðals	7
2.5.8 Real-time PCR á þorsksýnum úr geymsluþolstilraun	7
2.5.9 Prófun á real-time PCR greiningarharfi í PCR tækjabúnaði mismunandi framleiðanda	7
2.6 Photobacterium phosphoreum	8
2.6.1 Hönnun P. phosphoreum prímera og LNA þreifara	8
2.6.2 Sýnaundirbúningur og DNA einangrun	8
2.6.3 Real-time PCR uppsetning	8
2.6.4 Næmni og línuleiki	8

2.6.5 sértækni.....	8
2.6.6 Kvörðun staðals	8
2.6.7 Real-time PCR á sýnum úr þorski	8
2.6.8 Prófun á real-time PCR greiningarhvarfi í PCR tækjabúnaði mismunandi framleiðanda	8
A hluti - Sjúkdómsvaldandi örverur	9
3.1 Salmonella	9
3.1.1 Greiningarhæfni Salmonella real-time PCR í mismunandi hráefnum og hæsnasaur	9
3.1.2 Samanburður á greiningarhæfni real-time PCR á Salmonella í hæsnasaur við hefðbundnar ræktunargreiningar	9
3.1.3 Salmonella real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum	10
3.2 Campylobacter	11
3.2.1 Þróun Campylobacter real-time PCR greiningar	11
3.2.2 Greiningarhæfni Campylobacter real-time PCR í hæsnasaur og kjúklingi	11
3.2.3 Samanburður á greiningarhæfni real-time PCR á Campylobacter í hæsnasaur við hefðbundnar ræktunargreiningar	12
3.2.4 Campylobacter real-time PCR greiningar á náttúrulega smituðum sýnum	12
3.3 Listeria monocytogenes	13
3.3.1 Þróun L. monocytogenes real-time PCR greiningar	13
3.3.2 Greiningarhæfni L. monocytogenes real-time PCR í mismunandi afurðum	13
3.4 Vibrio parahaemolyticus	14
3.4.1 Uppsetning V. parahaemolyticus toxR og tdh real-time PCR greiningarhvarfa.....	14
3.4.2 Sértækni greiningarhvarfa.....	14
3.4.3 Prófanir greiningarhvarfa á tilrauna-smituðum krækling	14
B hluti - Sérvirkar skemmdarörverur	16
3.5 Pseudomonas spp.	16
3.5.1 Hönnun Pseudomonas spp. prímera.....	16
3.5.2 Fínstilling greiningarhvarfs	16
3.5.3 Sértækni	16
3.5.5 Áreiðanleiki.....	18
3.5.6 Real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum	18
3.5.7 Sannprófun Pseudomonas aðferðarinnar	20
3.6 Photobacterium phosphoreum.....	21
3.6.1 Hönnun prímera og þreifara	21
3.6.2 Næmni, línuleiki og sértækni	21
3.6.3 Real-time PCR greining á náttúrulega smituðum sýnum	21
4 UMRÆÐUR.....	24
A hluti - Hraðvirkar greiningaraðferðir á sjúkdómsvaldandi örverum.....	24
B hluti - Hraðvirkar greiningaraðferðir á sérvirkum skemmdarörverum.....	26
ÞAKKARORÐ.....	27
6 HEIMILDIR.....	27

1 INNGANGUR

Hraðvirk greining á óæskilegum bakteríum er mikilvægur þáttur í að tryggja gæði, öryggi og um leið verðmæti matvæla. Eftirlit með matvælaöryggi er sífellt að aukast. Markaður með kældar afurðir, tilbúna til eldunar hefur vaxið mikið, þar sem aukin hættu er á að óæskilegar og sjúkdómsvaldandi bakteríur séu til staðar. Breytt markaðs- og neysluhverfi kallar því á nýjar og hraðvirkari aðferðir til örverumælinga. Aukinn flutningshraði matvæla eykur ennfremur á nauðsyn matvælaframleiðenda fyrir aðgengi að hraðvirkum aðferðum til greiningar á óæskilegum örverum og eru slíkar greiningar mikilvægur þáttur í að tryggja öryggi, gæði og þ.a.l. verðmæti matvæla.

Með hefðbundnum aðferðum til örverugreininga er niðurstaðna ekki að vænta frá rannsóknarstofum fyrr en að 3-7 dögum liðnum. Varan er þá iðulega komin í dreifingu eða til umboðsaðila og innköllun á vöru sem hafnað er vegna lélegra gæða eða sjúkdómsvaldandi baktería hefur því í för með sér mikinn tilkostnað. Hraðvirkar örverugreiningar skipta því miklu máli fyrir framleiðendur, þeir þurfa að vera vissir um öryggi vöru sinnar og að lágmarkslíkur séu á kostnaðarsömum aðgerðum vegna óæskilegrar bakteríumengunar.

Notkun Polymerase Chain Reaction (PCR) aðferða við hraðvirkar bakteríugreiningar í matvælum hefur verið að færast mjög í vöxt undanfarin ár (Brakstad, Aasbakk et al. 1992; Aznar and Alarcon 2003; Cui, Schroeder et al. 2003; Ellingson, Anderson et al. 2004; McKillip and Drake 2004; Deschaght, De Baere et al. 2009). Með næmu greiningarprófi líkt og PCR má stytta greiningartímann frá 3-7 dögum niður í 12-24 klst Annar kostur PCR greininga er sá að mikillar sérþekkingar er ekki krafist líkt og við hefðbundnar ræktunaraðferðir, þar sem fjölda mismunandi aðferða er beitt til greiningar mismunandi bakteríutegunda. Í grunnatriðum þá felur real-time PCR aðferðafræðin í sér greiningu á stuttum DNA búi í erfðamengi bakteríanna. Þessi DNA búi er þá sérstæður fyrir þá bakteríu sem á í hlut og gerir það að verkum að hægt er að fá sértækar greiningar á bakteríutegundinni þó svo að hún sé í blöndu af mörgum öðrum tegundum baktería. Greiningin fer þannig fram að DNA er einangrað úr matvælasýni sem inniheldur þá DNA úr öllum bakteríum sem til staðar eru í sýninu. DNA sýnið er því næst sett í PCR blöndu sem inniheldur ýmis hvarfefni (polymerasi, nukleótíð, buffer) ásamt prímerum. Prímerunum má líkja við lyklu sem eru hannaðir þannig að þeir þekki einungis þá stuttu DNA búta á einni ákveðinni bakteríutegund, t.d. *Salmonella*. PCR blöndunni ásamt DNA sýninu er þvínæst komið fyrir í real-time PCR tæki sem keyrir 40 hitastýrða hringi. Ef markröðin er til staðar í sýninu magnast hún upp í PCR hvarfinu frá örfáum eintökum upp í milljarða eintaka. Þessi aukning á DNA er mæld með flúrljómandi efnum sem einnig er bætt í blönduna. Því meira magn baktería sem er í sýninu, því meira DNA og því fyrr kemur upp flúrljómandi merki í PCR keyrslunni. Ef engin baktería er til staðar í sýninu mun engin aukning á flúrljómun koma fram.

Samdægursvottun á öryggi matvæla - innan 24 klst frá því að sýni eru send til greiningar - er mjög mikilvæg fyrir fyrirtæki í matvælaíðnaðinum, einkum hvað varðar matvælasýkla og kemur til með að verða enn mikilvægari í nánustu framtíð. Hraðvirkar PCR greiningar gera matvælaframleiðendum kleift að grípa strax inn í, stýra vinnslu hráefnisins eða stöðva dreifingu ef framleiðsluvaran reynist innihalda óæskilegar örverur eða uppfyllir ekki gæðakröfur. Tæknin stuðlar því að bættum gæðum og ímynd matvæla sem er mjög mikilvægur þáttur til að viðhalda góðri ímynd Íslands fyrir heilnæmar landbúnaðar- og sjávarafurðir.

Markmið verkefnisins var að auka verðmæti og öryggi matvæla með því að setja upp og þróa nýjar hraðvirkar aðferðir til að greina sjúkdómsvaldandi og aðrar óæskilegar örverur í landbúnaðarafurðum og sjávarfangi. Verkefnið var tvíþætt og sneri annarsvegar að þróun og uppsetningu greiningaraðferða fyrir sýklana *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* og *Vibrio parahaemolyticus*. Sá hluti verkefnisins var styrktur af Tækniþróunarsjóði og unninn í samvinnu Matís við Matfugl, Kjarnafæði, Mjólkursamsöluna og Umhverfisstofnun. Hinn hlutinn snéri að þróun

greiningarhvarfa fyrir sérvirkar skemmdarörverur í fiskafurðum: *Photobacterium phosphoreum* og *Pseudomonas sp.*, var sá hluti fjármagnaður af AVS Rannsóknarsjóði í sjávarútvegi og unninn í samvinnu Matís við Umhverfisstofnun, Síldarvinnsluna, Framfoods, Fiskseafood og Icelandic Seafood.

Lokamarkmiðið verkefnisins er að geta mælt ástand hráefnis með óhlutdrægum hætti á nákvæman og hraðvirkan hátt með mögulegar þjónustumælingar í huga og framleiðslu greiningasetta ef vel tekst til.

2 FRAMKVÆMD

A hluti - Sjúkdómsvaldandi örverur

2.1 *Salmonella*

Þróun *Salmonella* real-time PCR greiningar hefur áður hlotið styrk frá AVS (tilvísunarnúmer S 006-05) og má sjá allar bakgrunnsupplýsingar aðferðarinnar í birtri vísindagrein (Reynisson, Josefsen et al. 2006). Greiningarhæfni aðferðarinnar á *Salmonella* í mismunandi afurðum hefur hins vegar ekki verið könnuð og var það viðfangsefnið hér ásamt uppsetningu hvarfsins til þjónustugreininga á *Salmonella*.

2.1.1 Real-time PCR uppsetning

Öll real-time PCR hvörf voru gerð með Mx3005p PCR tæki (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hvarflausn innihélt 0,5 µL Teg polymerasa (3 U/µL) frá Matís/Prokaria. Hvarfrúmmál var 25 µL, prímerastyrkur 400nm og LNA probe 240 nm. Innra viðmiðunarsýni (internal amplification control, IAC) var einnig notað en það var gert til að koma í veg fyrir falskar neikvæðar niðurstöður. IAC var þannig úr garði gert að DNA sameind var smíðuð sem innihélt sömu prímeraraðir og *Salmonella* skotmarkið en annars konar þreififaröð sem gerir það að verkum að hægt er að nema báðar PCR afurðirnar (IAC og *Salmonella*) í einu og sama hvarfinu. Hitaprófill var eftirfarandi: 95°C í 3min og síðan 40 hringir við 95°C í 30 sek, 65°C í 1 min og 72°C í 30 sek. Flúrljómun var lesin úr sýnum að hverjum hring loknum.

2.1.2 DNA einangrun

DNA einangrun úr sýnum var framkvæmd með Chelex (BioRad) og/eða Kingfisher einangrun. Chelex einangrunin fer þannig fram að um 2 mL af forræktunaræti voru spunnir niður til að mynda botnfall af bakteríum. Flotinu var fleygt og 200 µL af 5 % Chelex lausn bætt út í og hrist með vortex. Sýnin voru þá höfð við 55°C í 15 mín. og svo sett í suðubað í 10 mín. Að lokum var flotið hirt og þynnt tífalt fyrir PCR hvarf. Kingfisher DNA einangrun var framkvæmd með hálfjálfrökum einangrunarbúnaði (Kingfisher, Thermo) og hvarfefnum frá Promega (Promega Magnesil KF, Genomic system (MD1460) DNA isolation kit (Promega Corporation, Madison, USA) samkvæmt lýsingu framleiðenda.

2.1.3 Greiningarhæfni *Salmonella* real-time PCR í mismunandi hráefnum og hæsnasaur.

Smitunartilraunir voru settar upp til að meta greiningarhæfni og fínstilla sýnaundirbúning *Salmonella* real-time PCR greiningar í eftirfarandi hráefnum: hrognum, fiskimjöli, laxi, ýsu, rækjum auk hæsnasaur. Smitun var framkvæmd á eftirfarandi máta: 25 g af hráefni/saur var blandað við 225 g BPW (buffered peptone vatn) með magara (stomacher) og ræktir smitaðar með þekktu magni *Salmonella* í þrísýnum; 1-10, 10-100 og 100-1000 CFU/*Salmonella* per gramm hráefni/saur. Smituð matvæli ásamt kontról rækt voru settar í hitaskáp við 37°C og sýni tekin úr ræktum til real-time PCR greiningar eftir mislangan forræktunartíma. 1 mL sýni var tekið af rækt, spunnið við 3000 x g í 5 mínútur og botnfall geymt við -20°C fram að DNA einangrun.

2.1.4 Samanburður á greiningarhæfni *Salmonella* real-time PCR og hefðbundinnar ræktunargreiningar

Samanburðartilraun var framkvæmd til að meta greiningarhæfni hefðbundinna ræktunnar og real-time PCR greiningar á *Salmonella* í: hæsnasaur, fiskimjöli, hrognum og rækjum, lax og ýsu. Sýni voru smituð með þekktu magni *Salmonella* (sjá 2.1.1) og greind með hefðbundinni ræktun og real-time PCR greiningu. Sýni til real-time PCR greiningar á *Salmonella* voru tekin eftir forræktun yfir nótt, 2 x 2 mL af sýni voru spunnir við 3000 x g í 5 mínútur og botnfall geymt við -20°C fram að DNA einangrun.

2.1.5 Real-time PCR á náttúrulega smituð sýni

Til að kanna áreiðanleika real-time PCR greiningar á *Salmonella* á náttúrulega smituðum sýnum voru þjónustusýni sem bárust til greiningar samkeyrð með ræktunum og real-time PCR. Alls voru 99 kjúklingasýni og 17 svínakjötssýni tekin til greininga með báðum aðferðum samkvæmt fyrrgreindum aðferðalýsingum.

2.2 *Campylobacter*

Þróað var real-time PCR hvarf með Teg polymerasa Matís til greiningar á *Campylobacter* í kjúklingum og kjúklingasaur. Sértekni hvarfsins fyrir *Campylobacter* m.t.t. prímera og þreifara hefur þegar verið sannreynd (Lubeck, Wolffs et al. 2003; Josefsen, Jacobsen et al. 2004). DNA einangrun var framkvæmd með sama hætti og í kafla 2.1.

2.2.1 *Campylobacter* prímerar og þreifari (probe).

Prímerar og flúrljómandi þreifari fyrir *Campylobacter* real-time PCR greiningarhvarfið voru smíðaðir útfra 16S rRNA geninu samkvæmt Lubeck og félögum (heimild). Real-time PCR hvarf var gert með Mx3000p eða Mx3005p PCR tæki (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hvarf var keyrt með Teg DNA polymerasa. Hvarfrúmmál var 25 µL og hvarflausn innihélt: 1 x buffer, 1.5 U Teg DNA polymerasa, 0,5 mM dNTP, 25 ug bovine serum albumin, 400 nM fw og rev prímerar, 150 nM *Campylobacter* probe, 100nM IAC probe og 1.5×10^3 copy af IAC target DNA. Hitaprófíll var eftirfarandi: 95°C í 4min og 40 hringir við 95°C í 15sek, 58°C í 1 min og 72°C í 30 sek (Lübeck et al). Flúrljómun var lesin úr sýnunum að hverjum hring loknum.

2.2.2 Innra PCR viðmiðunarsýni (IAC)

Til að koma í veg fyrir fölsk neikvæð svör var útbúið innra viðmiðunarsýni í *Campylobacter* greiningarhvarfið (internal amplification control, IAC). Var IAC-ið útbúið samkvæmt ágætri aðferðalýsingu Abdulmawjood og félaga hans (Abdulmawjood, Roth et al. 2002). Hannaðir og smíðaðir voru samsettir prímerar með *Campylobacter* sértekum 5' enda og Puc19 sértekum 3' enda sem magna úr Puc19 plasmíðinu 200 bp afurð. Hannaður var TaqMan probe sem bindst sértekt Puc19 afurðinni. Real-time PCR hvarf var gert með Mx3000p PCR tæki (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hvarfrúmmál var 25 µL. Hvarflausn innihélt: 1x buffer fyrir Teg DNA polymerasa, 1.5 U Teg DNA polymerasi, 400 nm fw og rev primerar, 25 ug bovine serum albumin og 5 µL DNA. PCR hvarfið var eftirfarandi: 95°C í 4 min og síðan 40 hringir við 95°C í 15 sek, 58°C í 1 min og 72°C í 30 sek. PCR afurðin var rafdreigin og einangruð með GFX einangrunaraðferð (GE lifescience). DNA styrkur var mældur með Nanodrop ljósmæli (Nanodrop Technologies, DE, USA). Fjöldi eintaka var reiknaður samkvæmt (Josefsen, Jacobsen et al. 2004). Raðþynningar voru gerðar úr 1.5×10^5 - 10^1 copy/µL til að ákvarða hentugan IAC styrk til að nota í hvarfinu.

2.2.3 Greiningarhæfni *Campylobacter* real-time PCR í hæsnasaur

Smitunartilraunir voru settar upp í hæsnasaur til að meta greiningarhæfni hvarfsins og fínstillta sýnaundirbúning og sýnatöku. Hæsnasaur var blandað í saltvatn (50:50 v/v) sýni úr þessari blöndu var sett í forrækt í Bolton vökvaæti. Prófað var að sá smitaðri saurblöndu beint í forræktunaræti sem og taka til forræktunar síðan vökva úr smitaðri saurblöndunni. Smitanir voru gerðar á sýnum með tífoldum raðþynningum af *Campylobacter* næturrækt. Einnig var gerð prófun á greiningarhæfni hvarfsins á kjúklingum. Kjúklingaskinn var skolað með saltvatni 1/10 w/w og 10 mL af skollausn settir í Bolton vökvarækt. Sýni voru tekin til PCR greiningar eftir mislangan tíma í forrækt, 2 x 2 mL af sýni voru spunnir við 3000 x g í 5 mínútur og botnfall geymt við -20°C fram til DNA einangrunar.

2.2.4 Samanburður á greiningarhæfni *Campylobacter* real-time PCR greiningar og hefðbundinna ræktunargreininga

Samanburðartilraun var gerð á greiningarhæfni *Campylobacter* real-time PCR greiningar og hefðbundinna ræktunargreininga fyrir *Campylobacter*; beinnar strikunnar á Cx æti - en sú aðferð er viðurkennd til *Campylobacter* greiningar úr hæsnasaur héraendis og faggildrar CCDA ræktunaraðferðar. Hæsnasaur var smitaður með vaxandi styrk *Campylobacter* og sýni greind samkvæmt aðferðunum þrennum.

2.2.5 Real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum

Til að kanna áreiðanleika greiningarhvarfsins á *Campylobacter* úr hæsnasaur og kjúklingi var sýnum sem komu til *Campylobacter* þjónustugreininga á sviði Mælinga og Miðlunar hjá Matís tekin til samhliða greiningar með real-time PCR og ræktunargreiningum samkvæmt fyrrgreindum aðferðalýsingum.

2.3 *Listeria monocytogenes*

Þróað var real-time PCR hvarf með Teg polymerasa Matís til greiningar á *Listeria monocytogenes* samkvæmt forskrift Lázaro og kunningja hans (Rodriguez-Lazaro, Hernandez et al. 2004).

2.3.1 *L. monocytogenes* þrímerar og þreifari

Þrímerar og flúrljómandi þreifari fyrir *L. monocytogenes* real-time PCR greiningarhvarfið voru smíðaðir út frá metalloproteasea geninu *mpl* (Rodriguez-Lazaro, Hernandez et al. 2004). Real-time PCR hvarf var gert með Mx3005p PCR tæki (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hvarf var keyrt með Teg DNA polymerasa. Hvarfrúmmál var 25 µL og hvarflausn innihélt: 10 x buffer, 1.5U Teg DNA polymerasa, 0,5 mM dNTP, 25 µg bovine serum albumin, 400 nm fw og rev þrímerar, 240 nm *L. monocytogenes* probe, 240 nm IAC probe og 1.5×10^3 copy af IAC target DNA. Hitaprófill var eftirfarandi: 95°C í 1 mín og 40 hringir við 95°C í 15 sek, 63°C í 30 sek og 72°C í 1 mín. Flúrljómun var lesin úr sýnunum að hverjum hring loknum.

2.3.2 Innra PCR kontról

Innra kontról (IAC) var útbúið samkvæmt aðferð Abdulmawjood og félaga (Abdulmawjood, Roth et al. 2002) sjá *Campylobacter* - Innra PCR konnól.

2.3.3 DNA einangrun

DNA einangrun var framkvæmd með hálfsvífirkum Kingfisher einangrunarbúnaði (Thermo) og hvarfefnum frá Promega (Promega Magnesil KF, Genomic system (MD1460) DNA isolation kit (Promega Corporation, Madison, USA) samkvæmt lýsingu framleiðenda.

2.3.4 Næmni og línuleiki

Næmni hvarfsins var könnuð með mögnun á tíöldum raðþynningum af *L. monocytogenes* DNA.

2.3.5 Greiningarhæfni *L. monocytogenes* real-time PCR í afurðum

Smitunartilraunir voru settar upp í fiskimjöli, mjólk og rækjum til að meta greiningarhæfni hvarfsins í þessum afurðum. 25 g af afurðum og 250 mL af LFI æti var blandað saman í magara (stomacher). Ræktir voru smitaðar með tíöldum raðþynningum af *L. monocytogenes* næturrækt og ræktaðar við 37°C. Sýni voru tekin úr ræktum eftir 12 og 24 klst fyrir mjólk og fiskimjöl en 7, 8, 12 og 23 klst fyrir rækjur. Sýni voru spunnin við 12.000 rpm í 5 mín og botnfall tekið til DNA einangrunar.

2.4 *Vibrio parahaemolyticus*

Innleidd voru real-time PCR greiningarhvärf fyrir sjúkdómsvaldandi *V. parahaemolyticus* auk heildar *V. parahaemolyticus* í skelfiski. Markgen fyrir sjúkdómsvaldandi *V. parahaemolyticus* var meingenið *tdh*. Markgen fyrir greiningu heildar *V. parahaemolyticus* var stjórngenið *toxR*.

2.4.1 Real-time PCR uppsetning

Öll PCR hvörf voru keyrð í MX3005p með Brilliant II qPCR master mix (Stratagene, La Jolla, CA, USA). Hitaprófíll var eftirfarandi: 95°C í 10 mín, 40 hringir af 95°C í 15 sek, 60°C í 1 mín. Hvarfrúmmál var 25 µl. Fyrir *toxR* hvarfið var prímerstyrkurinn 300 nM (forward), 100 nM (reverse) og þreifaratyrkur 300 nM. Fyrir *tdh* hvarfið var prímerstyrkurinn 500nM og þreifara styrkurinn 300 nM.

2.4.2 Sértekni

Greiningarhvörfin voru prófuð á 22 *V. parahaemolyticus* stofnum auk 7 *Vibrio* spp. stofnum af öðrum tegundum. Greining var talin jákvæð ef flúrljómun mældist yfir þröskuldsgildi (Ct).

2.4.3 Real-time PCR á smituðum krækling

Smitunartilraunir voru settar upp til að meta greiningarhæfni hvarfanna í kræklingi. Ferskur íslenskur kræklingur (*Mytilus edulis*) var smitaður með *tdh* jákvæðum *V. parahaemolyticus* stofni. Kræklingurinn var þveginn og skrúbbaður áður skelin var opnuð og meltingarkirtill (digestive gland) fjarlægður og veginn. Kirtlarnir voru þynntir 10 x með APW (alkaline peptone vatn) ásamt 1% saltlausn og hakkaðir. Ræktir voru megnaðar í tvísýnum með 1 mL af *V. parahaemolyticus* næturrækt. Næturræktin var þynnt tífalt 6-8 sinnum og lægstu þynningar notaðar í smitunartilraunirnar. Þá var fjöldi baktería einnig ákvarðaður með sáningu á agarskálar. 10 mL sýni voru tekin til DNA einangrunar eftir 3, 6 og 21 klst forrækt.

DNA einangrun var framkvæmd á eftirfarandi hátt: Sýni voru síuð gegnum nitrocellulasa síu með 8µm möskvastærð. Sýnin voru þvínæst spunnin við 2.500 rpm í 15 mín og botnfall leyst í 2 mL af dauðhreinsuðu vatni. Sýnin voru spunnin aftur við 10.000 rpm og botnfall leyst upp í 200 µL af vatni. Sýnin voru þvínæst soðin í 10 mín, spunnin við 10.000 rpm og vökvi með DNA tekin og geymdur við -20°C fram til greiningar.

B hluti - Sérvirkar skemmdarörverur

2.5 *Pseudomonas* spp.

2.5.1 Bakteríustofnar

Stofnar til rannsóknarinnar voru fengnir úr stofnasöfnum DSMZ, NCTC og Matís. Einnig voru stofnar einangraðir úr geymsluþolstilraun á þorski notaðir til rannsóknarinnar.

2.5.2 Hönnun *Pseudomonas* prímera

Prímerar fyrir *Pseudomonas* tegundir voru hannaðir út frá *carA* geninu með samröðunum *carA* raða úr gagnagrunni NCBI auk raða úr *Pseudomonas* stofnum raðgreindum úr kælitilraun. Samraðanir voru gerðar með Bioedit (version 7.0.1) og hentug prímerasvæði ákvörðuð. Gæði hannaðra prímera voru könnuð með NetPrimer forritinu (www.primerbiosoft.com).

2.5.3 Sýnaundirbúningur og DNA einangrun

DNA úr stofnum var einangrað með Chelex aðferð (lýst ofar). DNA einangrun úr sýnum úr geymsluþolstilraun var á eftirfarandi máta: Sýni voru tekin með ákveðnu millibili yfir 28 daga. 25 g af þorskflaki var þynni í 25 mL af kældum MRD (oxid, hampshire, UK) og blandað í magara (stomacher). Tvísýni voru tekin. 1 mL af blöndu var tekin til DNA einangrunar. Sýnið var spunnið við

12.000 x g í 5 mín og botnfall hirt. DNA var einangrað úr botnfalli með hálsjálvirkum DNA einangrunarbúnaði (sjá ofar).

2.5.4 Real-time PCR uppsetning

Öll PCR hvörf voru framkvæmd með Mx3000P PCR tæki og Brilliant SYBR green mastermix (Stratagene, la Jolla, CA, USA). Hvarfrúmmál var 25 µL og prímerstyrkur 200nm. Hitaprófill var eftirfarandi: 95°C í 10 mín, 40 hringir af; 95°C í 30 sek, 57°C í 60 sek auk lengingarskrefs við 72°C í 30 sek. Að hvarfinu loknu var bræðslumark PCR afurðarinnar ákvörðað með hægri hitun (2°C/min) frá 55-95°C og stöðugum aflestri flúrljómunar.

2.5.5 Næmni og línuleiki

CarA PCR afurð var klónuð með TOPO4 (Invitrogen, Paisley UK) samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda. Plasmíð með klónaðri PCR afurð var einangrað með GelElute plasmid miniprep (Sigma-Aldrich Inc, MO, USA). Styrkur DNA var mældur með nanodrop ljómsæli (Nanodrop Technologies, DE, USA). Fjöldi *carA* eintaka var ákvarðaður útfrá stærð plasmíðsins skvt. aðferð (Josefsen, Jacobsen et al. 2004). Tífdar raðþynningar voru gerðar til ákvörðunar á línuleika hvarfsins og minnstum nægjanlegum DNA styrk til mögnunar.

2.5.6 Sértækni

Greiningarhvarfið var prófað á 18 *Pseudomonas* stofnum og 41 non-*Pseudomonas* stofnum af ýmsum uppruna. Greining var talin jákvæð ef flúrljómun mældist yfir þröskuldsgildi (Ct).

2.5.7 Kvörðun staðals

Nákvæmni hvarfsins til magngreiningar var ákvörðuð með raðþynningu *Pseudomonas* spp. næturræktar og talningu með ræktun á skálum og real-time PCR greiningu. Til talninga á skálum voru 100 µL af þynningu ræktar dreift á PCA agar (Oxid, Cambridge, UK) og skálar ræktaðar við 18°C í 5 daga og magn baktería (CFU/mL) ákvarðað með talningu. Talning með real-time PCR fór þannig fram að 100 µL af þynningum rækta voru teknir til DNA einangrunar og DNA leyst upp í 50 µL af vatni. 5 µL af DNA voru notaðir til real-time PCR greiningar. Staðall var kvarðaður út frá niðurstöðum talninga af skálum.

2.5.8 Real-time PCR á þorsksýnum úr geymsluþolstilraun

Þorsksýnum var safnað í tveimur aðskildum geymsluþolstilraunum haustið 2006 og 2007. Þorskur var geymdur við -4°C í 28 daga fyrir sýnatöku. Síðan þá hefur aðferðin verið notuð í fjölda rannsóknaverkefna með ágætis árangri (ekki fjallað um hér). Framkvæmd sýna undirbúnings og DNA einangrunar er lýst að ofan. Til að meta greiningarhæfni real-time PCR aðferðarinnar í fiskisýnum voru niðurstöður real-time PCR greiningarinnar bornar saman við niðurstöður *Pseudomonas* talninga úr af CFC agar á skálum ræktuðum við 18°C í 5 daga.

2.5.9 Prófun á real-time PCR greiningarhvarfi í PCR tækjabúnaði mismunandi framleiðanda

Pseudomonas spp. greiningarhvarfið var prófað á real-time PCR tækjabúnaði frá þrennum framleiðendum: Stratagene MxP3005, Roche, ABI (nöfn tækja). Þrenn frostpurruð þorsksýni úr geymsluþolstilraun Matís frá vori 2009 með þekktu og mismunandi magni baktería voru notuð til samanburðarins. Magn *Pseudomonas* baktería í sýnum hafði áður verið ákvarðað með talningu af skálum. DNA einangrun var framkvæmd á tvísýnum fyrir hvert sýni og PCR greining framkvæmd. DNA einangrun og PCR greining var framkvæmd af fjórum starfsmönnum á þrennum ólíkum PCR tækjum.

2.6 *Photobacterium phosphoreum*

2.6.1 Hönnun *P. phosphoreum* þrímera og LNA þreifara

Greiningarhvarf fyrir *P. phosphoreum* var hannað út frá 16S rRNA geninu. Samráðanir á 16S röðum úr gagnagrunni NCBI voru gerðar með Bioedit (version 7.0.1) og hentug þrímer- og þreifara-svæði ákvörðuð. Gæði hannaðra þrímera og þreifara voru könnuð með NetPrimer forritinu.

2.6.2 Sýnaundirbúningur og DNA einangrun

Sbr. lið 2.4.2

2.6.3 Real-time PCR uppsetning

Real-time PCR hvörf voru gerð með Mx3005P tæki og Brilliant qPCR mastermix hvarfefnum (Stratagene, La Jolla, CA, USA) Þrímerar voru framleiddir og hreinsaður með HPLC (MWG, Ebsberg, Þýskaland). Hvarfrúmmál var 25 µl með 200 nmol þrímerstyrk og 100 nmol probe. Hitaprófill var eftirfarandi: 95°C í 10 mín, 40 hringir af 95°C í 30 sek, 57°C í 1 mín og 72°C í 30 sek.

2.6.4 Næmni og línuleiki

Næmni hvarfsins var prófuð með mögnun á tíföldum raðþynningum á *P. phosphoreum* DNA.

2.6.5 sértækni

Sértækni greiningarhvarfsins var prófuð á 14 *P. phosphoreum* stofnum og 27 öðrum bakteríutegundum af ýmsum uppruna. Greining var talin jákvæð ef flúrljómun mældist yfir þröskuldsgildi (Ct).

2.6.6 Kvörðun staðals

Nákvæmni hvarfsins til magngreiningar var ákvörðuð með raðþynningu *P. phosphoreum* næturræktar og með PPDM-Malthus leiðnimælingum (Dalgaard, Mejlholm et al. 1996). Talning með real-time PCR fór þannig fram að 100 µL af þynningum rækta voru teknir til DNA einangrunar og DNA leyst upp í 50 µL af vatni. 5 µL af DNA voru notaðir til real-time PCR greiningar. Staðall var kvarðaður út frá niðurstöðum PPDM-Malthus mælinga.

2.6.7 Real-time PCR á sýnum úr þorski

Greiningarhæfni hvarfsins var prófuð á sýnum úr geymsluþolstilraunum á þorski (sjá lið 3.4.7). Til að meta greiningarhæfni aðferðarinnar voru niðurstöður real-time PCR greiningar bornar sama við hefðbundna Malthus greiningu á rafleiðni sýna.

2.6.8 Prófun á real-time PCR greiningarhvarfi í PCR tækjabúnaði mismunandi framleiðanda

P. phosphoreum greiningarhvarfið var prófað á real-time PCR tækjabúnaði frá þrennum framleiðendum: Stratagene MxP3005, Roche, ABI (nöfn tækja). Þrenn frostþurrkuð þorsksýni úr geymsluþolstilraun Matís frá vori 2009 með þekktu og mismunandi magni baktería voru notuð til samanburðarins. Magn *P. phosphoreum* s í sýnum hafði áður verið ákvarðað með talningu af skálum. DNA einangrun var framkvæmd, tvísýni fyrir hvert tiltekið sýni og PCR greining framkvæmd. DNA einangrun og PCR greining var framkvæmd af fjórum starfsmönnum á þrennum ólíkum PCR tækjum.

3 NIÐURSTÖÐUR

Áður en greint er frá niðurstöðum er rétt að útskýra Ct gildi sem kemur fram víða í niðurstöðum. Real-time PCR er jafnan keyrt í 40 hringi og við hvern hring tvöfaldast magn PCR afurðarinnar í sýninu. Á ákveðnum tímapunkti í PCRinu verður aukning á DNA myndun greinanleg og er sá tímapunktur kallaður „cycle threshold“ eða Ct. Ct gildið getur því verið frá 1-40 eftir því hvenær aukning á DNA greinist í tækinu. Því lægra sem Ct gildið er því meira var upphaflegt magn af DNA til staðar í sýninu (eða fjöldi baktería).

A hluti - Sjúkdómsvaldandi örverur

3.1 Salmonella

3.1.1 Greiningarhæfni Salmonella real-time PCR í mismunandi hráefnum og hæsnasaur.

Niðurstöður smitunartilrauna má sjá í töflu 1. Niðurstöður eru birtar fyrir minnstan smitstyrk *Salmonella* í hverju hráefni (10-100 CFU/g). *Salmonella* greindist í öllum smituðum hráefnum að undangengnu að hámarki sextán klukkustunda forræktunarskerfi (ræktun yfir nótt). Styttri ræktunartími nægði til greiningar úr hrognum, rækju, hæsnasaur (8 klst) og fiskimjöli (12 klst). Engin sýnataka var úr laxi og ýsu eftir skemmri forræktun en sextán klukkustundir. Sýnataka eftir skemmri forræktunarskerfi en átta klukkustundir var skoðuð fyrir hæsnasaur og fiskimjöl. Engin mögnun fékkst úr smituðu fiskimjöli undir tólf klukkustunda forræktun (gögn ekki sýnd) en *Salmonella* greindist úr hæsnasaur eftir fimm klukkustundir í forræktun með hærri smitstyrk. Mynd 1 sýnir niðurstöður real-time PCR greininga úr hæsnasaur eftir smitstyrk og lengd forræktunar.

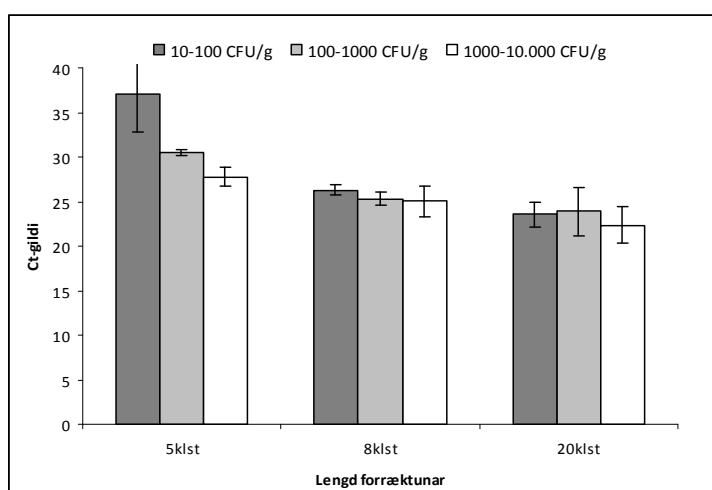
Tafla 1. Ct-gildi *Salmonella* real-time PCR greiningar úr smitunartilraunum í mismunandi hráefni. Taflan sýnir Ct-gildi (meðaltöl þiggja mælinga) eftir mislangan forræktunartíma, smitstyrkur er 10-100 CFU *Salmonella*/g. *Salmonella* greinist í öllum sýnum að undangenginni sextán klukkustunda forrækt (SF táknar staðalfrávik).

Hráefni/matrix	8 klst		12 klst		16 klst		20-24 klst	
	Ct	SF	Ct	SF	Ct	SF	Ct	SF
	meðaltal		meðaltal		meðaltal		meðaltal	
Fiskimjöl	neg	0	27,6	0,5	x	x	20	1,0
Hrogn	28,2	3,9	18,2	0,6	x	x	15,3	0,2
Rækjur	28	0,8	x	x	x	x	23,7	0,3
Lax	x	x	x	x	14,2	0,6	13,8	1,9
Ýsa	x	x	x	x	18,8	1,2	18,8	7,7
hæsnasaur	30,5	0,4	x	x	x	x	27,8	1,1

x – engin sýnataka.

3.1.2 Samanburður á greiningarhæfni real-time PCR á *Salmonella* í hæsnasaur við hefðbundnar ræktunargreiningar

Greining á því hvort *Salmonella* sé til staðar í eldishópum kjúklingabúa er gerð með sýnatöku úr saur kjúklinga (hvenær í eldinu). Gerð var samanburðartilraun til að bera greiningarhæfni *Salmonella* real-time PCR við hefðbundna ræktunargreiningu (hvaða aðferð) á *Salmonella* úr hæsnasaur og er niðurstöður þess samanburðar að finna í töflu 2. Niðurstöðurnar sýna sambærilega greiningarhæfni aðferðanna tveggja á smituðum hæsnasaur. Sýni smituð með yfir 10-100 CFU *Salmonella*/g greinast *Salmonella* jákvæð með báðum aðferðum. *Salmonella* greinist ekki í sýnum smituðum með 1-10 frumum eða minna.



Mynd 1. Grafið sýnir greiningu real-time PCR á *Salmonella* í hæsnasaur eftir lengd forræktunarskrefs og smitstyrks *Salmonella*. Með auknum tíma í forrækt fæst sterkara svar með real-time PCR. Áreiðanleg greining fæst eftir fimm klukkustundir í saur smituðum með fleiri en 100-1000 CFU *Salmonella*/g.

Tafla 2. Samanburður á greiningarhæfni ræktunargreiningar og real-time greiningar á *Salmonella* í hæsnasaur eftir 20klst forræktun. Báðar aðferðir greina sýni smituð með yfir 10-100 CFU *Salmonella*/g sem *Salmonella* jákvæð.

Smitstyrkur <i>Salmonella</i> CFU/g saur	Ræktun	qPCR Matis Ct
10^5 - 10^6	pos	20,6
10^4 - 10^5	pos	23,5
10^3 - 10^4	pos	25,7
10^2 - 10^3	pos	29,7
10^1 - 10^2	pos	31,6
10^0 - 10^1	neg	neg
0- 10^0	neg	neg

3.1.3 *Salmonella* real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum

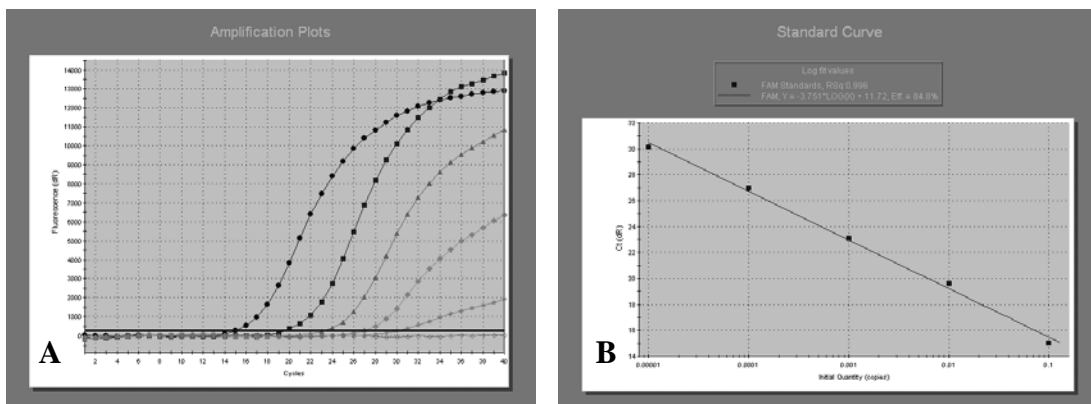
Alls hafa 99 kjúklinga- og kjúklingasaur sýni verið keyrð samhliða með ræktunargreiningum og *Salmonella* real-time PCR. Full samsvörun hefur fengist við niðurstöður ræktunnar með *Salmonella* real-time PCR (niðurstöður ekki sýndar). Af þessum 99 sýnum hafa 9 sýni greinst *Salmonella* jákvæð og 90 neikvæð. Ennfremur hafa verið keyrð 17 svínakjöttssýni samhliða þjónustugreiningum, þrjú þeirra voru *Salmonella* jákvæð og 14 neikvæð og staðfesti real-time greining ennfremur þær niðurstöður.

3.2 *Campylobacter*

3.2.1 Þróun *Campylobacter* real-time PCR greiningar

Staðalkúrvur fyrir mögnun real-time PCR aðferðarinnar með Teg polymerasa Matís má sjá á myndum 2A og 2B. Línuleg mögnun náðist yfir 5 þrep á logaritmískum skala, frá 38 ng DNA/ μ L niður í 3.8×10^{-4} ng DNA/ μ L styrk af einangruðu *C. jejuni* DNA. PCR hæfni var reiknuð út frá hallatölu DNA styrks og þröskuldsgildis (Ct) ($R=0.996$) og reyndist 84.8%.

Campylobacter greiningarhvarfið var optimerað m.t.t. styrk innri viðmiðunargreiningar (IAC, internal amplification control) og IAC þreifara. Innra viðmiðunargreining er höfð með til að koma í veg fyrir falskar neikvæðar niðurstöður t.d. vegna PCR hindra eða mistaka í PCR uppsetningu. IAC mögnun úr sértæku IAC hvarfi án *Campylobacter* DNA náðist niður í 3 eintök IAC DNA per hvarf. Styrkur IAC í greiningarhvarfi var fínstilltur við 1000 IAC eintök per hvarf, sem gaf síðbúna svörun uppúr hring 30 (gögn ekki sýnd).



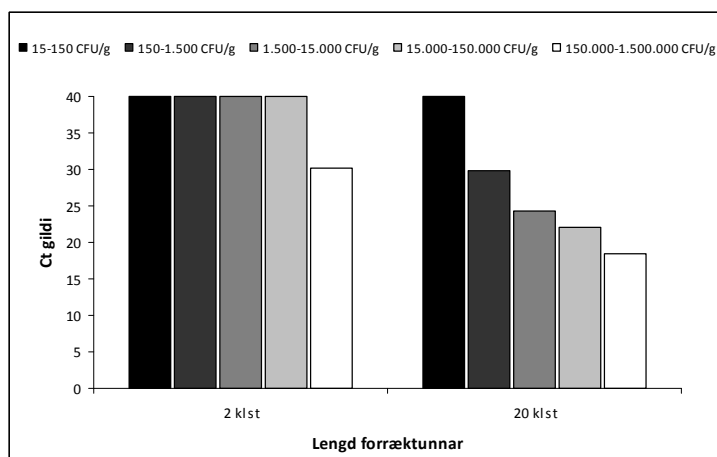
Mynd 2. Raðþynningar af *Campylobacter jejuni* DNA úr stofnasafni og mögnun úr *Campylobacter* real-time PCR greiningarhvarfi. Línuleg mögnun náðist yfir 5 stærðarþrep, úr þynningum 10^{-1} - 10^{-5} . $Rsq = 0.996$ og reiknuð PCR hæfni = 84.8% (B).

3.2.2 Greiningarhæfni *Campylobacter* real-time PCR í hæsnasaur og kjúklingi.

Könnun á greiningarhæfni hvarfsins á *Campylobacter* í hæsnasaur var prófuð og sýnaundirbúningur fínstilltur. Prófanir á sýnaundirbúningi sýndu að betri næmni greiningar fékkst með sýnatöku smærra rúmmáls úr forrækt til DNA einangrunar, 2 mL frekar en 10 mL. Aukin PCR hindrun orsakaðist ef aukið rúmmál sýnis var tekið til greiningar og næmni greiningarinnar minnkaði þar með (gögn ekki sýnd). Ennfremur sýndu samanburðartilraunir að DNA einangrun með Kingfisher búnaði gaf betri næmni en einangrun með Chelex kvoðu. Til einföldunar á greiningarferli hefur Chelex aðferð hins vegar verið notuð sem DNA einangrunaraðferð og næmi hennar verið ásættanleg.

Greiningarhæfni *Campylobacter* real-time PCR hvarfsins úr kjúklingum var prófuð með forræktun smitaðra sýna yfir nótt. Greiningarhvarfið greindi *Campylobacter* með fullum áreiðanleika í öllum sýnum niður í minnstan prófaðan smitstyrk, 10-100 CFU/mL (gögn ekki sýnd).

Kannað var hvort stytta mætti forræktunarskref þannig að skila mætti samdægurs niðurstöðum úr greiningu. Tekin voru sýni eftir, 2-4-6 og 20 klst í forrækt. Mynd 3 sýnir niðurstöður real-time PCR greiningar eftir 2 og 20 klst forræktun sýna. Ekki reyndist munur á greiningarhæfni hvarfsins úr sýnatökum eftir 2, 4 og 6 klst; aðeins sýni með hæstum smitstyrk greindust jákvæð. Eftir forræktun yfir nótt (20klst) greindust sýni smituð með 15-150CFU/g og yfir sem *Campylobacter* jákvæð (mynd 2). Ekki reyndist hægt að greina sýni án forræktunnar nema þéttni *Campylobacter* í saurnum væri í kringum 10^6 CFU/g.



Mynd 3. Grafið sýnir greiningu real-time PCR á *Campylobacter* í hæsnasaur eftir 2 og 20 klst forræktunarskref og vaxandi smitstyrk.

3.2.3 Samanburður á greiningarhæfni real-time PCR á *Campylobacter* í hæsnasaur við hefðbundnar ræktunargreiningar

Samanburðartilraun var gerð á greiningarhæfni real-time PCR greiningar og tveggja ræktunaraðferða; beinnar strikunnar á Cx skálar og faggildrar CCDA greiningar á *Campylobacter*. Þekktu magni *Campylobacter* var smitað beint út í forræktaræti blandað floti af hæsnasaur. Niðurstöður í töflu 3 sýna að real-time PCR greining á *Campylobacter* úr hæsnasaur hefur sambærilega greiningarhæfni og faggild CCDA ræktunaraðferð. Báðar aðferðir greina sýni smituð með 10-100 CFU/mL sem *Campylobacter* jákvæðar með fullum áreiðanleika. Tvö þrísýna smituð með 1-10 CFU/mL greindust einnig jákvæð með PCR greiningu. Bein strikun á Cx skálar sýndi nokkuð minni næmni og sú aðferð greindi sýni smituð með 10^3 - 10^4 CFU/mL og meiru sem *Campylobacter* jákvæð.

Séu sýni tekin til DNA einangrunar með Chelex aðferð minnkar næmni real-time PCR greiningarinnar og sýni smituð með 10^3 - 10^4 CFU/mL og meiru greinast jákvæð (gögn ekki sýnd). Næmni hennar er í því tilfalli sambærileg við beina strikun á Cx skálar.

Önnur samanburðartilraun á Cx strikun og real-time PCR greiningar með Chelex einangrun, þar sem saur var smitaður beint og þynntur saur þvínæst tekinn til forræktunnar sýndi einnig sambærilega greiningarhæfni Cx strikunnar og real-time PCR greiningar. Greiningarþröskuldurinn hér reyndist 100-1000 CFU/g fyrir real-time PCR og tífalt hærri fyrir Cx strikun.

3.2.4 *Campylobacter* real-time PCR greiningar á náttúrulega smituðum sýnum

Þjónustusýni frá kjúklingabúum voru tekin til samhliða greiningar með Cx strikun og real-time PCR greiningu. 28 sýni voru samkeyrð og reyndust öll neikvæð með báðum aðferðum. Engar falskar jákvæðar greiningar fengust með real-time PCR. Ekkert náttúrulega smitað sýni barst til PCR greiningar að undandgenginni forræktun.

Tafla 3. Samanburður á greiningarhæfni Cx og CCDA ræktunargreininga og real-time PCR greiningar á *Campylobacter* í hæsnasaur.

Smitstyrkur CFU/mL	Ræktun		PCR Ct +/- ST
	CCDA	Cx	
10^5 - 10^6	+	+	13,1 +/- 1,7
10^4 - 10^5	+	+	14,4 +/- 1,5
10^3 - 10^4	+	+	16,1 +/- 0,1
10^2 - 10^3	+	-	17,7 +/- 1,2
10-100	+	-	17,5 +/- 2,4
1-10	-	-	27,5 +/- 10,9
0-1	-	-	40,0 +/- 0,0
0	-	-	40,0

3.3 *Listeria monocytogenes*

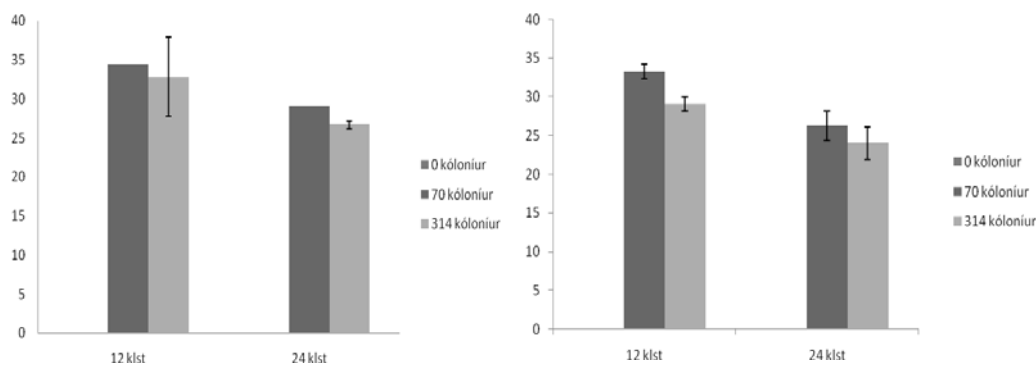
3.3.1 Þróun *L. monocytogenes* real-time PCR greiningar

Staðalkúrvur fyrir mögnun *L. monocytogenes* real-time PCR með Teg polymerasa Matís úr raðþynntri *L. monocytogenes* hreinrækt kom ágætlega út. Línuleg mögnun náðist yfir 5 þrep log skala. PCR hæfnin var 97.6% (efficiency). Fylgnistuðull (R) DNA styrks og þröskuldsgildis (Ct) var 0.927.

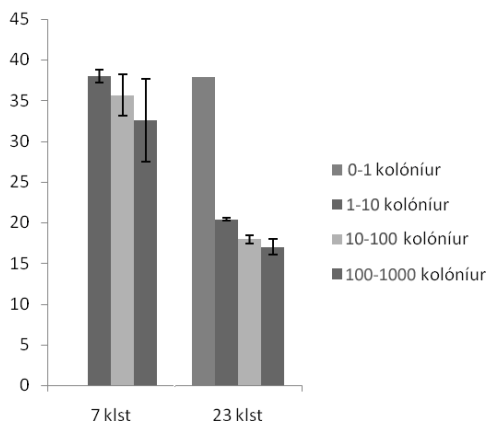
Greiningarhvarfið var fínstillt m.t.t. styrk innri viðmiðunargreiningar (IAC) og IAC þreifara. IAC mögnun úr sértæku IAC hvarfi án *L. monocytogenes* DNA náðist yfir átta þrep á logaritmískum skala. Styrkur IAC í greiningarhvarfi var fínstilltur við 1000 IAC eintök per hvarf, sem gaf síðbúna svörun uppúr hring 30 (gögn ekki sýnd).

3.3.2 Greiningarhæfni *L. monocytogenes* real-time PCR í mismunandi afurðum

Smitunartilraunir voru gerðar í rækjum, fiskimjöli og mjólk til að meta greiningarhæfni *L. monocytogenes* real-time PCR hvarfsins í þessum afurðum. *Listeria* (10-100 CFU/mL smitstyrkur) greindist í mjólk og fiskimjöli að undandgenginni 12 klst forræktun. Forræktun yfir nótt (24 klst) gaf sterkari svörun, niðurstöður þeirra smitunnar má sjá á mynd 4. Sýni úr rækjum greindust *Listeria* (1-10 CFU/mL smitstyrkur) jákvæð með fullum áreiðanleika eftir 23 klst ræktun. Jákvæð svörun fékkst úr sýnum eftir skemmri forræktunarskref, allt niður í 7 klst; en töluverður breytileiki reyndist á þeim niðurstöðum (mynd 5).



Mynd 4. Gröfin sýna *Listeria* real-time PCR greiningar úr smitunartilraunum á fiskimjöli (vinstri) og mjólk (hægri) eftir 12 og 24 klst forræktunarskref og tvenna smitstyrki *L. monocytogenes*.



Mynd 5. Grafíð sýnir *Listeria* real-time PCR greiningar úr smitunartilraunum rækjum eftir 7 og 24 klst forræktunarskref og þrenna smitstyrki *L. monocytogenes*.

3.4 *Vibrio parahaemolyticus*

3.4.1 Uppsetning *V. parahaemolyticus* *toxR* og *tdh* real-time PCR greiningarhvarfa

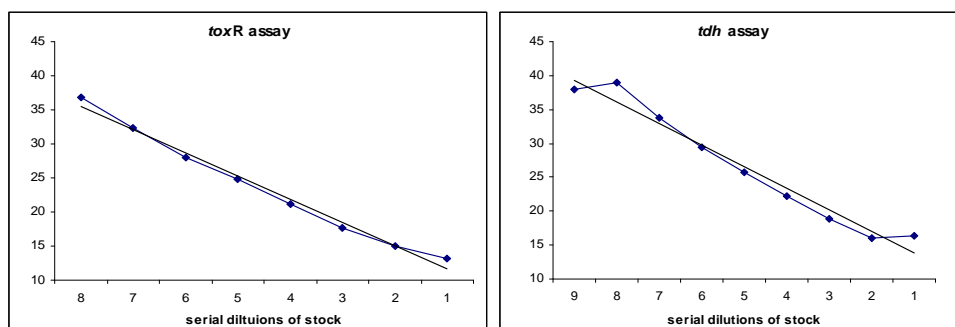
Real-time PCR keyrslur á raðþynntu *V. parahaemolyticus* DNA sýndi línulega mögnun yfir 8 veldisföll í DNA styrkleika fyrir *tdh* hvarfið og 9 veldisföll fyrir *toxR* hvarfið (mynd 6).

3.4.2 Sértekni greiningarhvarfa

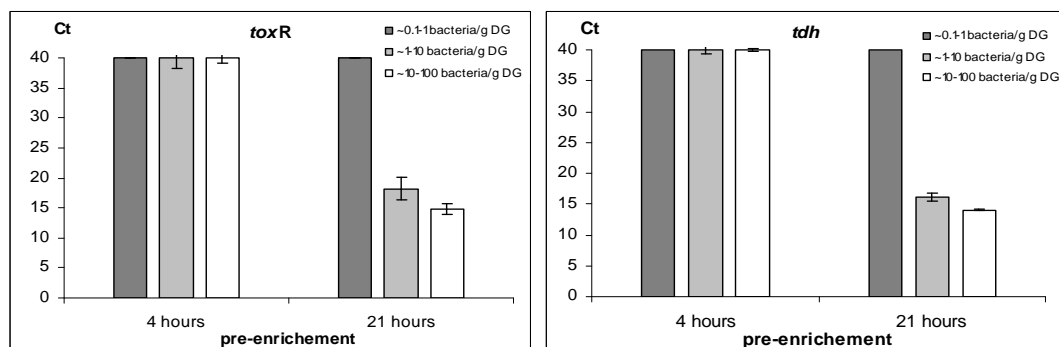
Nítján *V. parahaemolyticus* stofnar, ásamt 7 öðrum *Vibro* spp. stofnum voru ræktaðir og DNA einangrað með Chelex aðferð. Bakgrunnsupplýsingar og niðurstöður PCR greininga á stofnunum með *toxR* og *tdh* greiningarhvarfum má sjá í töflu 4. Allir *V. parahaemolyticus* stofnar utan einn sýna *toxR* mögnun en enginn non-*parahaemolyticus* stofnanna 7 svöruðu *toxR* PCR. Tvennir stofnar voru skráðir *toxR* neikvæðir en sýndu *toxR* mögnun. Af 14 *tdh* jákvætt skráðum stofnum, greindust 10 jákvæðir með *tdh* hvarfinu og einn stofn er skráður var *tdh* neikvæður sýndi mögnun.

3.4.3 Prófanir greiningarhvarfa á tilrauna-smituðum krækling

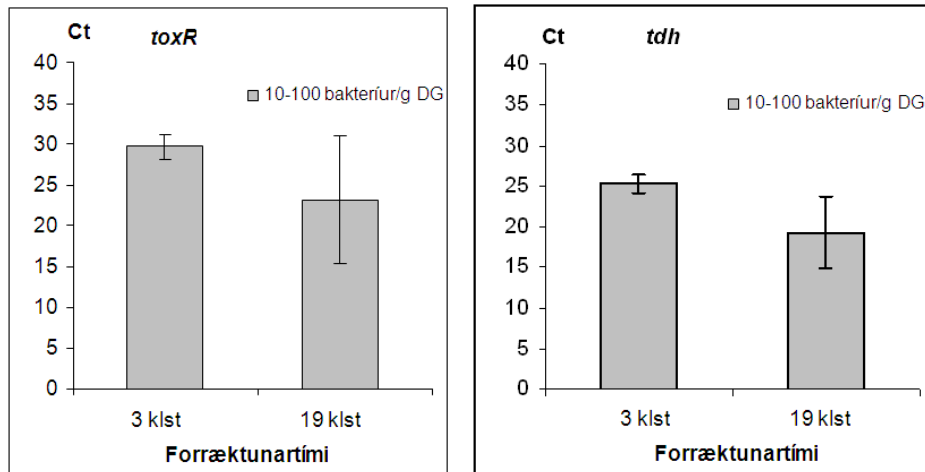
Meltingarkirtlar kræklinga voru smitaðir með *V. parahaemolyticus* af þekktum smitstyrk. Niðurstöður PCR greiningar úr tvennum smitunartilraunum eru sýndar á myndum 7 og 8. Mynd 7 sýnir niðurstöður smitunnar þar sem sýni voru smituð með þrennum styrkleikum *V. parahaemolyticus*: 0-1, 1-10 og 10-100 CFU/g. Engin mögnun náðist eftir 4 klst forrækt en eftir forræktun yfir nótt fékkst sterk mögnun úr sýnum smituðum með 1-10 CFU/g og yfir. Mynd 8 sýnir smitun þar sem sýni voru smituð með einum styrkleika *V. parahaemolyticus* 10-100CFU/g en í þessu tilfelli var síun sýna fyrir DNA einangrun gerð með 8um nítrócellulasa filter en í fyrri smituninni var filtrering gerð gegnum mun víðari möskva. Niðurstöður seinni smitunarinnar sýna að *V. parahaemolyticus* mögnun næst úr öllum sýnum þegar eftir einungis 3 klst forrækt.



Mynd 6. Real-time PCR greiningar á raðþynntu *V. parahaemolyticus* DNA með *toxR* (vinstri) og *tdh* (hægri). Staðalkúrva *toxR* hvarfsins hafði $R^2 = 0.965$ og reiknaða hæfni 105%, hallatala var -3.118. Staðalkúrva *tdh* hvarfsins hafði $R^2 = 0.965$ og reiknaða hæfni 96.6% og hallatala var -3.407.



Mynd 7. Smitunartilraun 1. Ct gildi *toxR* og *tdh* real-time PCR greininga eftir 4 og 21 klst forræktun á meltingarkirtlum (DG) kræklinga smituðum með þrennum raðþynningum af *V. parahaemolyticus*.



Mynd 8. Smitunartilraun 2. Ct gildi *toxR* og *tdh* real-time PCR greininga eftir 3 og 19 klst forræktun á meltingarkirtlum (DG) kræklinga smituðum með 10-100 CFU *V. parahaemolyticus*.

Tafla 4. Listi yfir *Vibrio* spp. stofna sem prófaðir voru með *tdh* og *toxR* real-time PCR hvörfum. Misræmi milli PCR greiningar og skráningar er litað með gulu.

Strain	nr.	<i>ToxR</i>	PCR	<i>tdh</i>	PCR
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/001	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/002	+	+	+	+
<i>V. vulnificus</i>	V05/003	-	-	-	-
<i>V. fluvialis</i>	V05/004	-	-	-	-
<i>V. hollisae</i>	V05/006	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	V05/008	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/009	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/010	-	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/016	-	+	-	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/017	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/020	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/025	+	+	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/026	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/027	+	+	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/029	+	+	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/032	+	-	+	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/035	+	+	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/036	+	+	-	-
<i>V. vulnificus</i>	V05/039	-	-	-	-
<i>V. cholerae</i>	V05/040	-	-	-	-
<i>V. alginolyticus</i>	V05/041	-	-	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/062	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/063	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/064	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/065	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/066	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/067	+	+	+	+
<i>V. parahaemolyticus</i>	V05/068	+	+	+	+

B hluti - Sérvirkar skemmdarörverur

3.5 *Pseudomonas* spp.

3.5.1 Hönnun *Pseudomonas* spp. þrímera

Eftir viðtæka leit af erfðamarki fyrir *Pseudomonas* var ákveðið að notast var við *CarA* genið sem hentar vel vegna vel varðveittra svæða í geninu. Varðveitt svæði í *CarA* geni *Pseudomonas* spp. má sjá á samröðun (tafla 4) og voru þessi svæði notuð til að smíða sértæka þrímera. PCR afurðin er 165 bp. Fremri þrímer gaf fulla samsvörun við *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. mendocina*, *P. syringae*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. aurantiaca* og 1 basa misvísun við *P. resinovirans*, *tolaasi* og *P. maginalis*. Aftari þrímer gaf fulla samsvörun við *P. fluorescens*, *P. putida*, *P. chlororaphis*, *P. aureofaciens*, *P. aurantiaca*, *P. lundensis*, *P. marginalis* og 1 basa misvísun við *P. agarici*.

Þessir þrímerar greina *Pseudomonas* hópa I og II samkvæmt skilgreiningu Shewan et al ((Shewan, Hobbs et al. 1960)heimild).

Tafla 4. Samanburður þrímera (neðst) við *carA* samraðanir. Efstu átta raðirnar voru fengnar gegnum NCBI en þær þrjár neðstu voru raðgreindar í þessari rannsókn.

Tegund (accession)	Forward primer (5'-3')	LNA þreifari (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
<i>P. putida</i> (DQ178193)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAGTCGGACAG
<i>P. putida</i> (DQ178194)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAGTCGGACAG
<i>P. putida</i> (DQ178195)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAGTCGGACAG
<i>P. putida</i> (DQ178196)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAGTCGGACAG
<i>P. fluorescens</i> (DQ178197)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAGTCGGACAG
<i>P. fluorescens</i> (DQ178198)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
<i>P. fluorescens</i> (DQ178200)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
<i>P. fluorescens</i> (DQ178201)	CAACAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
<i>Pseudomonas</i> sp. Group I	CAGCAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
<i>Pseudomonas</i> sp. Group II	CAGCAGATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTGGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
<i>P. fluorescens</i> (Strain 31)	CAGCAAATCGTTACCCTGACT	..GCCAGTTGCTCGC..	GGCTTTCAGGTAATCGGACAG
Oligos for PCR	CARCARATCGTTACCCTGACT	GCCAGTTGCTCGC	GGCTTTCAGGTARTCGGACAG

3.5.2 Fínstilling greiningarhvarfs

SYBR-green hvarf var fínstíllt m.t.t. PCR hitaprófíls og hvarfefna blöndu. Í sumum tilfellum gaf 55°C annealing hitastig fölsk jákvæð svör, en með hækkun upp í 57°C mátti koma í veg fyrir þessa krossmögnum. Þrímerstyrk var haldið við 200 nM og með þessari uppsetningu náðist fullnægjandi sértækni og næmni.

3.5.3 Sértækni

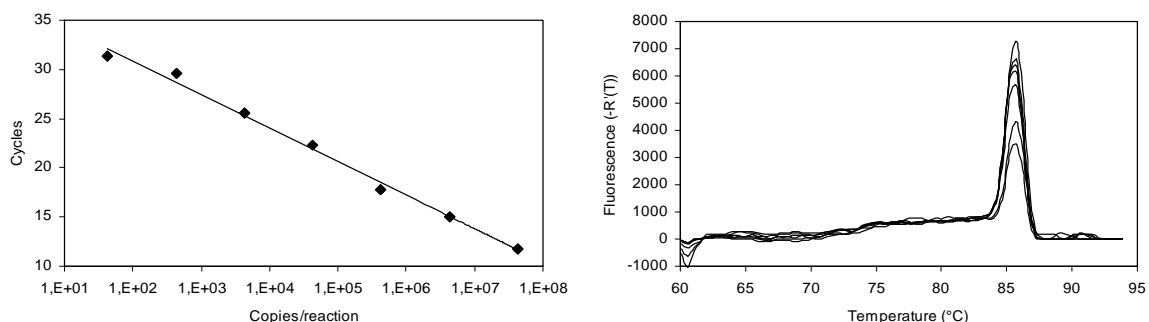
Á þeim stofnum sem *Pseudomonas* spp. SYBR green real-time PCR hefur verið prófað hefur hvarfið reynst áreiðanlegt. Allir *Pseudomonas* spp. stofnar hafa greinst og engin fölsk jákvæð svör fengist (tafla 5).

Tafla 5. Stofnar prófaðir með *Pseudomonas* spp. greiningarhvarfi. Stofnar aðkeyptir eða einangraðir úr íslenskum þorski og ýsu.

Tegund	16S Samsvörun (%)	Kenninúmer	Uppruni/ DMSZ no.	Fjöldi Stofna	SYBR Svörun	TaqMan svörun
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	AY092072	Haddock	2	+	Nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	99	AY581137	Haddock	2	+	Nd
<i>Pseudomonas</i> sp.	97	AY689025	Haddock	1	+	Nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	AF336352	Cod	5	+	Nd
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	AY092072	Cod	1	+	Nd
<i>Pseudomonas libanensis</i>	100	DQ288882	Cod	2	+	Nd
<i>Pseudomonas tolaasii</i>	100	EU169178	Cod	1	+	Nd
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	100	DQ099331	Cod	5	-	Nd
<i>Acinetobacter</i> sp.	100	AJ301674	Cod	2	-	Nd
<i>Shewanella</i> sp.	100	EU016165	Cod	18	-	Nd
<i>Shewanella putrefaciens</i>	100	AB205574	Cod	1	-	Nd
<i>Shewanella hanedai</i>	100	DQ011269	Cod	1	-	Nd
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	100	EU263112	Cod	1	-	Nd
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	100	EU195932	Cod	6	-	Nd
<i>Aeromonas sobria</i> isolate	100	DQ133179	Cod	7	-	Nd
<i>Pseudomonas</i> spp. Group I	Nd		Cod	2	+	+
<i>Pseudomonas</i> spp. Group II	Nd		Cod	2	+	+
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Group III	Nd		Cod	2	-	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp. Group IV	Nd		Cod	2	-	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nd		DSMZ 6609	1	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nd		DSMZ 50090	1	+	+
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Nd		DSMZ 50415	1	+	+
<i>Pseudomonas fragi</i>	Nd		DSMZ 3456	1	+	-

3.5.4 Næmi og línuleiki real-time PCR greiningar.

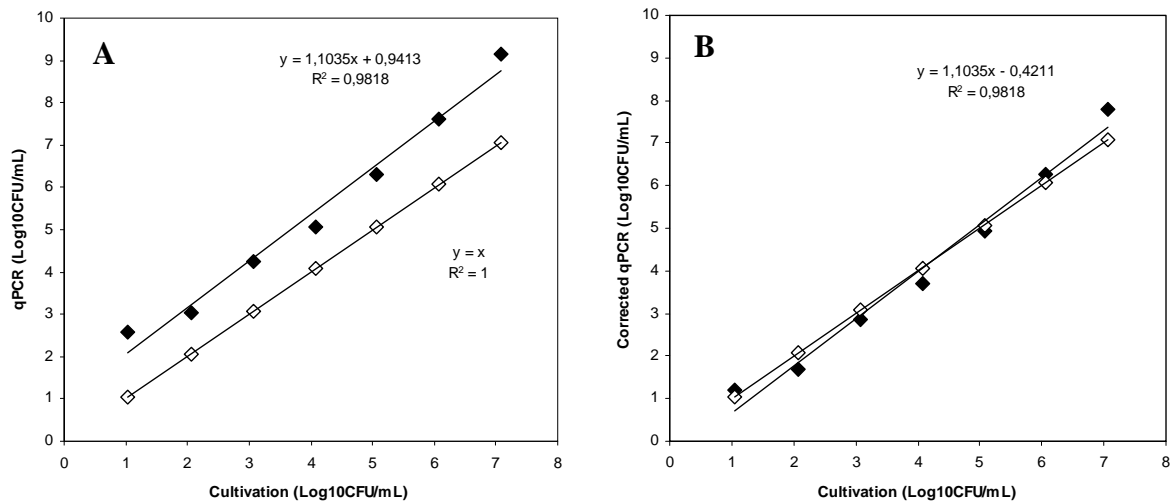
Línuleg mögnun náðist með *Pseudomonas* spp. SYBR green greiningarhvarfinu yfir 7 þrep á logaritmískum skala, frá 40 eintökum *CarA* í hvarfi up í 4×10^8 eintök hvarf. Meltikúrva PCR afurðar sýnir að bræðslumark hennar er 87,5°C (mynd 7)



Mynd 7. *CarA* Real-time PCR til magngreiningar á *Pseudomonas* spp. Tífaldaðar raðþynningar á á TOPO vector með innlimuðu *CarA* geni var keyrt með PCR. Staðalkúrva með $R_{sq} = 0,994$ og reiknaða PCR hæfni uppá 96,7% náðist með DNA styrk yfir 7 þrep á logaritmískum skala (vinstri). Bræðslumark PCR afurðarinnar var 87,5% (hægri).

3.5.5 Áreiðanleiki

Staðalinn sem notaður var til magnmælinga var ákvarðaður útfrá þekktri stærð plasmíðs og ljósmælingum á hreinsuðu DNA. Þegar magnákvæðanir skv. staðlinum voru bornar saman við beinar talningar af skálum kom í ljós 1.36 log (SD=0.4) eininga mismunur milli mælingaraðferðanna tveggja (mynd 8A). Til kvörðunar staðalsins gegn talningum var þessi mismunur dregin frá magnmælingum real-time PCR greiningarinnar (Mynd 8B). Bestri samsvörun milli aðferðanna var náð milli 2 og 6 þynninga (log eining). Magngreining var gerð úr öllum þynningum í real-time PCR og með talningum af skálum. Aðeins var mögulegt að ákvarða fjölda bakteríu kólónía (CFU) á tveimur neðstu þynningum þar sem meðaltal af þrísýnum var 11 og 118 CFU/mL.

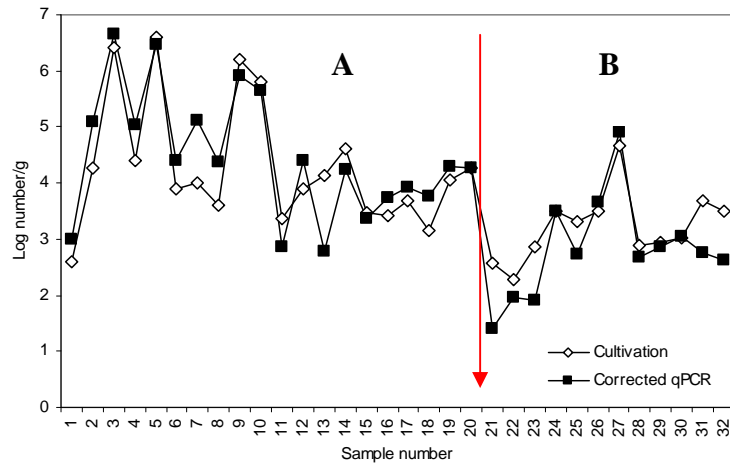


Mynd 8. Samanburður á magngreiningu *Pseudomonas* spp. með real-time PCR og talningu af skálum. Beinn samanburður (A) og leiðréttur real-time PCR samanburður (B). Lokuð form eru real-time PCR gildi og opin form niðurstöður ræktanna. Með ræktunum er gert ráð fyrir 100% línuleika fyrir hærri smitstyrki þar sem beinar talningar voru ekki mögulegar.

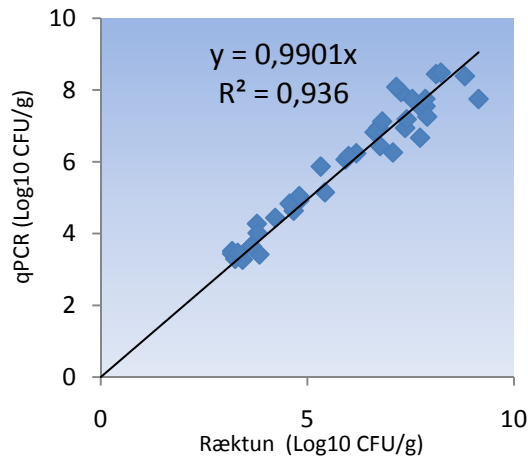
3.5.6 Real-time PCR á náttúrulega smituðum sýnum

Real-time PCR greining á *Pseudomonas* spp. var gerð á sýnum sem safnað var úr geymsluþolstilraun á þorski og beitarfiski (*Tilapia*). Þorskurinn var geymdur við mismunandi hitastig í lofttæmdum umbúðum og í andrúmslofti. Magn *Pseudomonas* spp. í sýnunum var borið saman með talningu af skálum og kvarðaðri real-time PCR aðferð. Gott samræmi var milli aðferðanna tveggja (mynd 9 og 10). Að metaltali reyndist 0.4 (+/- 0.6) log eininga mismunur á milli aðferðanna. Af könnuðum sýnum sýndu 66% 0-0.5 log₁₀ breytileika frá talningum af skálum, 25% sýndu 0.5-1 log₁₀ breytileika og 6% sýndu 1-1.5 log₁₀ breytileika frá talningu af skálum.

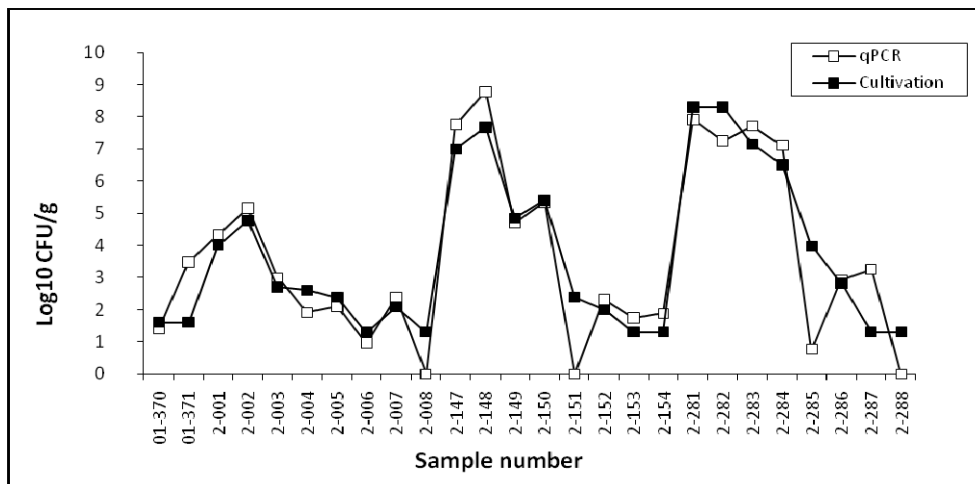
Til að sýna fram á getu *Pseudomonas* spp. greiningarhvarfsins til magngreiningar á öðrum fisktegundum en þorski var magn *Pseudomonas* í sýnum úr geymsluþolstilraun á beitarfiski greint með CFC talningum og real-time PCR. Gott samræmi var á milli aðferðanna tveggja (mynd 11). Tvö sýni gáfu ekki mögnun með PCR. Bæði innihéldu samkvæmt ræktun 20 CFU/g sem eru neðri mörk ræktunaraðferðarinnar. Ein kólónía sem vex upp í mestri þynningu myndi samsvara 20 CFU/g. Líkur eru á því að engin *Pseudomonas* spp. fruma finnist í 1mL rúmmáli sýnis við þetta lága þéttni frumna.



Mynd 9. Tengsl milli ræktunnar og real-time PCR til magngreiningar á *Pseudomonas* spp. Sýni voru tekin í geymsluþolstíraun haustið 2006 (A) og 2007 (B). Sýnanúmer eru ekki í tímaröð innan hvers sýnatökutímabils.



Mynd 10. Samsvörun magngreininga á *Pseudomonas* spp. með ræktun (x-ás) og real-time PCR (y-ás) á sýnum úr geymsluþolstíraunum. Sýni voru tekin úr fiski geymdu í lofttæmdum umbúðum (þríhyrningar) og andrúmslofti (kassar).



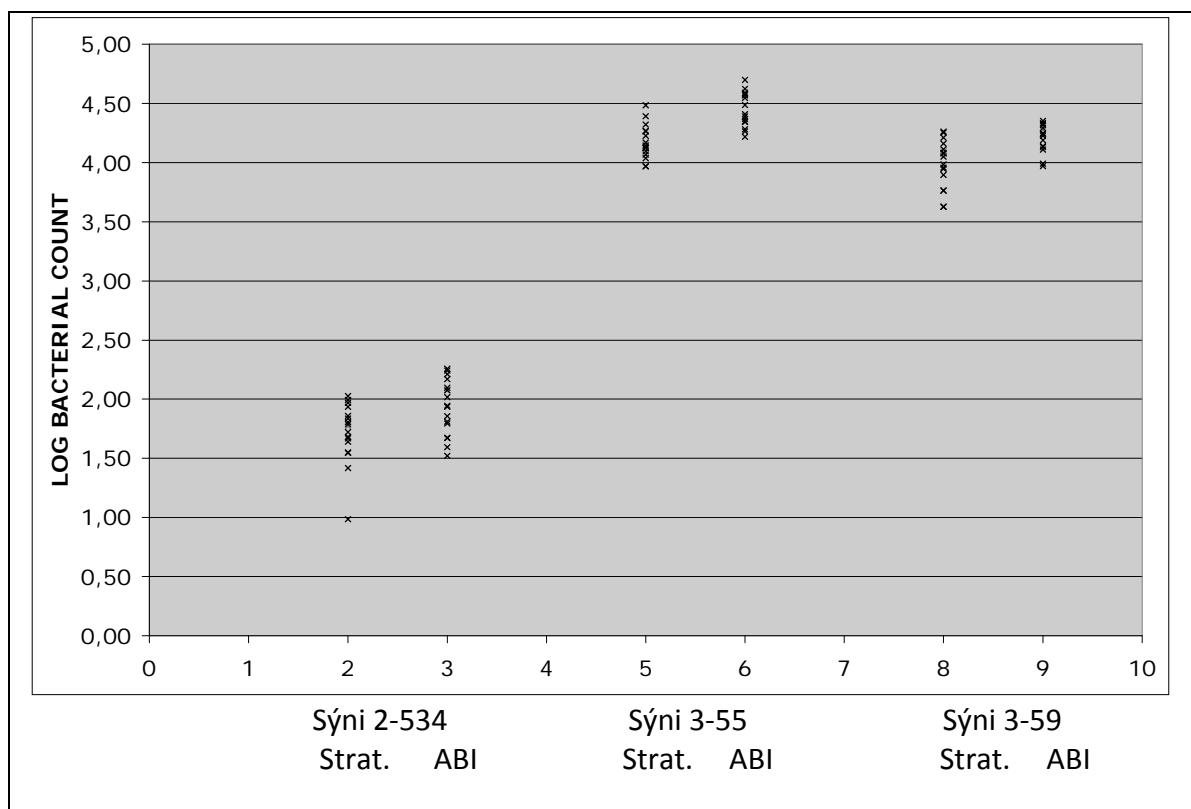
Mynd 11. Samanburður á magngreiningu *Pseudomonas* spp. í sýnum úr geymsluþolstíraun á beitarfiski með ræktun og real-time PCR.

3.5.7 Sannprófun *Pseudomonas* aðferðarinnar

Aðferðin var sannprófuð af samstarfsaðilum í Evrópu þar sem 4 tæknimenn, af mismunandi rannsóknarstofum, keyrðu *Pseudomonas* greininguna á PCR tækjum frá tveim framleiðendum (Stratagene og ABI). Tafla 6 tekur saman öll meðaltöl og staðalfrávik fengin í tilrauninni og mynd 12 sýnir dreifingu allra mæligilda á hvert sýni sem prófað var.

Tafla 6. Meðaltal magngreininga á bakteríufjölda í logaritmískum einingum á tæknimenn og PCR tæki.

Tæknimaður::PCR tæki	Sýni 2-534 meðaltal (staðalfrávik)	Sýni 3-57 meðaltal (staðalfrávik)	Sýni 3-59 meðaltal (staðalfrávik)
Tæknimaður A, Stratagene tæki	1.81 (0.12)	4.14 (0.07)	4.10 (0.09)
Tæknimaður A, ABI tæki	1.95 (0.23)	4.33 (0.04)	4.23 (0.07)
Meðaltal tæknimanns A	1.88 (0.18)	4.23 (0.12)	4.16 (0.10)
Tæknimaður B, Stratagene tæki	1.82 (0.16)	4.21 (0.16)	3.96 (0.06)
Tæknimaður B, ABI tæki	1.94 (0.19)	4.55 (0.04)	4.27 (0.11)
Meðaltal tæknimanns B	1.88 (0.18)	4.38 (0.21)	4.09 (0.18)
Tæknimaður C, Stratagene tæki	1.75 (0.27)	4.24 (0.24)	4.19 (0.09)
Tæknimaður C, ABI tæki	2.11 (0.16)	4.46 (0.24)	4.29 (0.06)
Meðaltal tæknimanns C	1.93 (0.28)	4.35 (0.25)	4.24 (0.09)
Tæknimaður D, Stratagene tæki	1.48 (0.36)	4.11 (0.05)	3.69 (0.08)
Tæknimaður D, ABI tæki	1.71 (0.25)	4.48 (0.10)	4.07 (0.10)
Meðaltal tæknimanns D	1.60 (0.31)	4.30 (0.21)	3.88 (0.22)
Meðaltal á Stratagene tæki	1.71 (0.26)	4.17 (0.14)	3.99 (0.21)
Meðaltal á ABI tæki	1.93 (0.24)	4.46 (0.15)	4.21 (0.12)
Heildarmeðaltal (staðalfrávik)	1.82 (0.27)	4.08 (0.20)	4.09 (0.20)
Staðalfrávik endurgeranleika (reproducibility)	14.8%	5.0%	4.9%
Dreifing endurtakanleika (repetability)	6.5-24.1%	1.0-5.6%	1.4-2.5%



Mynd 12. Dreifing allra mæligilda tæknimanna A,B,C og D raðað eftir sýnum og PCR tæki. Y-ásinn sýnir Log_{10} CFU/g

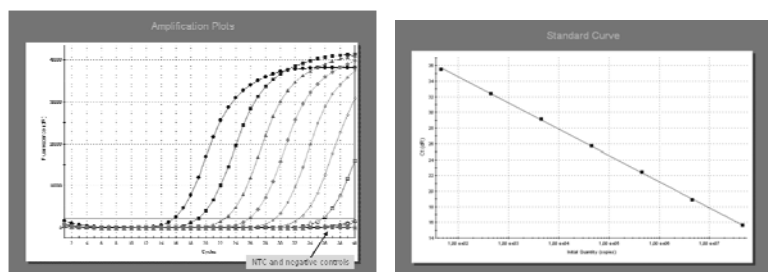
3.6 *Photobacterium phosphoreum*

3.6.1 Hönnun þrímera og þreifara

Nokkur gen og þrímerarar voru prófaðir í þessum verkhluta. Gen á borð við TMAO reductasi, *hdc*, *lux* genagengið og 16S rRNA voru talin álitleg í fyrstu. Prófanir á *lux* genagenginu sýndu að ekki reyndist unnt að fá jákvæða svörun þrátt fyrir þó nokkra umleitun. Að lokum tókst að staðsetja varðveitt svæði í 16S geni *P. phosphoreum* sem var ólík viðmiðunarröðum úr öðrum tegundum bakteria og var það því notað til smíði þrímera sem magna upp 64bp afurð ásamt TaqMan þreifara í miðri markröðinni.

3.6.2 Næmni, línuleiki og sértækni

Greiningarhvarfið sýndi góða næmni og sértækni, línuleg mögnun úr raðþynningum af *P. phosphoreum* DNA náðist frá u.þ.b. 45×10^7 niður í 45 eintök af 16S geninu. Reiknuð PCR hæfni var 99.1% og R^2 stuðull var 1.000 (mynd 13).

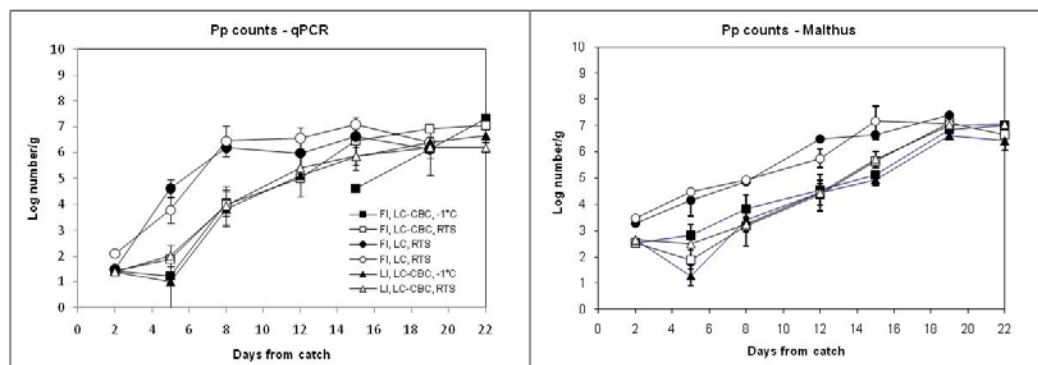


Mynd 13. sértækni *P. phosphoreum* greiningar á tíföldum raðþynningum á *P. phosphoreum* DNA, frá 45×10^7 eintökum 16S gens per hvarf.

Könnun á sértækni hvarfsins sýndi sterka mögnun úr *P. phosphoreum* stofnum. Nokkur krossmögnun við óskildar tegundir fékkst með SYBR green uppsetningu en með innleiðingu TagMan þreifara í hvarfið var komist fyrir ósértæka mögnun úr þeim stofnum sem þegar hafa verið prófaðir (Tafla 7)

3.6.3 Real-time PCR greining á náttúrulega smituðum sýnum

Real-time PCR greining á *P. phosphoreum*. var gerð á sýnum sem safnað var úr geymsluþolstilraun á þorski. Þorskurinn var geymdur við mismunandi hitastig í lofttæmdum umbúðum og í andrúmslofti. Magn *P. phosphoreum* í sýnunum var borið saman með Malthus aðferð og kvarðaðri real-time PCR aðferð. Gott samræmi var milli aðferðanna tveggja. Mynd 14 sýnir niðurstöður magngreininga með aðferðunum tveimur á sýnum sem tekin vorum með reglulegum millibili við geymslu á fiski og mynd 15 samræmi aðferðanna tveggja.



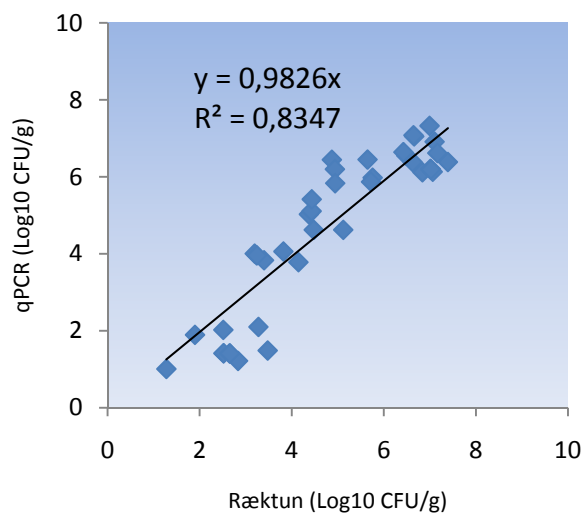
Mynd 14. Magnákvörðun *P. phosphoreum* í þorsklökum úr geymsluþolstilraun með real-time PCR greiningu (vinstri) og ræktun (hægri).

Tafla 7. Stofnar sem prófaðir hafa verið fyrir sértækni *Photobacterium phosphoreum* PCR hvarfs. Stofnar voru fengnir úr ýsu og fiskvinnsluumhverfi

Tegund ¹	Fjöldi stofna	Svörun
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	26	+
<i>Shewanella baltica</i>	19	-
<i>Shewanella</i> sp.	12	-
<i>Pseudomonas</i>	12	-
<i>Brochothrix</i> sp.	8	-
<i>Photobacterium phosphoreum</i> ²	3	-
<i>Psychrobacter</i> sp.	2	-
<i>Pseudoalteromonas</i> sp.	2	-
<i>Aeromonas sobria</i>	2	-
<i>Chryseobacterium</i>	1	-
<i>Arthrobacter</i>	1	-
<i>Acinetobacter</i>	1	-
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	1	-
<i>Shewanella hanedai</i>	1	-

¹Tegund var ákvörðuð með 16S rRNA raðgreiningu

²Grunur leikur á um að þessir tilteknu stofnar hafi verið ranglega skilgreindir en eru hafðir hér með engu að síður



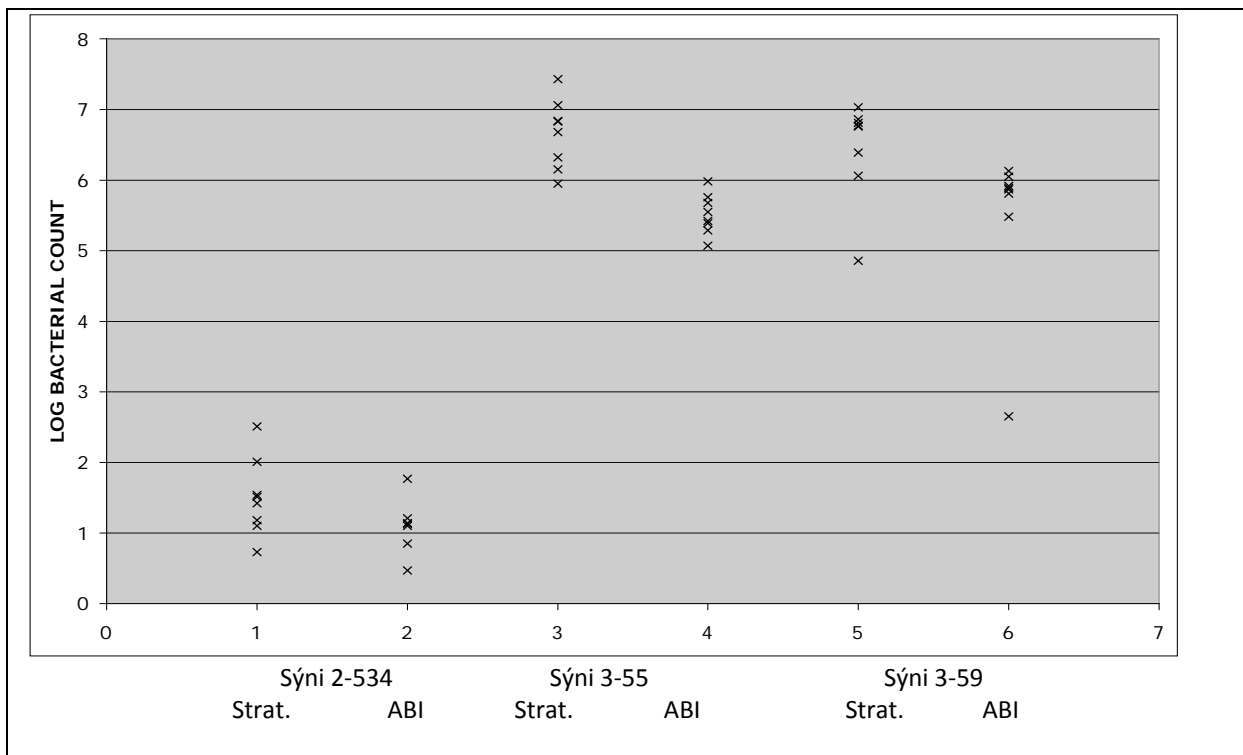
Mynd 15. Samræmi milli magngreiningar real-time PCR og ræktunar á *P phosphoreum* í þorsklökum úr geymslupólstíraun.

3.6.4 Sannprófun *Photobacterium* aðferðarinnar

Aðferðin var sannprófuð af samstarfsaðilum í Evrópu þar sem 4 tæknimenn, af mismunandi rannsóknarstofum, keyrðu *Photobacterium* phosphoreum greininguna á PCR tækjum frá tveim framleiðendum (Stratagene og ABI). Tafla 8 tekur saman öll meðaltöl og staðalfrávik fengin í tilrauninni og mynd 16 sýnir dreifingu allra mæligilda á hvert sýni sem prófað var.

Tafla 8. Meðaltal magngreininga á bakteríufjölda í logaritmískum einingum á tæknimenn og PCR tæki.

Tæknimaður::PCR tæki	Sýni 2-534 meðaltal (staðalfrávik)	Sýni 3-57 meðaltal (staðalfrávik)	Sýni 3-59 meðaltal (staðalfrávik)
Tæknimaður A, Stratagene tæki	1.52 (0.02)	6.58 (0.36)	6.62 (0.33)
Tæknimaður A, ABI tæki	1.44 (0.47)	5.52 (0.33)	6.00 (0.18)
Meðaltal tæknimanns A	1.48 (0.28)	6.05 (0.67)	6.31 (0.42)
Tæknimaður B, Stratagene tæki	1.62 (1.26)	6.05 (0.14)	5.46 (0.85)
Tæknimaður B, ABI tæki	0.84 (0.52)	5.52 (0.64)	4.35 (2.40)
Meðaltal tæknimanns B	1.23 (0.91)	5.79 (0.49)	4.91 (1.61)
Tæknimaður C, Stratagene tæki	1.60 (0.59)	6.87 (0.27)	6.92 (0.16)
Tæknimaður C, ABI tæki	0.99 (0.20)	5.54 (0.21)	5.90 (0.02)
Meðaltal tæknimanns C	1.29 (0.50)	6.20 (0.80)	6.41 (0.59)
Tæknimaður D, Stratagene tæki	1.26 (0.23)	7.14 (0.42)	6.76 (0.01)
Tæknimaður D, ABI tæki	1.14 (--)	5.48 (0.09)	5.64 (0.23)
Meðaltal tæknimanns D	1.22 (0.17)	6.31 (0.98)	6.21 (0.66)
Meðaltal á Stratagene tæki framkvæmt af öllum tæknimönnum	1.50 (0.55)	6.66 (0.49)	6.44 (0.71)
Meðaltal á ABI tæki framkvæmt af öllum tæknimönnum	1.10 (0.39)	5.52 (0.29)	5.48 (1.16)
Heildarmeðaltal (staðalfrávik)	1.31 (0.51)	6.09 (0.71)	5.96 (1.05)
Staðalfrávik endurgeranleika (reproducability)	39.1%	11.6%	17.7%
Dreifing endurtakanleika (repeatability)	1.4-77.7%	1.7-11.6%	0.1-15.5%



Mynd 16. Dreifing allra mæligilda tæknimanna A,B,C og D raðað eftir sýnum og PCR tæki. Y-ásinn sýnir Log_{10} CFU/g

4 UMRÆÐUR

Þessi skýrsla lýsir þróun örverurannsóknardeildar Matís á hraðvirkum real-time PCR greiningaraðferðum á matvælasýklunum *Campylobacter*, *Salmonella* og *Listeria* í landbúnaðarafurðum annarsvegar og *V. parahaemolyticus* og sérvirku skemmdarörverunum *Pseudomonas* spp. og *Photobacterium phosphoreum* í sjávarfangi hinsvegar.

Aðferðirnar eru annað hvort magnbundnar mælingar á örverum eða staðfesting á því hvort sýklar séu til staðar eða ekki. Sýklar eru oft á tíðum í mjög litlu magni í matvælum og eru vart greinanlegir án forræktunar á sýninu þ.e. sýnið er blandað við æti sem vekja tiltekin sýkil sem leitað er eftir og stuðlar að frekari vexti þeirra. Eftir forræktun, sem oftast varir í 18-24 klst eru meiri líkur á að sýkillinn greinist sé hann til staðar en á sama tíma er ekki hægt að mæla upphaflegt magn sýkilsins.

Magnbundnu greiningarnar sem þróaðar voru í verkefninu beindust að bakteríum sem ávallt eru til staðar, sérvirkar skemmdarbakteríur. Þær vaxa og dafna á meðan á geymslu stendur en vaxtarhraði þeirra ákvarðast af ytri aðstæðum s.s. hitastigi og öðrum geymsluskilyrðum. Í þessum tilvikum er því gagnlegra að geta mælt magn skemmdarörveranna og fá um leið óhlutdrægt mat á gæðum fisksins. Rannsóknir hafa sýnt að ýmsar tegundir baktería þrífast í matvælum en sumir hópar baktería stuðla meira að skemmdaráhrifum. Því hafa þær verið nefndar sérvirkar skemmdarbakteríur.

Í flestum greiningaraðferðum sem settar voru upp var notast við *Teg* polymerasann til að knýja PCR hvarfið. Þetta ensím er í eigu Matís og því ættu að vera talsverðir möguleikar á framleiðslu ódýrari greiningarsetta en margir erlendir samkeppnisaðilar hafa tók á sem þurfa að reiða sig á dýrari polymerasa á almennum markaði. Þetta gæti styrkt samkeppnisstöðu þessara setta sé litið til framtíðar.

A hluti - Hraðvirkar greiningaraðferðir á sjúkdómsvaldandi örverum.

Salmonella & Campylobacter

Hraðvirkar real-time PCR aðferðir til greininga á *Salmonella* og *Campylobacter* hafa verið fullmótaðar. Prófanir á *Salmonella* real-time PCR greiningarhvarfinu í mismunandi afurðum og samanburður við greiningarhæfni hefðbundinna ræktunargreininga gáfu góða raun. Samanburður á greiningarhæfni *Salmonella* real-time PCR greiningar í hænsnasaur (sem var erfiðasti efniviðurinn viðfangs, sökum PCR hindra í saurnum) við faggilda NMKL (Nordisk metodikkomité for Næringsmidler) ræktunar aðferð sýndi að næmni aðferðanna var sambærileg. Hvor um sig greindi saursýni smituð með 10-100 *Salmonella*/g saur sem jákvæð. *Salmonella* real-time PCR greiningarhvarfið greindi *Salmonella* ennfremur með fullum áreiðanleika í öllum öðrum hráefnum, þ.e. fiskimjöli, hrognum, rækju, laxi og ýsu, sem prófuð voru og menguð með 10-100 CFU/g eða hærri smitstyrk að undangenginni 8-16 klukkustunda forræktun.

Prófanir á greiningarhæfni *Campylobacter* aðferðarinnar í hænsnasaur og kjúklingum hafa að sama skapi sýnt að greina má bakteríuna í sýnum sem innihalda aðeins 10-100 CFU/g með fullum áreiðanleika að undandenginni forræktun yfir nótt. Til samanburðar má nefna að almennt er forræktun 18-24 klukkustundir, með þeim aðferðum sem notaðar eru í dag, áður en sáð er á hefðbundið ræktunaræti. Samanburður við faggilda NMKL ræktun sýndi ennfremur að real-time PCR aðferðin hafði næmni sem var sambærileg eða meiri en faggild NMKL ræktun.

Kannaður var möguleiki á styttingu forræktunarskrefs fyrir sýnatöku niður í 4-5 klst. Með því móti mætti ljúka greiningu á einum vinnudegi og skila niðurstöðum samdægurs. Þær prófanir sýndu að með núverandi uppsetningu var ekki hægt að fá áreiðanlega staðfestingu á smiti með nægjanlegri næmni eftir svo stutta forræktun. Fyrirkomulag greininganna með núverandi uppsetningu yrði því á

Þann máta að sýni yrðu forræktuð yfir nótt og tekin til PCR greiningar að morgni næsta dags. Niðurstöður greiningarprófa myndu þá gefa niðurstöður um hádegi daginn eftir að sýni bærust til greininga. Greiningarferlið hefur því verið styttað úr þeim 5-7 dögum sem ræktunargreiningar taka, niður í einn sólarhring með real-time PCR greiningum á *Salmonella* og *Campylobacter*.

Víðtækar prófanir á áreiðanleika *Salmonella* real-time PCR greiningarhvarfsins voru gerðar með samkeyrslu við þjónustusýni sem send voru til greiningar á þjónustudeild Matís. Yfir hundrað sýni úr kjúklingum, svínakjöti og hæsnasaur voru greind samhliða með ræktunargreiningu og real-time PCR greiningu. Sýndi sá samanburður fulla samsvörun milli aðferðanna. Öll sýni sem greindust jákvæð við ræktun svöruðu jákvætt með real-time PCR og engar falskar jákvæðar greiningar voru gerðar. Áreiðanleiki real-time PCR greiningarhvarf fyrir *Salmonella* fyrir þau sýni sem þegar hafa verið prófuð jafnast því á við faggilda NMKL samanburðaraðferð.

Ekki hefur reynst mögulegt að kanna til hlítar áreiðanleika *Campylobacter* aðferðarinnar á náttúrulega smituðum sýnum þar sem erfitt reyndist að fá jákvæð sýni. Greiningarhvarfið hefur hins vegar verið keyrt á fjölda ósýkra *Campylobacter* hæsnasausýna og hafa engin fölsk jákvæð svör komið fram.

Almennt séð gekk uppsetning *Campylobacter* og *Salmonella* greiningarhvarfa vel og sett markmið hafa náðst. Niðurstöður okkar sýna að real-time PCR greiningarprófin sem sett hafa verið upp til í þessu verkefni til greininga á *Salmonella* og *Campylobacter* hafa sambærilega og jafnvel meiri næmni en þær faggildu NMKL aðferðir sem notaðar voru til samanburðar. Báðar mælingar má nú nýta á rannsóknarstofu Matís og innleiðing á hraðvirkum *Salmonella* mælingum fyrir íslenskan matvælaíðnað er nú raunhæfur kostur. Til að bjóða megi aðferðirnar sem fullgildar þjónustumælingar verður hins vegar að kanna áreiðanleika aðferðanna tveggja betur með frekari samkeyrslu á náttúrulega smituðum og ósmituðum sýnum. Faggiltar *Salmonella* greiningar er ekki hægt að framkvæma að svo stöddu með þessari aðferð. Til að svo megi verða þarf mun víðtækari sannprófanir af óháðum aðilum (external validation) með töluverðum tilkostnaði. Hugsanlegt er að farið verði út í slíkt ef efni standa til. Einnig til að þessar greiningar geti nýst við faggiltar mælingar á rannsóknarstofum sem gefa út vottorð fyrir útflutning. Reglugerðir Evrópusambandsins er varða *Campylobacter* eru ekki jafn strangar og t.a.m. fyrir *Salmonella* sem gerir það að verkum að auðveldara ætti að reynast að fá aðferðina viðurkennda til þjónustumælinga hérlandis. Með þeim samanburði sem settur hefur verið fram í þessari skýrslu má telja að mögulegt væri að fá aðferðina samþykka af MAST. Aðferðin hefur verið borin saman við núverandi greiningaraðferðir og næmni hennar hefur reynst fyllilega sambærilegt við faggilda ræktunaraðferð NMKL (númer) og strikun á Cx æti sem er sú aðferð sem almennt er nú notuð til þjónustugreininga á *Campylobacter* í sláturstofnum kjúklingabúa.

Listeria & Vibrio

Uppsetning greiningaraðferða fyrir *Listeria monocytogenes* í landbúnaðarafurðum og *Vibrio parahaemolyticus* í skelfiski tókust vel. Hér á landi og víðar er krafa um eftirlit á *V. parahaemolyticus* og *Listeria monocytogenes* minni en t.a.m. fyrir *Salmonella* og *Campylobacter*. Þó er ekki síður mikilvægt að hafa hraðvirkar greiningar á takteinunum fyrir þessa sýkla þegar þörf krefur.

Listeria smit hefur gegnum tíðina einkum verið tengt neyslu sjávarafurða, einkum rækju sem og mjólkurafurða. Tíðni bakteríunnar í fisk- og rækjuvinnslum hefur minnkað mikið undanfarinn áratug vegna betra hreinlætis og þekkingar á smitleiðum. Gerilsneyðing mjólkurvara kemur ennfremur í veg fyrir smit við neyslu mjólkurvara en þó eru kröfur um eftirlit með *L. monocytogenes* við framleiðslu á mjólkurafurðum. Real-time PCR aðferð til greiningar á *Listeria* var sett upp og næmni hennar prófuð á tilraunasmituðu fiskimjöli, rækjum og mjólk. Niðurstöður þeirra prófana sýna að með aðferðinni má greina *L. monocytogenes* í þessum afurðum á innan við sólarhring þrátt fyrir lágan smitstyrk sýkilsins (10-100 CFU/ml). Ekki var farið í sannprófun á áreiðanleika aðferðarinnar með náttúrulega smituðum

sýnum innan verkefnisins enda lítið af jákvæðum *Listeria* smituðum sýnum sem greinast hérlendis árlega.

Settar voru upp tvennar real-time PCR aðferðir til greiningar á *Vibrio parahaemolyticus* í skelfiski. Annarsvegar aðferð til greiningar á sjúkdómsvaldandi *V. parahemolyticus* og hins vegar heildar *V. parahaemolyticus*. *V. parahaemolyticus* stofnar eru ekki allir sjúkdómsvaldandi og því mikilvægt að búa yfir greiningaraðferðum sem greint geta á milli skaðlegra og meinlausra stofna. Niðurstöður prófana sýna að næmni aðferðanna er góð í tilraunasmituðum kræklingi og greina má krækling smitaðan með litlu magni *V. parahaemolyticus* (10-100 CFU/g) eftir fárra klukkustunda forræktun. Áreiðanleiki aðferðarinnar var prófaður á nokkrum tugum sýna innan þessa verkefnis sem sýndu nokkurt misræmi við bakgrunnsupplýsingar þeirra stofna er prófaðir voru. Frekari sannprófun aðferðanna og fínþússun vankanta er að vænta.

Algengi *V. parahaemolyticus* hér við land er ekki þekkt þar sem engar rannsóknir hafa farið fram á algengi *Vibrio* tegunda í sjó við Ísland. Ástæðu þessa má ekki hvað síst rekja til þess að lítið hefur borið á *Vibrio* tegundum hérlendis. Vöxtur *V. parahaemolyticus* er háður hitastigi sjávar og greinast þær oftast þar sem sjávarhiti er milli 10-30°C og sjaldan þegar sjávarhiti er kominn undir 15°C (www.shellfishquality.ca). Sumarhiti sjávar hér við land hefur undanfarin ár víða mælst milli 12-13°C og þess því varla langt að bíða þar til bakterían gerir vart við sig í strandsjó hér við land. Dreifing *Vibrio* tegunda hefur aukist mjög undanfarinn áratug og finnst hún nú víða á svæðum þar sem hana var ekki áður að finna (Martinez-Urtaza, Lozano-Leon et al. 2008). Þessi aukna útbreiðsla hefur þá einnig haft í för með sér vaxandi vandamál á ræktunarsvæðum skelfisks í Evrópu og N. Ameríku. Sýkingar af völdum *V. parahaemolyticus* voru nánast óþekktar í Evrópu fram til 1998 (Martinez-Urtaza, Simental et al. 2005). Sjúkdómsvaldandi O3:K2 *V. parahaemolyticus* hefur nú einnig borist til Evrópu. Aukin áhersla með eftirlit *V. parahaemolyticus* og skelfiskræktunar er að vænta frá eftirlitsaðilum. Sem stendur er sala sjávarafurða sem innihalda undir 10.000 baktería á hvert gramm leyfð í Bandaríkjunum. Hins vegar hefur sýkinga orðið vart í skelfiski sem innihaldið hefur undir 200 baktería á hvert gramm (Daniels, Ray et al. 2000). Endurskoðun á reglugerðum varðandi *V. parahaemolyticus* er því bersýnilega nauðsynleg.

B hluti - Hraðvirkar greiningaraðferðir á sérvirkum skemmdarörverum

Pseudomonas spp og *Photobacterium phosphoreum* greiningarhvörfin voru þróuð frá grunni innan þessa verkefnis. Hraðvirkum greiningum á sérvirkum skemmdarörverum í fiski með real-time PCR aðferð hefur ekki áður verið lýst. Aðferðirnar bjóða uppá magngreiningu á *Pseudomonas* spp og *Photobacterium phosphoreum* til hraðvirks gæðamats á fiskafurðum. Þessi hluti verkefnisins var unnin í nánú samstarfi við Evrópuverkefnið Chill-On sem fjallar um flutninga og kælingu á ferskum matvælum og þá sérstaklega fiski. Hugsunin með þessum aðferðum er að geta boðið bæði upp á sjálfstæða tæknilausn til að meta ferskleika fiskflaka en einnig sem hluti af heildstæðu flutnings- og rekjanleika kerfi þar sem fylgst er með ýmsum þáttum til að tryggja öryggi og gæði vörunnar s.s. hitastigsferlum, tímaferlum og gæðavísu. Yfirleitt eru gæði og ástand fiskafurða ákvarðað með skynmati sem er góð leið að mörgu leyti en gallinn er sá að ekki er hægt að nota hana við rútínubundnar mælingar en einnig er hún háð smekkvísi manna sem oft getur verið mismunandi. Í viðskiptum með fisk er því hagur af því að hafa óháðar aðferðir til að staðfesta gæði afurðanna.

Innan Chill-On verkefnisins er einnig unnið að því að þróa örveruvaxtarlíkön fyrir bæði *Pseudomonas* og *Photobacterium phosphoreum* til þess að spá fyrir um geymsluþol fisks. Í þessum líkönum er helst tekið tillit til örverutalninga en einnig hitaferla við framleiðslu og flutninga. Til þess að geta nýtt þessi líkön í rauntíma við framleiðslu og móttöku á fiski í fjarlægum höfnum er því nauðsynlegt að geta metið magn skemmdarbakteríanna á hraðvirkan hátt. Með hefðbundnum aðferðum væru

niðurstöður að berast 2-3 dögum eftir að sýni eru tekin sem er of langur tími til að unnt sé að koma niðurstöðunum inn í geymsluþolsspá. Með þeim aðferðum sem þróaðar voru hér væri möguleiki á að mata spálíkanið með niðurstöðum mælinga samdægurs.

Niðurstöðurnar prófana þar sem mismunandi rannsóknarmenn og mismunandi tæki eru notuð sýna að auðvelt ætti að vera að yfirfæra aðferðina á aðrar rannsóknarstofur þó að annar tækjakostur sé þar fyrir hendi.

Stefnt er að því að koma þessum mælingum upp á þjónustuform og einnig að vinna áfram með þessar aðferðir í tengslum við geymsluþolsspá. Næstu skref í þessari þróun gætu t.d. verið að koma upp verkferlum sem auðveldara væri að framkvæma inn í vinnslunum sjálfum t.d. með einföldun á sýnaundirbúningi.

5 ÞAKKARORÐ

Aðstandendur verkefnisins vilja þakka fjármögnunaraðilum, AVS, Tækniþróunarsjóði og Evrópusambandinu fyrir veittan stuðning.

6 HEIMILDIR

- Abdulmawjood, A., S. Roth, et al. (2002). "Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction." *Mol Cell Probes* **16**(5): 335-9.
- Aznar, R. and B. Alarcon (2003). "PCR detection of *Listeria monocytogenes*: a study of multiple factors affecting sensitivity." *J Appl Microbiol* **95**(5): 958.
- Brakstad, O. G., K. Aasbakk, et al. (1992). "Detection of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction amplification of the nuc gene." *J Clin Microbiol* **30**(7): 1654.
- Cui, S., C. M. Schroeder, et al. (2003). "Rapid sample preparation method for PCR-based detection of *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef." *J Appl Microbiol* **95**(1): 129-34.
- Dalgaard, P., O. Mejlholm, et al. (1996). "Conductance method for quantitative determination of *Photobacterium phosphoreum* in fish products." *Journal of Applied Bacteriology* **81**: 57-64.
- Daniels, N. A., B. Ray, et al. (2000). "Emergence of a new *Vibrio parahaemolyticus* serotype in raw oysters: A prevention quandary." *JAMA* **284**(12): 1541-5.
- Deschaght, P., T. De Baere, et al. (2009). "Comparison of the sensitivity of culture, PCR and quantitative real-time PCR for the detection of *Pseudomonas aeruginosa* in sputum of cystic fibrosis patients." *BMC Microbiol* **9**: 244.
- Ellingson, J. L., J. L. Anderson, et al. (2004). "Twelve hour real-time PCR technique for the sensitive and specific detection of *Salmonella* in raw and ready-to-eat meat products." *Mol Cell Probes* **18**(1): 51-7.
- Josefsen, M. H., N. R. Jacobsen, et al. (2004). "Enrichment followed by quantitative PCR both for rapid detection and as a tool for quantitative risk assessment of food-borne thermotolerant campylobacters." *Appl Environ Microbiol* **70**(6): 3588-92.
- Lubeck, P. S., P. Wolffs, et al. (2003). "Toward an international standard for PCR-based detection of food-borne thermotolerant *Campylobacters*: assay development and analytical validation." *69*(9): 5664.

- Martinez-Urtaza, J., A. Lozano-Leon, et al. (2008). "Environmental determinants of the occurrence and distribution of *Vibrio parahaemolyticus* in the rias of Galicia, Spain." Appl Environ Microbiol **74**(1): 265-74.
- Martinez-Urtaza, J., L. Simental, et al. (2005). "Pandemic *Vibrio parahaemolyticus* O3:K6, Europe." Emerg Infect Dis **11**(8): 1319-20.
- McKillip, J. L. and M. Drake (2004). "Real-time nucleic acid-based detection methods for pathogenic bacteria in food." J Food Prot **67**(4): 823-32.
- Reynisson, E., M. H. Josefsen, et al. (2006). "Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR." Journal of Microbiological Methods **66**(2): 206-16.
- Rodriguez-Lazaro, D., M. Hernandez, et al. (2004). "Quantitative Detection of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by Real-Time PCR: Assessment of *hly*, *iap*, and *lin02483* Targets and AmpliFluor Technology." **70**(3): 1366.
- Shewan, J. M., G. Hobbs, et al. (1960). "A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with special reference to the Pseudomonadeceae." Journal of applied bacteriology **23**(3): 379-390.