

SVETOVNI DAN VARNOSTI HRANE 2020

WORLD FOOD SAFETY DAY 2020

2. konferenca ob svetovnem dnevu varnosti hrane 2020

2nd Conference On World Food Safety Day 2020

Ljubljana, Državni svet, 8. junij 2020

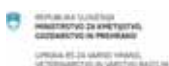
Analitična in diagnostična orodja za zagotavljanje učinkovite mikrobiološke varnosti živil v izrednih razmerah

Darja Barlič - Maganja, Katja Bezek

- UP, Fakulteta za vede o zdravju, Izola
- e-naslov: darja.maganja@fvz.upr.si; katja.bezek@fvz.upr.si

Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020



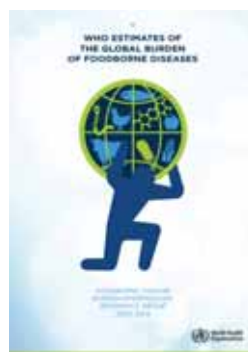
World Food Safety Day 2020

Uvod

WHO dec. 2015: najbolj celovita ocena vpliva kontaminirane hrane na zdravje

- globalna in regionalna ocena pojavnosti, smrtnosti in obremenitve zaradi hrane prenosljivih bolezni (diareja: letno 550 milj. obolelih in 230 000 smrti; otroci 220 milj. obolelih in 96 000 smrti)

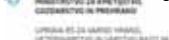
- najbolj pogosti povzročitelji: norovirusi, kampilobakter, salmonela (NTF), EPEC, ETEC



Slika: https://www.who.int/foodsafety/areas_work/foodborne-diseases/ferg_infographics/en/

Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020

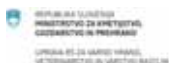


World Food Safety Day 2020

Uvod

- **EFSA** (2019) za leto 2018:
 - 5146 izbruhov okužb povezanih z živili (5098 z živili, 48 z vodo):
 - **bakterije (57 %),**
 - **bakterijski toksini (24.2 %),**
 - virusi (13.5 %), ostali povzročitelji (4.3 %), paraziti (1 %)
- VIR okužb najpogosteje živila živalskega izvora (jajca in jajčni izdelki, meso in mesni izdelki, ribe in ribiški proizvodi, mleko in mlečni izdelki)
- **SLO** (2013 – 2017):
 - prijavljenih **424 različnih izbruhov**, od tega **25 izbruhov povzročenih s hrano**.
 - v 2017 prijavljena **dva izbruha črevesne nalezljive bolezni povzročena z živili**, v katerih je zbolelo 45 oseb, štiri osebe so bile hospitalizirane, umrl ni nihče - v obeh izbruhih **povzročitelj ni bil dokazan, obstajala pa je povezava med zaužitimi živili in bolniki**

Svetovni dan varnosti hrane 2020



Za javnost/For public dissemination

World Food Safety Day 2020

Uvod

- **FWD-Net** (Food-and Waterborne Diseases and Zoonoses Network): **evropska mreža** epidemiološkega in laboratorijskega spremljanja bolezni, povezanih s povzročitelji iz hrane, vode in zoonoz
 - Mreže držav članic EU koordinira ECDC
- **PulseNet International: mreža nacionalnih in regionalnih laboratorijskih mrež** - namenjene spremljanju okužb s hrano po vsem svetu
 - Laboratoriji uporabljajo standardizirane metode in izmenjujejo informacije v realnem času



<https://www.cdc.gov/pulsenet/participants/international/index.html>
Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020



World Food Safety Day 2020

Kontaminacija hrane s patogenimi MO

• Viri mikrobiološke kontaminacije hrane:

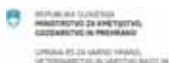
- Izločki živali oz. okuženi viri v okolju (zoonoze)
- Okuženi delavci
- Onesnaženo okolje, surovine, pripomočki
- Odkrivanje patogenov v hrani je pomembno tako z vidika varnosti hrane kot tudi javnega zdravja.
- **Potrebujemo:** učinkovit nadzor in sistem ukrepov za obvladovanje in preprečevanje širjenja bolezni



**Hitre, občutljive in zanesljive laboratorijske metode
za identifikacijo in karakterizacijo mikroorganizmov**

Za javnost/For public dissemination

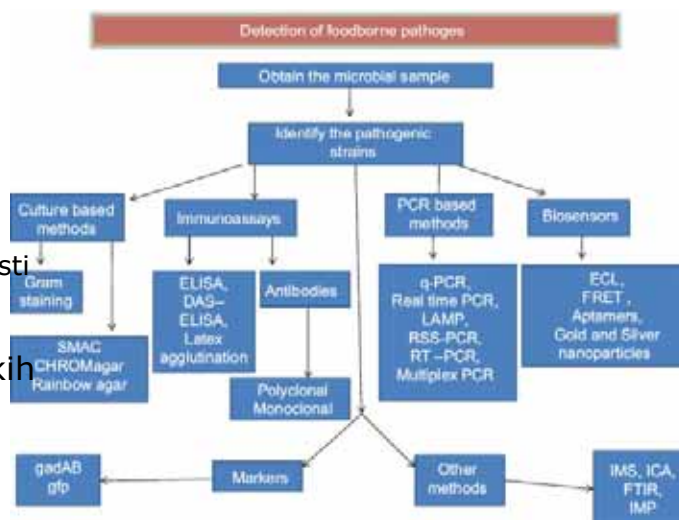
Svetovni dan varnosti hrane 2020



World Food Safety Day 2020

Metode za dokazovanje bakterij v živilih

- Tradicionalne splošno sprejete gojitvene metode:
 - **Temeljijo na fenotipskih značilnostih in osebni razlagi rezultatov**, lahko pride do napačne identifikacije
 - **Zamudne:** npr. za potrditev odsotnosti kampilobaktra 4-9 dni, za prisotnost 14-16 dni
- Kombinacija gojitvenih, imunoloških in molekularnih metod
- Direktno dokazovanje DNA/RNA, uporaba različnih detekcijskih metod (PCR, biosenzorji)



Priyanka B in sod. A review on detection methods used for foodborne pathogens. Indian Journal of Medical Research 2016, 144(3), 327–338.

Svetovni dan varnosti hrane 2020

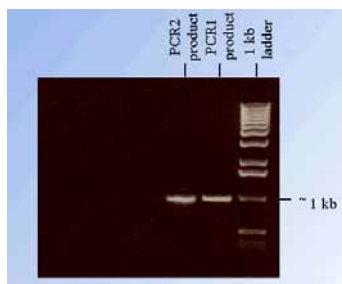
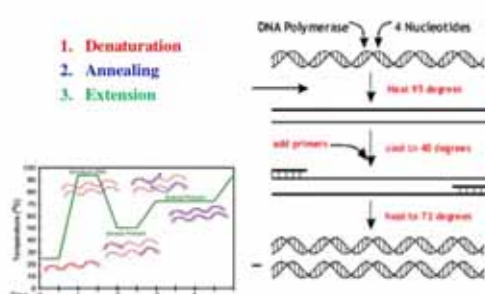


Za javnost/For public dissemination
World Food Safety Day 2020

Dokazovanje bakterijske DNA

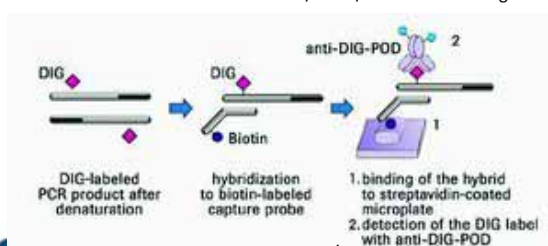
- Pomnoževanje z metodo PCR** (simplex, multiplex)

PCR - Principle



Dokazovanje produktov PCR

<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/11636120910?lang=en®ion=SI>



Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

efitn



REPUBLIKA SLOVENIJA
OKRŽANI SVET

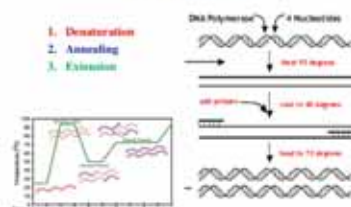
Za javnost/For public dissemination
World Food Safety Day 2020

Dokazovanje bakterijske DNA

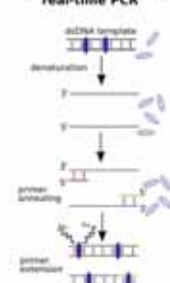
- Pomnoževanje z metodo PCR v realnem času (SYBR Green, TaqMan)**

Detekcija produktov PCR

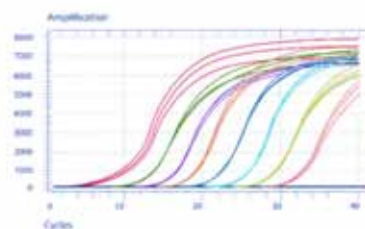
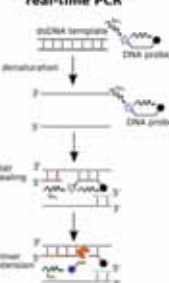
PCR - Principle



Fluorescent dye-based real-time PCR



DNA probe-based real-time PCR



<https://bitesizebio.com/29508/real-time-pcr-digest/>

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

efitn



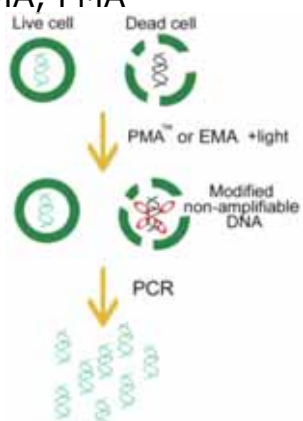
REPUBLIKA SLOVENIJA
OKRŽANI SVET

Za javnost/For public dissemination

World Food Safety Day 2020

Dokazovanje živih bakterij z molekularnimi metodami

- Uporaba interkalirajočih barvil EMA, PMA



Iz matriksa izoliramo samo DNA živih bakterij, ki jo dokažemo s PCR,.....

Fusco V in Quero GM. Culture-Dependent and Culture-Independent Nucleic-Acid-Based Methods Used in the Microbial Safety Assessment of Milk and Dairy Products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13, 493-537

Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

eftn

REPUBLIKA SLOVENIJA
OKOLJSKI SVEET

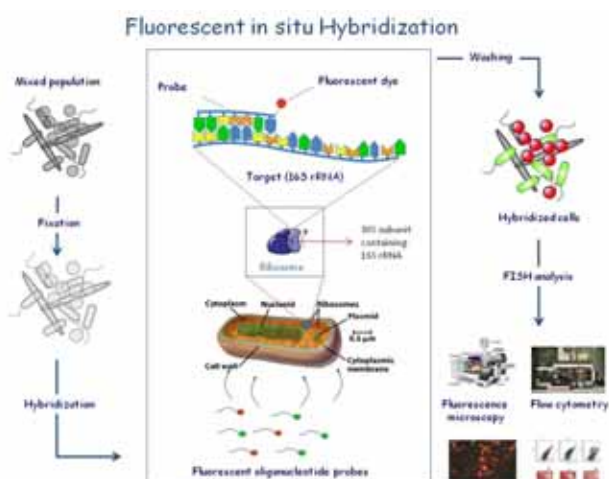
REPUBLIKA SLOVENIJA
OKOLJSKI SVEET

World Food Safety Day 2020

Dokazovanje živih bakterij z molekularnimi metodami

Dokazovanje rRNA

Dokazovanje presnovno aktivnih MO, dokažemo tudi VBNC



<https://www.biovisible.com/indexRD.php?page=fish>

Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

eftn

REPUBLIKA SLOVENIJA
OKOLJSKI SVEET

REPUBLIKA SLOVENIJA
OKOLJSKI SVEET

World Food Safety Day 2020

Dokazovanje živih bakterij z molekularnimi metodami

Dokaz mRNA - prisotna samo pri živih MO

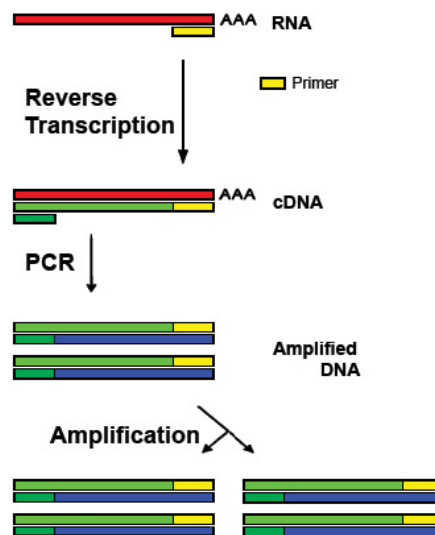
Kakovost mRNA !

RT - PCR

UPORABA

Ocena odzivnosti bakterij na biotske in abiotske obremenitve (proizvodnja, skladiščenje, distribucija)

Analiza izražanja določenih genov (virulenca)



<http://www.differencebetween.net/science/difference-between-rt-pcr-and-qpcr/>

Za javnost/For public dissemination

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO



REPUBLIKA SLOVENIJA
DRŽAVNI SVET

World Food Safety Day 2020

Dokazovanje živih bakterij z molekularnimi metodami

Dokaz mRNA - prisotna samo pri živih MO

Kakovost mRNA !

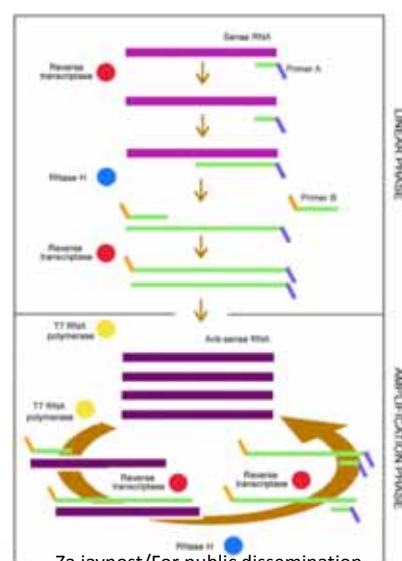
NASBA

**Izotermalno pomnoževanje
mRNA**

Bolj enostavna metoda kot RT-PCR

Ne zahteva dragih termopomnoževalnikov

Lažje prenosljiva tehnologija – lab-on-chip



Fusco V in Quero GM. Culture-Dependent and Culture-Independent Nucleic-Acid-Based Methods Used in the Microbial Safety Assessment of Milk and Dairy Products. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2014, 13, 493-537

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO



REPUBLIKA SLOVENIJA
DRŽAVNI SVET

Za javnost/For public dissemination

World Food Safety Day 2020

Biosenzorji za hitro dokazovanje MO v živilih

- Primerni za preverjanje varnosti hrane v celotnem proizvodnem procesu
- Omogočajo odziv v realnem času

Naprave z biosenzorjem sestavlja:

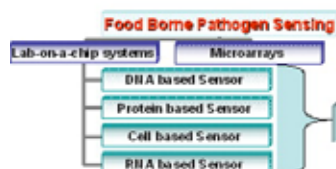
- **Bioreceptor** (biološki material, ki prepozna analit – MO, encim, celica, DNA, RNA)
- **Pretvornik** (omogoča pretvorbo energije, ki nastane pri prepoznavanju biološke molekule v optične ali električne signale).
- **Transdukcija** je lahko optična, elektrokemična, termometrična, magnetna, mikromehanična...

Svetovni dan varnosti hrane 2020

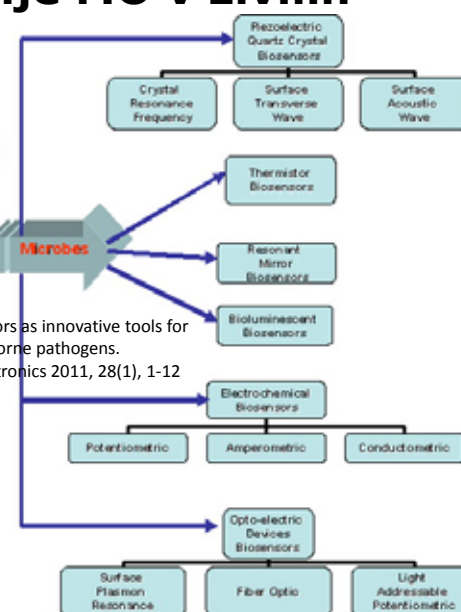
REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

efitn

REPUBLIKA SLOVENIJA
OBČASNI SVET



Arora P in sod. Biosensors as innovative tools for the detection of food borne pathogens. Biosensors and Bioelectronics 2011, 28(1), 1-12



Za javnost/For public dissemination
World Food Safety Day 2020

"Point-of-care" za analizo varnosti hrane

KAJ OMOGOČAJO?

- Predstavljajo ogromen potencial za hitro analizo varnosti hrane (on-site in real-time)
- Preproste, robustne, hitre, stroškovno učinkovite in uporabnikom prijazne
- Temeljijo na biočipih
- Primerne za detekcijo patogenih MO v živilih brez laboratorijske podpore
- Omogočajo detekcijo in kvantifikacijo z uporabo preproste aplikacije na pametnih telefonih
- Analizo lahko opravijo nekvalificirani uporabniki na mestu samem

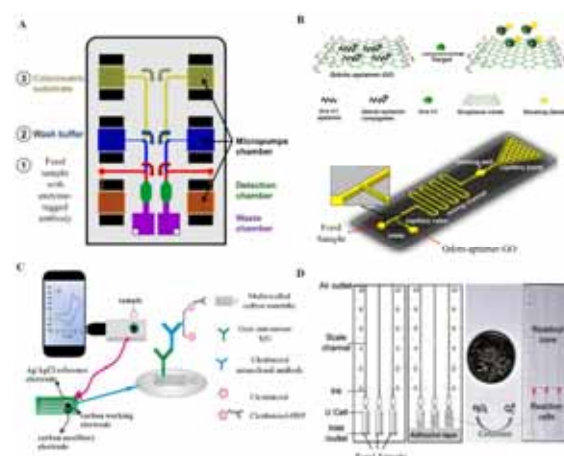


Figure 3. Schematic diagram of a point-of-care device for food safety analysis.

Choi JR in sod. Emerging Point-of-care Technologies for Food Safety Analysis. Sensors 2019, 19, 817

Za javnost/For public dissemination
World Food Safety Day 2020

Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIJSTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO

efitn

REPUBLIKA SLOVENIJA
OBČASNI SVET

"Point-of-care" – KJE SMO V PRAKSI?

IZZIVI:

- Poenostavitev in avtomatizacija uporabniških korakov
- Priprava živilskega matriksa
- Dovajanje reagentov za izvajanje vseh zaporednih korakov (ekstrakcija DNA/RNA, pomnoževanje, detekcija) na enostaven in stroškovno učinkovit način
- Stabilnost reagentov brez laboratorijske podpore shranjevanja
- Možnost dokazovanja večjega števila različnih kontaminantov (multiplexing)
- Razvoj močnejših aplikacij za pametne telefone, ki omogočajo analizo na kraju samem, hkrati pa omogočajo hiter prenos in shranjevanje podatkov za njihovo analizo
- Asinhroni prenos podatkov, vključevanje alternativnih virov energije (baterijska ali sončna energija)
- KLJUČNO: Združevanje vseh ključnih korakov obdelave** (odvzem vzorcev, priprava vzorcev in detekcija) v eno popolnoma integrirano napravo

Svetovni dan varnosti hrane 2020



Za javnost/For public dissemination

World Food Safety Day 2020

Zaključki

- Idealna analitična in diagnostična orodja za zagotavljanje učinkovite mikrobiološke varnosti živil morajo zagotoviti:
 - Visoko specifičnost (odkrivanje le bakterij/e, ki nas zanima/jo)
 - Visoko občutljivost (zaznavanje min. števila bakterijskih celic),
 - Čim krajši čas postopka (nekaj minut do ure)
 - Preprosto izvedbo (kratki postopki vzorčenja in preprosta uporaba specializirane opreme)
 - Stroškovno učinkovitost (cenovna sprejemljivost reagentov in opreme)

Svetovni dan varnosti hrane 2020



Za javnost/For public dissemination

World Food Safety Day 2020

Zaključki

- Razvoj biosenzorjev in naprav "point-of-care" odpira nove možnosti za hitro in specifično opredeljevanje mikrobnih kontaminantov v vseh fazah pridelave, predelave in priprave hrane.
- Miniaturizirane in avtomatizirane naprave za uporabo na terenu omogočajo hiter odziv tudi v izrednih razmerah, ko je zagotavljanje javnega zdravja in preprečevanje nalezljivih bolezni še poseben izziv.

<https://www.gov.uk/government/news/market-exploration-point-of-care-diagnostics>



Svetovni dan varnosti hrane 2020

Za javnost/For public dissemination
World Food Safety Day 2020

Za javnost/For public dissemination

HVALA ZA VAŠO POZORNOST

<https://www.ift.org/news-and-publications/blog/2019/september/top-10-most-common-foodborne-pathogens>



Svetovni dan varnosti hrane 2020

REPUBLIKA SLOVENIJA
MINISTRSTVO ZA KMETIŠTVO,
GOZDARSTVO IN PREHRANO
UPRAVA RS ZA VARNOST HRANE
VE TOVARNOVAH IN V SVOBODNI TRGOVINI

eftn
EUROPEAN FOOD TRADING NETWORK



REPUBLIKA SLOVENIJA
OBČJANI SVET

World Food Safety Day 2020