

PATOGENY CZŁOWIEKA W ŻYWNOSCI POCHODZENIA ROŚLINNEGO – WADY I ZALETY ZASTOSOWANIA TECHNIKI REAL-TIME PCR DO ICH WYKRYWANIA

Ewelina Jaroszewska, Damian Pietracha, Anna Misiewicz

Instytut Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego im. prof. Wacława Dąbrowskiego

Zakład Mikrobiologii

ul. Rakowiecka 36, 02-532 Warszawa,

damian.pietracha@ibprs.pl

Streszczenie

W ostatnich latach zaobserwowano znaczny wzrost liczby epidemii chorób pokarmowych związanych ze spożywaniem świeżych produktów, w skład których wchodzi surowce roślinne. Źródło zakażeń najczęściej wiązano z pomidorami, melonami, sałatą, pistacjami, przyprawami, kielkami, malinami, roślinami strączkowymi i zbożem, a główne patogeny będące ich przyczyną to: *Salmonella spp.*, patogenne *Escherichia coli*, *Campylobacter spp.*, *Shigella spp.*, *Yersinia enterocolitica* i *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* i *Clostridium perfringens*, a także norowirusy i HAV. Obecnie najbardziej obiecujące metody wykrywania i identyfikacji bakterii zanieczyszczających żywność opierają się na technice PCR. Metody wykorzystujące technikę real-time PCR (qPCR) pozwalają zdecydowanie szybciej niż metody klasyczne wykryć obecność określonego drobnoustroju w badanej próbce. Opracowanie niezawodnych i powtarzalnych metod wykrywania drobnoustrojów potencjalnie patogennych dla człowieka, opartych na technice qPCR, wymaga optymalizacji i standaryzacji oraz potwierdzenia kompetencji w badaniach biegłości. Zapotrzebowanie na szybkie i mniej pracochłonne metody wykrywania drobnoustrojów patogennych w żywności ciągle rośnie, co wpływa na rosnącą popularność metod opartych na qPCR.

Słowa kluczowe: real-time PCR, qPCR, patogeny, żywność roślinna, metody alternatywne

HUMAN PATHOGENS IN PLANT FOOD - APPLICATIONS OF REAL-TIME PCR METHODS FOR THEIR DETECTION

Summary

Recently there has seen a significant increase in the number of outbreaks associated with fresh plant products. Source of outbreaks most often has been associated with the following crops: tomatoes, melons, lettuce, pistachios, spices, sprouts, raspberries, pulses and grain, and the main pathogens which cause them are: *Salmonella* spp., pathogenic *Escherichia coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp. *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum* and *Costridium perfringens*, noroviruses and HAV. Currently, the most promising methods for detection and identification of food pathogenes are based on PCR. Methods based on the technique of real time PCR (qPCR) allow you to specify the presence of the organism in the sample, much faster than classical methods. The development of reliable and reproducible methods for the detection of potentially pathogenic microorganisms to humans based on qPCR technique requires optimization, standardization, and accurate assessment of proficiency testing. The demand for rapid, less labor-intensive and explicit methods for detecting specific microorganisms in foods is still growing which affects the growing popularity of qPCR-based methods.

Key words: real-time PCR, pathogens, plant food, alternative methods

WSTĘP

Dla producentów żywności jej jakość oraz bezpieczeństwo mikrobiologiczne podczas produkcji i przechowywania są priorytetami. Ostatnie wydarzenia związane z zakażeniami *E. coli* spowodowanymi spożyciem kontaminowanych kielków pokazały, jak ważny dla producentów żywności jest dostęp do szybkich, precyzyjnych, czułych, tanich oraz wiarygodnych metod wykrywania mikrobiologicznych zakażeń żywności, z naciskiem na te pochodzenia roślinnego. Obecnie najbardziej obiecujące metody wykrywania i identyfikacji bakterii zanieczyszczających żywność bazują na technice PCR oraz jej licznych wariantach.

Jakkolwiek większość bakterii chorobotwórczych lepiej rozwija się na surowcach i produktach pochodzenia zwierzęcego, to istnieje znaczne niebezpieczeństwo występowania patogenów także w żywności pochodzenia roślinnego. Na obecność bakterii w produktach roślinnych wpływ ma wiele czynników. Najczęściej patogeny te przenoszone są na rośliny z takich rezerwuarów drobnoustrojów, jak: gleba nawożona obornikiem, fekalia, woda, kurz, zwierzęta, pracownicy przemysłu przetwórczego będący nosicielami różnych patogenów.

W ostatnich latach obserwowano znaczny wzrost liczby epidemii pokarmowych związanych ze świeżymi warzywami [Elizaquivel i Sanchez 2012]. Zwiększona liczba zakażeń pochodzących z żywności roślinnej wynika z rosnącego zainteresowania zdrowym odżywianiem, a co za tym idzie – z konsumpcji większej ilości warzyw i owoców, jak również z coraz większej popularności tzw. „żywności ekologicznej”, nawożonej nawozem naturalnym. Istnieją liczne dowody wskazujące na to, że warzywa uprawiane na polach użyźnianych nawozami naturalnymi lub ściekami często są znacznie bardziej zanieczyszczone drobnoustrojami niż ich odpowiedniki hodowane na polach użyźnianych nawozami sztucznymi. Następnym poważnym źródłem zakażeń może być proces produkcyjny. Zanieczyszczenie może być skutkiem złego stanu higienicznego podczas procesów przetwórczych, magazynowania i dystrybucji. Najczęściej zanieczyszczone są przenośniki taśmowe, schładzacze, krajalnice, urządzenia do rozdrabniania, mielenia i plasterkowania [Sip 2010].

Patogeny występujące w żywności pochodzenia roślinnego

Z raportu przygotowanego na zamówienie Unii Europejskiej, zawierającego dane z lat 2007–2011, wynika, że w Europie żywność niebędąca pochodzenia zwierzęcego (ang. *food of non-animal origin*, FoNAO) była powodem powstania 10% ognisk epidemicznych, 26% przypadków zakażeń, 35% hospitalizacji oraz 46% zgonów w stosunku do wszystkich zakażeń mikrobiologicznych żywności traktowanych w tym porównaniu jako całość. Jeśli wyłączyć z tego dane związane z zakażeniami szczepem *E. coli* VTEC O104, w 2011 r. z FoNAO wiązało się 10% ognisk epidemicznych, 18% przypadków zakażeń, a tylko 8% hospitalizacji i 5% zgonów.

Źródła zakażeń najczęściej związane były z: pomidorami, melonami, sałatą, pistacjami, przyprawami, kiełkami, malinami, roślinami strączkowymi i zbożem, a główne patogeny będące ich przyczyną to: *Salmonella* spp., patogenne *E. coli*, *Campylobacter* spp., *Shigella* spp., *Y. enterocolitica* i *Y. pseudotuberculosis*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *B. cereus*, *Cl. botulinum* i *Cl. perfringens*, norowirusy i HAV [Raport europejski 2013]. Zestawienie patogenów i roślin, w których wykryto dany patogen, przedstawia tabela 1.

Tabela 1. Wybrane patogeny występujące w żywności pochodzenia roślinnego i produkty, w których zostały wykryte

Patogen	Produkty, w których wykryto patogen
<i>Aeromonas sp.</i>	kiełki lucerny, szparagi, brokuły, kalafior, seler, sałata, papryka, szpinak
<i>Bacillus cereus</i>	kiełki lucerny, kiełki rzeżuchy, ogórki, kiełki gorczycy, kiełki soi
<i>Campylobacter jejuni</i>	zielona cebula, sałata, grzyby, ziemniaki, pietruszka, papryka, szpinak
<i>Clostridium botulinum</i>	kapusta, grzyby, pieprz
<i>Clostridium perfringens</i>	szpinak, fasola
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	kiełki lucerny, sok jabłkowy, kapusta, seler, kolendra, kiełki rzeżuchy, sałata
<i>Listeria monocytogenes</i>	kiełki, kapusta, cykoria, ogórek, bakłażan, sałata, grzyby, ziemniaki, rzodkiewka, sałata, pomidor
<i>Salmonella sp.</i>	kiełki lucerny, karczochy, liście buraków, seler, kapusta, kantalupa, kalafior, chili, kolendra, bakłażan, cykoria, koper, zielona cebula, sałata, kiełki mungbean, rzeżucha, musztarda, sok pomarańczowy, pietruszka, papryka, sałaty, szpinak, truskawki, pomidor, arbuz
<i>Shigella sp.</i>	kantalupa, seler, sałata, pietruszka, szalotki
<i>Staphylococcus sp.</i>	kiełki lucerny, marchew, kapusta, sałata, cebula, pietruszka, rzodkiewka
<i>Vibrio cholerae</i>	kapusta, mleko kokosowe, sałata
<i>Yersinia sp.</i>	marchewka, sałata, kiełki fasoli, soja

Największy problem wśród ludzkich patogenów występujących na świeżych owocach i warzywach stanowią patogeny układu pokarmowego (np. *E. coli* O157: H7 i *Salmonella* sp.), które charakteryzują się wysokim potencjałem wzrostu oraz niską dawką zakaźną wywołującą chorobę. Przypadki salmonelloz związane były ze spożyciem pomidorów, kiełków, kantalupy, mamei, soku jabłkowego i soku pomarańczowego, natomiast zakażenia *E. coli* O157:H7 – ze spożyciem sałaty, kapusty, soku jabłkowego, a enterotoksigeniczną *E. coli* – ze spożyciem marchewki. Udokumentowano związki shigelloz z sałatą, cebulką dymką i pietruszką; cholery z truskawkami; chorób pasożytniczych z malinami, bazylią, prefermentowanym sokiem jabłkowym; wirusa zapalenia wątroby typu A z sałatą, malinami i mrożonymi truskawkami; wirusów Norwalk i typu Norwalk z melonem, sałatą i selerem [Buck i in. 2003].

Według amerykańskiego Centrum ds. Kontroli i Zapobiegania Chorobom [CDC] w 2008 roku dwiema głównymi grupami produktów pochodzenia roślinnego związanymi z większością chorób pokarmowych były owoce pestkowe i warzywa łądzykowe. Patogenem odpowiedzialnym za zakażenia była głównie *Salmonella* spp. oraz norowirus pochodzący z warzyw liściastych. Ponadto we wrześniu 2011 r. liczne ogniska zakażeń *Listeria monocytogenes* związane ze spożyciem melona kantalupa spowodowały 29 zgonów z kilku stanach USA [Raport europejski 2013].

Kolejny poważny problem stanowią zanieczyszczone nasiona służące do otrzymywania kiełków roślin. Obecnie uważa się, że są one najważniejszym źródłem chorób pokarmowych związanych z kiełkami. Najczęściej bardzo trudne lub niemożliwe jest ustalenie pierwotnego miejsca pochodzenia zakażonych nasion, ponieważ dystrybuowane są one na duże odległości. Trudno jest wtedy powiązać zakażenia występujące np. w Finlandii i Stanach Zjednoczonych jako wywodzące się z jednego źródła. W takich przypadkach zakażające kiełki lub warzywa pochodzą od różnych producentów, ale ich źródłem jest jeden dystrybutor ziaren [Buck i in. 2003]. Tego rodzaju problem wystąpił w maju 2011 roku w Niemczech, gdzie znajdowało się główne ognisko epidemiologiczne powodujące zakażenia enterokrwotocznym szczepem *E. coli* O104: H4 produkującym toksynę Shiga. Około 4000 osób zgłosiło się z objawami choroby, a w trakcie epidemii zmarło 56 osób. Inne kraje zgłosiły pewną liczbę chorych z objawami wywołanymi przez ten sam szczep. Większość z tych osób przebywała na terenie północnych Niemiec, gdzie epidemia miała swój początek. Pod koniec czerwca 2011 r. ponownie wystąpiły zachorowania we Francji, w Bordeaux, spowodowane przez ten sam szczep *E. coli*. W obu przypadkach badania wskazały kiełki jako źródło zakażeń [Raport europejski 2013].

Wśród drobnoustrojów znajdujących się w surowcach roślinnych mogą występować formy patogenne, z których duża część to psychrotrofy. Należą do nich m.in. *L. monocytogenes*, szczepy *Cl. botulinum* typu E i B, *Y. enterocolitica*, *Aeromonas* sp. i niektóre enterotoksyczne odmiany *E. coli*. Są one zagrożeniem, nawet jeżeli stanowią minimalne zanieczyszczenie surowców, bowiem w cyklu produkcyjnym mogą namnażać się w szerokim zakresie temperatur od 2°C do 12°C [Berger i in. 2010]. Dlatego *L. monocytogenes* wywołująca listeriozę może występować w żywności pakowanej próżniowo i przechowywanej w warunkach chłodniczych, np. w kielbasie, surowym mleku i produkowanych z niego wyrobach, niedojrzewających serach, rybach wędzonych, surowym mięsie, surowych warzywach i sałatkach [Juszczak 2011]. Źródłem bakterii *L. monocytogenes* niejednokrotnie są surowe owoce i warzywa, zwłaszcza melony, kapusta, sałata, szpinak, marchew, kalafior, brokuły i seler, a także sałatki i surówki warzywne, zwłaszcza pakowane w atmosferze modyfikowanej [Sip 2010; Kordowska-Wiater i in. 2007; Szymczak i in. 2011]

Kolejną chorobotwórczą bakterią występującą w przetwórstwie surowców roślinnych jest *Bacillus cereus*. Żywność, w której najczęściej wykrywana jest ta bakteria, to produkty zbożowe, makarony, ryż i płatki. *B. cereus* to laseczki występujące naturalnie w glebie, zdolne do wytwarzania form przetrwalnikowych. Z gleby, jako zanieczyszczenia pierwotne lub wtórne, mogą trafiać do surowców roślinnych, środowiska produkcyjnego lub do gotowych produktów, również pochodzenia zwierzęcego. Spory tych bakterii są ciepłoodporne, a ich formy wegetatywne mają zdolność wzrostu w temperaturach chłodniczych. Chorobotwórczość bakterii z grupy *B. cereus* jest związana z produkowanymi przez nie toksynami oraz enzymami o charakterze toksyn. Dwa główne typy toksyn odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe wywołane przez *B. cereus* to enterotoksyna i toksyna emetyczna, które powodują biegunkę lub wymioty [Juszczak 2011].

Możliwość zastosowania real-time PCR do wykrywania patogenów występujących w żywności pochodzenia roślinnego

Wzrost epidemii pokarmowych spowodowanych spożyciem świeżych warzyw spowodował zwiększenie nacisku na rozwój szybkich i dokładnych metod wykrywania patogenów [Elizaquive i Sanchez 2012]. Większość testów do wykrywania zakażeń żywności wykorzystuje technikę znaną jako real-time PCR (qPCR). Wykrywanie w czasie rzeczywistym jest dokładniejsze, a otrzymany wynik może być również ilościowy. Komercyjne testy do zastosowań w mikrobiologii żywności, wykorzystujące wspomnianą

metodę, umożliwiając automatyzację procesu, co minimalizuje ryzyko zakażenia. Reakcja przebiegająca w termocyklerze monitorowana jest przy wykorzystaniu detekcji fluorescencyjnej i z użyciem odczynników dostępnych w postaci gotowych zestawów. Zazwyczaj identyczne warunki reakcji stosowane są dla wszystkich patogenów i w ten sposób kilka oznaczeń może być prowadzonych jednocześnie. Cykle reakcji i detekcji fluorescencyjnej są kontrolowane przez specjalne oprogramowanie, które również oblicza i interpretuje wyniki [www.rapidmicrobiology.com].

Testy oparte na metodzie real-time PCR do wykrywania patogenów są dostępne dla większości patogenów występujących w żywności pochodzenia roślinnego wymienionych w tabeli 1.

Real-time PCR jako metoda alternatywna

Chociaż metody oparte na technice real-time PCR mają wiele zalet w stosunku do metod klasycznych, to opracowanie niezawodnych i powtarzalnych testów wykorzystujących qPCR wymaga wielu badań pozwalających na ich zoptymalizowanie i standaryzację. Weryfikacja i ocena jest czasochłonna oraz narzuca konieczność potwierdzenia wykrywania drobnoustrojów na dużej liczbie próbek. Są one jednak niezbędne, aby protokoły metod opartych na real-time PCR mogły być wykorzystywane przez przemysł. Dokładność diagnostyczna musi zatem zostać należycie oznaczona i udokumentowana, by wyżej wymienione metody nadawały się do zastosowania jako narzędzie analityczne [Garrido i in. 2013].

Walidację testów opartych na PCR i real-time PCR do wykrywania patogenów w żywności należy przeprowadzić zgodnie z normą PN-EN ISO 16140:2004, ponieważ są to metody alternatywne w stosunku do metod referencyjnych. Metodami referencyjnymi są metody klasyczne, płytkowe, których całkowity czas analizy może wynosić nawet 10 dni [Nowak i Otluszczak-Walczak 2012]. Natomiast wymagania dotyczące techniki PCR i real-time PCR zostały zapisane w normach PN-EN ISO 22119:2011 oraz PN-EN ISO 22118:2011. Podkreślono w nich możliwość wystąpienia w najbliższym czasie zmian w ich treści, ze względu na szybki postęp w tej dziedzinie.

W ostatnich latach opracowano wiele protokołów wykorzystujących metody PCR i real-time PCR. W wielu krajach przepisy prawne związane z wykrywaniem oraz identyfikacją mikroorganizmów w żywności nie precyzują możliwości stosowania metod wykorzystujących technikę PCR jako oficjalnie przeznaczonych do badań przesiewowych w kierunku patogenów. Zatem metody klasyczne nadal są złotym standardem. Zostało to

zawarte w zmianach w prawodawstwie europejskim [Garrido 2013]. Obecnie nie ma bowiem europejskich norm opisujących wykrywanie określonych patogenów bądź ich grup w żywności z zastosowaniem techniki real-time PCR.

Jednym z głównych problemów przy opracowywaniu testów opartych na reakcji qPCR, wykorzystywanych do wykrywania obecności mikroorganizmów patogennych w żywności, są substancje obecne w badanej matrycy spożywczej, mogące wpływać hamująco na przebieg reakcji PCR. Związki te mogą zanieczyszczać materiał DNA wyizolowany z próbek żywności oraz próbek środowiskowych, czego efektem mogą być wyniki fałszywie negatywne. Niektóre z inhibitorów, które mogą mieć wpływ na poszczególne etapy real-time PCR, to m.in. związki fenolowe, tłuszcze i glikogen. Różni autorzy zdecydowanie zalecają więc zastosowanie odpowiedniej kontroli wewnętrznej reakcji (IAC) w diagnostyce wykorzystującej PCR i qPCR. Europejski Komitet Normalizacyjny (CEN), we współpracy z Międzynarodową Organizacją Normalizacyjną (ISO), sformułował ogólne wytyczne dla badań żywności wykorzystujących reakcję PCR, w tym obowiązkowe dodanie IAC do mieszaniny reakcyjnej. W konsekwencji opracowano zbiór reguł dotyczących tego typu metod [Garrido i in. 2013].

Główną wadą większości zwalidowanych do tej pory reakcji qPCR jest brak wewnętrznej kontroli procesu amplifikacji (IAC). W przeciwieństwie do (zewnętrznej) kontroli pozytywnej, w reakcji z IAC powielany jest niedocelowy fragment sekwencji DNA. Sekwencja kontroli wewnętrznej reakcji jest obecna w każdej reakcji i jest jednocześnie amplifikowana z sekwencją docelową, która jest poszukiwana. Sekwencja niespecyficzna jest powielana również w próbkach, w których sekwencja docelowa nie występuje. W reakcji PCR negatywny wynik reakcji (brak sygnału lub prążka) może mieć wiele różnych przyczyn, innych niż brak sekwencji docelowej w próbce (próbka negatywna), np. inhibicja polimerazy z powodu wadliwej pracy termocyklera, nieprawidłowej mieszaniny PCR, słabej aktywności polimerazy DNA lub obecności substancji hamujących w próbce matrycy DNA. Kontrola pozytywna (próbka zawierająca docelową sekwencję DNA) weryfikuje takie błędy jak: zła mieszanina reakcyjna, brak aktywności polimerazy DNA lub źle skalibrowany termocykler. Kontrola wewnętrzna reakcji IAC sprawdza, czy nie doszło do zahamowania reakcji w próbce z powodu obecności substancji inhibujących w danej matrycy DNA. Jest to ważne ze względu na pochodzenie matrycy DNA z wielu różnych próbek żywności. W reakcji PCR z IAC powinniśmy otrzymać sygnał zajścia reakcji PCR, także wtedy, gdy w próbce nie jest obecna docelowa sekwencja (próbka negatywna). Brak takiego sygnału wskazuje na obecność substancji inhibującej reakcję amplifikacji. Europejski Komitet

Normalizacyjny (CEN), we współpracy z Międzynarodową Organizacją Normalizacyjną (ISO), zaproponował ogólne wytyczne do badań patogenów żywności metodą PCR, które wymagają obecności IAC w mieszaninie reakcyjnej. CEN postanowił pozostawić opracowanie IAC autorom reakcji PCR [Hoorfar i in. 2004].

PODSUMOWANIE

Zastosowanie techniki real-time PCR w analizach mikrobiologicznych żywności ma plusy i minusy. Z jednej strony jest to technika nowa, a testy ją wykorzystujące dopiero od niedawna są dostępne na rynku. Są one cały czas udoskonalane, a ich producenci starają się sprostać wymaganiom norm, np. dotyczącym kontroli jakości badań. Koszty ich opracowywania są bardzo wysokie, co wpływa na ceny analiz z ich wykorzystaniem. Kolejnym minusem jest uznanie technik opartych na PCR za metody alternatywne. Przy wprowadzaniu ich do laboratoriów akredytowanych należy potwierdzać ich przydatność w odniesieniu do obowiązujących metod, tzn. metod klasycznych.

Zapotrzebowanie na szybkie, możliwe do automatyzacji metody jest ogromne. Takie możliwości dają właśnie testy oparte na reakcjach PCR. Mimo że ich opracowanie wymaga dużej wiedzy z zakresu biologii molekularnej oraz wysokich nakładów finansowych, to po ich weryfikacji i dodaniu do metod zawartych w obszarze chronionym prawnie zyskują one dużą przewagę nad metodami klasycznymi. Rozwój w zakresie metod alternatywnych, do których należą metody wykorzystujące real-time PCR, następuje bardzo szybko. Obecnie przy zwiększającej się liczbie przypadków zakażeń produktami pochodzenia roślinnego metody oparte na technice real-time PCR mogą stanowić obiecującą alternatywę w szybkim wykrywaniu drobnoustrojów patogennych.

PIŚMIENNICTWO

1. Berger C. N., Sodha S. V., Shaw R. K., Griffin P. M., Pink D., Hand P., Frankel G. (2010). Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ. Microbiol.*, 12 (9), 2385-2397
2. Buck J. W., Walcott R. R., Beuchat L. R. (2003). Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.

3. Elizaquivel P., Sanchez G. (2012). Quantitative detection of viable foodborne *E. coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in fresh-cut vegetables combining propidium monoazide and real-time PCR. *Food Control*, 25 (2), 704-708
4. (EC), C.R., 2005. Microbiological Criteria for Foodstuffs. Off. J. Eur. Union, Vol. 2073/2005
5. (EC), C.R., 2007. Amending Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs. Off. J. Eur. Union, Vol. 1441/2007
6. (EC), C.R., 2010. Amending Regulation (EC) No 2073/2005 on Microbiological Criteria for Foodstuffs as Regards *Enterobacteriaceae* in Pasteurised Milk and other Pasteurised Liquid Dairy Products and *Listeria monocytogenes* in Food Grade Salt. Off. J. Eur. Union, Vol. 365/2010
7. (EU), C.R., 2011. Amending Annex II to Regulation (EC) No 2160/2003 of the European Parliament and of the Council and Annex I to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 as regards *Salmonella* in Fresh Poultry Meat. Off. J. Eur. Union, Vol. 1086/2011
8. Garrido A., Chapela M. J., Román B., Fajardo P., Vieites J. M., Cabado A. G. (2013). In-house validation of a multiplex real-time PCR method for simultaneous detection of *Salmonella* spp., *Escherichia coli* O157 and *Listeria monocytogenes*. *Intern. J. Food Microbiol.*, 164, 92-98
9. Hoorfar J., Malorny B., Abdulmawjood A., Cook N., Wagner M., Fach P. (2004). Practical Considerations in Design of Internal Amplification Controls for Diagnostic PCR Assays. *J. Clinical Microbiol.*, 42 (5), 1863-1868
10. Hoorfar J., Wolffs P., Radstro P. (2004). Diagnostic PCR: validation and sample preparation are two sides of the same coin. *M. APMIS*, 112, 808-814
11. Juszczak L. (2011). Co kryje żywność. Zagrożenia mikrobiologiczne, środowiskowe i technologiczne w żywności pochodzenia roślinnego – cz. II. *Agro Przem.*, 5
12. Kordowska-Wiater M., Janas P., Sosnowska B., Waśko A., Nowak A., Kluza B. (2007). Występowanie bakterii patogennych oraz drobnoustrojów wskaźnikowych zanieczyszczenia fekalnego w mrożonych warzywach. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2 (51), 134-144
13. Nowak A., Otluszek-Walczyk E. (2012). *Listeria monocytogenes* w żywności, metody wykrywania i oznaczania. *Przem. Spoż.*, 66, 30-33

14. PN-EN ISO 22119:2011 Mikrobiologia żywności i pasz -- Reakcja łańcuchowa polimerazy [PCR] do wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności -- Ogólne wymagania i definicje
15. PN-EN ISO 22118:2011 Mikrobiologia żywności i pasz -- Reakcja łańcuchowa polimerazy [PCR] do wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności -- Charakterystyka molekularnych metod wykrywania
16. PN-EN ISO 16140:2004P Mikrobiologia żywności i pasz. Protokół walidacji metod alternatywnych
17. Raport europejski. (2013). Scientific opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 [outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations]. EFSA J., 11 (1), 3025
18. Szymczak B., Sawicki W., Bogusławska-Wąs E., Koronkiewicz A., Dąbrowski W. (2011). Występowanie *L. monocytogenes* w świeżych owocach i warzywach pochodzących z upraw ekologicznych województwa zachodniopomorskiego. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2 (75), 67-76
19. Sip A. (2010). Bakterie *Listeria monocytogenes*, cz. I. Występowanie i źródła zanieczyszczeń żywności. Przem. Spoż., 64, 40-43
20. <http://www.rapidmicrobiology.com/test-methods/PCR-food-microbiology.php>