

Tabajdiné dr. Pintér Veronika

ÉLELMISZEREK SALMONELLA VIZSGÁLATAINAK ÚJABB MÓDSZEREI II.

A cikk második részében a szalmonellák kimutatására szolgáló immunológiai és konduktometriás eljárások ismertetésére kerül sor. Mindkét elven működő eljárások munka, idő, anyag és költségtakarékosak. Az immunselektív dúsítással valamint a latex agglutinációs módszerekkel való kombinálás pedig lehetővé teszi a 24-48 órán belüli eredmény megadást. A szerző elemzi az adott célnak megfelelő módszerkiválasztás szempontjait.

6. Salmonella vizsgálatok immunológiai módszerekkel

E témakörbe tartozó vizsgálati módszerek közül az ELISA, ELFA, latex agglutinációs és immunselektív dúsítási eljárások (dip stick, IMS) kerülnek bemutatásra.

6.1. Salmonella vizsgálatok ELISA módszerrel

Vizsgálataink célja az ELISA módszerek összehasonlítása volt a szabványos tenyésztéses eljárással.

A különböző érzékenyséű és típusú ELISA kitek közül elővizsgálatok után egy vizuális screening módszert választottunk vizsgálatainkhoz. A TECRA kit egy szelektív dúsítás utáni Salmonella jelenlét meghatározására alkalmas teszt.

E tesztben a nagy érzékenyséű, szalmonellákra specifikus befogó antitestek vannak adszorbeálva a mikroküveték felületére, amelyekbe a Salmonella dúsítás utáni mintát pipettázzuk.

Amennyiben jelen vannak a Salmonella antigének a mintában, specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel. A mintában lévő kísérő anyagok mosással történő eltávolítása után szalmonellákra specifikus, enzimmel jelzett antitestet (konjugátum) adagolunk a mikroküvetékbe, mely hatására egy komplex ("szendvics") keletkezik.

A szalmonellák jelenlétét láthatóvá egy enzim-szubsztrát színreakcióval tesszük. Ha a mintában nincs Salmonella, akkor nem lesz a küvetékben lévő oldat színe zöld.

A standard ELISA vizsgálat menetét az **1.sz. ábra**, míg az ELISA vizsgálat végrehajtási útmutatóját a **2.sz. ábra** szemlélteti.

Az ELISA kit **érzékenységét** S.typhimurium, S.enteritidis, S.derby és S.infantis törzsekkel vizsgálva az 10^6 sejt / cm^3 -nek adódott. Az érzékenységet a dúsító összetétele nem befolyásolja, ha a Salmonella e szükséges sejtszámot elérte benne.

A **szelektivitást** 10 Salmonella törzssel S.typhimurium, S.paratyphi B, S.derby, S.infantis, S.newport, S.enteritidis, S.give, S.worthington, S.arizona, S.choleraesuis, valamint Citrobacter, Yersinia enterocolitica, E.coli, Proteus rettgeri, Proteus vulgaris, Proteus morgani, Pseudomonas aeruginosa, P.fluorescence törzsekkel vizsgáltuk.

A különböző mikrobacsoportok zavaró hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a tenyésztéses módszernél zavaró baktériumok (Proteus, Citrobacter, Pseudomonas, E.coli) közül egyikkel sem adott a kit fals pozitív eredményt.

Az elővizsgálatok után nagyon jó eredményeket adó kittel felmérő összehasonlító vizsgálatokat végeztünk. Az ISO szabvány szerinti meghatározással párhuzamosan végeztük az ELISA vizsgálatokat.

A módszerösszehasonlítást a tojáspor, baromfi felület és takarmány mintákkal, valamint sertés vágóhídon, és egyéb élelmiszeripari üzemben vett higiéniai tampon mintákkal végeztük el. A mintavételnél szándékosan törekedtünk a pozitív minták gyűjtésére.

A 210 megvizsgált minta Salmonella pozitív mintáinak számát a különböző módszerekkel mérve a **3.sz. ábra** szemlélteti. E vizsgálatok alapján

az ELISA módszer érzékenysége $100 \cdot p / (p + fn) = 100 \%$,

az ELISA módszer specifitása $100 \cdot n / (n + fp) = 99,2 \%$

ahol:

p: Valós pozitív minták száma

n: Valós negatív minták száma

fn: Fals negatív minták száma

fp Fals pozitív minták száma

A megvizsgált minták esetében tehát egyértelműen megállapítható, hogy a TECRA kit-tel és az ISO szabvány szerinti tenyésztéses eljárással kapott eredmények között nincs szignifikáns eltérés. Ami nagyon fontos, fals negatív eredményt nem kaptunk az ELISA vizsgálatokkal.

Egy minta esetében ELISA vizsgálattal Citrobacter spp. Okozta fals pozitív eredményt kaptunk.

Az ELISA vizsgálattal átlagosan 48 órán belül biztosan kiadhatók a negatív eredmények, mivel fals negatív eredményt nem kaptunk az ELISA vizsgálatok során. Nagyszámú kísérő flóra esetén a klasszikus vizsgálati módszerrel egy esetben fals negatív eredményt kaptunk (érzékenység 98,6%, specifitás 100 %).

Az ELISA vizsgálat mellett, hogy megbízható, idő, munka, anyag és eszköz takarékos eljárás. Nagyszámú szelektív, Petri csészébe kiöntött táptalajt, rövid biokémiai sort és sok élőmunkát lehet vele megspórolni.

6.2. Az ELISA módszer kombinálása szelektív sejtkoncentrációval

A korszerű minőségbiztosítási rendszereket működtető vállalatoknál 48 óránál rövidebb időre van szükség, hogy az élelmiszerbiztonságot szavatoló HACCP rendszerek működtetéséhez megfelelő információval tudjanak szolgálni a mikrobiológusok.

Ehhez az elődúsítás és dúsítás műveletének gyorsítását kell elérni.

Lehetőségek:

-membránszűrés (legrégebbi sejtkoncentrációra alkalmas módszer, de csak tükrös levek esetében jó)

-immunszelektív felületek alkalmazása

Salmonella Immuncapture system

Immunmágneses szeparálás (IMS)

Ezek közül a gyakorlati szempontból igen jelentős immunológiai módszereket vizsgáltuk.

Mind az IMS, mind aTECRA Salmonella immunológiai alapon történő dúsító rendszer (Immuncapture system) élelmiszerekben lévő Salmonella törzsek gyors kimutatására szolgál.

ELISA technikával való kombinálással 24 órán belül valószínűsíthető a pozitív eredmény, illetve adható meg a negatív eredmény.

A módszer eleve:

A hagyományos eljárást helyettesítő teszt a szelektív dúsítás helyett egy immunszelektív felületet, a szelektív és differenciáló agartáptalajok helyett egy vizuális ELISA módszert alkalmaz.

A teszt lépéseit az **1. sz. ábra** szemlélteti. Ezek:

a./ Elődúsítás egy éjszakán át.

b./ Salmonella sejtek "befogása" az elődúsítóból. az immunszelektív felület segítségével.

c./ Mosás után az immunszelektív felületeket M-levesben inkubáljuk néhány órán át, hogy az ELISA vizsgálatokhoz szükséges sejtszámot elérjük.

d./ Hőkezeljük a Salmonella sejteket, ezzel leválasztjuk az antigéneket az immunszelektív felületről.

e./ Enzimmel jelzett Salmonella antitesteket (konjugátum) kötünk az antigénekhez, amelyek hatására egy színtelen szubsztrát sötét zöldre változik.

Az e módszerrel megvizsgált 310 minta Salmonella pozitív mintáinak számát a különböző módszerekkel mérve a **4.sz. ábra** szemlélteti.

Az immunszelektív dúsítással kombinált ELISA módszer érzékenysége:

$$100 \cdot p / (p + fn) = 100 \%$$

Az immunszelektív dúsítással kombinált ELISA módszer specificitása

$$100 \cdot n / (n + fp) = 98,5 \%$$

A nagyszámú ELISA vizsgálat eredményei alapján megállapítható, hogy ha a dúsításokat úgy vezetjük, hogy a sejtszám nagy biztonsággal elérje a kimutatási határt, az ábrán látható jó egyezést kapjuk a referencia módszerrel összehasonlítva.

Az immunszelektív dúsításos módszer tehát idő és anyagtakarékos, szelektív, nem igényel berendezést, mivel vizuálisan is nagyon jól értékelhető, felhasználóbarát (a szétszedhető lemez a napi mintaszámhoz könnyen igazítható).

6.3. Salmonella vizsgálat ELFA módszerrel

Szelektív dúsítás utáni Salmonella jelenlét meghatározására alkalmas . ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) vizsgálatok egy teljesen automatizált VIDAS készülékben végezhető.

A Salmonella dúsítás utáni hőkezelt mintát egy reagenseket is tartalmazó műanyag strip megfelelő küvetájába pipettázzuk, majd a készülékbe helyezzük. A vizsgálat valamennyi lépését a készülék automatikusan elvégzi.

A készülékben lezajló folyamatok:

A nagy érzékenységű, Salmonellákra specifikus befogó monoklonális antitestek egy a készülékben lévő pipettázó (SPR= Solid Phase Receptacle) felületére vannak adszorbeálva. A mintatartó küvetából a minta a pipettázóba cirkulál a szükséges reakció ideig. Amennyiben jelen vannak a Salmonella antigének a mintában, specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel. A minta visszakerül a küvetába, majd a

SPR mosása történik. A következő munkafázisban Salmonellákra specifikus, alkálikus foszfatázzal jelzett antitest (konjugátum) cirkulál a SPR-ben. Hatására egy komplex ("szendvics") keletkezik. A következő lépésben mosással eltávolításra kerül a nem kötött konjugátum, majd szubsztrátként 4-metil-umbelliferil-foszfát szubsztrátot cirkulál a SPR-ben. Az alkálikus foszfatáz hidrolizálja a szubsztrátot és egy fluoreszkáló vegyület (4-metil-umbelliferon) keletkezik. A fluoreszcenciát 450 nm-en méri a készülék.

Ha a mintában nincs Salmonella, akkor nincs fluoreszcencia..

A Salmonella kimutatás ELFA módszerének menetét az **5.sz. ábra** szemlélteti. Az ELFA vizsgálat végrehajtása során az összes elvégzendő művelet a hőkezelt dúsító pipettázása a mintatartó küvettába.

7. Salmonella vizsgálatok konduktometriás módszerekkel

E témakörben vizsgálatainkat Malthus 2000 készülékkel végeztük.

A Malthus készülék élelmiszerekben, vízben, kozmetikumokban és környezeti mintákban lévő mikroorganizmusok széles körének kimutatására és mennyiségének meghatározására szolgál.

A Malthus rendszer a mikrobaszaporodást szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával, folytonos konduktancia méréssel követi nyomon. Az állandó hőmérsékleten mért μS értékekből egy szaporodási görbe jellegű változást kapunk, amelynek jellemző paramétere, a detektálási idő szolgál a termékek mikrobiológiai állapotának meghatározására (a mikrobaszám fordítottan arányos a detektálási idővel.), jelenlét hiány próbák esetén pedig a görbe meredeksége és a μS érték változásának mértéke szolgál az adott baktérium jelenlétére.

A kimutatási határ 1 élő sejt/mérőcella.

Mivel a konduktancia mérést a minta turbiditása nem zavarja, felhasználási területe széleskörű.

A Salmonella vizsgálatok menetét az **6. sz. ábra** szemlélteti.

A készülék mérő cellájába az elődúsítást követően kerül a minta, ahol a szelektív dúsítás során 6 percenként méri a műszer a vezetőképességet. A küvettában lévő szelektív táptalaj a szokásos dúsítóktól annyiban tér el, hogy egy ún. szelektív supplementet (novobiocint) és egy a mérést segítő adalékot is tartalmaz. Ez az adalék a TMO (trimetilamin-N-oxid-dihidrát), amely vegyületet a szalmonellák metabolizálják, és a keletkező anyagcseretermék hatására jelentősen megnő a vezetőképesség. Így a műszerben való dúsítás és mérés lehetővé teszi egyrészt a kísérő mikroflóra visszaszorítását, másrészt Salmonella jelenlét esetén a gyors és jelentős mértékű konduktancia változást. Ez a változás (pozitív válasz) az elődúsítóban lévő szalmonellák számától függően 8 - 20 óra inkubálási idő után jelentkezik. Negatív esetben 24 órás inkubálás után nincs változás, a Salmonella negatív eredmény kiadható.

Pozitív válasz esetében az e célra kifejlesztett latex agglutináció segít a valóban pozitív minták kiszűrésére.

A vizsgálati idő, mint a leírtakból kitűnik, attól függ, hogy a Salmonella sejtek kezdeti száma mennyi a mérő küvetében. Ezt befolyásolni tudjuk az elődúsítás vezetésének a mikroökológiai körülményekhez való igazításával (ld. I.rész), valamint az előző részben tárgyalt sejtkoncentrálnálási (immunszelektív oszlop, immunmágneses szeparálás) műveletekkel. E műveletek közbeiktatásával akár 24 órára is csökkenthető a Salmonella kimutatás ideje.

A módszer fő előnye tehát a gyorsaság. A mikroorganizmusok kimutatása gyorsabb a hagyományosnál, így csökken a tárolási, raktározási idő, valamint a várakozási idő a higiéniai vizsgálatok eredményére. A gyártásközi ellenőrzésbe építve a rendszert, lehetővé válik a gyorsabb hibafeltárás, így a korai beavatkozással a veszteség csökkenthető, így hatékony mikrobiológiai minőségellenőrzést tesz lehetővé. A számítógéppel vezérelt műszer folyamatos mérésre alkalmas, készüléktípustól függően 60 - 240 mintát képes egyszerre mérni.

8. A Salmonella vizsgálati módszer kiválasztásának szempontjai

Az élelmiszeripar fejlődése, a gyártott élelmiszer termékek és a kereskedelmi tevékenység bővülése miatt egyre inkább szükséges az élelmiszerek, illetve azok alapanyagai mikrobiológiai állapotának pontos ismerete. Az élelmiszerbiztonságot, -minőséget érintő korszerű megítélés a módszerekkel szemben is új követelményeket állít: egyszerűség, gyorsaság, munka és anyagtakarékosság, reprodukálhatóság, károsodott sejtek kimutatása, nagyszámú kísérő mikroflóra mellett a kórokozó és feltételesen kórokozó mikroorganizmusok kimutatása, a preventív, gyártástechnológiába beépülő szabályozási és ellenőrző (surveillance) rendszerek kiszolgálása. Ez az objektív szükségesség az elmúlt tíz évben hazánkban is forradalmasította a mikrobiológiai szemléletmódot és az igénybe vehető módszereket egyaránt.

Még ma is hetente jelennek meg új eljárások, alkalmazások a mikrobiológusok munkája, de még inkább a diagnosztika és a termelésirányítás segítésére.

Az általunk vizsgált módszerek (de a legtöbb új módszer) előnyei a munka, idő, táptalaj megtakarítás, ennek megfelelően több vizsgálati lehetőség, így nagyobb biztonság.

Hátrányként egyes esetekben a műszerek, táptalajok magas ára, másrészt a hivatalos módszergyűjteményekbe való lassú bekerülésük jelölhető meg.

Mi határozza meg, hogy melyik módszert válasszuk?

⇒ a vizsgálat célja

Döntő vizsgálat esetében szabványos, élelmiszer könyvekben rögzített, vagy kereskedelmi szerződésekben rögzített módszereket kell alkalmazni. Belső ellenőrzésre, folyamatszabályozásra alkalmazhatók az ettől eltérő módszerek is.

⇒ biztonsági szint

A gyártó milyen biztonsággal akarja garantálni az adott mikrobára vonatkozó határértéket

Ez a gyártó stratégiájához, kockázatvállalásához igazodik. PI tételenként 10 mintaelem 60 %-os, 60 mintaelem 90 %-os biztonságot jelent a jelenlét hiány próbáknál.

⇒ **mintavételi terv**

A megválasztott biztonsági szint eléréséhez szükséges mintavételi terv alapján határozható meg, hogy milyen gyakorisággal hány mintát kell vizsgálni. Ez függ a tételen belüli eloszlástól is. Egészem más módszert igényel 10 minta/nap vagy 100 minta /nap.

⇒ **érzékenység**

Lehetőség szerint alacsony legyen a kimutatási határa a módszernek. (Minél rövidebb ideig tartó dúsítással legyen elérhető.)

⇒ **specifitás**

A kimutatandó kórokozó szelektív kimutatására legyen lehetőség,

⇒ **pontosság**

A fals pozitív és fals negatív eredmények aránya a lehető legalacsonyabb legyen, de főleg a fals negatív eredményeké.

⇒ **élelmiszer összetétele**

Egyes élelmiszerek összetétele befolyásolhatja az alkalmazott módszert. Például ha az élelmiszer peroxidáz enzimet tartalmaz, az ELISA módszerekkel fals eredményt kaphatunk.

⇒ **validálás**

Jelenleg az új módszerek többsége csak belső ellenőrzésekre alkalmas, mivel a módszertani gyors fejlődést a szabályozó eljárások nem követték. Napjaink feladata ezeknek a módszereknek a hivatalos módszergyűjteményekbe való bevezetése nemzetközi körvizsgálatokkal való tesztelés után (AOAC, AFNOR, EU stb.).

Jelenleg az ELISA módszerek, MALTHUS Salmonella vizsgálati módszer az AOAC módszerek közé tartozik.

⇒ **vizsgálati idő**

Folyamatellenőrzés esetében nem lehet több néhány óránál, nyersanyagok és a késztermék esetében a minőségmegőrzési időtartam és a raktárkapacitás függvénye.

Cél, hogy speciális dúsítási eljárásokkal minél előbb érjük el a detektáláshoz szükséges sejtkoncentrációt.

⇒ **automatizálás lehetősége adattárolás, adatelemzés**

A korszerű termelésirányítás és laborakkreditálás megköveteli a számítógépes adatnyilvántartást, adatelemzést.

⇒ **szervíz és céginformációk**

A műszerek javításának gyorsasága, a fejlesztések, módosítások, újítások gyors bevezetése ma már alapkövetelmény.

⇒ **vizsgálati költség**

A műszeres vizsgálatokat magas beszerzési költség és olcsó üzemeltetési költség jellemzi, ezért ezek csak teljes kihasználás mellett gazdaságosak. A műszert nem igénylő megoldások anyagköltsége a magasabb

A fenti szempontok figyelembevételére után a még oly sok új mikrobiológiai módszer közül is csak egy-két módszer marad. Ezekkel feltétlenül el kell végezni az összehasonlító vizsgálatokat a szabványos módszerekkel a referencia laboratóriumokban, mert a legtöbb módszert a klinikai vizsgálatokra fejlesztették ki, ahol a vizsgálandó kórokozó nagy számban fordul elő és nem kísérí

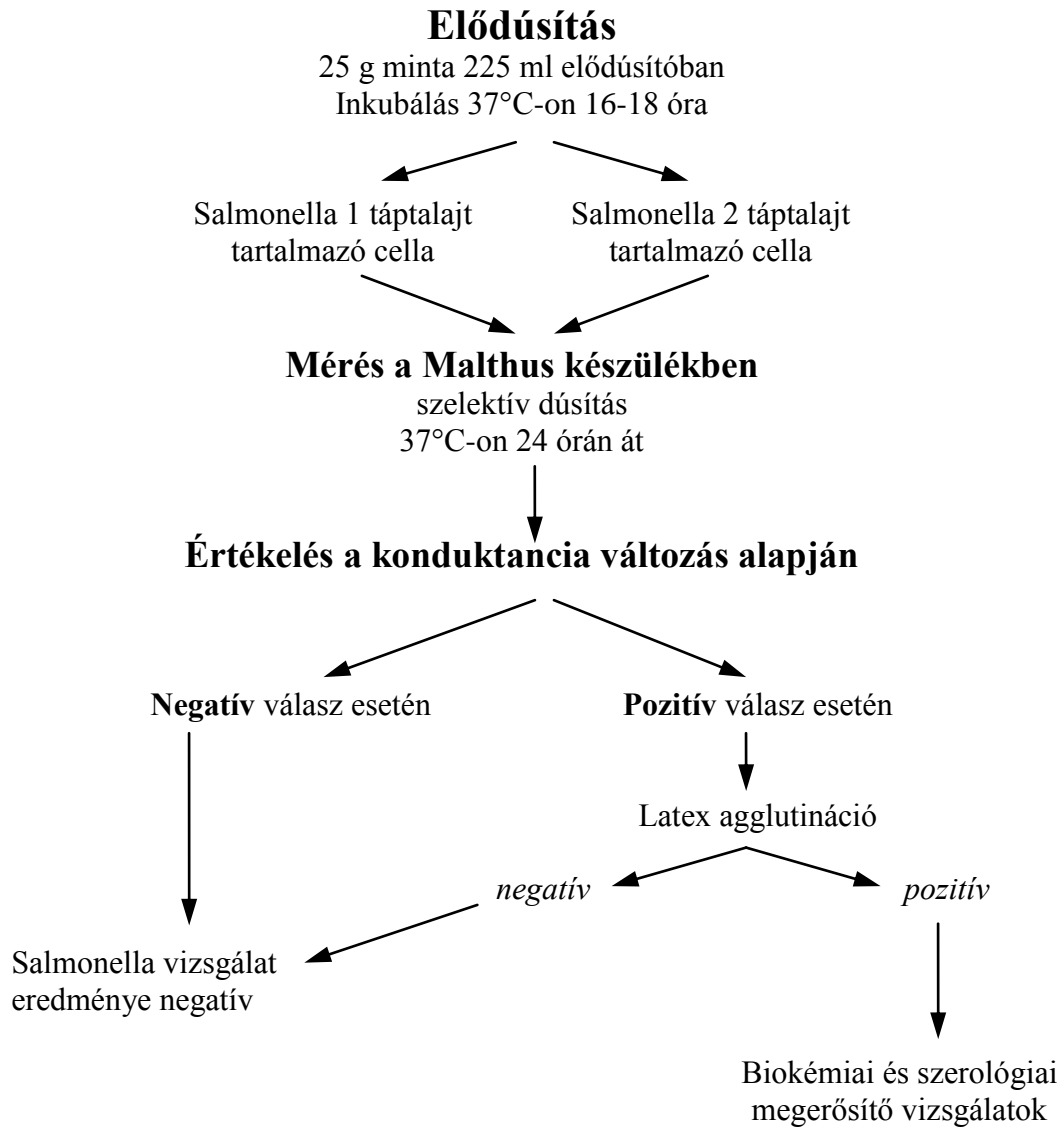
nagyságrendekkel több más mikroorganizmus. Ráadásul az élelmiszerek többségéből a tartósító eljárásoktól sérült sejteket is ki kell mutatni, amelyek célirányos speciális dúsítási eljárásokat igényelnek.

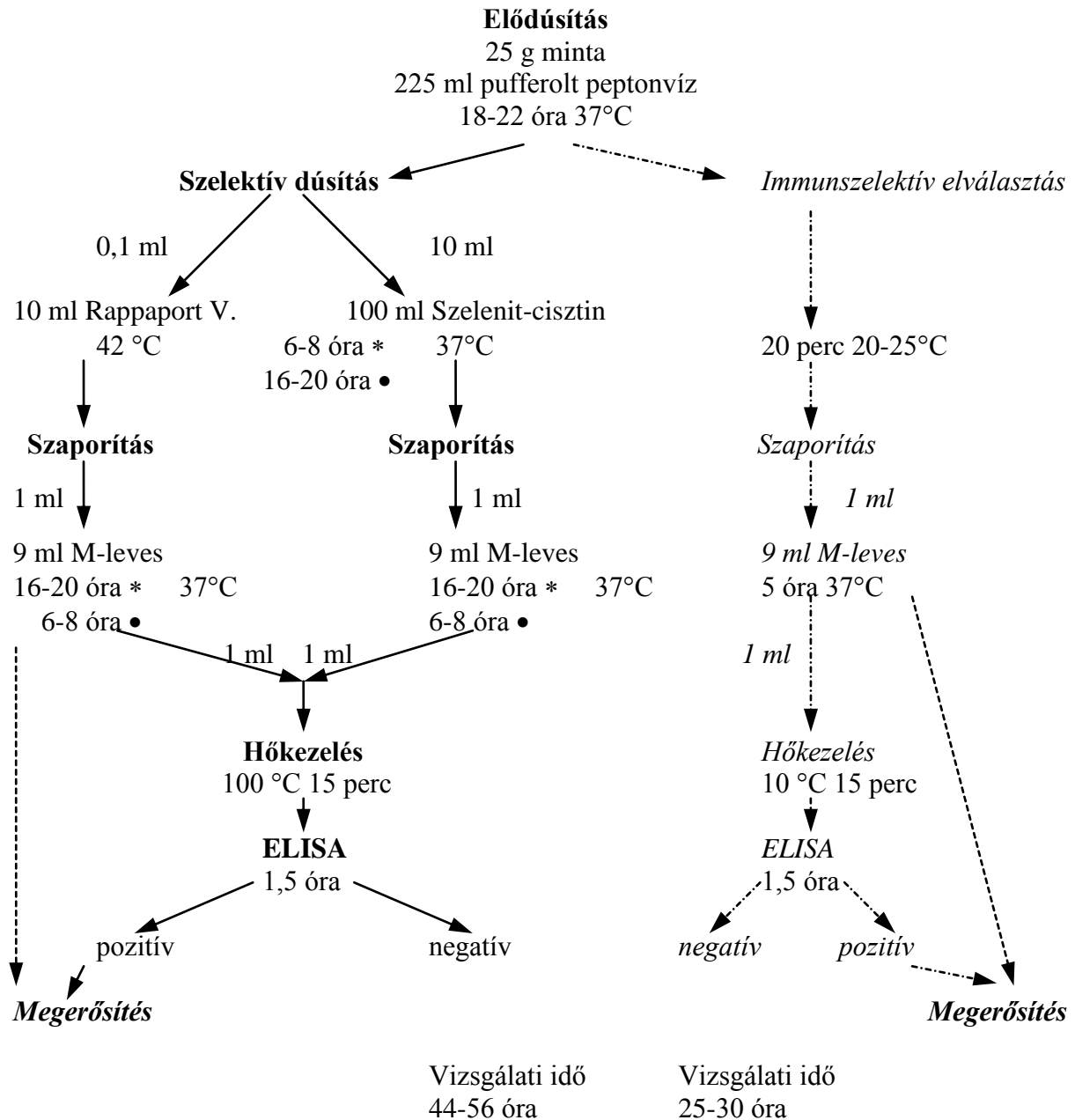
A módszer kiválasztásban alapkövetelmény, hogy fals negatív eredmény nem fordulhat elő, és a fals pozitív eredmények százalékos aránya is lehetőleg alacsony legyen.

A screening módszerrel kapott pozitív eredmény mindig megkapja a valószínűleg jelzőt, amit minden esetben a klasszikus megerősítő vizsgálatnak kell követnie.

Összefoglalva: A klasszikus idő és munkaigényes mikrobiológiai vizsgálati módszerek gyors diagnosztikai módszerekkel való helyettesítése napjaink követelménye annak érdekében, hogy a minőségbiztosítási rendszereket maximálisan kielégítse. A mikroorganizmusok széles körének kimutatási lehetősége mellett kompatibilisnek kell lennie a hagyományos módszerekkel, amelyekre vonatkoznak a szabályozások jelenleg.

Salmonella kimutatás Malthus eljárással



Salmonella kimutatás ELISA módszerrel*Standard ELISA módszer**Immunszelektív dúsítással kombinált ELISA módszer*

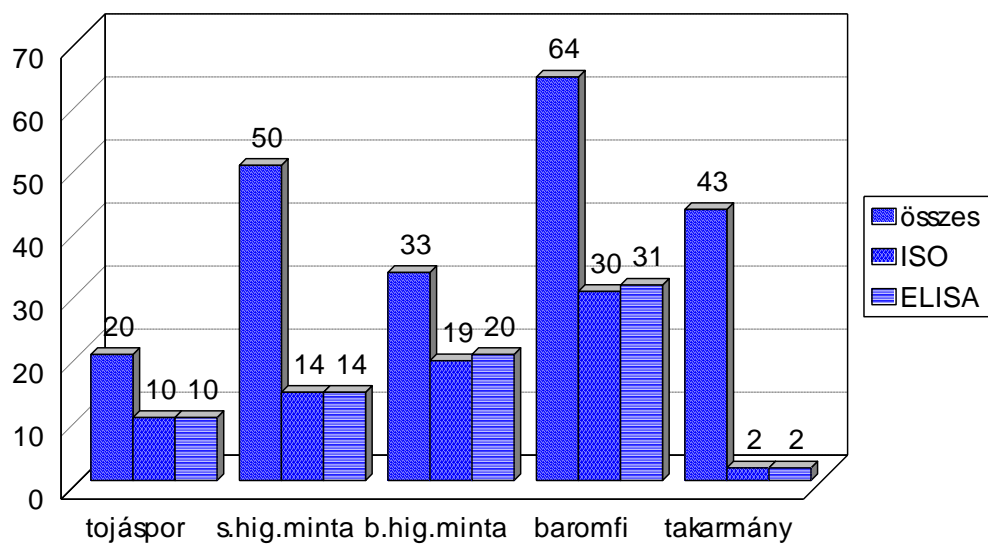
• nagyszámú kísérő flóra

* kevés kísérő flóra

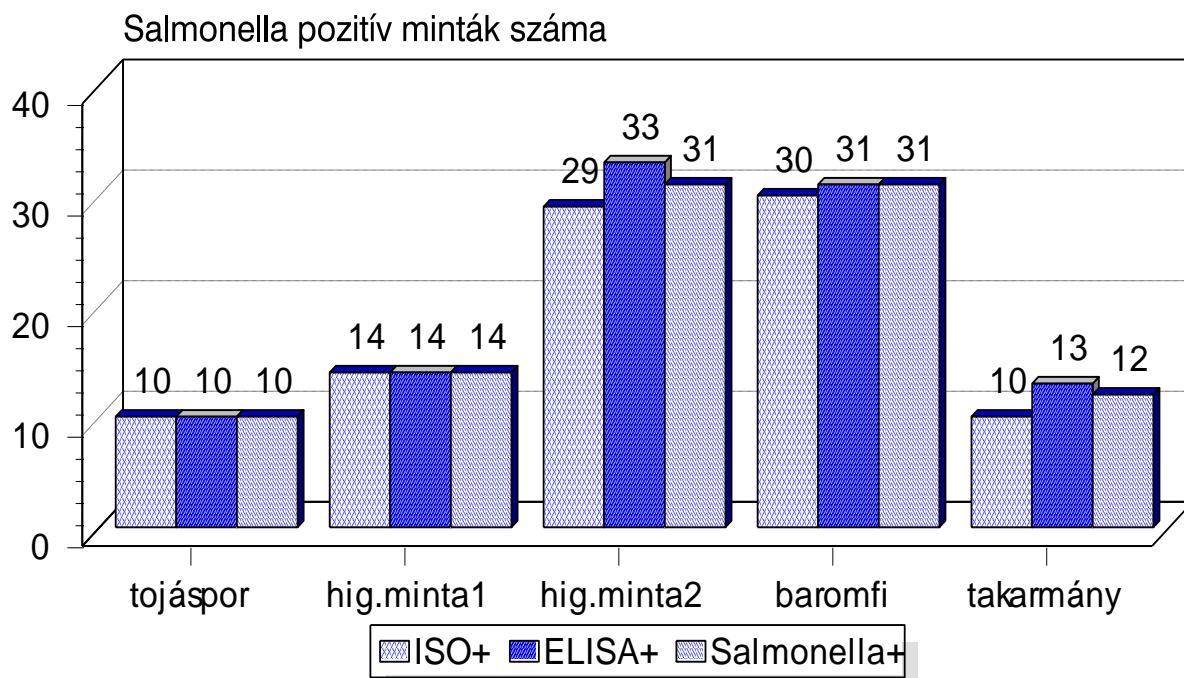
ELISA vizsgálat végrehajtási útmutatója

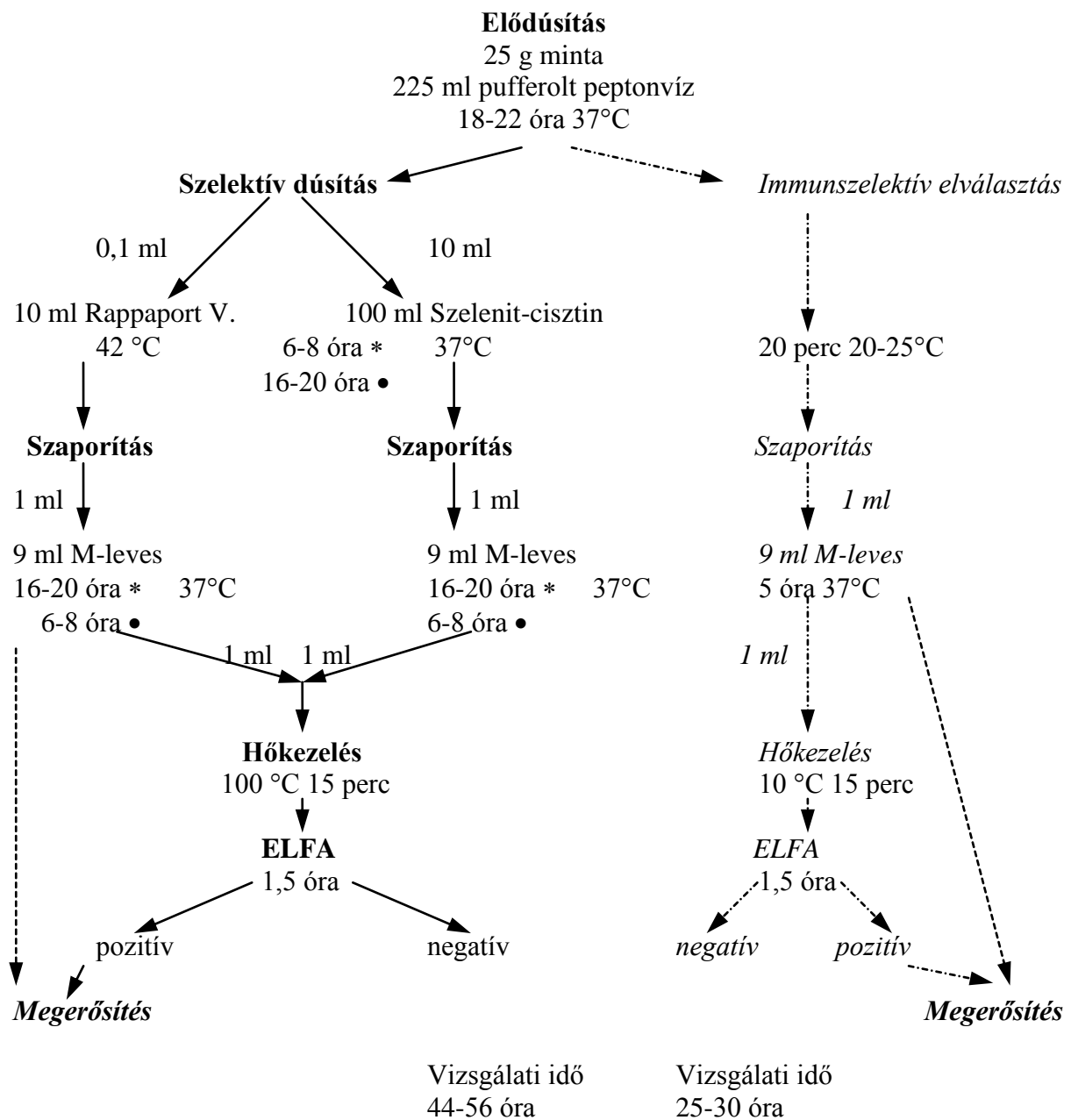
Minta adagolás (0,2 ml M-leves/mikroküvetta)	10 perc
Inkubálás 30 perc, 37°C	30 perc
Mosás háromszor	5 perc
Konjugátum adagolás (0,2 ml/mikroküvetta)	5 perc
Inkubálás 30 perc, 37°C	30 perc
Mosás négyszer	6 perc
Szubsztrátum adagolás (0,2 ml/mikroküvetta)	5 perc
Inkubálás 10 perc, 20-25°C	10 perc
Leállító oldat adagolás (0,05 ml/mikroküvetta)	5 perc
Vizuális értékelés	5 perc

Szalmonella kimutatási módszerek összehasonlítása



4.sz.ábra



Salmonella kimutatás VIDAS ELFA módszerrel

- nagyszámú kísérő flóra
- * kevés kísérő flóra

Irodalomjegyzék:

Van der Zee H. (1992.) Detection of Salmonella spp. With the use of a standard method, diagnostic semi-solid agars and immunocapture kit. Third World Congress foodborne infections and intoxications, Berlin

MSZ EN ISO 12824:1999 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a szalmonellák kimutatására

MSZ ISO 6785:1994 Tej és tejtermékek. A Salmonella kimutatása

Tabajdiné P.V., Sréterné L.Zs.: (2000) A Salmonella dúsítási és elődúsítási módszerek megválasztásának jelentősége. Akadémiai Beszámolók ÁOTE Élelmiszerhigiéniai szekció január 26.

Medici D., Pezotti G.: (1998) Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for Salmonella recovery in poultry meat. Int. Journal of Food Microbiology **45** 205-210.

Bacteriological Analytical Manual /th Edition (1996) AOAC International

Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology (1994) Edited by P.Patel Blackie Academic

Collins and Lyne's: (1995) Microbiological Methods Butterworth

M.R. Adams and M.O.Moss (1995) Food Microbiology Royal Society of Chemistry

E:de Boer, R.R.Beumer: (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms International Journal of Food Microbiology 50/1-2

D.C.Kilsby: (1999) Food microbiology: Challenges for the future International Journal of Food Microbiology 50/1-2

Tabajdiné P.V., Kovácsné D.H., Fábrián A.: (1998) Korszerű mikrobiológiai vizsgálati módszerek az élelmiszerellenőrzésben. Konzervújság 1. 11-14