

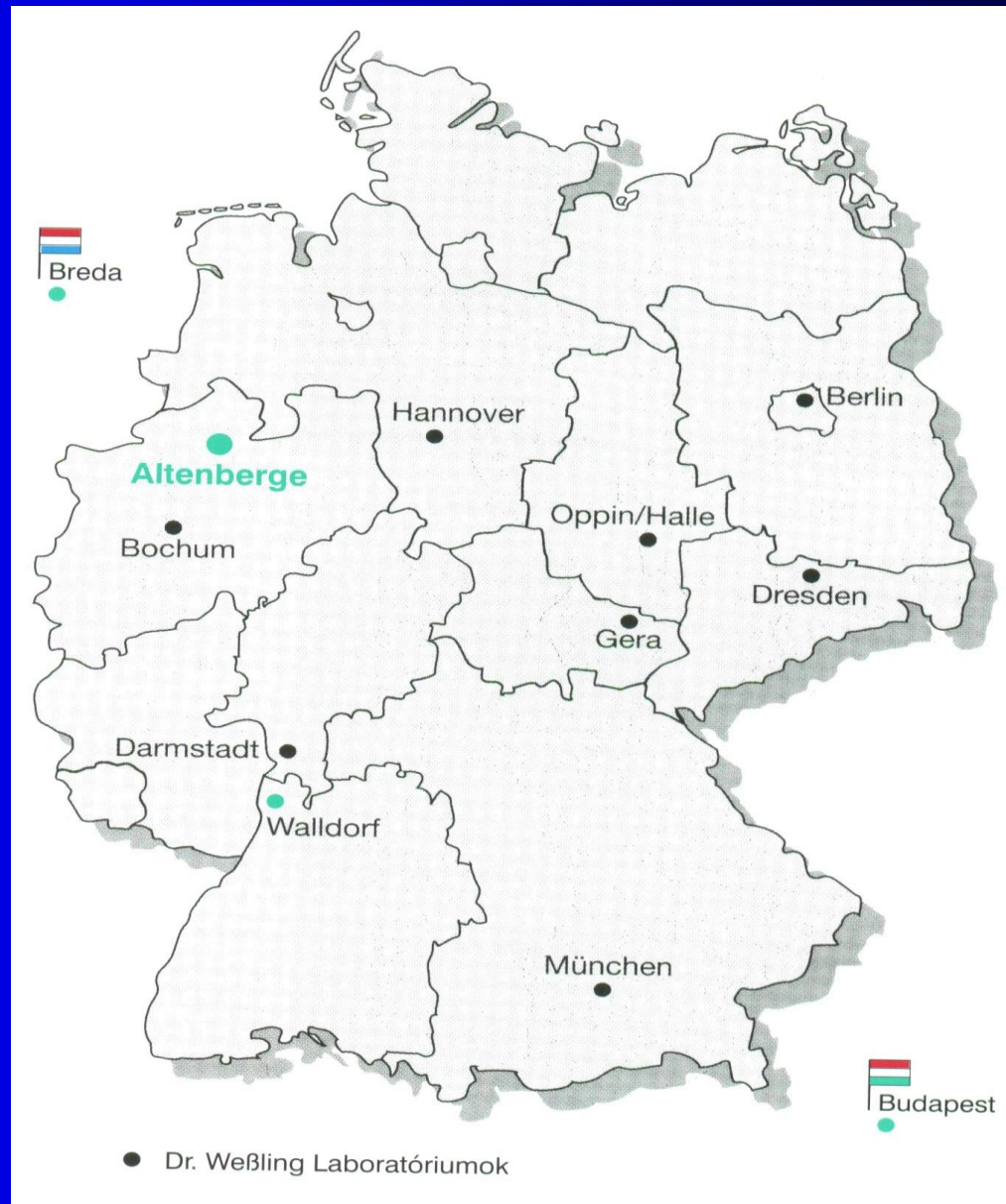
Korszerű Salmonella kimutatási módszerek tapasztalatai a magyarországi élelmiszerellenőrzésben

Tabajdiné dr. Pintér Vera

FoodMicroKft.

Budapest

Weßling



Élelmiszerekkel szemben támasztott követelmények

- Egészségre ártalmatlan
- Jó minőség (érzékszervi tulajdonság, beltartalom)
hosszú minőségmegőrzési időtartam
tömeges termelés
feldolgozottsági fok növelése
nemzetközi kereskedelem
új táplálkozási szokások
- Gazdaságos

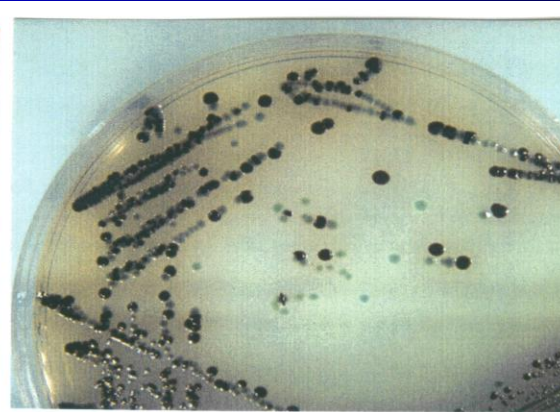
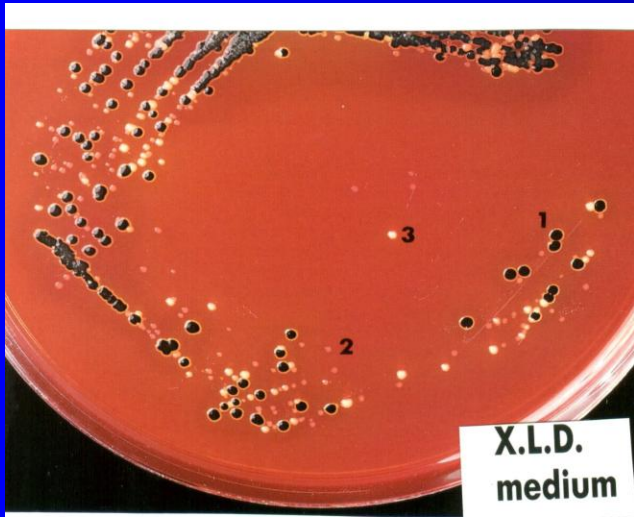


Preventív, gyártásközi technológiába beépülő szabályozási rendszer (HACCP)

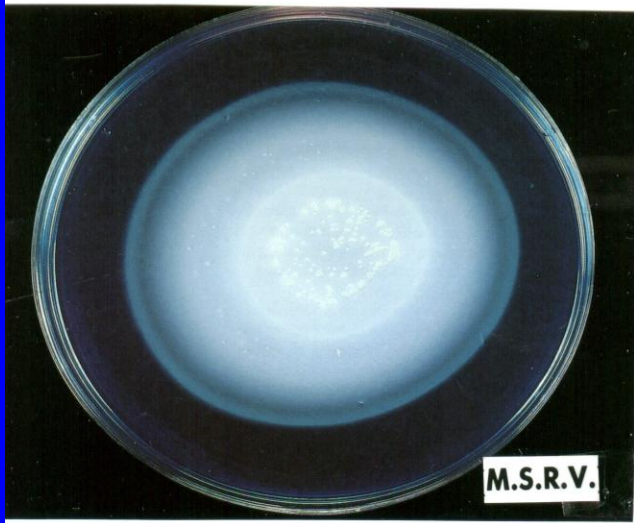
A Salmonella vizsgálati módszerek csoportosítása

- Klasszikus vizsgálatok gyorsítása egyszerűsítése
- Kromogén táptalajok
- Dúsítás kombinálása műszeres méréssel pl. konduktancia
- Molekuláris biológiai módszerek (PCR, DNS hibridizáció)
- Immunológiai vizsgálatok (FIA, RIA, ELISA, ELFA)
- Sejtkoncentráció

Salmonella táptalajok

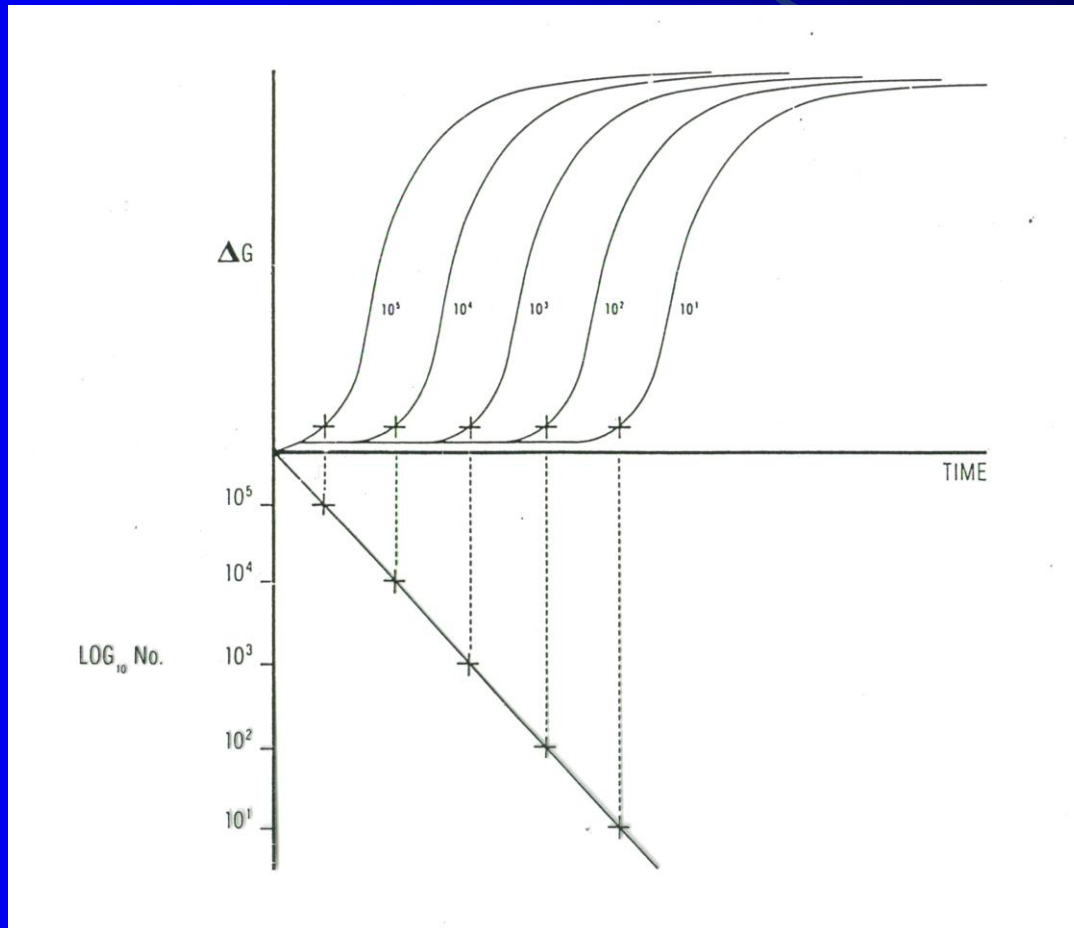


**Harlequin™
Salmonella**



Mikrobaszaporodás detektálása

(hő, turbitás, szín, konduktancia, beütésszám, redoxpotenciál)



IMS

IMMUNOMAGNETIC SEPARATION

Sample preparation → Immunomagnetic separation (IMS) → Detection

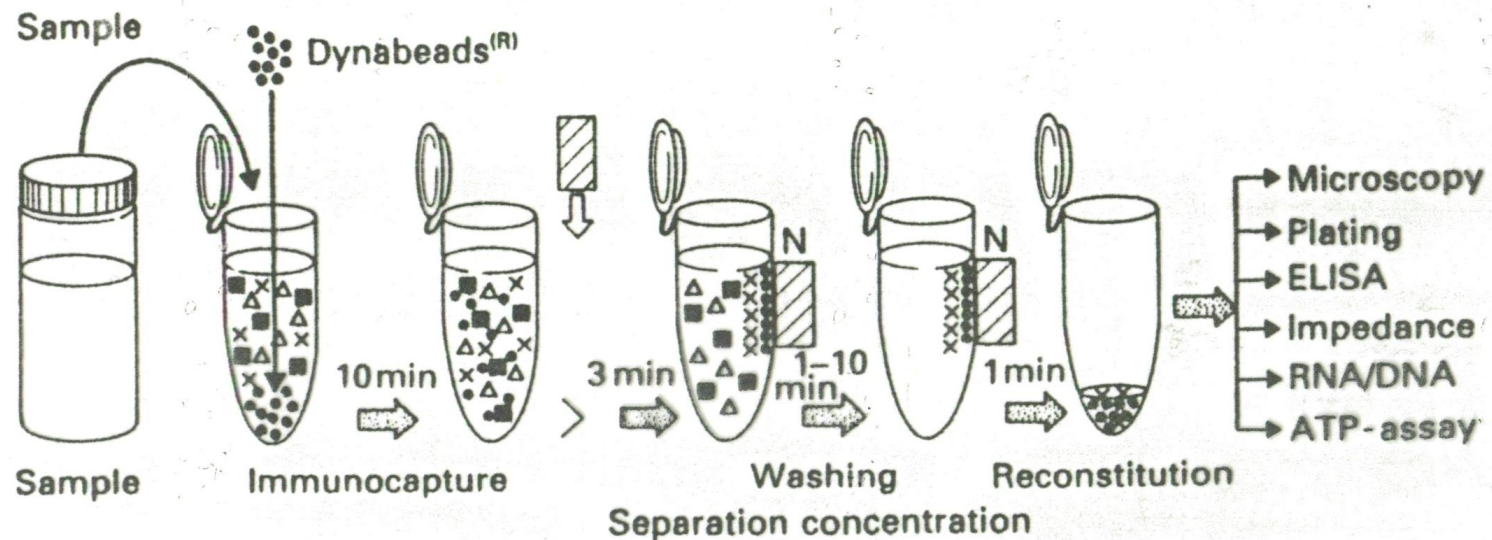
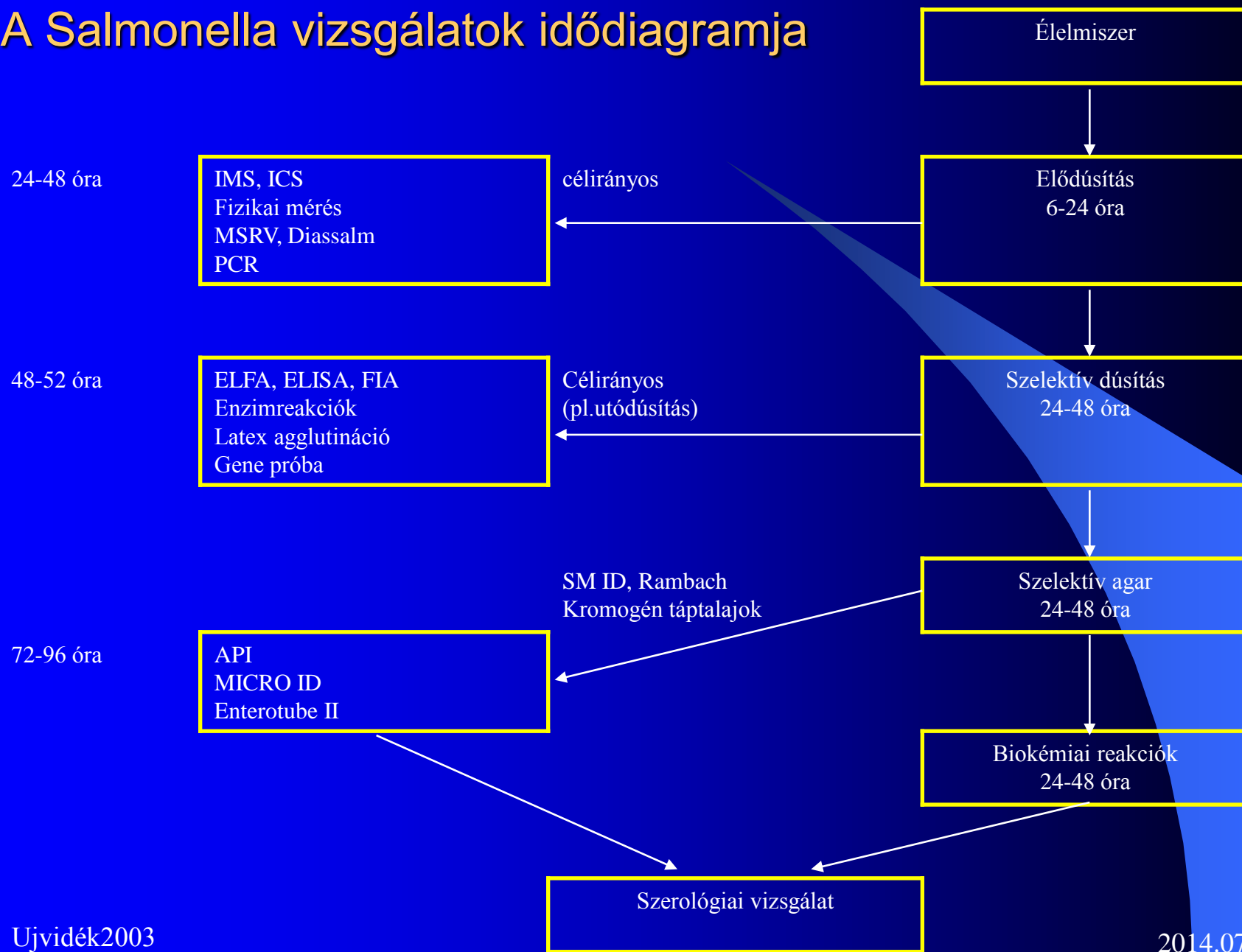


FIG. 2.1. Diagrammatic scheme to show the immunomagnetic separation process.

A Salmonella vizsgálatok idődiagramja



ELŐDÚSÍTÁS

Cél: a sérült sejtek
reszuszcitációja

Ráztatva, nem ráztatva

INKUBÁLÁSI IDŐTARTAM

Az elődúsítást követő módszer és a kísérő
mikroflóra mennyiségének függvénye

- Klasszikus tenyésztéses
16-24 óra
- Motilitási elven alapuló
16-20 óra
- Immunszelektív dúsítás
6-8 óra
- PCR 6-16 óra
- Konduktometriás 16-24 ó
- ELISA
 - kevés kísérő mikroflóra
16-24 óra
 - sok kísérő mikroflóra
6-8 óra

ELŐDÚSÍTÓ

AOAC

*Laktózleves**

tojás, tej, hús, gyümölcs hal

*Triptikáz szója leves**

tojás, tojáslé, fűszerek, élesztő

Brillantzöld oldat

tejpor

TSB + 0,5 % K_2SO_3

fokhagymapor, vöröshagymapor

Steril sovány tej

csokoládé termékek

ISO 6579

LB + Tergitol vagy
Triton*

kókuszreszelék, húsipari mellék-
termékek, hal-, csont- húslisztek

BPW
Pufferolt peptonvíz

legtöbb élelmiszer, nyers hús

BPW +5% kazein,
vagy 10 % tejpor

kakaó és kakaó alapú termékek

BPW +1/100 hígítású
minta

gyógynövények, fűszerek,

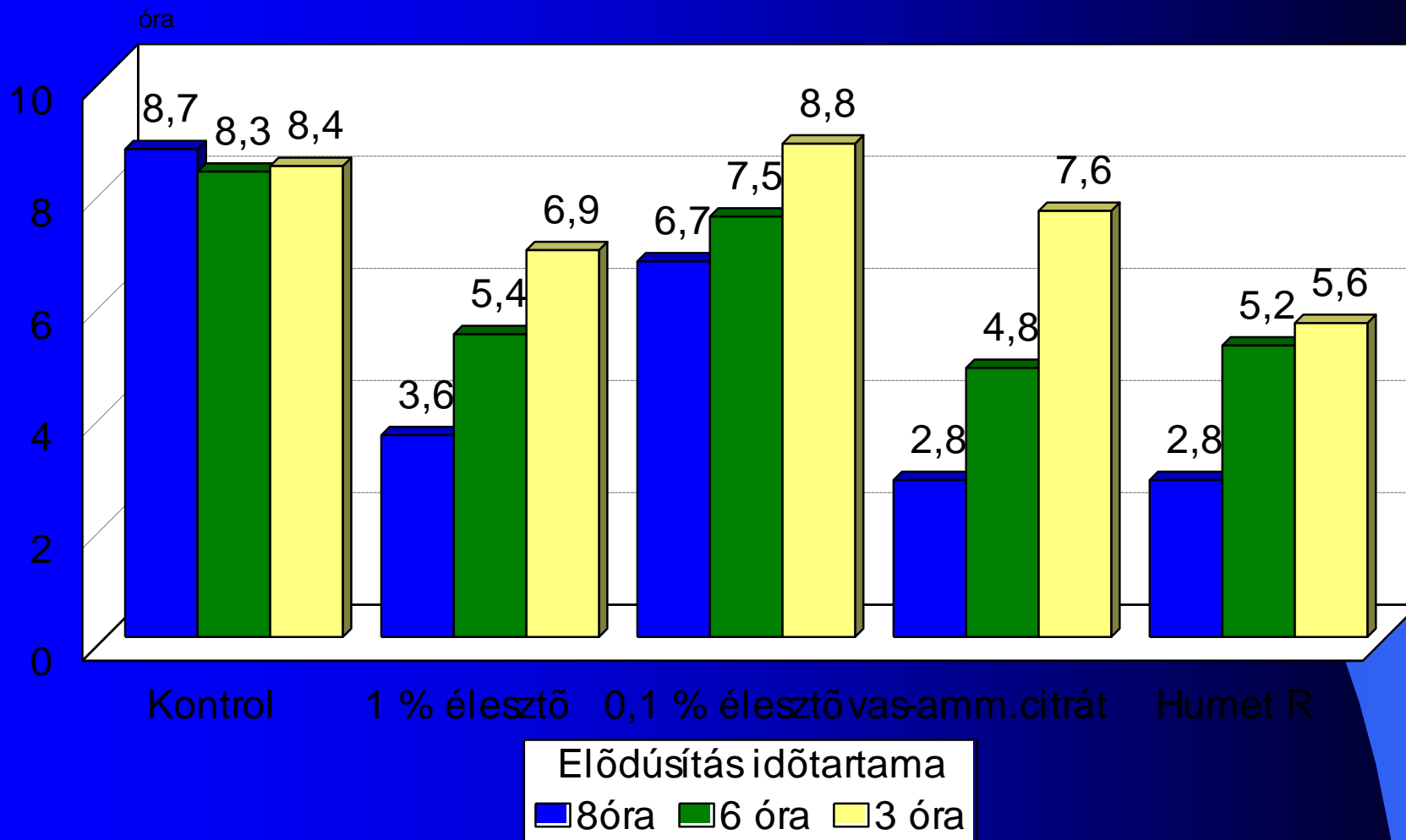
BPW+0,1-1%
Tween80

nagy zsírtartalmú
termékek(>20%)

BPW+ pH kontrol

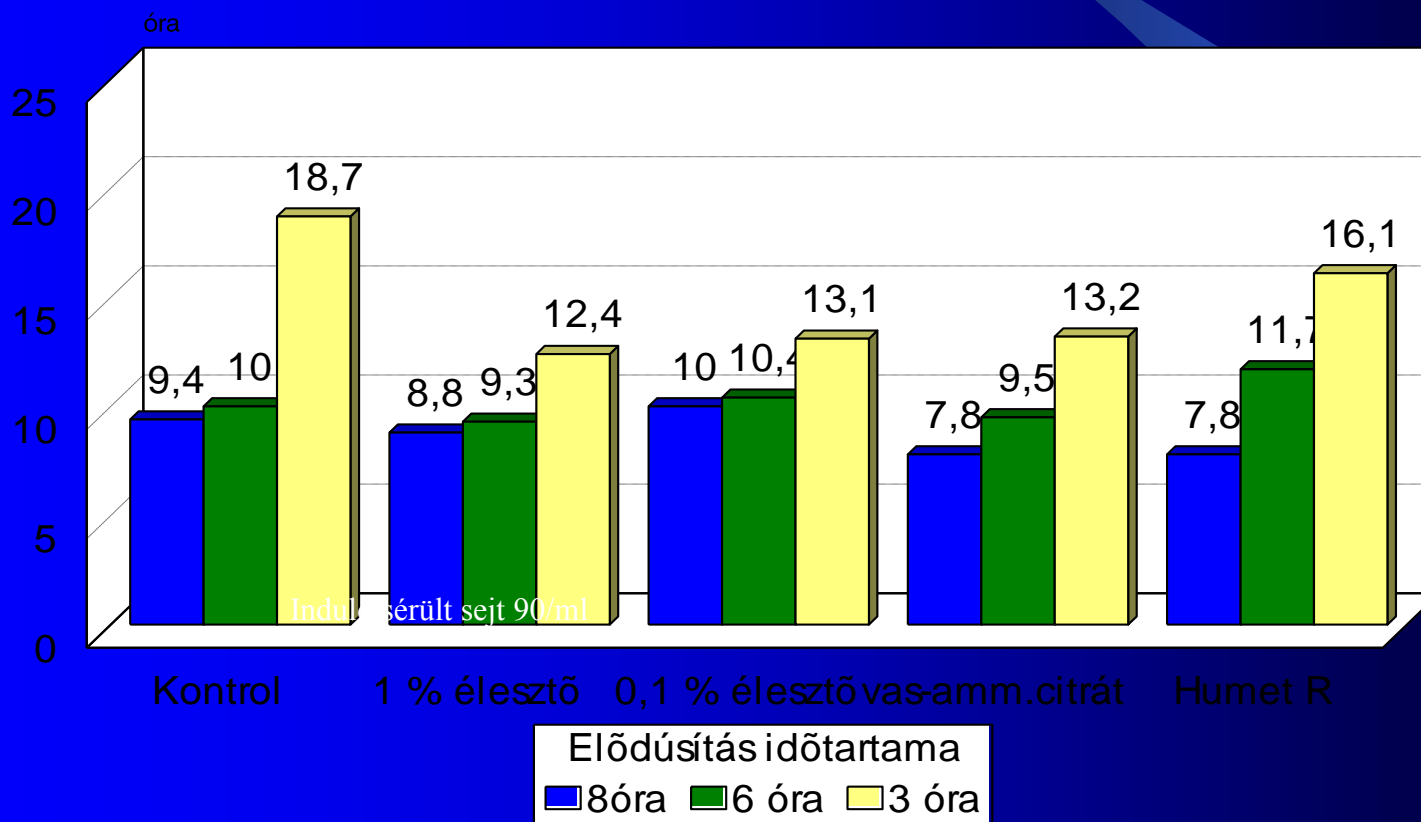
savak és savas termékek

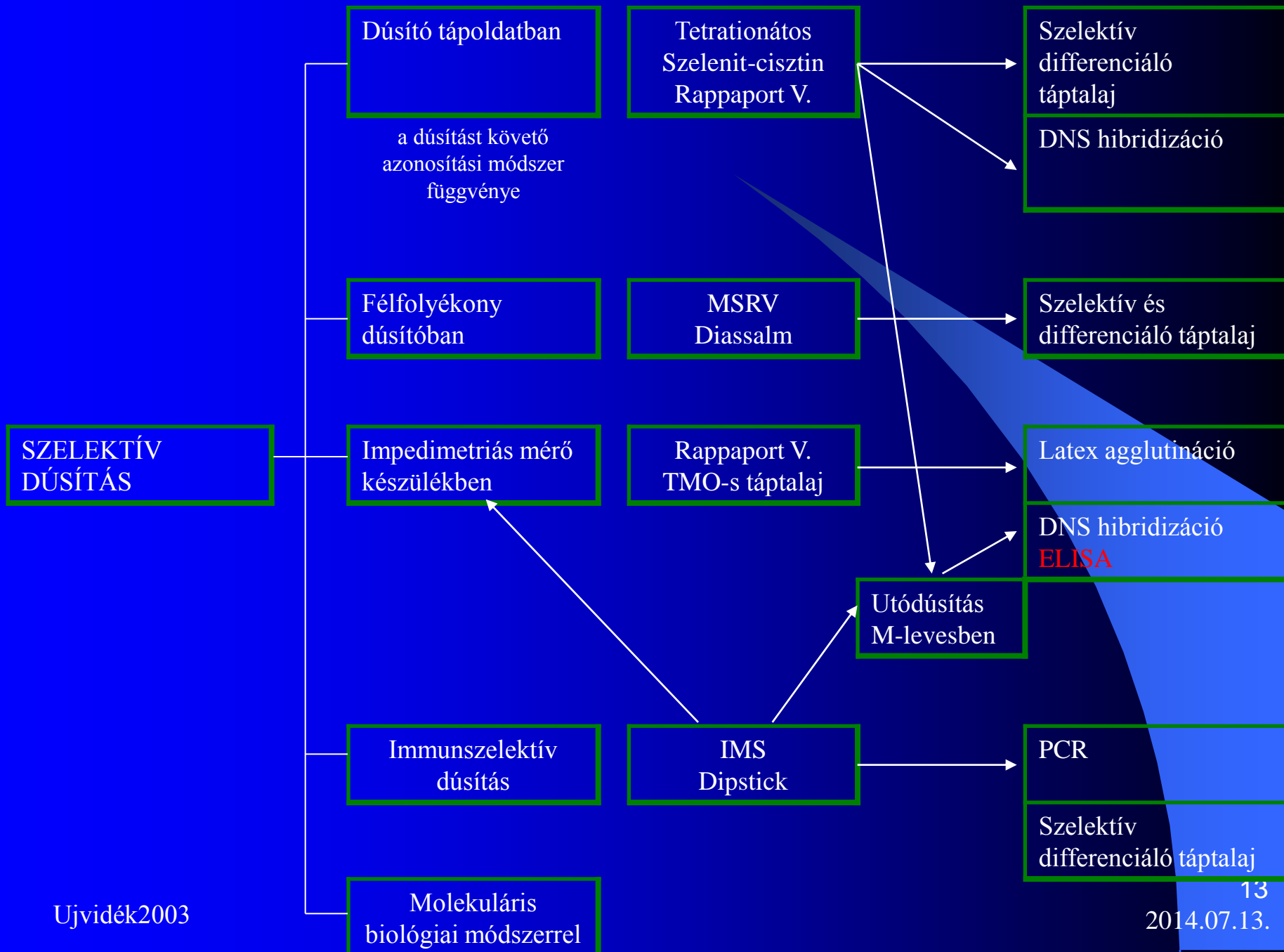
Tojásfehérje



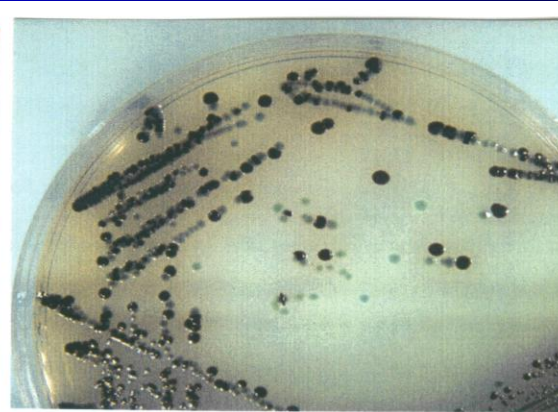
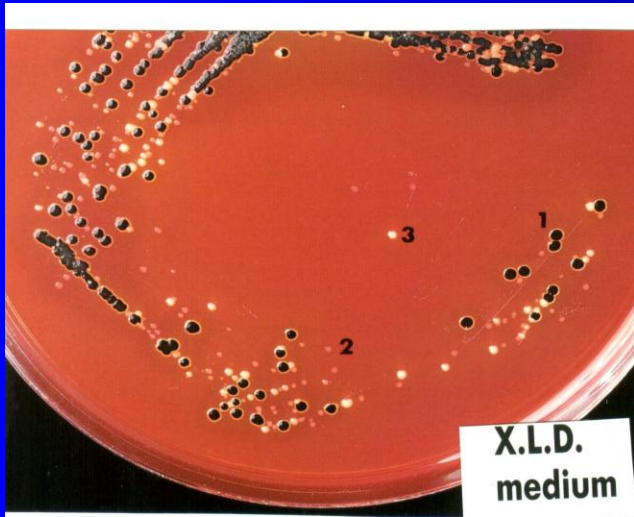
Salmonella kimutatás hőkezelt tejből

Kimutatási határ eléréséhez szükséges idő

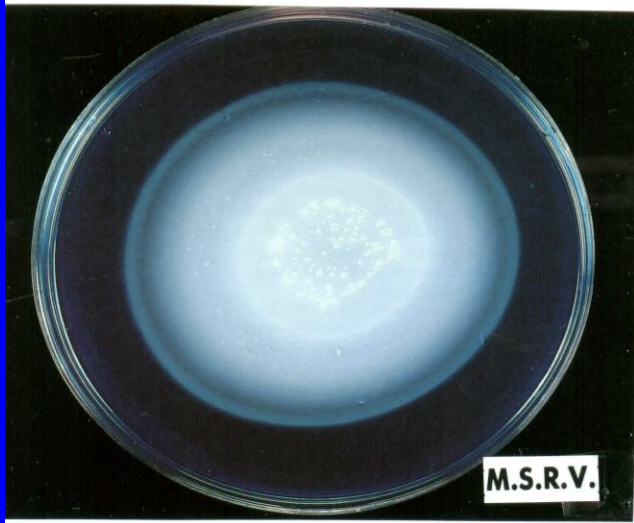




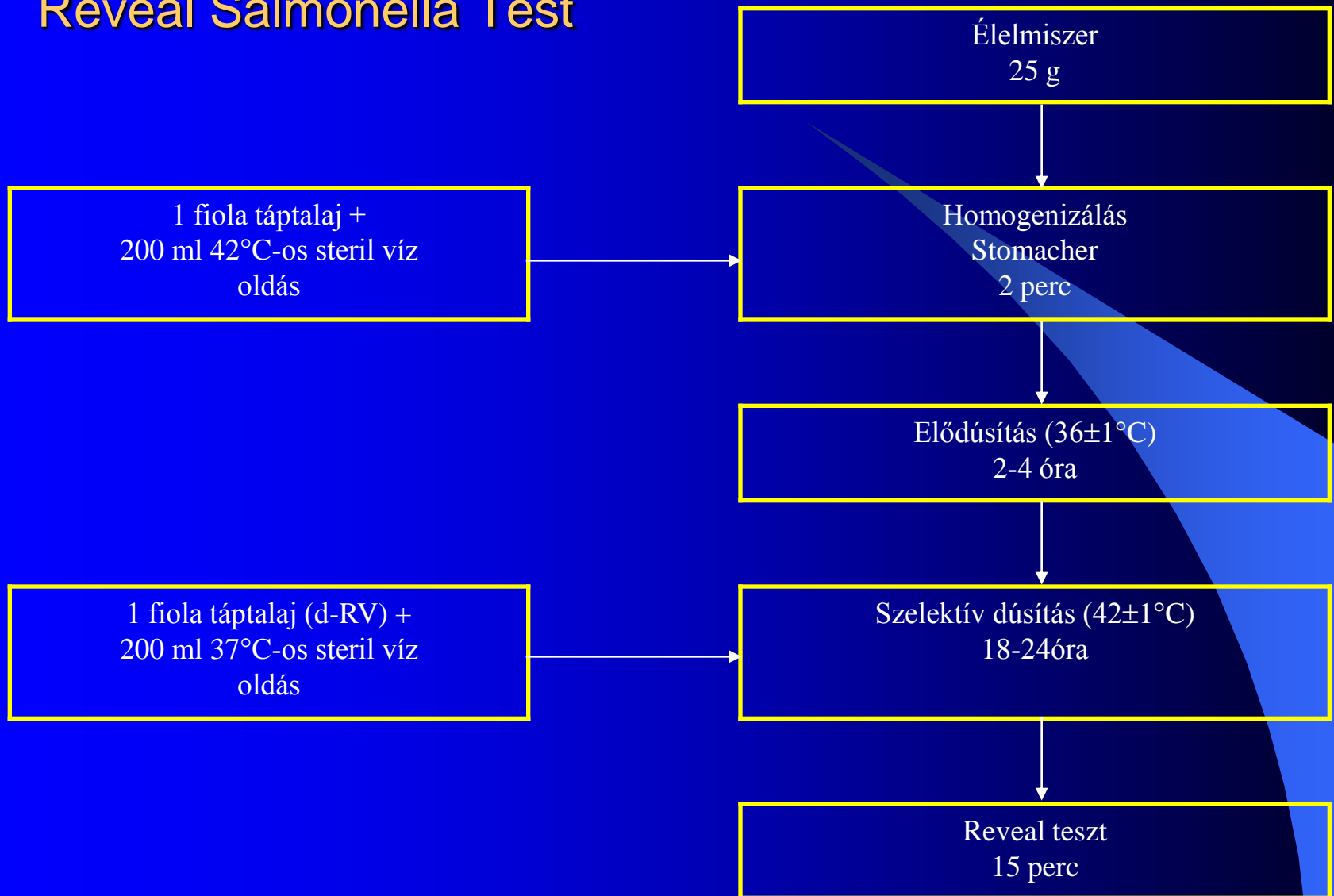
Salmonella táptalajok



**Harlequin™
Salmonella**



Reveal Salmonella Test



REVEAL

REVEAL teszt



1. Elődüsitő táptalaj oldása.



2. Adjuk a mintát a táptalajhoz és inkubáljuk 37°C-on.



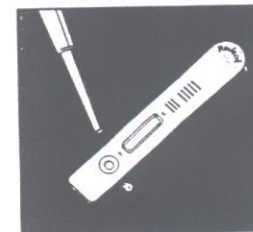
3. Szelektív düsitő táptalaj oldása.



4. Adjuk a szelektív düsitőt az elődüsitóhoz és inkubáljuk 43°C-on.



5. Hűtjük szobahőmérsékletre.



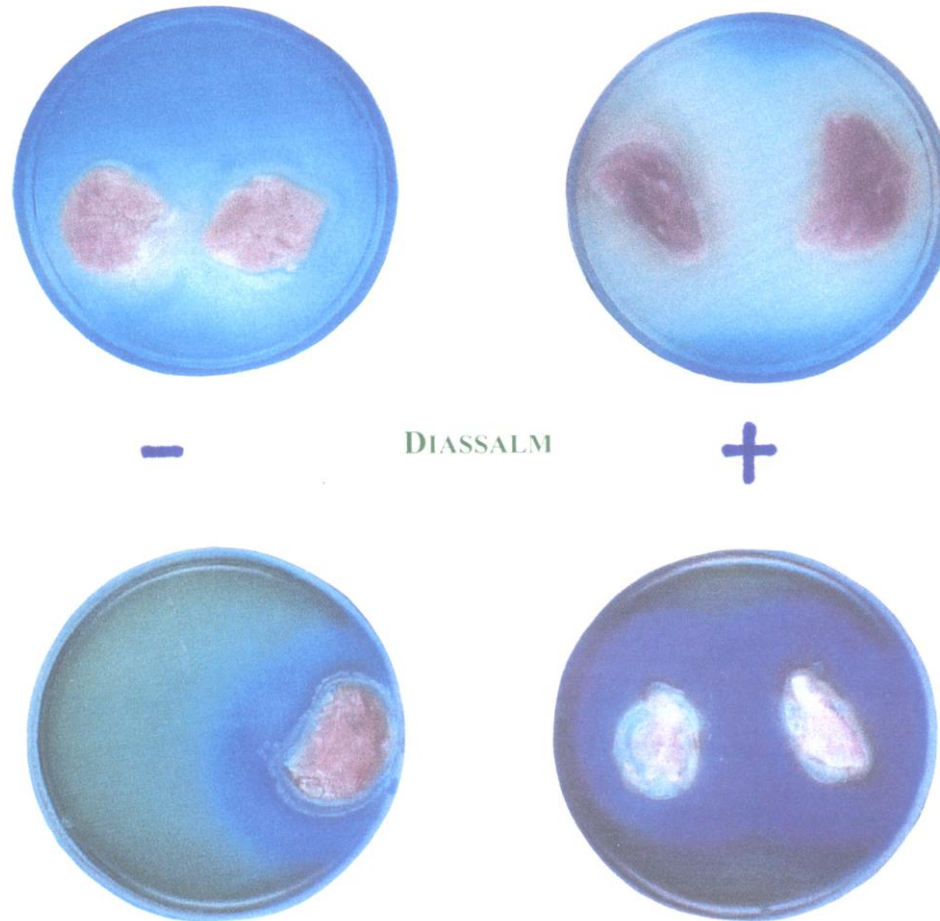
6. Cseppentsünk 3 csepp düsitőt a minta helyre.



7. Olvassuk le az eredményt 20 percen belül.

EGYSZERŰSÍTETT SALMONELLA VIZSGÁLATOK NYERS HÚSBÓL

MSRV (Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis)



Követelmények

- Gyors, vagy gyorsított
- Nemzetközi szabványoknak való megfelelés
- Akkreditálási követelményeknek való megfelelés
- Jártasság igazolása körvizsgálatokban való részvétellel
- Minőségbiztosítási rendszereknek való megfelelés

A vizsgáló és kalibráló laboratóriumok alkalmasságának általános követelményei **MSZ EN ISO 17025:2001**

5.4 VIZSGÁLÓ MÓDSZEREK:

- ❖ Elsősorban nemzetközi, regionális és nemzeti szabványokat kell alkalmazni.
- ❖ Laboratóriumban kifejlesztett, vagy átvett módszert a használatba vétel előtt validálni kell.

Validálni kell:

- Nem szabványos módszereket
- Saját kifejlesztésű módszereket
- Működési területen kívül eső szabványos módszereket
- Szabványos módszerek kiegészítéseit, módosításait

MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATI MÓDSZEREK VALIDÁLÁSA

EN ISO 16140:2000

LÉPÉSEI:

- Alternatív és referencia módszer laboratóriumon belüli összehasonlítása
- Körvizsgálat

Jellemző paraméterek

Relatív pontosság: $100 \cdot (p+n) / N \%$

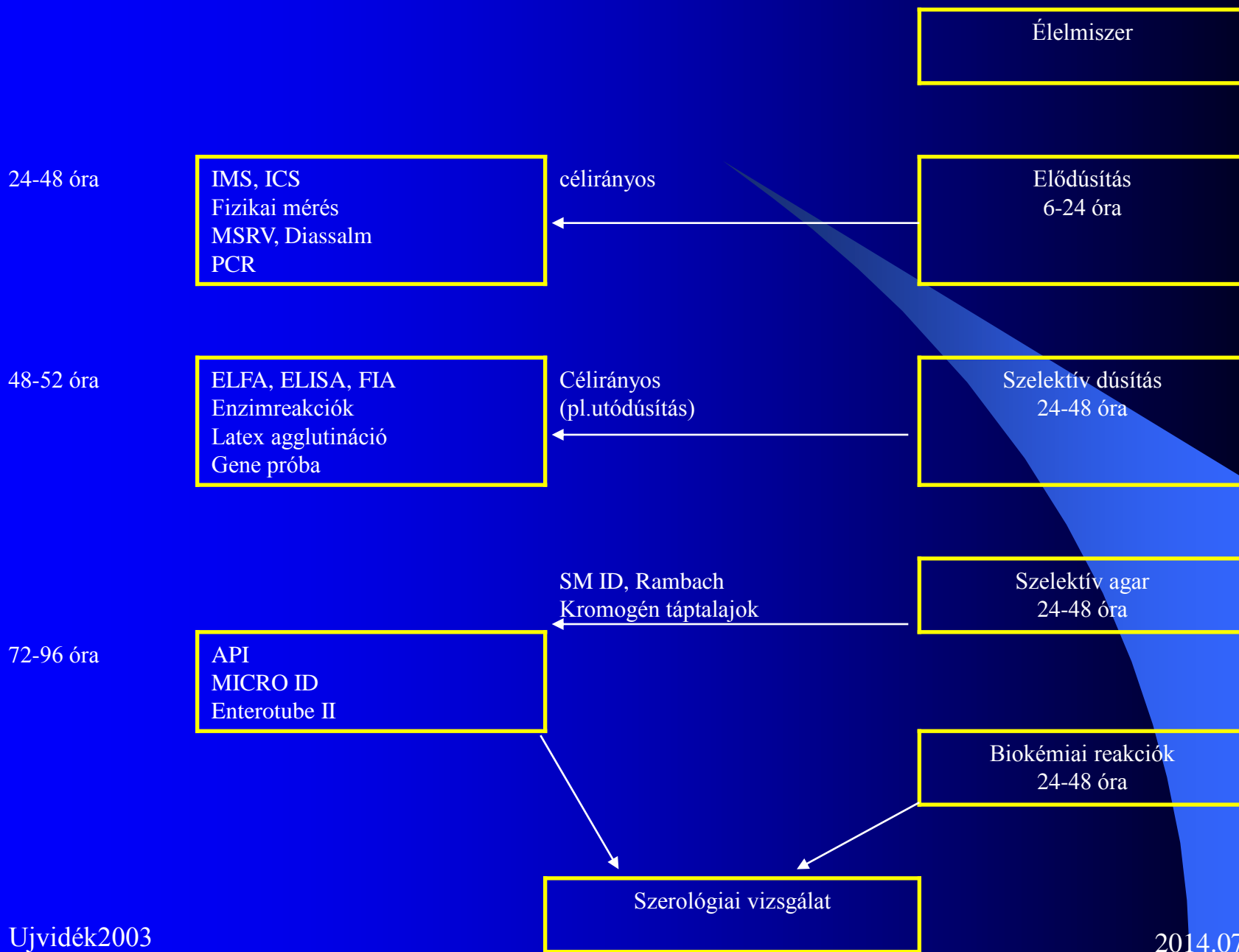
Relatív specitikusság: $100 \cdot n / (n+fp) \%$

Relatív érzékenység: $100 \cdot p / (p+fn) \%$

	Referencia +	Referencia -
Alternatív +	p	f _p
Alternatív -	f _n	n

Mi határozza meg, hogy melyik módszert válasszuk?

- a vizsgálat célja
- biztonsági szint
- mintavételi terv
- validálás
 - érzékenység
 - specifikusság
 - pontosság
- élelmiszer összetétele
- vizsgálati idő
- automatizálás lehetősége adattárolás, adatelemzés
- szervíz és céginformációk
- vizsgálati költség



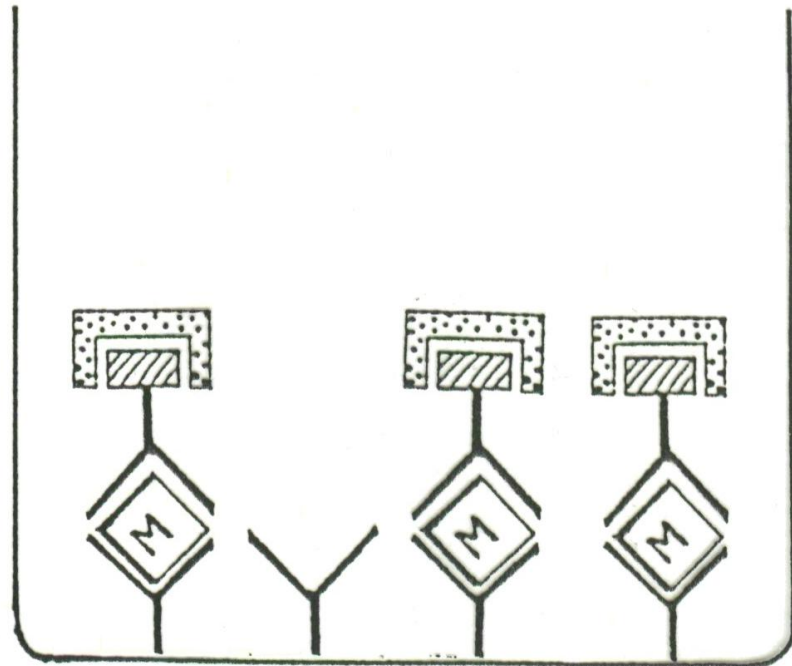
Szendvics ELISA

Szubsztrát

Konjugátum

Minta

Kötő antitest



BIOLINE ELISA

Salmonella ELISA Test 96/1

- ➡ Preenrichment in BPW for 16-24h at 37°C
- ➡ Selective enrichment in RVS for 18-24h at 41.5°C
- ➡ Boil for 15 minutes and cool the RVS-sample

Start the Salmonella ELISA Test

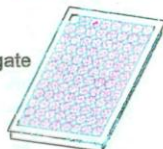
Procedure

Leave one well blank.
Use one well for negative
and one for positive control.
Pipette 100 µl of enriched
sample into each well.



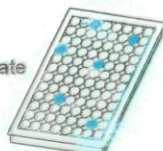
WASH

Pipette 100 µl of Conjugate
into each well.

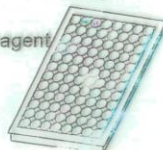


WASH

Pipette 100 µl of Substrate
into each well.



Pipette 100 µl of Stopreagent
into each well.
Read the plate with
photometer at 450nm.



Incubation

35 - 37°C
30 minutes

35 - 37°C
30 minutes

20 - 25°C
15 minutes

Test Procedure Summary

Step	Minutes	Activity
1	30	Pipette 100µl Negative Control Pipette 100µl Positive Control Pipette 100µl of each boiled sample Incubate at 35 - 37°C Wash 7 times with diluted Washing Buffer
2	30	Pipette 100µl of Conjugate Incubate at 35 - 37°C Wash 7 times with diluted Washing Buffer
3	15	Pipette 100µl of Substrate TMB Incubate at room temperature
4		Pipette 100µl of Stopping Solution Read results immediately on a Reader at 450nm

bioline

PERFORMANCE TESTED
AOAC
RESEARCH INSTITUTE

BIOLINE ELISA előnyei

Széleskörű felhasználási terület (élelmiszerek, takarmányok, környezeti minták)

Egyszerű, felhasználóbarát (akár napi 600 minta)

Flexibilis (igény szerint csíkokra szétszedhető kit)

Stabil, felhasználásra kész reagensek (12 hónap)

Detektálási limit (10^6 - $6 \cdot 10^6$ cfu/ml RV)

Analóg a referencia módszerrel

Érzékenység: 99%

Specifikusság: 97%

Csak az ELISA pozitív mintákat kell megerősíteni.

A reprodukálhatósági vizsgálatok során a variációs koefficiens <7%
(12-szeri ismételés esetén)

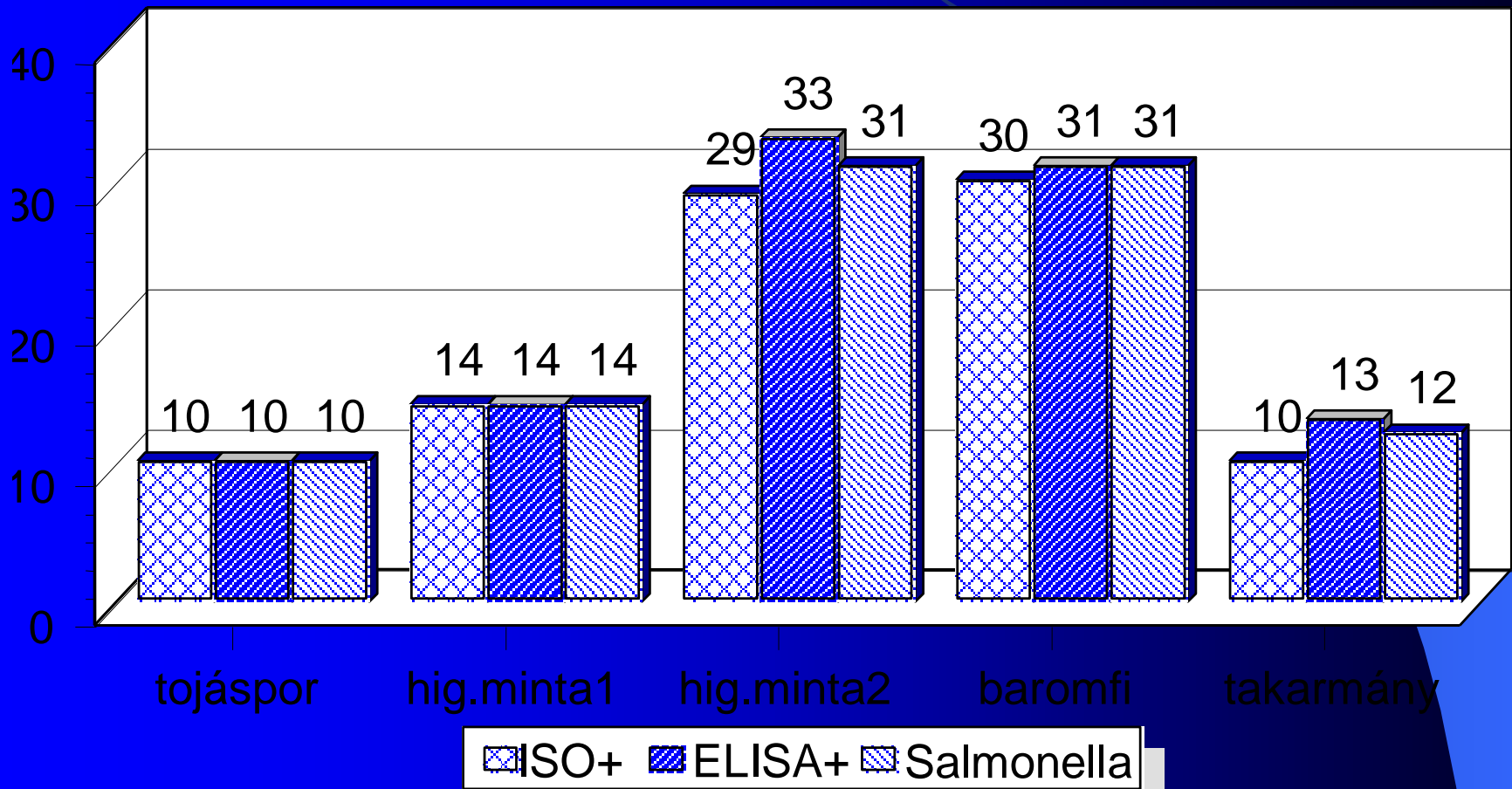
Keresztreakció: E.coli, Proteus, E.cloaceae, Klebsiella negatív
E.aerogenes, C.freundii előfordul

Élelmiszerelőállítóknál biztonságos vizsgálat (hőkezelés miatt)

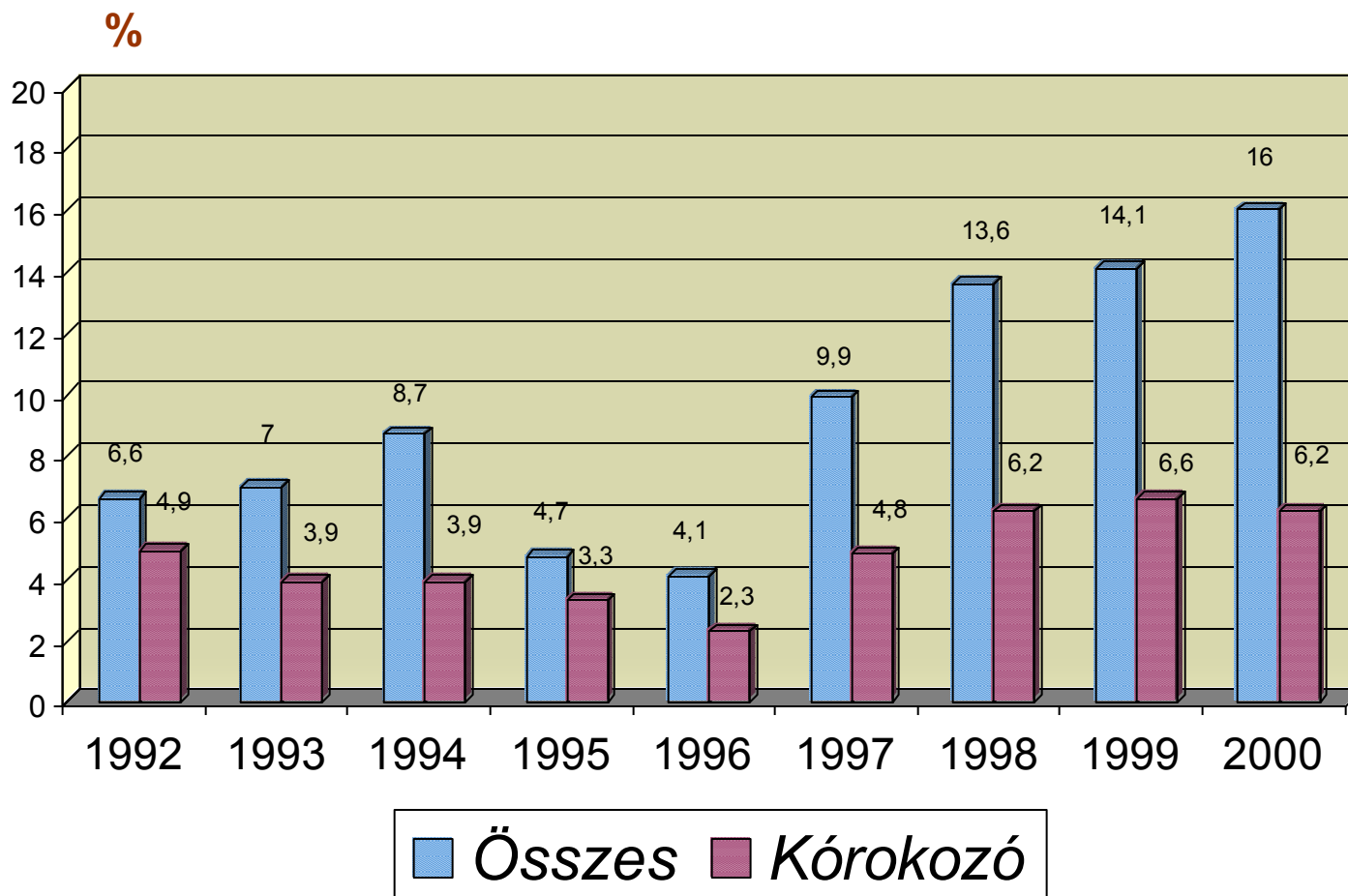
AOAC certificate: No.960901

AFNOR, DANVAL

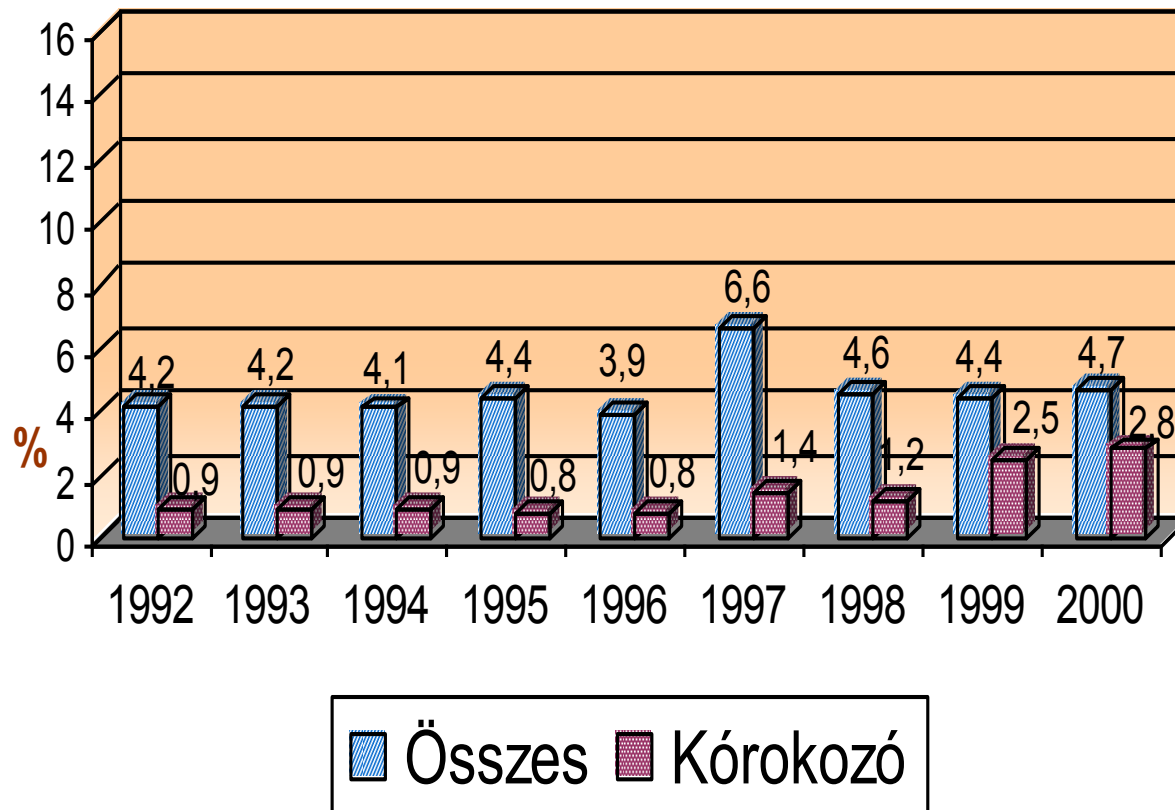
Salmonella pozitív minták száma



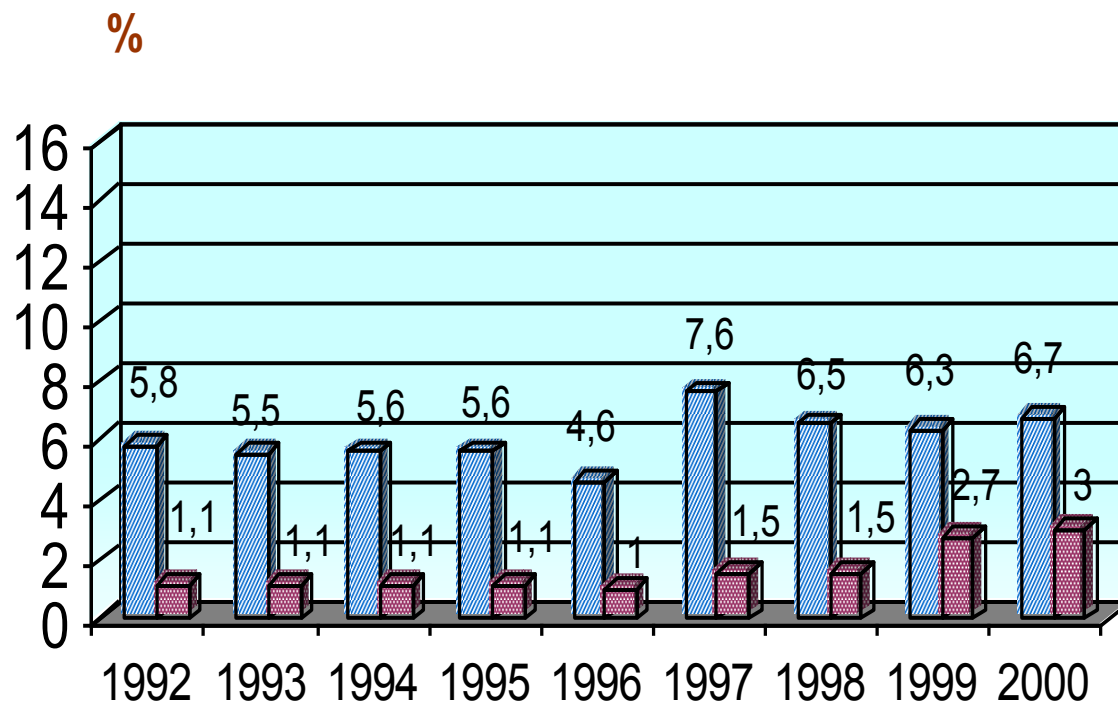
BAROMFIIPAR



HÚSIPAR



ÉLELMISZERIPAR



Összes
 Kórokozó

Állatfaj

- Szarvasmarha
- Sertés
- Tyúk
- Kacsa, liba
- Pulyka

Szerotípus „reservoar”

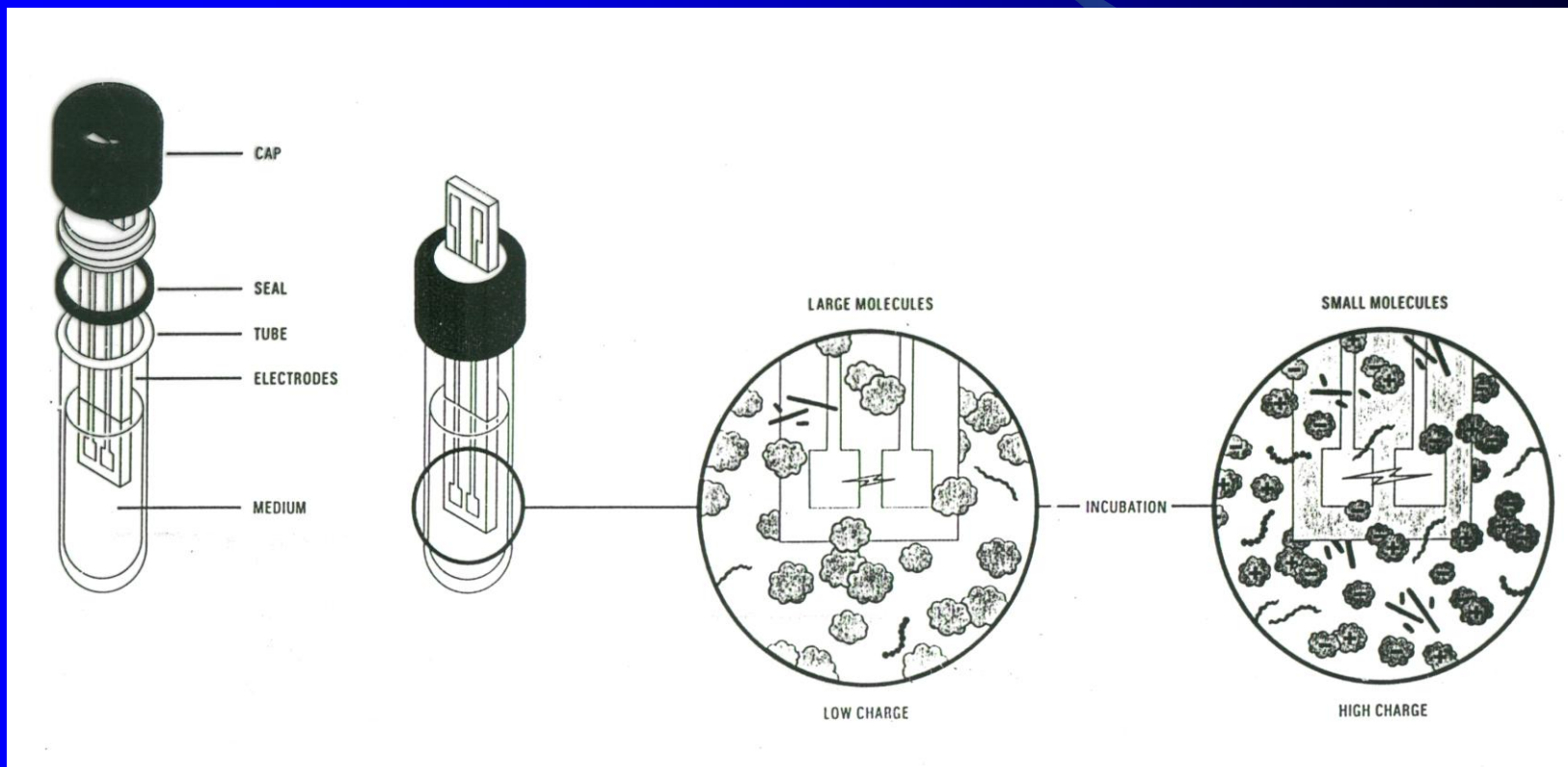
- S.Enteritidis, S.Typhimurium
- S.Derby, S.Typhimurium, S.Choleraesuis
- S.Enteritidis
- S.Typhimurium
- S.Saintpaul, S.Enteritidis, S.Infantis

Élelmiszer

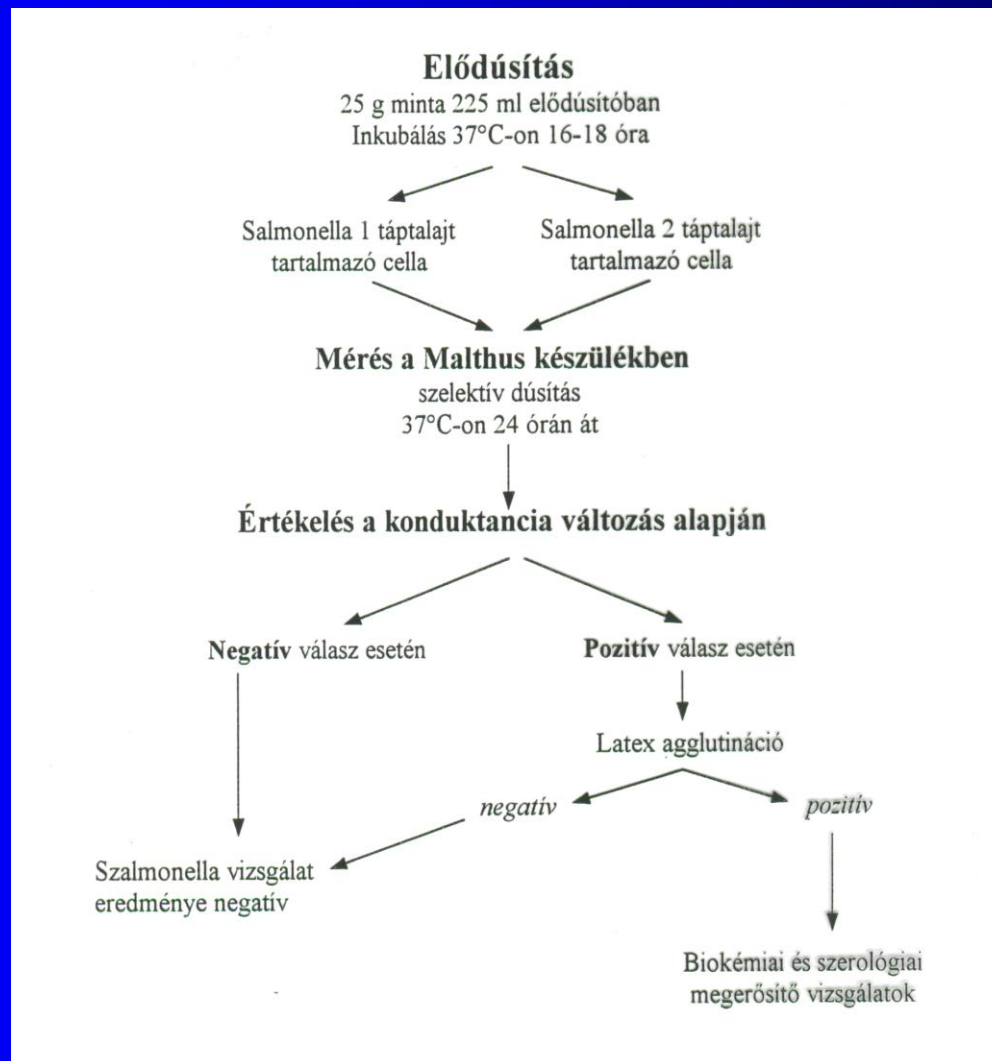
Szerotípus „hordozó”

- Marhahús
- Sertéshús
- Tyúk hús
- Kacsa, liba
- Pulyka hús
- Húsipari termék
- Tojás, sz.tészta
- S.Enteritidis, S.Typhimurium
- S.Derby, S.Typhimurium
- S.Enteritidis → S.Infantis
- S.Typhimurium
- S.Brockley, S.Virchow, S.Hadar
- S.Derby
- S.Enteritidis

Konduktancia mérés



Salmonella kimutatás Malthus eljárással



HAGYOMÁNYOS MÓDSZEREK GYORSÍTÁSA, AUTOMATIZÁLÁSA

TÁPTALAJOK (KÉSZ POR, REDY TO USE)

GRAVIMETRIÁS ADAGOLÁS, HIGÍTÁS

DIP SLIDE MÓDSZEREK

SPIRÁL LEMEZ MÓDSZER

PETRIFILM

HIDROFÓB HÁLÓZATOS MEMBRÁNFILTEREK (HGMF)

ÚJ SZELEKTÍV TÁPTALAJOK

IDENTIFIKÁLÁS (API, CRISTAL, MINI TUBE:..)

EGYSZER HASZNÁLATOS ESZKÖZÖK

TELEPSZÁMLÁLÁS AUTOMATIZÁLÁSA

Tenyésztési eljárás (ISO 6579)

