

Patogén mikroorganizmusok vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel

Rohonczy Kata, Zoller Linda, Fodor Andrea,
Tabajdiné, dr. Pintér Vera

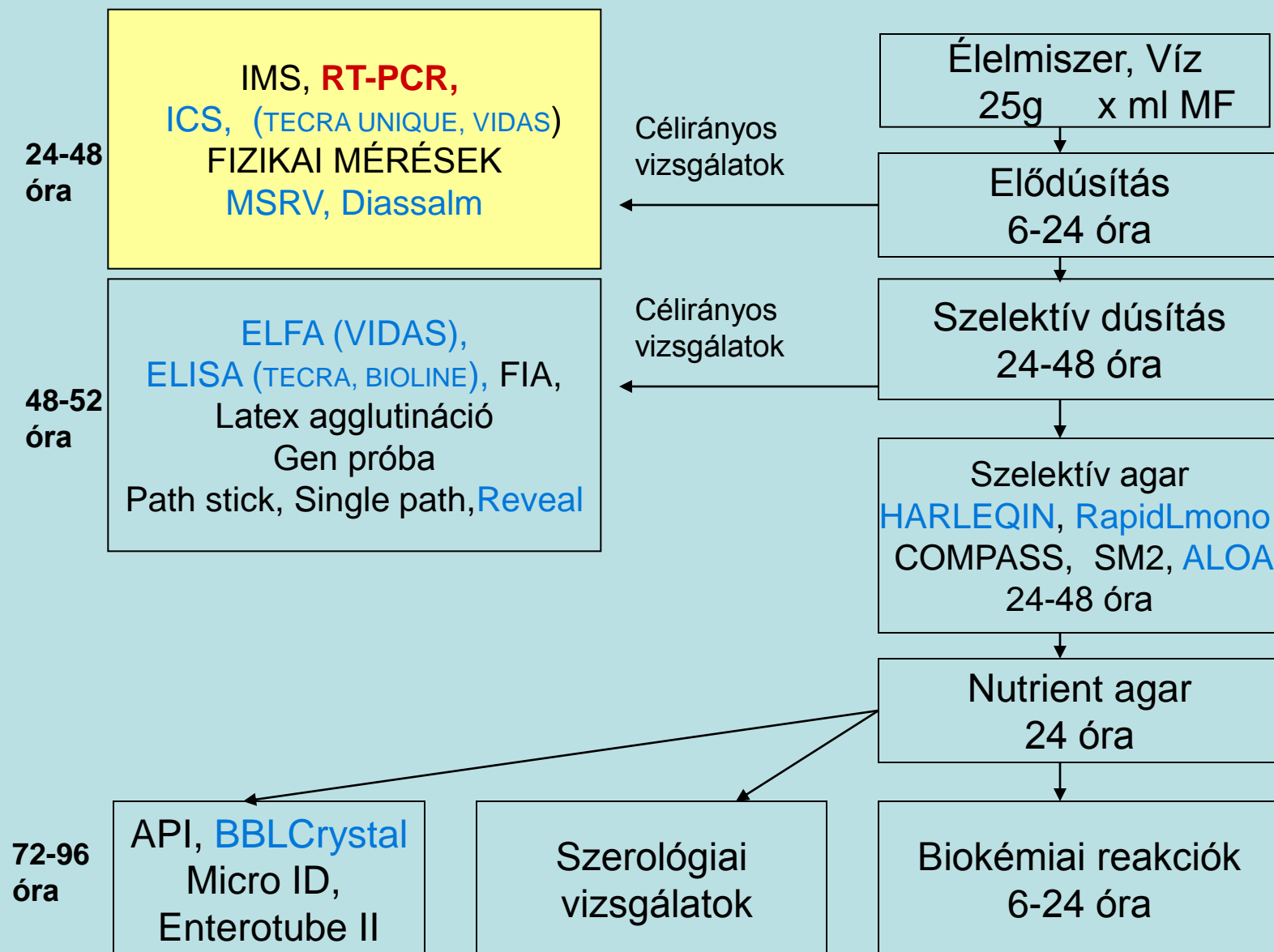
FoodMicro Kft.

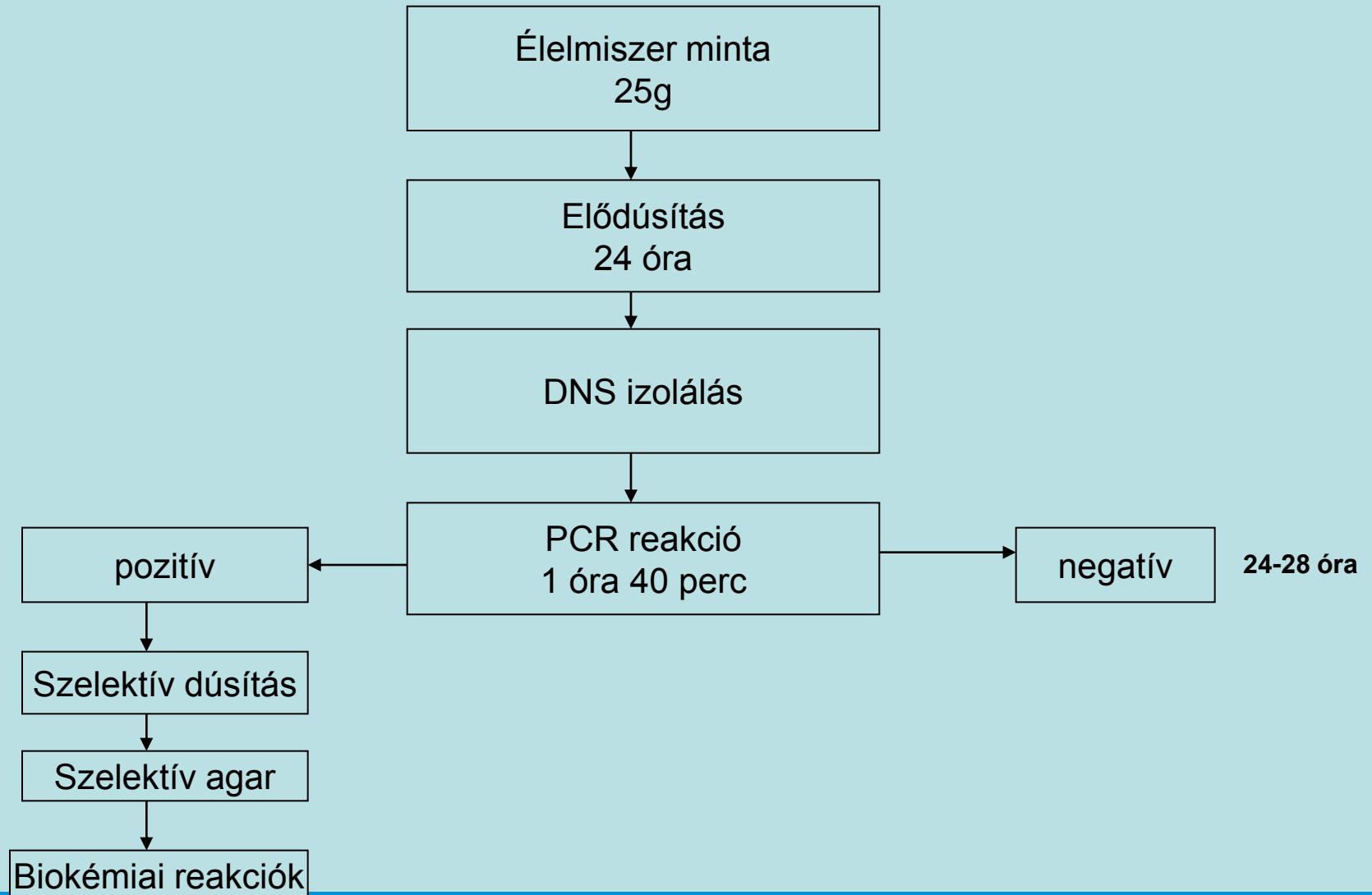
Élelmiszerekben és takarmányokban előforduló patogén mikroorganizmusok
(*Salmonella*, *Listeria monocytogenes*) kimutatásához szüksége idő lerövidítése

Molekuláris biológiai eljárással nyert adatok összehasonlítása a referencia
módszerekkel

Különböző élelmiszermátrixok hatásának elemzése a biztonságos
kimutathatóságra

Az ISO 16140 szabvány alapján a jellemző paraméterek meghatározása





Elődúsítás

25g minta+225ml BPW inkubálás 24 óra 37°C

DNS izolálás

1. Centrifugálás
2. Sejtfeltárás
 - Sejtfal bontás (PrepMan Ultra)
 - Hőkezelés (100 °C 10 perc)
 - Centrifugálás (12000rpm 3 percig).
3. DNS hígítása (10 µl DNS+90 µl víz) mátrix hatás és a holt sejtek zavaró hatásának csökkentése
4. PCR mix összeállítása
5. PCR (12 µl mix=0,001g mintából izolált DNS extrakt)

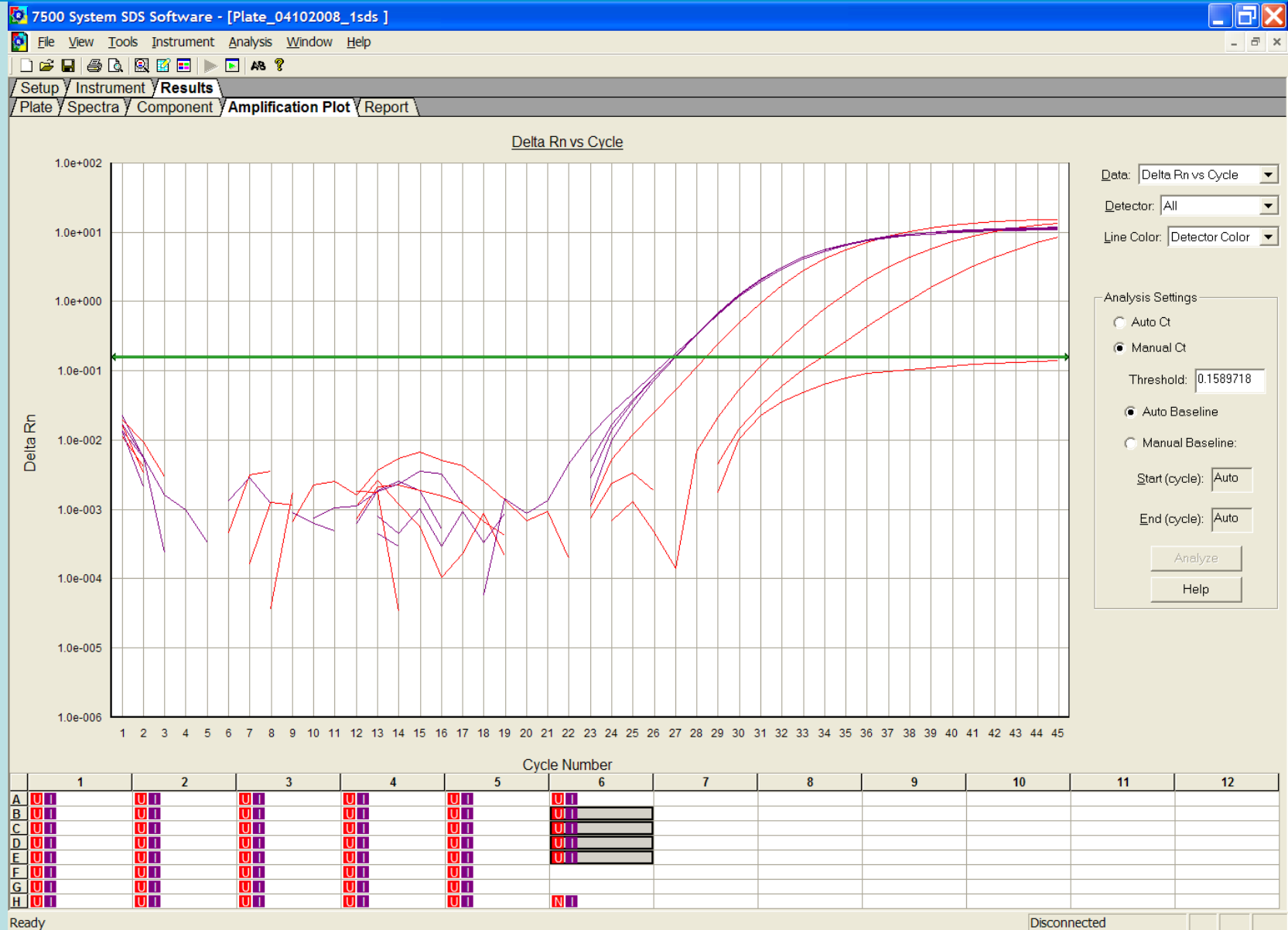
Reakció oldat összeállítása mintánként:

1. Master Mix (dNTP, proteináz-K, Mg)
2. Target Assay (festék, primerek, IPC)
3. Mintából izolált DNS

PCR reakció lényege ciklusonként

1. Denaturáció
2. Primerek bekapcsolódnak az egyszálú DNS-ek célszekvenciáiba
3. Láncosszabbítás

A specifikus DNS szakaszok felszaporítása és a detektálása egy időben történik.



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

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

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

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

Élelmiszer mátrix	Összes vizsgált minta	Relatív pontosság	Relatív specifikusság	Relatív érzékenység
Hús, hús készítmények	73	100	100	100
Tej, tejtermék	66	97	93,5	100
Zöldségek	63	98,4	97	100
Tojás és tojás termékek	65	98,5	100	97,1
Takarmány (pet foods)	66	98,5	96,7	100

98,5

97,4

99,4

Vizsgált minták:

Előkészített hús, húskészítmény,

csokoládé,

fűszer,

takarmány

- Salmonella tartalmú minták
- Negatív minták

<i>Élelmiszer mátrix</i>	<i>Összes vizsgált minta</i>	<i>Relatív pontosság</i>	<i>Relatív specifikusság</i>	<i>Relatív érzékenység</i>
<i>Előkészített húsok</i>	220	76,9	76,1	100
<i>Felvágottak</i>	92	97,8	97,8	100
<i>Csokoládé</i>	44	97,7	97,5	100
<i>Fűszer</i>	9	100	100	100
<i>Takarmány (pet foods)</i>	864	95,8	95,8	100

96,1

96,1

100

- **Előkészített húsok**

„fals pozitivitás” ----holt sejtek kimutatása ---- higiéniai indikátor

---nagy számú kísérő mikroflóra miatt a klasszikus módszer hibája

(6-8 ó elődúsítás utáni szelektív dúsítás)

- **Csokoládé**

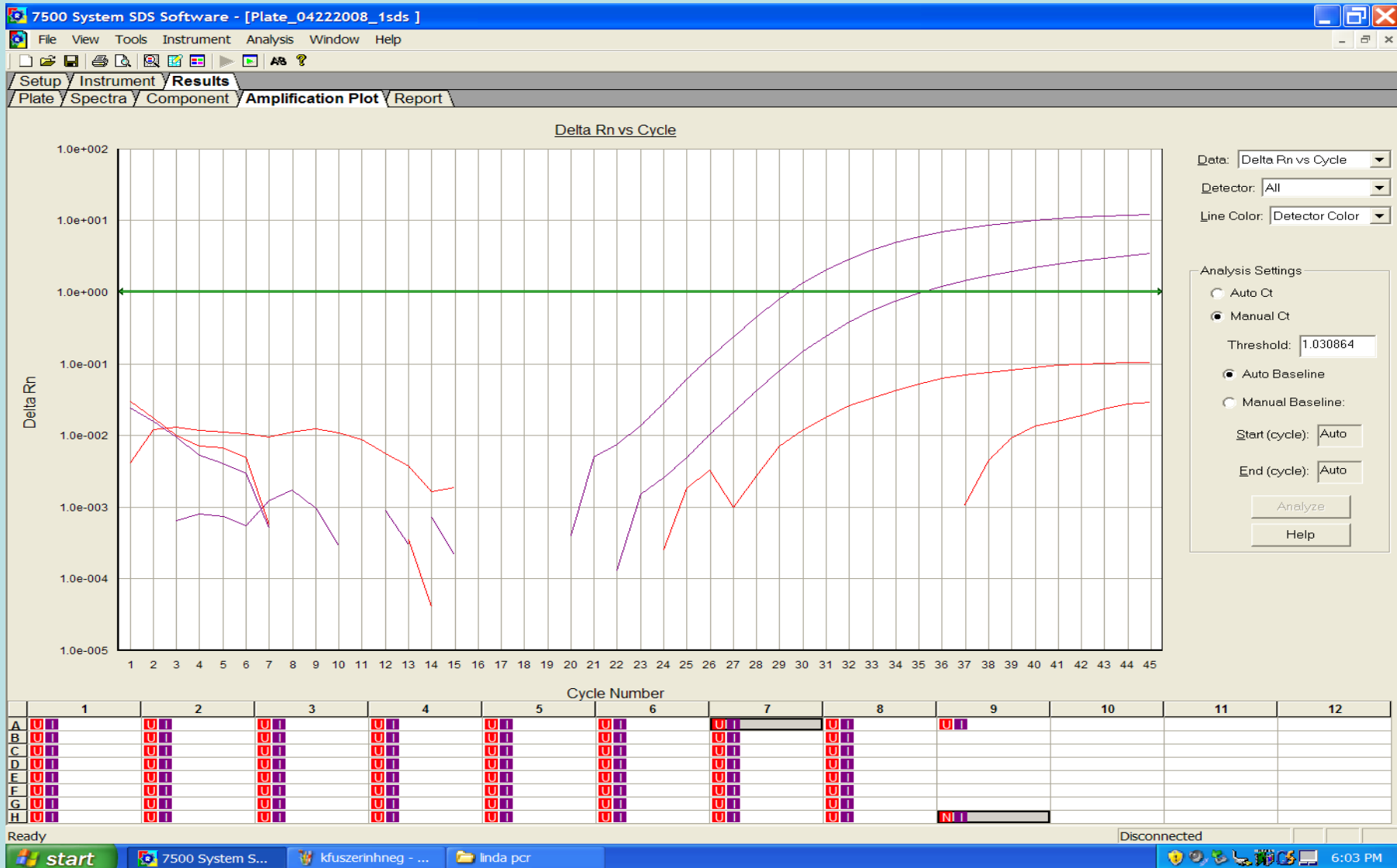
a gátló hatás a sovány tejben történő elődúsítással kiküszöbölhető

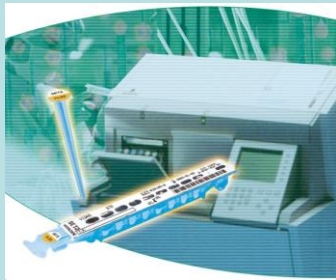
- **Fűszerek** részleges vagy teljes inhibíció

kiküszöbölés --- -elődúsítás megfelelő vezetése 5g/l káliumszulfít

-hígítás







	Relatív pontosság (%)	Relatív specifitás (%)	Relatív érzékenység (%)
COMPASS	100	100	100
HARLEQUIN	100	100	100
SM2	100	100	100
VIDAS SLM	100	100	100
VIDAS ICS+SLM	99	100	98
TECRA ICS	99	100	96

RT-PCR

96,1

96,1

100

30 órán belül kiadható

1. *Salmonella*,
2. *L. monocytogenes*,
3. *E.coli* 0157,
4. *Campylobacter*,
5. *Staph. enterotoxin*,
6. *Enterobacter sakazakii*
7. *Legionella*

eleget téve az új EU direktíva előírásainak.

Az 1-5. paraméterek CALITAX, FEPAS, OKI, OÉVI és általunk szervezett körvizsgálatokban tesztelt akkreditált módszerek.

Köszönöm megtisztelő figyelmüket!

