

## Bevezetés

A fág kutatás reneszánszát éli. Gyógyászati, élelmiszeripari felhasználás mellett a mikrobiológiai diagnosztikában is új lehetőséget teremtett.



A fágok szaporodási ciklusában a legfontosabb fázis a gazda szervezet szelektív felismerés és a specifikus fehérjék kötődése gazda baktériumokhoz. A bakteriofág csak a gazda szervezettel együtt képes fejlődni, ezért nagy érzékenységű gazdasejt felismerési mechanizmussal rendelkezik.

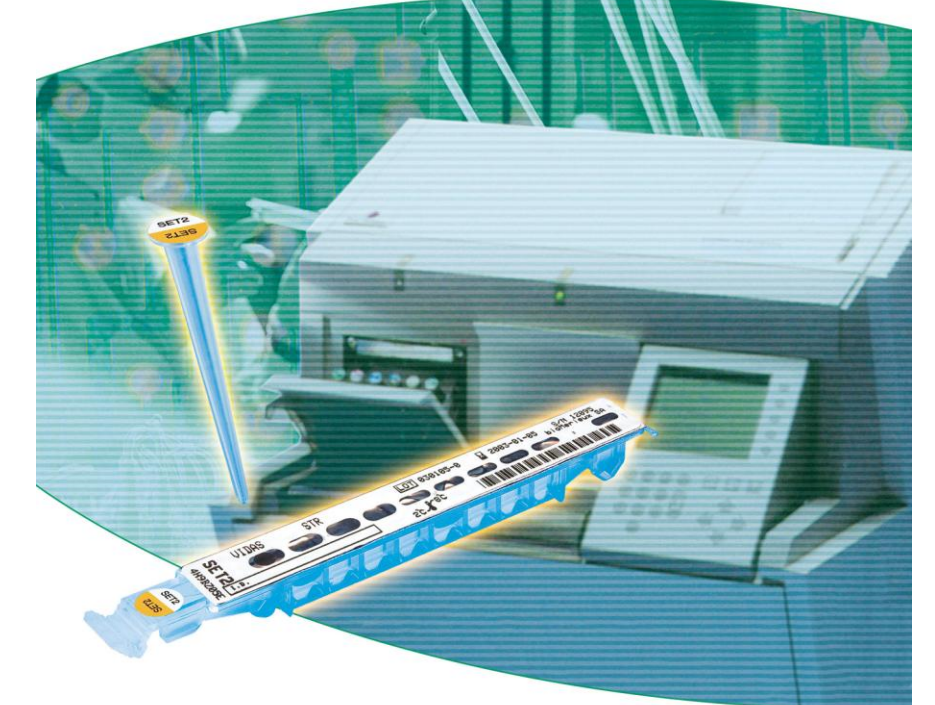
A baktériumok kimutatási módszereinek fejlesztésében a fágok fajspecifikus fehérjei biztosítanak lehetőséget.

A faj specifikus fehérje előállítási folyamat lépései:  
\*a kérdéses patogénre specifikus fág keresése és azonosítása  
\*a fehérje sokszorosítása  
\*klónozás  
\*a rekombináns fehérje előállítása és tisztítása  
rekombináns fehérje jelölése

A fág rekombináns fehérje technológiát a Profos AG biotechnológiai cég fejlesztette ki, a bioMerieux pedig ezt a technikát integrálta a VIDAS élelmiszer eredetű patogén kimutatási módszerrel.

A rekombináns fág fehérje speciális és érzékeny eszköz a megfelelő élelmiszer patogén befogására és detektálására és kiküszöböli az élő fág esetleges mutációjából eredő veszélyeket

VIDAS élelmiszerekben előforduló patogének detektálására



Salmonella (ICS, SLM)  
Listeria monocytogenes (LMO2)  
E.Coli O157(ECO)  
**E.Coli O157 (VIDAS UP)**  
Staphylococcus enterotoxin

## E.coli O157:H7 élelmiszeripari jelentősége

*E. coli* O157:H7 szerotípus súlyos gasztroenteritist és életveszélyes hemolitikus urémiát (vérzéses bélgyulladás, veseelégtelenség) okozhat, különösen gyermekeknél. A toxintermelő képességét valószínűleg bakteriofág révén, feltehetőleg *Shigella*-tól szerezte. 1982-ben azonosították először, az Egyesült Államok nyugati részén 1992/93-ban több mint 700 egyén megbetegedését okozta, Japánban pedig 1996-ban egy több mint 8000 esettel járó eseményt idézett elő.

A szarvasmarhákat és más kérődző állatokat tekintik a baktérium fő tünetmentes hordozóinak. Elégtelen főzés, sütés, vagy a hőkezelés utáni újraszennyeződéssel kerülhet a húsrá. Jelentős savtűrése miatt olyan élelmiszerekben is életben maradhat, amelyeket korábban biztonságosnak gondoltak. Előfordult már szennyeződött fermentált nyerskolbászok, saláták vagy almabor fogyasztása révén is verotoxinogén *E. coli*- okozta megbetegedés is.

A verotoxin-termelő *E. coli* legfőbb forrása a nyers marhahús, nyers tej, kérődző állatok bélsarával szennyezett zöldségfélék. Az esetek kb. 5%-ában halált okoz, amely leggyakrabban a szövődményként kialakuló vérzéses húgyúti megbetegedés következménye.

## E.coli O157:H7

törvényi szabályozása

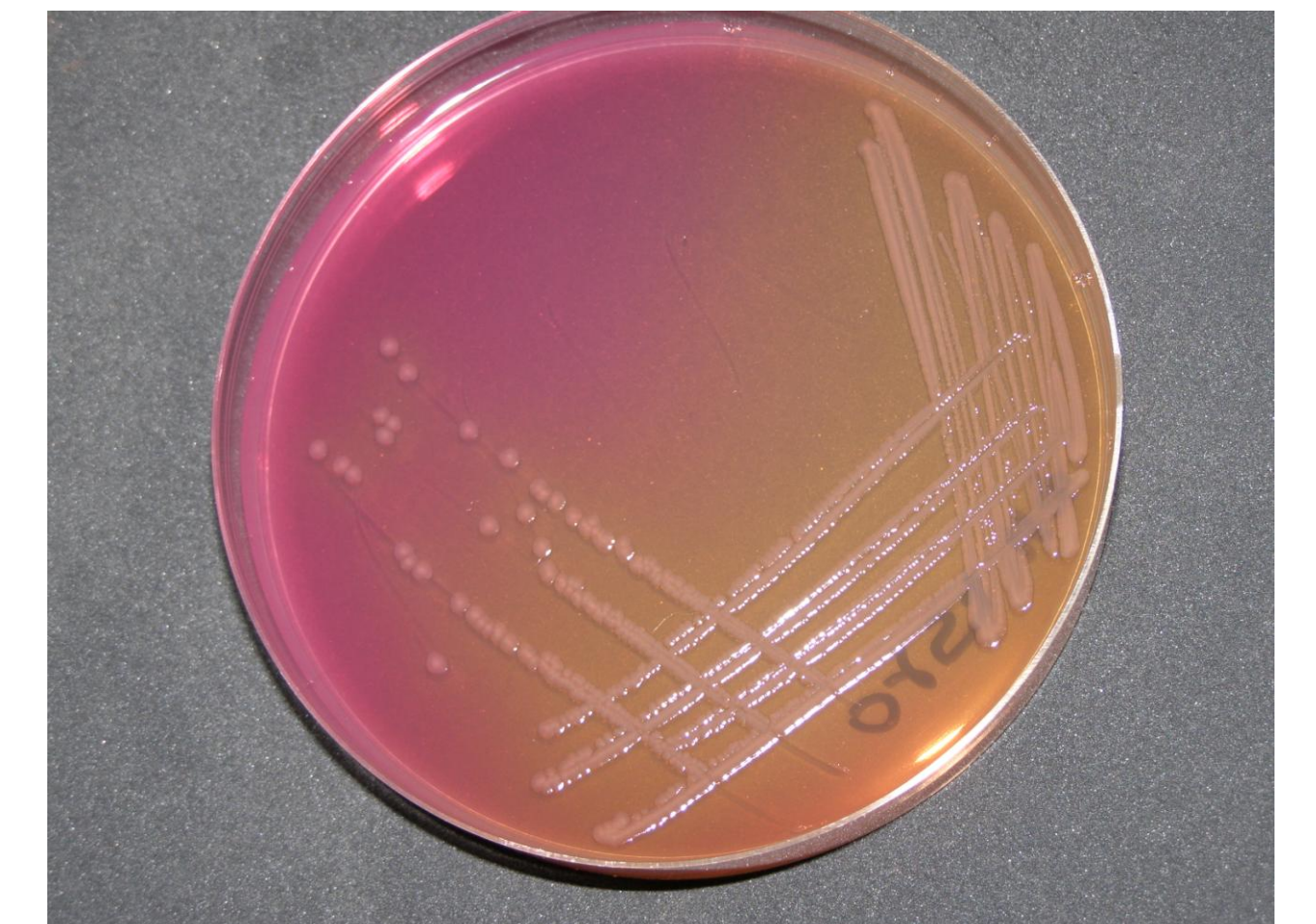
(2073/2005/EK)

Az *E. coli* O157:H7 végtermék ellenőrzése nem csökkenti a kockázatot. A fekális szennyezettséget csökkentő eljárások egyben VTEC kockázatot is csökkentik.

*E. coli* O157:H7 előfordulási lehetősége: marhahúsok, nyers tej és belőle készült termékek, friss termények, nem hőkezelt gyümölcs és zöldséglevék, csíráztatott magvak

## E.coli O157:H7 szabványos módszerrel történő kimutatása

MSZ EN ISO16654:2001



## VIDAS UP E.coli O157:H7

A VIDAS UP *E. coli* O157:H7 a fág rekombináns fehérje technológiát a VIDAS technológiával ötvözi, amely eredményeként egy könnyen kezelhető gyors módszer áll a modern mikrobiológiai laboratóriumok rendelkezésére

## A módszer előnyei:

A rekombináns fág protein használatának köszönhetően érzékeny

A specifitásnak köszönhetően a pozitív eredmény alapján megbízható döntés hozható Optimalizált protokoll ( reagens és laborköltség csökkenés)

Nagyon alacsony szennyezettségi szint detektálható (25g-375g)

Gyors (hét órán belül kaphatunk eredményt)

## A vizsgálat lépései

VIDAS® UP *E. coli* O157 kimutatás

Előmelegített 41,5°C-os Pufferolt peptonvízben (saláta esetében vankomicin hozzáadásával, marhahús esetén anélkül) történő dúsítás 41,5°C-on 6-24 óráig (marhahús-saláta)

A dúsítóból 1-2 ml-t átpipetázunk pl. Eppendorf csőbe, a lezárt csövet 95-100°C-on 5 percig forraljuk

A lehűtött és felkevert előkészített mintából 0,5 ml-t pipetázunk a csík minta-küvetájába, behelyezzük a csíkot a készülékbe

A fel nem forralt dúsító oldatot 2-8°C-on 48 óráig eltarthatjuk

## A módszerek érzékenysége

A dúsításra kerülő mintában lévő 1-5 sejt a megadott termék jellegétől függő dúsítás után kimutatható, mivel a dúsítás végére eléri a sejtsűrűség a 10<sup>5</sup>/ml értéket, ami a VIDAS kimutatási határa ennél a tesztnél.

## Összehasonlító értékelés

A szabványos tenyésztéses, a VIDAS UP és a real time PCR módszerrel kapott eredmények között nem volt különbség a vizsgált mátrixra vonatkozóan. A termék jellegének megfelelő protokoll esetén mindkét módszer kimutatási határa nagy biztonsággal elérhető (VIDAS UP esetén a 10<sup>5</sup>/ml, PCR esetén a 10<sup>2</sup>/ml dúsító).

## Real time PCR

### Elődúsítás:

25 g mintát 225 ml TSB tápoldatban 18-24 óra 42 °C-on

### DNS izolálás

1 ml centrifugáljuk 14000 rpm 3 percig. eltávolítjuk a felülúszót.

100 µl PrepMan Ultra Sample Preparation reagens Homogenizálás Vortex-el 10-30 sec.

4. Hőkezelés: 100 °C-on 10 perci Keverés Vortex-el.

Centrifugálás 14000 rpm 3 percig.

A felülúszóból 10 µl DNS extraktumot kipipetázunk egy tiszta eppendorf csőbe , majd hozzáadunk 90 µl steril (RN-áz, DN-áz mentes) vizet.

**Sokszorosítás és detektálás**  
real time PCR

