

Metódy na rýchly dôkaz salmonel v potravinách

TOMÁŠ KUČHTA - DAGMAR VRÁBLOVÁ

SÚHRN. V poslednom čase je k dispozícii viacero nových metód na rýchly dôkaz salmonel v potravinách. K najperspektívnejším patria imunochemické metódy, konduktometrické metódy, metódy na princípe polymerázovej reťazovej reakcie a metódy využívajúce imunomagnetickú separáciu. V článku sa podáva stručný opis týchto metód, ich parametre a možnosti použitia pri mikrobiologickom hodnotení potravín.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: *Salmonella*, ELISA, konduktometria, polymerázová reťazová reakcia, imunomagnetická separácia

Salmonelózy patria k rozšíreným gastrointestinálnym ochoreniam spôsobeným konzumáciou potravín kontaminovaných baktériami *Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium* alebo inými druhmi resp. sérotypmi salmonel. Salmonely kontaminujú najmä potraviny živočíšneho pôvodu, ako sú mäso, vajcia a výrobky z nich [1,2]. Jednou z možností boja proti salmonelózam je skorý záchyt potravín kontaminovaných salmonelami. Na tento účel sú potrebné rýchle analytické metódy, ktoré však musia mať tiež vysoké analytické parametre čo do citlivosti a selektivity. Spomedzi v súčasnosti dostupných rýchlych metód na dôkaz salmonel v potravinách patria k najvhodnejším imunochemické metódy, konduktometrické metódy, metódy na princípe polymerázovej reťazovej reakcie a metódy využívajúce imunomagnetickú separáciu. V nasledujúcom texte sa podáva stručný prehľad týchto metód.

RNDr. Tomáš KUČHTA, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, 820 06 Bratislava.

Ing. Dagmar VRÁBLOVÁ, Slovenská poľnohospodárska a potravinárska inšpekcia, Miletíčova 23, 815 49 Bratislava.

Imunochemické metódy

Imunochemické metódy na dôkaz baktérií sú založené na interakcii špecifických protilátok, monoklonálnych, polyklonálnych alebo ich zmesí, s antigénmi prítomnými na povrchu baktérií alebo na flagelách. Selektivitu dôkazu určuje predovšetkým voľba protilátok, ktoré musia svojou selektivitou pokrývať celý rod *Salmonella* a čo najmenej presahovať do príbuzných rodov enterobaktérií. Dôležité je tiež usporiadanie metódy, ktoré ovplyvňuje aj citlivosť dôkazu. K najdokonalejšej verzii imunochemických metód patria metódy ELISA. Tieto väčšinou využívajú 96-jamkové mikrotitračné doštičky, pokryté protilátkou proti salmonelám. Naviazanie salmonel do príslušnej jamky sa deteguje analogickou protilátkou, ktorá je označená enzýmom. Tento v záverečnom kroku dôkazu reaguje s chromogénnym substrátom a farebná zmena sa hodnotí vizuálne alebo spektrofotometricky. Medzi jednotlivé kroky metódy sa zaraďuje optimalizované oplachovanie, čo oproti iným imunochemickým metódam umožňuje minimalizáciu falošne pozitívnych výsledkov, zapríčinených prítomnosťou baktérií, ktoré sa nešpecificky viažu na použité protilátky [3,4].

V súčasnosti sú k dispozícii súpravy ELISA na dôkaz salmonel od viacerých výrobcov. Ich detekčný limit je 10^5 - 10^6 KTČ.ml⁻¹, z čoho vyplýva pre analýzu potravín potreba spravidla 2-dňovej prípravy vzorky kultivačným rozmnožením, ktorá umožňuje dôkaz 10^0 KTČ / 25 g. Samotná ELISA trvá 2 hodiny, v prípade použitia automatického analyzátora 1 h. Určitým problémom dostupných súprav je falošná pozitivita, ktorá sa prejavuje v prítomnosti niektorých kmeňov z rodov *Citrobacter* a *Enterobacter*. Falošná pozitivita má zjavne principiálny charakter, vyplýva z veľkej antigénnej podobnosti medzi týmito baktériami [4-6].

Výhodou metód ELISA je rýchlosť, pomerne vysoká citlivosť i selektivita. Určité principiálne riziko falošnej positivity však existuje a limitujúcim faktorom praktického využitia týchto metód je do značnej miery tiež cena, dostupnosť a trvanlivosť súprav, ako aj požiadavky na nástroje a prístroje (viackanálové mikropipety, spektrofotometer na mikrotitračné doštičky).

Konduktometrické metódy

Konduktometrické metódy na dôkaz salmonel sú založené na schopnosti salmonel metabolizovať špecifický substrát, najčastejšie trimetylamin-*N*-oxid, čím stúpa elektrická vodivosť kultivačného média. Vzorka

potraviny sa najprv inkubuje v modifikovanej tlmivej peptónovej vode, čím sa dosiahne resuscitácia salmonel a súčasne adaptácia ich enzýmového aparátu. Potom nasleduje subkultivácia v dvoch selektívnych médiách obsahujúcich trimetylamín-*N*-oxid, pričom sa pomocou automatického konduktometrického prístroja počas 30 h kontinuálne meria vodivosť médií. Prítomnosť salmonel indikuje charakteristický nárast vodivosti. Výsledok analýzy potraviny je možné získať touto metódou do 48 h, pričom sa dá súčasne analyzovať až niekoľko desiatok vzoriek [7,8].

Určitým problémom metódy je zabezpečenie dostatočnej selektivity, nakoľko niektoré kmene *Escherichia coli*, *Citrobacter* spp. a *Hafnia* spp. a tiež niektoré iné poskytujú falošne pozitívne výsledky. Úpravou zloženia pôd je možné selektivitu metódy zvýšiť, nie však na 100 % [9,10]. Z toho vyplýva, že výsledky konduktometrického dôkazu salmonel v potravinách sa považujú za predbežné a je potrebné ich potvrdiť.

Výhodou konduktometrických metód je rýchlosť v prípade negatívneho výsledku. Nevýhodami je riziko falošnej pozitivity vedúce k potrebe potvrdenia pozitívneho výsledku, a tiež cena konduktometrického zariadenia.

Polymerázová reťazová reakcia

Metódy na princípe polymerázovej reťazovej reakcie (PCR) detegujú salmonely na základe enzýmovej amplifikácie charakteristických sekvencií ich genómovej DNA, najčastejšie častí génov súvisiacich s patogenitou alebo kódujúcich štruktúrne proteíny. Pripraví sa reakčná zmes, ktorá obsahuje termostabilnú DNA-polymerázu, jednotlivé nukleotidy, špecifické oligonukleotidové primery a DNA, izolovanú zo vzorky. Reakčná zmes sa inkubuje v termocykléri, naprogramovanom na cyklické striedanie teplôt, optimálnych pre jednotlivé deje. Každý z 25-40 cyklov sa skladá z týchto dejov:

1. denaturácia DNA, t. j. rozpletenie dvojvláknovej DNA na jednovláknovú (pri $> 90^{\circ}\text{C}$),
2. annealing t. j. priľnutie primerov (pri $45 - 70^{\circ}\text{C}$, podľa štruktúry použitých primerov),
3. dosyntetizovanie druhého vlákna DNA (pri 72°C).

V prípade, že sa vo vzorke nachádza DNA s danými sekvenciami, amplifikujú sa charakteristické fragmenty DNA, ktoré sa následne elektroforeticky analyzujú. Selektivitu PCR určujú použité primery, citlivosť ovplyvňuje predovšetkým metóda izolácie DNA [3,11,12].

Komponenty PCR na dôkaz salmonel, prípadne aj kompletne súpravy dodáva v súčasnosti viacero výrobcov. Detekčný limit PCR je v opísanom usporiadaní 10^4 - 10^5 KTČ.ml⁻¹, z čoho vyplýva potreba 1- až 2-dňovej prípravy vzorky kultivačným rozmnožením, ktorá umožňuje dôkaz 10^0 KTČ / 25 g [13,14]. Vykonanie PCR aj s elektroforézou trvá 2-6 hodín. Keďže PCR deteguje jednorozmerné sekvencie DNA, je vysoko selektívna a pri použití vhodných primerov identifikuje salmonely so stopercentnou správnosťou, pričom správne odlišuje *Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. a iné nepatogénne baktérie [15].

Výhodami PCR je rýchlosť, vysoká citlivosť a selektivita. Nevýhodami sú pomerne vysoká cena zariadení a reagentov.

Imunomagnetická separácia

Imunomagnetická separácia je metóda založená na použití paramagnetických gulôčok pokrytých protilátkou. Tieto gulôčky sa inkubujú s 1 ml zmesnej bakteriálnej kultúry. Priložením magnetu k skúmavke sa uchytia na jej stenu a zvyšný materiál sa odstráni. Po odložení magnetu sa gulôčky rozsuspensujú v oplachovacom roztoku, znovu uchytia pomocou magnetu a zvyšný materiál sa odstráni. Oplachovací postup sa môže niekoľkokrát zopakovať, pričom so zvyšovaním počtu oplachov sa zvyšuje selektivita, ale znižuje citlivosť metódy. Imunomagnetická separácia sa pri dôkaze salmonel v potravinách aplikuje na predbežne rozmnožené vzorky v tlmivej peptónovej vode. Gulôčky s naviazanými baktériami sa použijú na očkovanie kvapalnej selektívnej pôdy alebo priamo na vyočkovanie na selektívne agarové pôdy. Tým je možné podstatné skrátenie alebo úplné nahradenie selektívnej kultivácie v rámci štandardnej metódy [16,17].

Imunomagnetická separácia umožňuje 10- až 20-násobné obohatenie zmesných kultúr v prospech salmonel. Jej vykonanie trvá necelú hodinu a umožňuje skrátenie dôkazu salmonel v potravinách o 1 až 2 dni. Selektivita imunomagnetickej separácie mierne presahuje rod *Salmonella*, čo však kompenzuje na ňu nadväzujúca selektívna kultivácia [16-18].

Výhodou imunomagnetickej separácie je rýchlosť a to, že len dopĺňa už zavedenú štandardnú metodiku dôkazu salmonel v potravinách. Nevýhodou sú určité problémy s dostupnosťou a tiež pomerne krátka doba použiteľnosti imunomagnetických gulôčok.

Aplikovateľnosť rýchlych metód v praxi

Motívom použitia rýchlych metód na dôkaz salmonel v potravinách je úspora času. Požiadavkou praxe však je, aby táto úspora nebola na úkor analytických parametrov a aby získané výsledky boli porovnateľné so štandardnou kultivačnou metódou. Aktuálnou úlohou je preto validácia rýchlych metód, ktorá sa v Európskej únii začína rozbiehať [19].

Z vlastností a parametrov jednotlivých opísaných metód vyplýva ich vhodnosť pre niektoré aplikácie. Napríklad, konduktometrické metódy sú vhodné na analýzu súborov, v ktorých je veľká prevaha negatívnych vzoriek. V prípade pozitívneho výsledku sa časová náročnosť zvyšuje, pretože treba pokračovať štandardnými postupmi (vyočkovanie na selektívne agarové pôdy, potvrdenie). Pre negatívne vzorky, ktoré sú vo väčšine, je však časová úspora výrazná. V prípade, že potrebujeme skrátiť predovšetkým dobu analýzy pre pozitívne vzorky, prichádzajú do úvahy metódy imunochemické alebo PCR. Významnou nevýhodou imunochemických metód je však riziko falošnej pozitivity. Toto riziko odpadá v prípade PCR, avšak širšia aplikácia tejto metódy pri analýze potravín je iba v začiatkoch a dostatok skúseností ešte nie je k dispozícii. Využitie imunomagnetickej separácie závisí na ustálení dostupnosti a ceny imunomagnetických gulôčok.

Literatúra

1. ROSICKÝ, B. - SIXL, W.: Salmonelózy. Scientia Medica, Praha 1994. 208 s.
2. LACEY, R. W.: Food-borne bacterial infections. Parasitology, 107, 1993, s. S75-S93.
3. GERHARDT, P. - MURRAY, R. G. E. - WOOD, W. A. - KRIEG, N. R.: Methods for general and molecular bacteriology. American Society for Microbiology, Washington 1994. 791 s.
4. MAJERÍKOVÁ, I. - KUČTA, T.: Hodnotenie imunochemickej metódy detekcie salmonel s použitím komerčne dostupných systémov. Bulletin potravinárskeho výskumu, 34, 1995, s. 141-146.
5. FLINT, S. H. - HARTLEY, N. J.: Evaluation of the TECRA immunocapture ELISA for the detection of *Salmonella typhimurium* in foods. Letters in Applied Microbiology, 17, 1993, s. 4-6.
6. BLACKBURN, C. W. - CURTIS, L. M. - HUMPHESON, L. - PETITT, S. B.: Evaluation of the Vitek immunodiagnostic assay system (VIDAS) for the detection of *Salmonella* in foods. Letters in Applied Microbiology, 19, 1994, s. 32-36.
7. EASTER, M. C. - GIBSON, D. M.: Rapid and automated detection of salmonella by electrical measurements. Journal of Hygiene, 94, 1985, s. 245-262.
8. SMITH, P. J. - BOARDMAN, A. - SHUTT, P. C.: Detection of salmonellas in animal feeds by electrical conductance. Journal of Applied Bacteriology, 67, 1989, s. 575-588.
9. OGDEN, I. D.: A conductance medium to distinguish between *Salmonella* and *Citrobacter* spp. International Journal of Food Microbiology, 7, 1988, s. 287-297.

10. BLIVET, D. - SALVAT, G. - HUMBERT, F. - COLIN, P.: Development of a new culture medium for the rapid detection of *Salmonella* by indirect conductance measurements. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 1998, s. 399-403.
11. CANDRIAN, U.: Polymerase chain reaction in food microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 23, 1995, s. 89-103.
12. KUČTA, T. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - DRAHOVSKÁ, H.: Dôkaz salmonel v potravinách metódami založenými na polymerázovej reťazovej reakcii. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 37, 1998, v tlači.
13. ZIGOVÁ, M. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - RIJPENS, N. - KUČTA, T.: Detekcia salmonel polymerázovou reťazovou reakciou. *Bulletin potravinárskeho výskumu*, 34, 1995, s. 135-139.
14. TRKOV, M. - MAJERÍKOVÁ, I. - JERŠEK, B. - ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - RIJPENS, N. - KUČTA, T.: Detection of *Salmonella* in food in 30 hours using enrichment and polymerase chain reaction. *Food Microbiology*, v tlači.
15. ŠTEFANOVIČOVÁ, A. - REHÁKOVÁ, H. - ŠKARKOVÁ, A. - RIJPENS, N. - KUČTA, T.: Confirmation of presumptive *Salmonella* colonies by the polymerase chain reaction. *Journal of Food Protection*, v tlači.
16. CUDJOE, K. S. - KRONA, R. - OLSEN, E.: IMS: a new selective enrichment technique for detection of *Salmonella* in foods. *International Journal of Food Microbiology*, 23, 1994, s. 159-165.
17. CUDJOE, K. S. - KRONA, R.: Detection of *Salmonella* from raw food samples using Dynabeads® and a conventional reference method. *International Journal of Food Microbiology*, 37, 1997, s. 55-62.
18. DYNAL, Oslo: Attention food microbiologists. 1996. 4 s.
19. NEDERLANDSE NORMALISATIE-INSTITUUT, Delft: MicroVal, a european approach to the certification of new microbiological methods. 1998. 10 s.

Do redakcie došlo 25.8.1998.

Methods for rapid detection of salmonella in food

KUČTA, T. - VRÁBLOVÁ, D.: *Bull. potrav. Výsk.*, 37, 1998, p. 83-88.

SUMMARY. Several new methods for a rapid detection of salmonella in food became available recently. The most promising are immunochemical methods, conductometric methods, methods based on the polymerase chain reaction and methods employing immunomagnetic separation. A brief description of these methods, their parameters and the potential of their utilization for the microbiological evaluation of food are presented.

KEYWORDS: *Salmonella*, ELISA, conductometry, polymerase chain reaction, immunomagnetic separation