

Hodnotenie imunochemickej metódy detekcie salmonel s použitím komerčne dostupných systémov

IVANA MAJERÍKOVÁ - TOMÁŠ KUČHTA

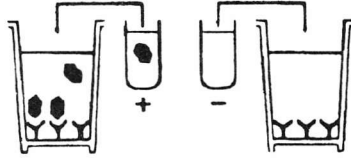
SÚHRN. Testovali sme systémy na imunochemickú detekciu salmonel VIDAS *Salmonella* (Bio-Mérieux), Locate *Salmonella* Screening Test (Rhône-Poulenc) a *Salmonella*-Tek (Organon Teknika) s použitím definovaných kultúr salmonel (*Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. adelaide*) a príbuzných baktérií (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. a i.). Systémy umožňovali rýchlu detekciu všetkých použitých kmeňov salmonel v priebehu 1 - 2 h, pričom systém VIDAS vyžadoval minimum manuálnej práce. Detekčný limit všetkých metód bol 10^6 KTJ/ml. Každý zo systémov poskytoval falošne pozitívne výsledky s niektorými príbuznými baktériami.

Súčasná štandardná metóda detekcie salmonel [1] svojou časovou náročnosťou (4 - 7 dní) nepostačuje súčasným nárokom na kontrolu mikrobiologickej nezávadnosti potravín. Nielenže často neumožňuje analyzovať rizikové potravinárske výrobky pred ich konzumáciou, ale spravidla neumožňuje ani kontrolu kritických potravinárskych surovín alebo polotovarov pred ich vstupom do výroby. Preto je veľký záujem o alternatívne rýchlejšie metódy detekcie salmonel v potravinách. V posledných rokoch sa objavilo viacero alternatívnych metód, pričom väčšina pracuje na princípe imunochemickej detekcie bielkovín, charakteristických pre salmonely. Vzhľadom na dostupnosť takýchto metód na našom trhu v podobe komerčných systémov a vzhľadom na nedostatok objektívnych informácií o nich, zamerali sme sa na zistenie základných charakteristík troch z nich.

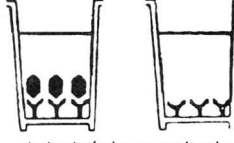
Všetky tri testované systémy pracujú na princípe ELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay, obr. 1), pričom používajú odlišné protilátky resp. ich zmesi. Princíp ELISA je v súčasnosti považovaný za najdokonalejší variant imunochemickej analýzy a je v širokom rozsahu používaný v medicínskej oblasti. Pre analýzu potravín vyžadujú systémy 2 - 3 stupňovú prípravu vzorky,



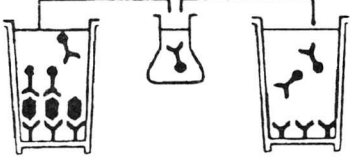
Protilátky ukotvené na povrch nádoby



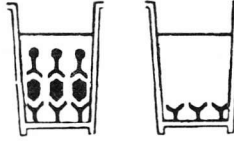
Prídavok vzoriek



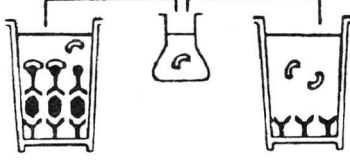
Inkubácia a oplach



Prídavok protilátok označených enzýmom



Inkubácia a oplach



Prídavok substrátu



Prítomnosť enzýmovej reakcie indikuje
prítomnosť antigénu vo vzorke

Obr. 1. Schéma princípu ELISA.
Fig. 1. The principle of ELISA.

pozostávajúcu z neselektívnej a selektívnej kultivácie, v trvaní 48 h. Postup ELISA začína reakciou analyzovanej vzorky so špecifickými protilátkami (polyklonálnymi, monoklonálnymi alebo ich zmesou), ktoré sú ukotvené na povrchu plastikovej nádoby. Ak sú vo vzorke prítomné hľadané látky, v našom prípade bielkoviny charakteristické pre salmonely, tieto sa naviažu na protilátky a ich prostredníctvom sa ukotvia na povrch nádoby. Nasleduje dôkladné oplachovanie, ktoré odstráni nešpecificky naviazané látky. Ďalším krokom je pridanie roztoku protilátok, ktoré sú označené enzýmom. Ak sa vo vzorke nachádzali salmonely, a teda nachádzajú sa teraz adsorbované na povrchu nádoby, výsledkom tohoto kroku bude ukotvenie enzýmu ich prostredníctvom na povrch nádoby. Záverečným krokom je, po dôkladnom oplachovaní kvôli odstráneniu nešpecificky naviazaných látok, detekcia prítomnosti enzýmu inkubáciou s chromogénnym substrátom.

K hlavným výhodám princípu ELISA patrí rýchlosť, vysoká citlivosť, selektivita a možnosť mechanizácie, príp. automatizácie. K nevýhodám patrí najmä cena, a tiež potenciálna možnosť nedostatočnej selektivity.

Materiál a metódy

Použili sme kmene salmonel a príbuzných baktérií zo zbierok mikroorganizmov, z Rijkszuivelstation, Melle, Belgicko a izoláty z potravín získané v roku 1994 zo Štátneho veterinárneho ústavu v Bratislave, Štátneho zdravotného ústavu v Bratislave a zo Slovenskej poľnohospodárskej a potravinárskej inšpekcie v Bratislave (tab. 1). Baktérie sme dlhodobu uchovávali v lyofilizovanej forme pri - 20 °C a krátkodobu vo forme rozterov na Živnom agare č. 2, uložené pri 4 °C. Kultivovali sme ich v Živnom bujóne č. 2 a na Živnom agare č. 2 (Imuna, Šarišské Michaľany) pri teplote 28 °C (kmene z rodu *Enterobacter*) a pri 37 °C (ostatné kmene). Vzorky kultúr baktérií sme riedili v 0,85 % roztoku NaCl. Celkové počty baktérií na analýzu sme stanovili štandardnou metódou [2].

Definované kultúry baktérií sme analyzovali imunochemickými systémami VIDAS Salmonella (Bio-Mérieux, Marcy-l'Étoile, Francúzsko), Locate Salmonella Screening Test (Rhône-Poulenc, Glasgow, Veľká Británia) a Salmonella-Tek (Organon Teknika, Turnhout, Belgicko). Analýzy sme robili podľa návodov na použitie priložených k jednotlivým systémom. Analýzu systémom VIDAS sme vykonali na Oddelení mikrobiológie, Železničná nemocnica s poliklinikou, Bratislava.

Výsledky a diskusia

Analýza kultúr baktérií bola rýchla: 1 h pre systém VIDAS, 2 h pre systém Locate a 2 h pre systém Salmonella-Tek. Kým systémy Locate a Salmonella-Tek

Tabuľka 1. Použité baktérie.

Table 1. The bacteria used.

KMENE ¹	PÔVOD ²
<i>Salmonella enteritidis</i> CCM 4420	Zbierka ³
<i>Salmonella enteritidis</i> , 9 kmeňov ¹	ŠVÚ, ŠZÚ ⁴
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 4419	Zbierka
<i>Salmonella typhimurium</i> CCM 5156	Zbierka
<i>Salmonella adelaide</i>	ŠVÚ
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 4475	Zbierka
<i>Citrobacter freundii</i> LMG 3246	Zbierka
<i>Citrobacter diversus</i> LMG 5519	Zbierka
<i>Enterobacter cloacae</i> LMG 2783	Zbierka
<i>Enterobacter cloacae</i> E1	Melle ⁵
<i>Enterobacter omnigenus</i> LMG 2784	Zbierka
<i>Enterobacter intermedius</i> LMG 2785	Zbierka
<i>Hafnia</i> sp.	SPPI ⁶

1 - Strains, 2 - Origin, 3 - Culture collection (CCM, Czech Collection of Microorganisms, Brno, Czech Republic; LMG, Laboratory for Microbiology, University of Ghent, Ghent, Belgium), 4 - State Veterinary Institute, Bratislava and State Medical Institute, Bratislava, 5 - Rijkszuivelstation, Melle, Belgicko, 6 - Slovak Agricultural and Food Inspection.

vyžadovali väčšie množstvo manuálnej práce, systém VIDAS, ktorý využíva automatizovaný analyzátor, redukoval manuálnu prácu na minimum. Z hľadiska pracnosti a rýchlosti sa systém VIDAS ukázal ako najvýhodnejší. Do úvahy však treba vziať aj cenu zariadenia, lebo analyzátor MiniVIDAS, umožňujúci súčasnú analýzu 12 vzoriek v dvoch blokoch, stojí pribl. 900 000 Sk. Používanie systému VIDAS je teda výhodné iba pri sériovej analýze väčšieho počtu vzoriek.

Pri analýze reprezentatívnych kultúr salmonel rôznej hustoty (10^4 až 10^8 KTJ/ml) sme zistili, že detekčný limit všetkých troch systémov je 10^6 KTJ/ml. Niektoré kmene salmonel bolo možné detegovať už pri 10^5 KTJ/ml.

Aby sme zistili záchytnosť a selektivitu jednotlivých systémov, analyzovali sme definované kultúry salmonel a príbuzných baktérií rodov *Citrobacter* a *Enterobacter*. Zistili sme, že všetky systémy správne detegovali všetky testované salmonely. Na druhej strane však každý zo systémov poskytoval falošne pozitívne výsledky s niektorými príbuznými baktériami (tab. 2). Jednotlivé falošne pozitívne výsledky sa potvrdili aj pri viacnásobnom opakovaní analýz.

Všetky testované systémy sa ukázali ako dobre prepracované a rýchle. Zistené detekčné limity sú v súlade s údajmi výrobcov. Nedostatočná selektivita, ktorú sme zistili, je známym nedostatkom imunochemických systémov [3,4]. V prípade falošne pozitívne detegovaných baktérií *Citrobacter* spp. a *Enterobacter* spp. možno predpokladať, že tieto obsahujú na svojich povrchoch príp. flagelách bielkoviny, ktoré sú rovnaké alebo veľmi podobné bielkovinám salmonel. Imunochemická analýza takýchto bielkovín potom neumožňuje rozlíšenie medzi kmeňmi uvedených príbuzných bakteriálnych rodov.

Vzhľadom na zistené parametre konštatujeme, že testované imunochemické systémy na detekciu salmonel napriek svojej rýchlosti, citlivosti a dokonalej záchytnosti nemajú dostatočnú selektivitu. Pritom prítomnosť baktérií rodov *Citrobacter* a *Enterobacter* je v potravinách bežná a nie je možné vylúčiť ich prítomnosť ani vo vzorkách po selektívnej kultivácii ([5] a Majeríková, I., nepublikované výsledky). Z tohoto dôvodu testované imunochemické systémy pravdepodobne nemôžu spoľahlivo poskytovať správne výsledky detekcie salmonel v potravinách.

Tabuľka 2. Výsledky detekcie baktérií.
Table 2. Results of the detection of bacteria.

KMENE ¹	Výsledok detekcie ²					
	VIDAS		Locate		Salmonella-Tek	
	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁶
	[KTJ/ml] ³					
<i>Salmonella enteritidis</i> (9/4/4) ⁴	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella typhimurium</i> (2/2/2)	+	+	+	+	+	+
<i>Salmonella adelaide</i> (1/1/1)	+	+	+	+	+	+
<i>Citrobacter freundii</i> CCM 4475	+	-	+	+	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> LMG 3246	+	+	+	+ ⁵	+	-
<i>Citrobacter diversus</i> LMG 5519	N ⁶		N		-	- ⁷
<i>Enterobacter cloacae</i> E1	-	-	-	-	N	
<i>Enterobacter cloacae</i> LMG 2783	-	-	N		N	
<i>Enterobacter omnigenus</i> LMG 2784	-	-	N		-	- ⁷
<i>Enterobacter intermedius</i> LMG 2785	N		N		+	-
<i>Hafnia</i> sp.	-	-	N		-	-

4 - Počet testovaných kmeňov, 5 - Pozitívna reakcia aj pri 10⁵ a 10⁴ KTJ/ml, 6 - Netestované, 7 - Pozitívna reakcia pri 10⁸ KTJ/ml.

1 - Strains, 2 - Result of the detection: +, positive; -, negative, 3 - CFU/ml, 4 - Number of strains tested, 5 - Positive reaction also at 10⁵ and 10⁴ CFU/ml, 6 - Not tested, 7 - Positive reaction at 10⁸ CFU/ml.

Literatúra

1. STN 56 0088 Dôkaz baktérií rodu *Salmonella*.
2. STN 56 0083 Stanovenie celkového počtu mezofilných aeróbných a fakultatívne anaeróbných mikroorganizmov platňovou metódou.
3. D'AOUST, J.Y. - SEWELL, A.M.: J. Food Sci., 51, 1986, s.484.
4. BLACKBURN, C.W. - CURTIS, L.M. - HUMPHESON, L. - PETITT, S.B.: Lett. Appl. Microbiol., 19, 1994, s.32.
5. BECKERS, H.J. - HEIDE, J.V.D. - FENIGSEN-NARUCKA, U. - PETERS, R.: J. Appl. Bacteriol., 62, 1987, s.97.

Do redakcie došlo 6.10.1995.

Evaluation of the immunochemical detection of salmonella using commercial systems

IVANA MAJERÍKOVÁ - TOMÁŠ KUČTA

Systems for the immunochemical detection of salmonella, namely, VIDAS Salmonella (Bio-Mérieux), Locate Salmonella Screening Test (Rhône-Poulenc) and Salmonella-Tek (Organon Teknika) were tested with defined cultures of salmonella (*Salmonella enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. adelaide*) and related non-salmonella strains (*Citrobacter* spp., *Enterobacter* spp. and others). Rapid (1 - 2 h) detection of all salmonella strains involved was achieved. Minimal labour was required to use the VIDAS system. The detection limit of all the three methods was 10^6 CFU/ml. Each of the systems produced false positive results with some related non-salmonella strains.