

UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI BAKTERIJ *Salmonella* spp. – PRIMERJAVA POSTOPKOV

Majda Biasizzo*, Urška Henigman, Urška Jamnikar Ciglencečki, Andrej Kirbiš, Stanka Vadrjal

Inštitut za varno hrano, krmo in okolje, Veterinarska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

majda.biasizzo@vf.uni-lj.si

Bakterije vrste *Salmonella* spp. so lahko prisotne v živilih ter pri ljudeh predstavljajo vzrok obolenj, predvsem v obliki enterokolitisov. V živilih jih ugotavljamo z različnimi postopki in z uporabo različnih gojišč. Referenčna metoda za ugotavljanje salmonel je določena v Uredbi (ES) št. 2073/2005 ISO standard 6579. V naši raziskavi smo rezultate preiskav ob uporabi različnih postopkov in selektivnih gojišč, primerjali z rezultati pridobljenimi z referenčno metodo. Vzorce smo testirali z metodo PCR v realnem času, nasajanjem po obogatitvi na pol-tekoče gojišče Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar - MSRV kot je opisano v ISO 6579, Anex D, in po uporabi selektivnih plošč: IRIS *Salmonella*® Agar (Biokar), *Salmonella* Chromogenic Agar (Conda) in RAPID *Salmonella* Agar (BIO-RAD) nasajenih iz obogatitvenega bujona RVS - Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (Merk). Skupno smo testirali 58 vzorcev: 40 vzorcev mesa in 18 vzorcev jajc. Ugotovljena občutljivost plošč IRIS *Salmonella*® Agar pri testiranih vzorcih je bila 100% (25/25), molekularna metoda PCR v realnem času pa 98% (30/31).

Ključne besede: *Salmonella* spp.; primerjava postopkov; selektivna gojišča; PCR v realnem času; živila

Uvod

Po podatkih epidemioloških služb so bakterije vrste *Salmonella* spp. za kampilobaktiri najpogostejši povzročitelji bakterijskih enterokolitisov. Vzrok salmoneloznih obolenj najpogosteje predstavljajo kontaminirana živila in prav zato se tovrstne zoonoze nemalokrat izražajo v obliki večjih izbruhov obolenj. Okužbe s salmonelami še vedno predstavljajo zdravstveni in ekonomski problem po vsem svetu, ne glede na stopnjo razvitosti posameznih držav. V preprečevanje salmoneloznih okužb, povezanih s kontaminiranimi živili so vključeni vsi vpleteni v t.i. verigi od "od vil do vilic". Najpomembnejši delež v tej problematiki kljub temu nosijo nosilci živilskih dejavnosti. Osnovna skrb le-teh je, da proizvedena živila ne vsebujejo mikroorganizmov ali njihovih toksinov oz. metabolitov, ki predstavljajo nesprejemljivo tveganje za zdravje ljudi (Uredba (ES) št. 178/2002; Uredba (ES) št. 2073/2005). S tem namenom v okviru notranjega nadzora izvajajo vzorčenje surovin in končnih proizvodov, uradne službe pa vršijo vsakoletni Program monitoringa zoonoz in njihovih povzročiteljev. Osnovni namen mikrobioloških preiskav, katerih cilj je ugotavljanje prisotnosti patogenih mikrobov v živilih je, da ugotovimo prisotnost mikroorganizmov tudi, ko se le-ti še v zelo nizki koncentraciji. Do konca roka trajanja nekega živila se namreč lahko razmnožijo do stopnje, ki predstavlja nevarnost za obolenje ljudi. Uredba (ES) št. 2073/2005 določa pri preiskavah na salmonele kot analitsko referenčno metodo ISO standard 6579. Ob uporabi Xylose lysine deoxycholate agar (XLD) je izbira drugega selektivnega trdnega gojišča prepuščena izvajalcem preiskave. V ponudbi posameznih proizvajalcev mikrobioloških gojišč je iz leta v leto širši nabor različnih

kromogenih gojišč, namenjenih izolaciji salmonel. Za ugotavljanje prisotnosti salmonel se lahko poleg klasičnih mikrobioloških poslužujemo tudi molekularnih metod.

Material in metode

V raziskavi smo pregledali 58 vzorcev: 40 vzorcev mesa, od tega 38 vzorcev perutninskega izvora (15 - meso, 16 -pripravki – začinjeno oz. marinirano meso, 4 - kože, 3 - organi), 2 vzorca mesa drugega izvora in 18 vzorcev jajc. Vzorci mesa so bili naravno kontaminirani, medtem ko so bili vzorci jajc pripravljeni za namen mednarodne medlaboratorijske kontrole. V vzorcih so bili prisotni različni serotipi salmonel: *S. Infantis*, *S. Enteritidis*, *S. Seftemborg*. Prisotnost salmonel smo ugotavljali v 25g.

Uporabili smo postopke:

1. ISO 6579:2002

Predobogatitev v puferni peptonski vodi (PV) (Biokar), inkubacija 16-20 ur pri 37 °C; Obogatitev - prenos vzorcev iz pred-obogatitve v selektivno obogatitveno tekoče gojišče Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (RVS); inkubacija 24 ur pri 42 °C in gojišče Muller Kaufman tetrationsat z novobiocinom (Biolife); inkubacija 24 ur pri 37 °C Nasajanje na selektivna trdna gojišča – XLD (Biolife) in gojišče po izbiri (npr. Rambach® Agar (Merck)); inkubacija 24 ur pri 37 °C Pregled plošč in potrditev tipičnih kolonij.

2. PCR v realnem času:

Izolacija nukleinske kisline s kitom High Pure PCR Template Preparation kit (Roche). PCR v realnem času z začetnimi oligonukleotidi SalF/SalR in sondo SalTM (Daum in sod., 2002) in kitom TaqMan Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific).

3. ISO 6579:2002, Anex D:

Iz pred-obogatitve v PV nanese 3 kapljice na poltrdno gojišče Modified Semisolid Rappaport-Vassiliadis (MSRV) ter plošče inkubiramo 24 in dodatno 24 ur pri 42 °C. V primeru opazne rasti gibljivih salmonel iz cone rasti (motno območje okrog kapljic) vzorce precepimo na XLD in npr. Rambach agar, inkubiramo 24 ur pri 37 °C, sledi pregled plošč in v primeru sumljivih kolonij potrditev.

4. Iz veje obogatitve preko RVS (ISO 6579) smo kot drugo (izbirno) gojišče poleg Rambach® agarja uporabili še:

- IRIS Salmonella® Agar (Biokar),
- Salmonella Chromogenic Agar (Conda)
- RAPID Salmonella Agar (BIO-RAD).

Vsa selektivna trdna gojišča smo inkubirali 24 ur pri 37 °C ter nato rast na ploščah ocenili.

5. Določanje stopnje kontaminacije vzorcev z metodo MPN: Vzorce (1g) smo inkubirali v 5 epruvetah z 9 mL PV. Po inkubaciji 16-20 ur pri 37 °C smo iz vsake epruvete vzorce precepili na RVS in inkubirali 24 ur pri 42 °C. Iz vsake epruvete smo vzorce precepili na plošče Rambach®, ter po inkubaciji ocenili rast. Vrednosti MPN smo ocenili iz MPN interpretacijskih tabel, ki ovrednotijo rezultat glede na kombinacijo pozitivnih/ uporabljenih testnih epruvet in mase testiranega vzorca.

Rezultati pridobljeni z referenčno metodo ISO 6579 oziroma ovrednoteni rezultati medlaboratorijske kontrole, so služili kot merilo (referenčni rezultati) za oceno dodatno testiranih postopkov. Glede na število testiranih pozitivnih in negativnih vzorcev za posamezen postopek smo izračunali občutljivost, specifičnost ter pozitivni in negativni odklon.

R Rambach® Agar

								TESTNE PLOŠČE						
vrsta vzorcev	št. vzorcev	ISO 6579				Rezult.	iz PV	iz PV/RVS			iz PV	MPN (MPN/g)		
		RVS		Miktn			MSRV	RAPID Salm.	CONDA	IRIS	qPCR			
		XLD	R	XLD	R									
Perut. meso	10	-	-	+++	+++	poz	+	+++	+++	+++	+	2,2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	+++	+++	+++	+	4,0		
		+	++	+++	++	poz	+	+++	+	+	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	+++	+++	+++	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+++	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	NT	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+++	+	2,2		
		+	+	+	+	poz	+	(48h) NT	NT	++	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+++	+	2,2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+++	+	2,2		
Mesni pripravki iz perut. mesa	4	+	+	-	+	poz	+	-	NT	NT	+	<2		
		+++	+++	++	+	poz	+	NT	NT	+++	+	<2		
		+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+++	+	<2		
		+++	+++	+	+	poz	+	NT	NT	+++	+	<2		
Koža perutnine	3	+++	++	+	+	poz	+	+++	+	NT	+	>38		
		+++	+++	+	+	poz	+	NT	NT	NT	-	<2		
		++	+	+	+	poz	+	NT	NT	NT	+	<2		
Organi perutnine	1	+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	NT	+	2,2		
Drugo	1	+++	+++	+++	+++	poz	+	NT	NT	+	+	<2		
Jajca	6	+++ 6	+++ 6	+++ 6	+++ 6	poz 6	+	6	+++ 6	NT	+++ 6	+	6	nizek nivo
	6	+++ 6	+++ 6	+++ 6	+++ 6	poz 6	+	6	+++ 6	NT	+++ 6	+	6	visok nivo
Σ	31	30	30	30	31	31	31	17/18	5/5	25/25	30/31			
Občutljivost (%)	100	98	98	98	100	100	100	94	100	100	98			
Negativni odklon (%)	0	2	2	2	0	0	0	6	0	0	2			

pozitivni odklon različnih postopkov

[illegible]

Rezultati

Primerjali smo rezultate 58 vzorcev, pridobljene z različnimi postopki testiranja, z rezultati pridobljenimi z metodo ISO 6579. Rezultati in ovrednotenje intenzivnosti rasti na ploščah ob uporabi selektivnih trdnih gojišč po inkubaciji, so prikazani v Tabeli 1 in 2. V tabeli sta razvidna tudi parametra – občutljivost, specifičnost posameznega postopka ter negativni in pozitivni odklon. Stopnja kontaminacije pozitivnih vzorcev mesa je bila večinoma (12/19) nizka (<2 MPN/g). Visoka stopnja kontaminacije (>38 MPN/g) je bila ugotovljena pri enem vzorcu piščančjih kož, medtem, ko so bili drugi vzorci kontaminirani z manj kot 10 MPN/g. Vzorci jajc so bili inokulirani s *S. Enteritidis* v koncentraciji 11-110 CFU/vzorec (nizek nivo) in >65 CFU/vzorec (visok nivo).

Razprava

Z metodo ISO 6579 smo prisotnost salmonel, ki predvideva dve veji obogatitve zaznali v 31 vzorcih. Ob obogatitvi preko RVS, je bila rast na posameznih ploščah boljša, vendar pri enem vzorcu v tej veji salmonela ni bila izolirana. To potrjuje upravičenost dvojne obogatitve z namenom izboljšanja občutljivosti metode. Občutljivost in specifičnost opisanih postopkov je bila dobra. Salmonela v enem primeru ni bila izolirana ob uporabi plošč RAPID *Salmonella* in pri enem vzorcu z molekularno metodo. Za potrditev vsaj 95% občutljivosti metode bi morali testirati vsaj 20 vzorcev. Tega števila za testni plošči Rapid *Salmonella* in Conda nismo dosegli, zato ocene ni mogoče podati.

Ob nasajanju že pripravljenih plošč IRIS *Salmonella*[®] (Biokar) iz obogatitve preko RVS, je bila ugotovljena občutljivost 100%. Tipične kolonije salmonel na tem gojišču so lepo vidne (vijolične barve na beli barvi gojišča) in zato gojišče ocenjujemo kot zelo prijazno za uporabo.

Metoda PCR v realnem času se je izkazala kot dobra metoda z občutljivostjo 98 % ter jo tudi zaradi krajšega časa, potrebnega za izvedbo postopka, ocenjujemo kot odlično presejalno metodo. V primeru pozitivnega rezultata je potrebno salmonele dodatno izolirati.

Reference

- Daum LT, Barnes WJ, McAvlin JC, in sod. Real-time PCR detection of *Salmonella* in suspect foods from a gastroenteritis outbreak in Kerr County, Texas. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 3050–52.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA J* 2015; 13 (1): 3991.
- Uredba Evropskega parlamenta in sveta (ES) št. 178/2002 z dne 28. januarja 2002 o določitvi splošnih načel in zahtevah živilske zakonodaje, ustanovitvi Evropske agencije za varnost hrane in postopkih, ki zadevajo varnost hrane. UL L 31, 2002.
- SIST EN ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.. Geneve: International Organization for Standardization, 2002:1-27.
- Uredba Komisije (ES) št. 2073/2005 z dne 15. novembra 2005 o mikrobioloških merilih za živila. UL L 338, 2005.

Detection of *Salmonella* spp. – comparison of the methods

Salmonella spp. is food contaminant that can cause human diseases, particularly enterocolitis. Different methods and media can be used for detection in food. ISO 6579 is a reference method prescribed in Regulation (EC) No. 2073/2005. Results obtained by different methods or media used have been compared to the results obtained by the reference method. We used real-time PCR method, plating of pre-enrichment to Semi-Solid Rappaport-Vassiliadis Agar - MSRV as described in ISO 6579 Anex D and plating after enrichment in Rappaport-Vassiliadis Selective Broth (RVS) to IRIS *Salmonella*® Agar (Biokar), *Salmonella* Chromogenic Agar (Conda) and Rapid'*Salmonella* agar (BIO-RAD). In total 58 samples have been tested: 40 meat samples and 18 samples of eggs. Sensitivity of 100% when IRIS *Salmonella*® Agar plates were used (25/25) and 98% by using real-time PCR (30/31) was determined.

Key words: *Salmonella* spp.; comparison of the methods; selective media; real-time PCR; food