

MOLEKULÁRIS DIAGNOSZTIKA AZ ÉLELMISZERIPARBAN

- *Listeria* spp. kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai egységcsomagok (kitek) összehasonlító vizsgálata -

KORCZ E.^{1*}, BIEBERNÉ FINTA Á.¹, HUCKER A.¹, NAGY J.¹, STEINERNÉ SMAJDA ZS.¹, ZRÍNYI E.², KERÉNYI Z.¹

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet (MTKI) Kft., 9200 Mosonmagyaróvár, Lucsony utca 24.

² Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, 9200 Mosonmagyaróvár, Vár tér 2.

*e-mail: ekorc@mtki.hu

BEVEZETÉS

Listeria spp. gyors kimutatására alkalmas ELISA vizsgálati módszer a megerősítésével (tenyésztéses mikrobiológiai módszerek, biokémia) együtt jellemzően akár 5–6 napba is telik, ezért felmerült az igény a mikroorganizmus jelenlétének gyorsabb, megbízható kimutatását jelentő real-time (rt-) PCR metodika iránt. A tenyésztésen alapuló *Listeria* spp. protokollokkal szemben azonban a klasszikus PCR módszerek az élő baktériumok mellett elhalt mikroorganizmusok jelenlétében is értékelhető jelet adnak. Propidium-monoazide (PMA) -kezelés paramétereinek optimalizálásával viszont különbséget lehet tenni élő és holt sejtekből származó örökítő anyag között. Kísérleteket végeztünk tehát *Listeria* spp. ELISA és rt-PCR egységcsomagok (kitek) összehasonlító vizsgálatára, valamint PMA-rt-PCR-kezelést alkalmaztunk életképes baktériumok szelektív kimutatása céljából.

VIZSGÁLATI ANYAG ÉS MÓDSZER

I. Kimutatási határ meghatározása

A választott ELISA kitek és rt-PCR kitek használatával kimutatható legalacsonyabb *Listeria* spp. szám (élőcsíraszámban kifejezett) értékének meghatározásához egysejttenyésztésből (üzemből izolált *Listeria* spp. törzs) készített decimális hígítási sor tagjait vizsgáltuk. Az alkalmazott vizsgálatok: élőcsíraszám-meghatározás, valamint ELISA kittel és rt-PCR kittel történő vizsgálat a vonatkozó validált gyártói protokollok alapján.

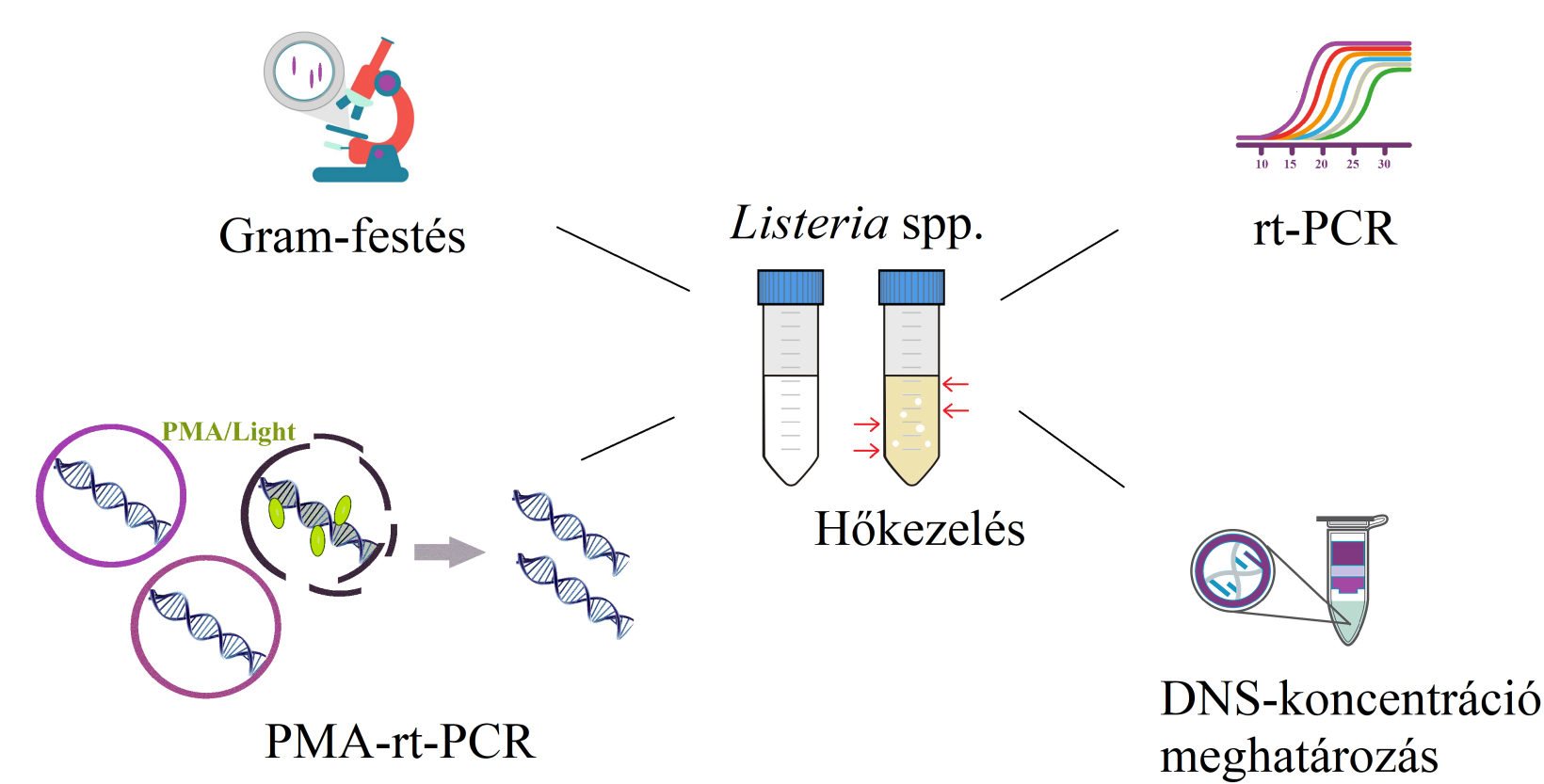
II. Különböző mérési módszerek összehasonlítása üzemi felületi minták esetén

Az ELISA és rt-PCR kitek gyakorlati használhatóságának jellemzése érdekében élelmiszeripari üzemi felületről mintavéve szivaccsal vett mintákat dolgoztunk fel. ELISA és rt-PCR kittel vizsgáltuk a minták *Listeria* spp. pozitivitását, eredményeinket összevetettük az ELISA megerősítő, biokémiai vizsgálatok eredményeivel.

III. Holt *Listeria* spp. baktérium rt-PCR vizsgálatban

Annak vizsgálatára, hogy holt baktérium jelenléte zavarhatja-e a PCR reakciót, illetve milyen nagyságrendű *Listeria* spp. holt sejt ad értékelhető jelet rt-PCR mérés során szintén *Listeria* spp. decimális hígítási sor tagjait vizsgáltuk. Élőcsíraszám-meghatározás után a minták egyik részét hőkezelésnek vetettük alá. Vizsgáltuk a baktériumokat fénymikroszkóppal (Gram-festés), DNS-feltárás és -tisztítás (szilika membrános oszlopos kittel) után meghatároztuk a DNS-koncentrációt (spektrofotométerrel) és elemeztük az rt-PCR vizsgálatok eredményeit (1. ábra).

IV. Életképes *Listeria* spp. baktériumok szelektív kimutatása PMA-rt-PCR módszerrel
Élőcsíraszám-meghatározás, majd a minták egy részének hőkezelése után, PMA-rt-PCR módszert alkalmaztunk (1. ábra). Az élő és holt baktériumot tartalmazó mintákból kapott értékelhető jeleket elemeztük.



1. ábra: Élő és holt *Listeria* spp. baktériumok szelektív elkülönítését célzó kísérleteink vizsgálati módszerei

EREDMÉNYEK

I. Kimutatási határ meghatározása

ELISA (A) kittel történő mérés egy nagyságrenddel érzékenyebbnek bizonyult, mint az ELISA (B) kit. Kimutatási határ: 10^4 – 10^5 CFU/cm³ *Listeria* spp. (élőcsíraszámban kifejezve) különböző kísérleti paraméterek mellett. Az alkalmazott két rt-PCR kit kimutatási határa közel azonos.

Eddigi eredményeink alapján mindkét PCR vizsgálati módszer 1–2 nagyságrenddel érzékenyebb, mint az ELISA mérés. Kimutatási határ: 10^2 – 10^3 CFU/cm³ *Listeria* spp. élőcsíraszámban kifejezve (1. táblázat).

1. táblázat: Kimutatási határ vizsgálata *Listeria* spp. egysejttenyésztéséből készített decimális hígítási sor alapján

<i>Listeria</i> spp. élőcsíraszám (CFU/cm ³)	ELISA (A) kit	ELISA (B) kit	rt-PCR (A) kit	rt-PCR (B) kit
$1,3 \times 10^9$	✓	✓	✓	✓
$1,3 \times 10^8$	✓	✓	✓	✓
$1,3 \times 10^7$	✓	✓	✓	✓
$1,3 \times 10^6$	✓	✓	✓	✓
$1,3 \times 10^5$	✓	✓	✓	✓
$1,3 \times 10^4$	✓	—	✓	✓
$1,3 \times 10^3$	—	—	✓	✓
$1,3 \times 10^2$	—	—	✓	✓
13	—	—	—	—
< 10	—	—	—	—

Vizsgálatainkban három párhuzamos mérés eredményeit vetettük össze.
Az **ELISA vizsgálat** eredményét pozitívnak (✓) tekintettük adott hígítási fokra nézve, amennyiben a párhuzamos tagok mindegyike pozitív eredményt adott, az értékek relatív szórása pedig <10%.
Az **rt-PCR vizsgálatok** eredményét pozitívnak (✓) tekintettük adott hígítási fokra nézve, amennyiben a párhuzamos tagok mindegyike pozitív eredményt adott, az értékek relatív szórása <3%, a ciklusszámok közötti eltérés pedig <5%.
A fentiekől történő bármilyen eltérés esetén adott hígítási fok *Listeria* spp. kimutathatóságát negatívnak (—) értékeltük.

EREDMÉNYEK

II. Különböző mérési módszerek összehasonlítása üzemi felületi minták esetén

A felületi mintavéve szivaccsal vett mintákból végzett vizsgálat során az rt-PCR (B) kitet használtuk. Összes vizsgált minta száma 161 db, ebből *Listeria* spp. pozitív 16 db volt (2. táblázat).

2. táblázat: Legalább egy vizsgálati típus alapján *Listeria* spp. pozitív felületi minták, n=16

Vizsgálat	Minta	ELISA (A) kit	ELISA (B) kit	rt-PCR kit	<i>Listeria</i> spp. megerősítő vizsgálat
1. dúsító	1	—	✓	—	—
	2	—	—	✓	—
	3	—	—	✓	✓
	4	—	—	✓	✓
	5	—	—	✓	✓
	6	✓	✓	✓	✓
	7	—	—	✓	✓
	8	—	✓	✓	✓
	9	—	✓	✓	✓
	10	—	✓	✓	✓
2. dúsító	11	—	✓	—	—
	12	✓	✓	✓	—
	13	✓	✓	✓	✓
3. dúsító	14	✓	✓	✓	✓
	15	✓	✓	✓	✓
	16	✓	✓	✓	✓

Jelmagyarázat:	
Pozitív	✓
Negatív	—

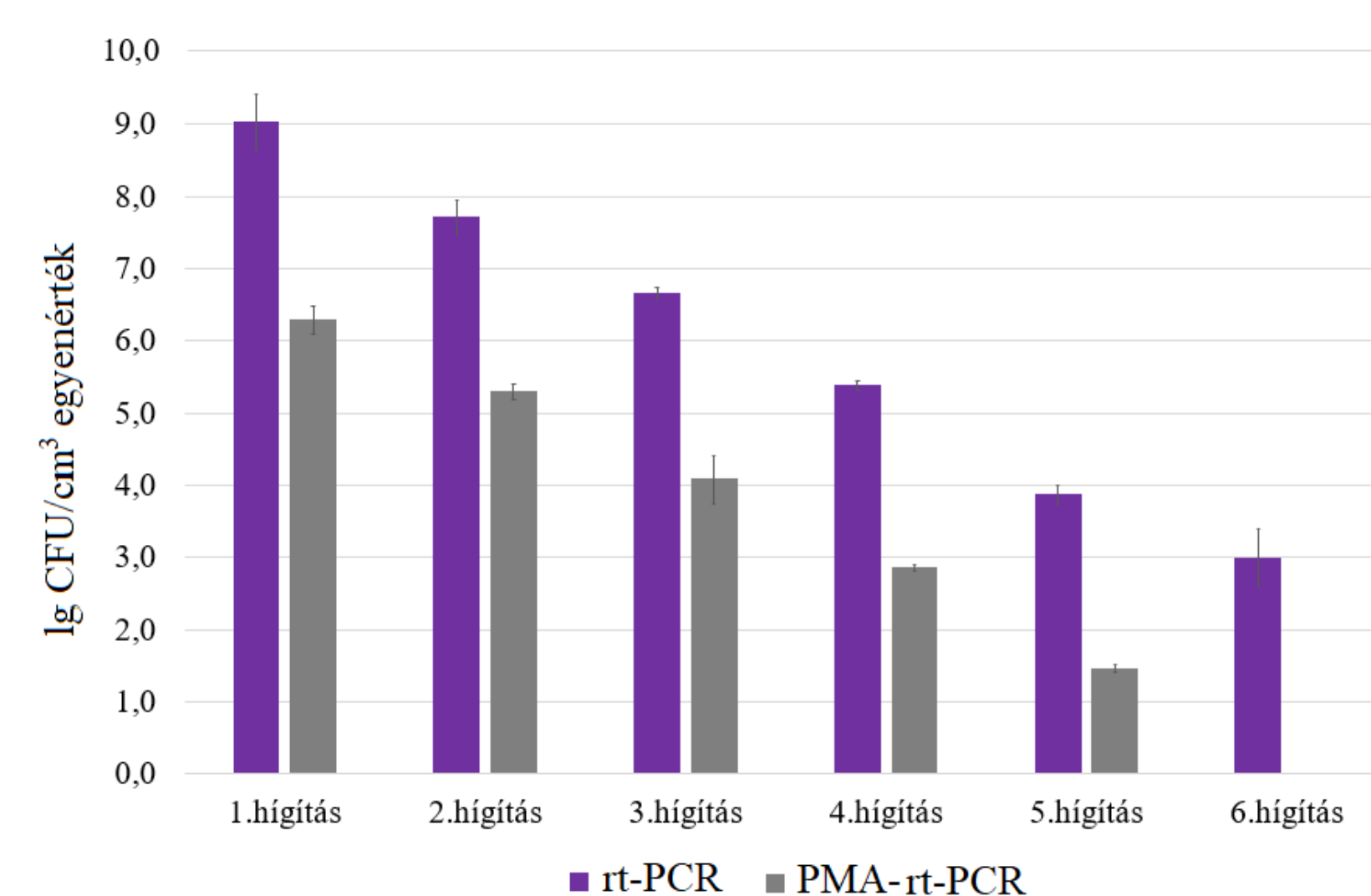
EREDMÉNYEK

III. Holt *Listeria* spp. baktérium rt-PCR vizsgálatban

Az alkalmazott hőkezelés hatására, a fénymikroszkópos kép alapján arra következtethetünk, hogy a sejtek jellemző alakjukat megőrzik az életképesség elvesztése után is. Élő és holt baktériumokat tartalmazó minták között nem tapasztaltunk különbséget sem azok DNS-koncentrációja, sem az rt-PCR vizsgálatban kapott adatok esetében.

IV. Életképes *Listeria* spp. baktériumok szelektív kimutatása PMA-rt-PCR módszerrel

Holt *Listeria* spp. minták PMA-kezelést követő rt-PCR vizsgálati eredményei alapján megállapítható, hogy a baktérium élőcsíraszámában fejezett értéke átlagosan 2,7 nagyságrenddel csökkent (2. ábra). Kísérleteink során vizsgáltuk a PMA-kezelés hatását életképes baktériumokra: szignifikáns változást a kezelés nem eredményezett.



2. ábra: Holt *Listeria* spp. elősejtszámra vonatkoztatott értékének csökkenése PMA-rt-PCR kezelés hatására klasszikus rt-PCR adatokhoz viszonyítva (három párhuzamos mérés átlaga alapján)

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS ÖSSZEGZÉS

Az alkalmazott két *Listeria* spp. rt-PCR kit kimutatási határa közel azonos. Az rt-PCR (A) kit alkalmazásához képest az rt-PCR (B) kit egyszerűbb, emberi beavatkozás igénye kisebb, így az esetleges hibalehetőségek száma kevesebb.

Az eredményekből látható, hogy a két ELISA kit közül az ELISA (A) kit bizonyult alkalmasabbnak; egy nagyságrenddel kevesebb *Listeria* spp. esetében is eredményt ad. A különbség oka feltételezhetően az alkalmazott rövid inkubálási idő, melyre az ELISA (B) kit nem rendelkezik specifikációval.

A kimutatási határ meghatározása és az üzemi felületi minták összehasonlító vizsgálata során egyaránt az rt-PCR mérési módszer megbízhatóbbnak látszik az ELISA méréshez képest. Az előbbi érzékenysége miatt olyan minták esetén is detektálható *Listeria* spp., ahol az ELISA mérési módszerek negatívat mutatnak. Az rt-PCR módszer alkalmazása jellemzően a második napon adatközlést tesz lehetővé. A kísérletsorozat eredményeit mindennapi élelmiszerdiagnosztikai munkánkban hasznosítjuk.

Életképes *Listeria* spp. baktériumok szelektív kimutatását céloztuk PMA-rt-PCR módszerrel. Holt *Listeria* spp. minták PMA-rt-PCR vizsgálatában a baktérium élőcsíraszámában kifejezett értéke átlagosan 2,7 nagyságrenddel csökkent. Szakirodalmi adatok alapján a PMA-rt-PCR vizsgálatban akár három nagyságrendnyi különbség érhető el élő és holt baktériumok között. További kísérleteinkben célozzuk a PMA-kezelés paraméterek optimalizálásának folytatását.



FELHASZNÁLT IRODALOM

- Agustí, G., Fittipaldi, M., Codony, F., *Current Microbiology*, 2018, **75**, 779–785.
Garrido-Maestu, A., Tomás Fornés, D., Prado Rodríguez, M., *Methods in Molecular Biology*, 2019, **1918**, 35–45.
Gianfranceschi, M. V., Rodríguez-Lazaro, D., Hernandez, M., González-García, P., Comin, D., Gattuso, A., Delibato, E. et al., *International Journal of Food Microbiology*, 2014, **1**, 128–133.
Oravcová, K., Trnčíková, T., Kačlíková, E., *Journal of Food and Nutrition Research*, 2007, **46**, 63–67.
Paul, M., Baranzoni, G. M., Albonetti, S., Brewster, J. D., *International Dairy Journal*, 2015, **41**, 46–49.