



A kép illusztráció / Picture is for illustration only

Ozsváth Xénia Erika¹, Keszler Ibolya², Rigó Karolina², Pál Károly³

Érkezett: 2019. január – Elfogadva: 2019. május

Real-Time PCR-készülék bevezetése a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal debreceni laboratóriumában *Salmonellakimutatás céljából*

KULCSSZAVAK: *Salmonella*, szalmonellózis, Real-Time PCR, patogén baktérium-kimutatás

ÖSSZEFOGLALÁS

A szalmonellózis a legelterjedtebb zoonózisok közé sorolható, amely Európa-szerte élen jár az emberre is terjedő állatbetegségek terén [1]. Ebből kifolyólag a *Salmonella* spp. élelmiszermintákból horizontális módszerrel történő kimutatása a kiemelt jelentőségű mikrobiológiai vizsgálatok közé sorolható a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Debreceni Regionális Élelmiszerlánc Laboratóriumában. Mivel az MSZ EN ISO 6579-1:2017 szabvány szerint alkalmazott *Salmonella*-kimutatási módszer roppant időigényes (legalább 3 munkanap), ezért a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Debreceni Regionális Élelmiszerlánc Laboratóriumában dolgozó szakemberek úgy döntöttek, hogy bevezetik egy a Real-Time PCR-készülék használatán alapuló gyorsmódszer alkalmazását. A módszer alkalmazhatóságát a *Salmonella* húsmintákból történő kimutatásának eredményei alapján vizsgáltuk. A horizontális és a molekuláris biológiai módszerrel kapott eredményeket összehasonlítva csekély eltérést tapasztaltunk; a két módszer eredményei 99%-ban megegyeztek egymással. A Real-Time PCR hatékonyságát (99,3%) figyelembe véve az új módszer bevezetése kapcsán biztató következtetések vonhatók le.

BEVEZETÉS

Az életszínvonal emelkedésével növekednek és szigorodnak az élelmiszerbiztonsággal szemben támasztott követelmények. Ehhez kapcsolódóan az élelmiszerlánc folyamatában fontos az élelmiszeripar eredetű kórokozók kimutatása, amelyhez elsődlegesen gyors és hiteles módszereket kell alkalmaznunk [2, 3]. Az alkalmazott módszerek megfelelő gyorsasága, elfogadható precízsége és érzékenysége elengedhetetlen úgy a biztonságos élelmiszer-ellátáshoz, mint egy felismert veszélyhelyzet esetén a fogyasztók idejében történő tájékoztatásához [3, 4].

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A *SALMONELLA* NEMZETSÉG JELLEMZŐI

A *Salmonella* genusz az *Enterobacteriaceae* családba tartozó, fakultatív anaerob, Gram-negatív, peritrich flagellummal mozgó, egyenes, pálcika alakú mikroorganizmusokat foglal magában, amelyeknek több mint 2500 szerotípusa ismert [5, 6]. Az emberi és az állati bélcsatorna lehetséges lakói, de a szervezetből a környezetbe jutva megtalálhatók a vizekben, a talajban, a növényeken és az állati eredetű alapanyagokban egyaránt. A *Salmonella* fajok 6–47 °C közötti hőmérsékleten és 3,8–9,5 közötti pH-tartományban szaporodnak, és hosszú ideig

¹ Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

² Élelmiszerlánc-biztonsági Centrum Nonprofit Kft.

³ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Intézet

képesek túlélni akár száraz körülményeket is, így hónapokig, sőt, évekig életben maradnak például a tojásporban vagy a száraztésztában [7]. A baromfiállományok alomját képező száraz szalmában a *Salmonella* akár 11 hónapig is életképes tud maradni [8]. Mindezek miatt fontos az állattartásban is előírt általános és higiéniai szabályok betartása.

SZALMONELLÓZIS

Az 1990-es évek óta jelentős figyelem irányul a fertőző betegségek kialakulásában fontos szerepet játszó *Salmonella* törzsekre [9]. Összességében elmondható, hogy a 2500 *Salmonella* szerotípus közül a közegészségügy szempontjából azon szerotípusok érdemelnek figyelmet, amelyek az állatokban paratífuszt, az emberi szervezetben pedig változó lefolyású és súlyosságú megbetegedéseket okoznak. Ide sorolhatók a világszerte legelterjedtebb, humán megbetegedést okozó mikroorganizmusok, a *Salmonella* Enteritidis és a *Salmonella* Typhimurium [1, 10].

A kórokozó leggyakrabban beteg vagy tünetmentes, a kórokozót ürítő állat vagy ember székletével kerül a környezetbe. A szalmonellózis tünetei (enyhe esetben fejfájás, levertség, hányás, hasmenés) a *Salmonellával* szennyezett étel elfogyasztását követően 6-48 órán belül megmutatkoznak. Az erős immunrendszerű egyéneknél a fent említett tünetek 2-5 nap alatt gyógyszeres kezelés nélkül elmúlnak, esetenként azonban akár mind a lappangási, mind a gyógyulási idő meghosszabbodhat. Súlyos esetben a *Salmonellával* fertőzött és elfogyasztott étel magas lázat, sőt, akár szeptikémiát is okozhat [11, 12]. A humán szalmonellózis eseteinek több mint felét baromfi eredetű fertőzés, különösen a bélsárral szennyezett tojás okozza. További fertőzési forrás lehet bármely állati eredetű alapanyag, ivóvíz, ürülékkel szennyezett, illetve mosatlan zöldség, gyümölcs, ételízesítők és fűszerek [1]. Gyakori az olyan tünetmentes kórforma is, amelynek során a patogén *Salmonella* baktérium a bélcsatornában elszaporodik, majd a széklettel kiürül a szervezetből. A fekáliával ürített *Salmonella* a személyi és gyártástechnológiai higiénia megszegése esetén az élelmiszerrel, illetve annak alapanyagaival az élelmiszerek fogyasztóit szájon át fertőzheti meg (fekál – orál terjedés) [13]. Kockázatot jelenthet továbbá a fertőzött, nem megfelelően hőkezelt húsaruk forgalmazása, fogyasztása, valamint a pasztörözés nélküli nyers tej felhasználása és további hőkezelés nélküli fogyasztása. A nem megfelelő hőkezelés mellett a patogén kórokozó fennmaradását, szaporodását segítheti az élelmiszerek meleg, nyirkos helyen történő, nem megfelelő tárolása is [1, 11]. További higiéniai veszélyt jelent, hogy a *Listeria monocytogenes*-hez hasonlóan a *Salmonella* is képes biofilmet kialakítani az élelmiszeriparban alkalmazott fém-, üveg-, gumi- és műanyag felületeken, ezért elengedhetetlen a különböző berendezések és az azokat összekötő

csővezetékek, szelepek és egyéb, az élelmiszerekkel érintkező szerelvények folyamatos tisztítása és fertőtlenítése [14].

Szalmonellózis alatt nemcsak humán megbetegedést értünk. A betegség állatokon, például sertéseken vagy baromfikon is kialakulhat. Ehhez kapcsolódóan a magyarországi baromfiállományokban 1997 óta folyik a *Salmonella* Enteritidis és a *Salmonella* Typhimurium ellen irányuló *Salmonella*-mentesítési program [11]. A tartástechnológia helyes megválasztása, a folyamatos egészségügyi monitorozás és a higiéniai szabályok betartása mellett szükség volt egy integrált védekezési program bevezetésére is. Az Európai Tanács 92/117/EEC számú Irányelvének és az Egészségügyi Világszervezet Irányelveinek felhasználásával készült az ún. „Fehér könyv”, vagyis „A *Salmonella* elleni védekezést célzó integrált minőség szabályozási rendszer a baromfiszektor számára Magyarországon” című kiadvány [15].

A *Salmonella*-mentesítés fontos része, hogy a gazdák állataik számára *Salmonella*-mentes ivóvizet és takarmányt biztosítsanak. A takarmányok alapanyagai között fertőzési forrást jelenthetnek az olajosmagvak, amelyeknek feldolgozása során a *Salmonella* tartós megtelepedésének és szaporodásának kedvező viszonyok alakulhatnak ki az extraháló üzemek páradús, poros, meleg klímája révén [16].

A magyarországi *Salmonella*-monitoring legfőbb irányítója a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), amely hivatali laboratóriumaival és bizonyos, hatóság által engedélyezett magánlaboratóriumok bevonásával állatállományokból, húsból, valamint különböző élelmiszerekből teljeskörű *Salmonella* vizsgálatokat végez [11].

REAL-TIME PCR

A megbízható, gyors és pontos kimutatási módszerek elérhetősége az elmúlt években egyre fontosabbá vált a mezőgazdaság és az élelmiszeripar számára. Az ilyen módszerek több patogén mikroorganizmus egyidejű kimutatását is lehetővé teszik és validált eredményt adnak csakúgy, mint a szabványokban leírt, „hagyományos” mikrobiológiai eljárások [17].

A polimeráz láncreakció (Polimerase Chain Reaction - PCR) egy gyorsdiagnosztikai módszer alapját képezi, amelyet a mintában vélhetően felfedezhető kórokozó DNS-ének kimutatására alkalmaznak, így a *Salmonella* baktérium élelmiszer mintából való direkt kimutatására is alkalmazható [18]. A PCR-módszernek több típusa ismert, például az általunk alkalmazott valós-idejű PCR-technika (Real-Time PCR). A hagyományos polimeráz láncreakcióhoz viszonyítva a valós idejű technikánál az amplifikálás és a detektálás egyidejűleg valósul meg a használt fluoreszcens molekuláris részecskék köszönhetően. A mérés alatt a minta kiemelt DNS-

szakaszai fluoreszcens jelet bocsátanak ki, amelyet a rendszer képes detektálni, ezáltal a kimutatási eljárás a „hagyományos” módszerekhez képest gyorsabbá, érzékenyebbé és szelektívebbé válik [19, 20]. Napjainkra a Real-Time PCR-technológia rutin laboratóriumi vizsgálattá vált. Egy 50 elemből álló mintacsomag vizsgálatának nettó időigénye 9-10 órára csökkenthető [21].

ANYAG ÉS MÓDSZER

A méréseket a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Debreceni Regionális Élelmiszerlánc Laboratóriumában (Élelmiszerlánc-biztonsági Centrum Nonprofit Kft.) végeztük 2018. január és május között.

A REAL-TIME PCR-HEZ FELHASZNÁLT KIT ÉS ESZKÖZÖK

- Bio-Rad iQ-Check *Salmonella* II kit: a reagensek 96 tesztre elegendők
 - o A reagens: lízis reagens 1×20 ml
 - o B reagens: fluoreszcens próba 1×0,55 ml
 - o C reagens: amplifikációs mix 1×4,4 ml
 - o D reagens: negatív PCR-kontroll 1×0,5 ml
 - o E reagens: pozitív PCR-kontroll 1×0,25 ml
- bioSan TS-100 Thermo-shaker
- Sigma 1-16 centrifuga
- Velp scientifica (Rx³) vortex
- Yellowline MST basic C mágneses keverő
- Bio-Rad CFX93 Real-Time System PCR-készülék
 - o C1000 Touch Thermal Cycler
- pipet4U pro automata pipetta

MÓDSZER

MINTAELŐKÉSZÍTÉS

A mintaelőkészítés során darált, illetve előkészített (pácolt, fűszerezett) sertés- és szarvasmarha hús mintájából táramérlegesen 10 g, minden más esetben 25 g mennyiséget mértünk be.

A 10:1-es arányt követve a 25 g mintát 250 g-ra, a 10 g mintát pedig 100 g-ra töltöttük fel pufferolt peptonvízzel, ezt követően Stomacher-készülékben 30 sec-ig szuszpendáltuk.

A SALMONELLA SPP. KIMUTATÁSA REAL-TIME PCR-MÓDSZERREL

A kimutatást az MB/12/2010 *Salmonella* kit leírása alapján végeztük. Az izoláláshoz Bio-Rad iQ-Check *Salmonella* II kitet használtunk. A kit 4 reagenst tartalmaz, amelyeket az **Anyag és módszer** fejezet elején ismertettünk.

18 ±2 órás inkubálást követően a DNS izolálását 37 °C-on inkubált pufferolt peptonvizes elődúsító folyadékból végeztük el. Bizonyos termékek esetén az inhibíció kivédése céljából az elődúsító táptalajból 20 µl-t célszerű bemérni 1 ml 37 °C-os pufferolt peptonvízbe, amelyet 37 °C-on kell inkubálni 4±1 órán át.

A DNS KIVONÁSA

A feltárt mintából a DNS kivonását 99 °C-os termomixerben végeztük. Az inkubált, pufferolt peptonvízből 1 ml-t Eppendorf-csőbe mértünk, majd 12000 g-n 5 percig centrifugáltuk. A centrifugálás alatt az „A” jelű reagenst mágneses keverőn kevertettük.

A centrifugálást követően a minta felülúszóját eltávolítottuk és a pelletre 200 µl „A” reagenst mértünk úgy, hogy a azt homogenizálás céljából a keverőn folyamatos kevertetés alatt tartottuk. Erre azért volt szükség, mert a reagens gyöngyös szerkezete miatt egyenletes elosztást kell biztosítanunk annak használatakor. A pelletet és a ráért „A” reagenst pipetta segítségével szuszpendáltuk, majd vortexeltük legalább 20 sec-ig, amíg az üledék teljesen fel nem oldódott. Az így előkészített mintákat termomixerben 15 percig 99 °C-on, 1400 rpm-en hőkezeltük. Ezt követően a mintákat a termomixerből kivéve, az Eppendorf-csövek tetejét fogva vortexeltük legalább 20 másodpercig, majd 12000 g-n, 5 percig ismét centrifugáltuk. Végül a felülúszó rétegből pipetta segítségével 50 µl-t Eppendorf-csövekbe mértünk. (A minták a mérésig -20 °C-on egy napig tárolhatók.)

REAL TIME PCR

A PCR-lemez (plate) reagenseinek összemérését steril boxban végeztük. A steril Eppendorf-csőbe a „B” és „C” jelű reagensek összemérését a kit-hez mellékelt táblázat alapján végeztük, beleértve a méréshez nélkülözhetetlen pozitív és negatív kontrollmintákat is. Az összemért reakcióelegy 4 °C-on legfeljebb egy óráig tárolható.

Az elegyekből a következő arányok szerint mértünk egyesével 45 µl mennyiséget a PCR-plate mélyedéseibe:

- „B” reagensből 5 µl/minta,
- „C” reagensből 40 µl/minta.

Ezt követően a „D” (negatív kontroll) és „E” (pozitív kontroll) jelű reagensből, valamint az ismeretlen mintákból azonosítható sorrendben 5-5 µl-t adagoltunk pipetta segítségével folyadékszint alá a bemért elegyekbe. Az izolálás utolsó lépéseként a plate-et lezártuk és buborékmentesítettük.

Ezt követően a reakcióelegyet tartalmazó plate-et a Bio-Rad CFX93 Real-Time System PCR-készülékbe helyeztük. A polimeráz láncreakció futtatása és az eredmények kiértékelése a Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2 programmal történt. A kimutatáshoz, vagyis az értékelhető jel nagyság eléréséhez 49 PCR-ciklusra volt szükség.

Az általunk használt készüléket FAM (Fluorescein amidite) filterrel szerelték fel. Kiértékeléskor abban az esetben pozitív az eredmény, ha a threshold-(küszöb-) értéket átlépő, jellegzetes szigmoid alakú görbe jelenik meg. Legtöbb esetben pozitív értéknél a görbe a 30. ciklus után tűnik fel. A 28. ciklus alatt – túl korán – vagy 40. ciklus után – túl későn – megjelenő görbék esetén a kapott eredmények megbízhatósága nem volt kielégítő. Az érintett kétes mintákat a szabványban leírt mikrobiológiai módszerrel is meg kellett vizsgálnunk.

A PCR-REAKCIÓ HATÉKONYSÁGÁNAK SZÁMÍTÁSA

A polimeráz láncreakció hatékonyságának számításához a LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data szoftvert alkalmaztuk, amely egy adott vizsgált génre egyedi reakcióhatékonyságot számol, majd az eredményeket átlagolva megadja a teljes reakció hatékonyságát. Előnye, hogy nem igényel külön standard görbét, hiszen a logaritmikus nézetben ábrázolt amplifikációs görbe lineáris szakaszára illesztett egyenes meredekségét helyettesíti be a következő képletbe:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{m}\right)} - 1 \times 100,$$

ahol az „E” a hatékonyság, az „m” a meredekség jele [22].

A hatékonyság ellenőrzésére az összes vizsgált mintára nézve relatív pontosságot, specifikusságot és érzékenységet is számoltunk az MSZ EN ISO 1640 szabványban foglalt képletek segítségével:

$$\text{Relatív pontosság (\%)}: \frac{(p + n)}{N} * 100$$

$$\text{Relatív specifikusság (\%)}: \frac{n}{(n + fp)} * 100$$

$$\text{Relatív érzékenység (\%)}: \frac{n}{(n + fp)} * 100,$$

ahol az „N” az összes vizsgált minta, „n” a negatív minták száma, „p” a pozitív minták száma, „fn” a fals negatív, míg az „fp” a fals pozitív minták számát jelölik [23].

EREDMÉNYEK ÉS KIÉRTÉKELÉSÜK

MINTAELŐKÉSZÍTÉS, DNS IZOLÁLÁS

Kísérleteink során összesen 109 db mintából végeztünk *Salmonella* kimutatást Real-Time PCR-készülék alkalmazásával. A minták csoportosítását az 1. táblázat szemlélteti. Főként szárnyashús és -húskészítmény (azon belül is csirke- és pulykanyakbőr) tette ki a vizsgálandó minták nagy részét.

Az inkubált, pufferolt peptonvízből 1 ml-t használtunk fel DNS izolálás céljából, a többit a horizontális módszer alkalmazása esetén használtuk fel. Az inkubált pufferolt peptonvizes mintákat felhasználásig Eppendorf csövekben hűtőszekrényben 4 °C-on tároltuk. A *Salmonella* optimális szaporodási hőmérséklete 37 °C, de 5-47 °C között is képes szaporodni. Későbbi tapasztalataink azt bizonyították, hogy az alacsony hőfokon való tárolás a szaporodást gátolta, a baktériumsejtek jelentős hányada azonban életképes maradt.

A KIMUTATÁS EREDMÉNYEI

A minták kiértékelését az eredményeket riportban összesítő Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2 programmal végeztük.

A Real-Time PCR-módszerrel végzett vizsgálatnál minden előkészítési lépést a kit-hez mellékelt protokoll alapján hajtottunk végre. A megfigyelés során összesen nyolc mérést végeztünk. Az első mérési sorozatban a minták várható eredményeit

1. táblázat: Real-Time PCR-rel vizsgált minták összesítése
Table 1: Summary of samples analyzed by real-time PCR

Hús fajtája Meat type	Szárnyas Poultry						Vörös hús Red meat			
	Csirke Chicken	Pulyka Turkey	Kacsa Duck	Liba Goose	Gyöngyös Guinea fowl	Fácán Pheasant	Sertés Pork	Marha Beef	Hal Fish	Vad Game
Összesen / Total:	26	44	6	1	1	2	20	2	5	2

Forrás: saját forrás / Source: own work

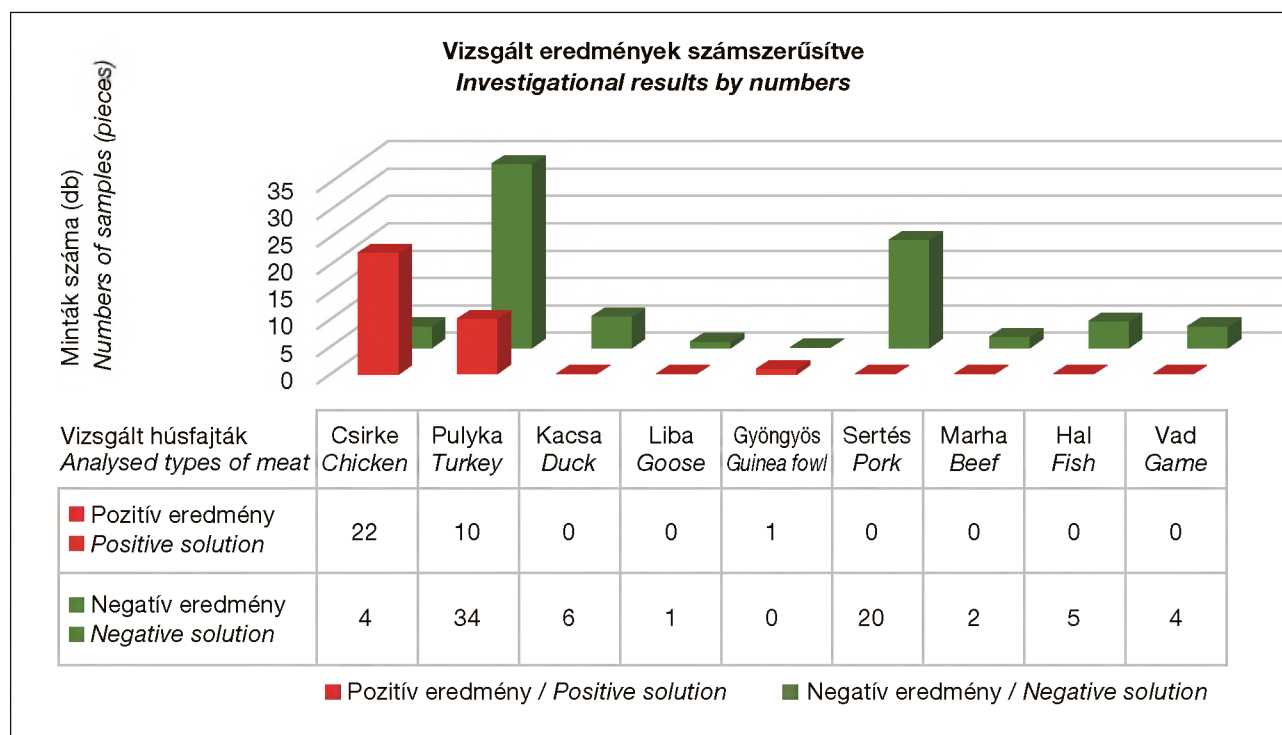
ismertük, hiszen a kimutatást horizontális módszerrel korábban már elvégeztük. Ezt követően egyetlen mérés kivételével a Real-Time PCR-rel végzett (vagyis a molekuláris biológiai módszerrel kapott) *Salmonella* kimutatási eredményeink megegyeztek a horizontális módszerrel végzett vizsgálatok eredményeivel. A negyedik mérésnél mutatkozott meg az első és egyetlen eltérés az említett két módszer között.

A molekuláris biológiai módszerrel végzett baktériumkimutatás alapján a friss pulyka darált alsócomb-filé pozitív eredményt hozott, míg a klasszikus eljárás során negatív eredményt kaptunk. A Real-Time PCR-technika alkalmazásánál a nem egyértelmű vizsgálati eredményű, valamint a *Salmonella*-pozitív minták esetén „klasszikus” megerősítő vizsgálatra van szükség, melyet az MSZ EN ISO 6579-1:2017 szabványban előírt módszer alapján végeztünk el. A fals pozitív eredmények kiküszöbölésére irányult *Wang-Mustapha* kísérlete, melynek során tyúktöjből végzett *Salmonella* kimutatást. A hagyományos PCR-technika mintaelőkészítése és -izolálása során kiegészítésként az elhalt baktériumsejteket megfestő etidium-bromid-monoazidot alkalmazott. A megfestődött baktériumsejtekben az etidium-bromid-monoazid megakadályozta, hogy a DNS polimeráz enzim reakcióba lépjen a holt sejtek örökítő anyagával, így azok DNS-tartalma nem tudott részt venni a polimeráz láncreakcióban. Ilyen módon az élettelen *Salmonella* sejtek okozta fals pozitív eredmény valószínűsége hatékonyan csökkenthető [24].

A laboratóriumba érkezett minták többsége szárnyas hús volt, ezen belül is csirke-, valamint pulykahús, amelyek esetében a legnagyobb mintaszámokban nyakbőr vizsgálatát végeztük. A nyakbőr vizsgálata iránti igény indokoltságát mutatja, hogy 2011-ben a brojler csirkenyak-bőr minták közel 86%-a mutatott *Salmonella* jelenlétet [25]. Ahogy az **1. ábrán** is látható, a Real-Time PCR-készülékkel általunk vizsgált nyakbőrből, szárnyból és friss egész csirkecomból álló csirkemintáknál 84,6%-ban kimutatható volt a patogén baktérium. A pulykahúsból és -nyakbőrből származó 44 db mintából 10 db pozitív eredmény született, azon belül is a nyakbőrből, a darált alsócomb filéből és a pulykamellből vett minták adtak pozitív eredményt. (A pulykamell a gyöngyös húshoz hasonlóan fagyaszta érkezett vizsgálatra a laboratóriumba.) Mindkét hús esetén kimutatható volt a *Salmonella* baktérium jelenléte. Mindez megerősíti azt a tényt, hogy bár a *Salmonella* nem képes szaporodni 5 °C alatt, mégis életképes marad, hiszen a vizsgálatot megelőző elődúsítás során az inaktív sejtek aktiválódtak, és a patogén mikroba szaporodni kezdett.

Szárnyas húsok közül kacsá-, liba-, valamint fácánhús is érkezett *Salmonella* kimutatásra. A felsorolt minták közül valamennyit negatívnak találtuk.

A vörös húsok esetén főként sertéshús, emellett marha- és vadhús vizsgálatát is végeztük. Az elenyésző számú halminta elsősorban gyorsfagyasztott állapotban került hozzánk vizsgálatra. Összesen 29 db minta tartozott a vörös



Forrás: saját forrás / *Source: own work*

1. ábra: Real-Time PCR készülékkel vizsgált minták pozitív és negatív eredményeinek bemutatása (db)
Figure 1: Positive and negative results of samples analyzed by real-time PCR

hús és hal kategóriába; ezek esetében a horizontális és a molekuláris biológiai módszer segítségével végzett eljárás során negatív eredményeket kaptunk.

A vizsgálatok során kapott pozitív és negatív eredmények eloszlását húsfajták alapján az **1. ábrán** tüntettük fel. Szükséges megjegyeznünk, hogy a hús- és húskészítmények közötti összehasonlítást a laboratóriumba érkező minták egyetlen eloszlása nem tette lehetővé.

Az általunk alkalmazott REAL-Time PCR-technika, illetve az MSZ EN ISO 6579-1:2017 szabvány szerinti *Salmonella*-kimutatás során kapott eredmények összevetése alapján megállapítást nyert, hogy a valós idejű polimeráz láncreakciós készülék használatának bevezetése a Debreceni Regionális Élelmiszerlánc Laboratóriumban mindenképpen előnyös. Az alkalmazott BioRad iQ-Check *Salmonella* II kithhez egyszerű mintaelőkészítési protokollt mellékelte a gyártó, így könnyen elsajátítható a vizsgálat folyamata, viszont a DNS-izolálás és a plate összeállítása fegyelmezett, pontos munkát igényel.

A PCR-technika a „hagyományos” módszernél rövidebb idő alatti, több mintából történő kimutatást tesz lehetővé. Amíg a horizontális módszerrel végzett vizsgálat negatív eredmény esetében három, pozitív eredménynél pedig öt napot vesz igénybe, addig a Real-Time PCR-készülék használatán alapuló eljárásnál negatív eredményt feltételezve 20 minta vizsgálatához kb. 3,5 órára van szükség. A vizsgálati idő hossza abban az esetben növekedhet, ha a molekuláris biológiai módszer nem hoz egyértelmű eredményt, vagy ha a minta *Salmonella*-pozitívnak

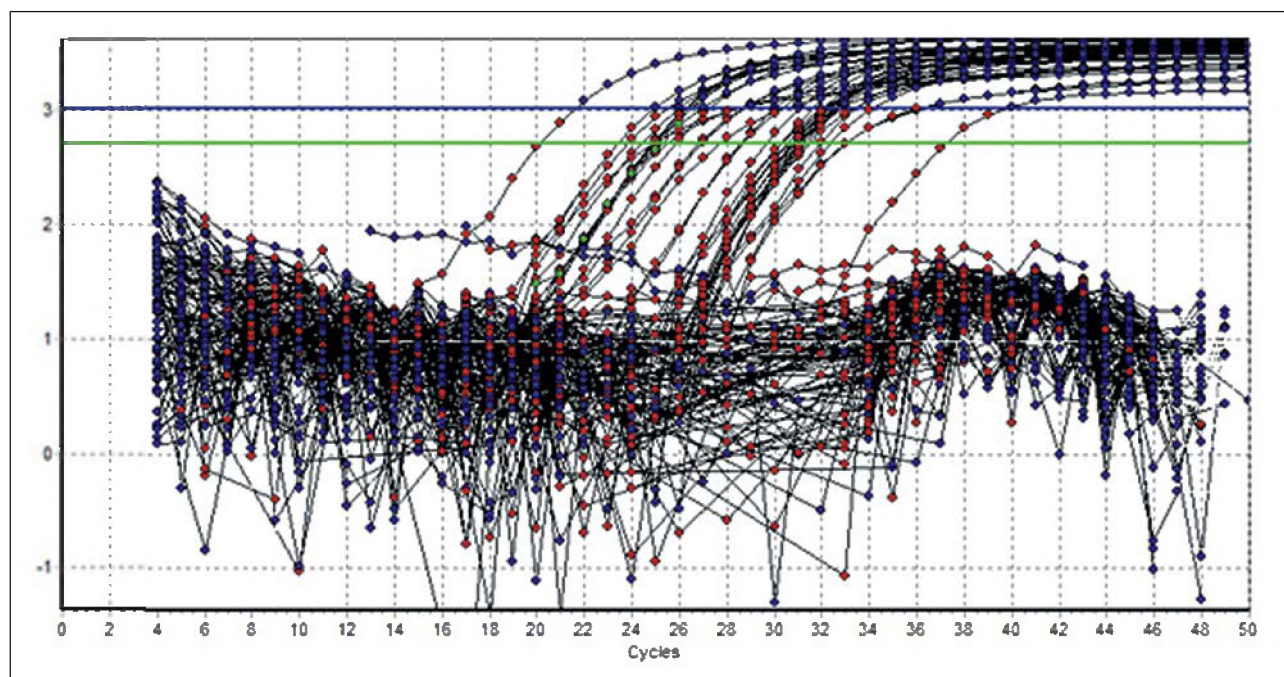
bizonyul. Ezekben az esetekben ugyanis a kimutatást horizontális módszerrel is meg kell ismételni. A Real-Time PCR-technikával egy munkanapon belül akár 40 minta vizsgálata is elvégezhető: mialatt a készülék az első mintasor elemzését végzi, addig elkészíthető a következő mintasor DNS izolálása és a plate összeállítása.

A PCR-REAKCIÓ HATÉKONYSÁGA

Az új módszer bevezetése kapcsán összesen 109 db mintából végeztünk *Salmonella* kimutatást, melynek eredménye csak egyetlen alkalommal tért el a horizontális kimutatással kapott eredményektől. A fals pozitív eredményből kikövetkeztethető, hogy a Real-Time PCR-módszer sokkal érzékenyebb, mint a klasszikus módszer. Ugyanakkor keresztszennyeződés vagy holt *Salmonella* sejtek jelenléte fals pozitív eredményhez vezethet.

A reakció hatékonyságát nemcsak az eredmények megfigyelésével és összehasonlításával szándékoztuk értékelni. E célból a LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data szoftvert alkalmaztuk, amelynek segítségével a reakció hatékonyságát százalékban kaptuk meg. Az értékelés során azt tapasztaltuk, hogy az alacsony mintaszámú mérések esetén a polimeráz láncreakció hatékonysága vagy túl alacsony (88% alatti) vagy túl magas (150% feletti). Ennek egyik oka vagy a pipettázás hibája, vagy az, hogy mastermixben a vizsgálni kívánt mintaszámhoz képest az optimálisnál több primer található.

A kiértékelő szoftver által beolvasott eredményeket a **2. ábra** szemlélteti. Jól látható, hogy a pozitív minták,



Forrás: LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data szoftver, saját forrás
Source: LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data software, own work

2. ábra: Hatékonyságszámítás: az összes eredmény alapvonal-meghatározás előtt
Figure 2: Efficiency calculation: all results before baseline determination

illetve a pozitív kontrollok logaritmusos görbét adnak, a program pedig ezeknek a lineáris szakaszára húzott egyenes meredekségéből számítja ki a hatékonyságot az alábbi képlet alapján:

$$E = 10^{\left(\frac{1}{m}\right)} - 1 \times 100,$$

ahol az „E” a hatékonyság, az „m” a meredekség jele [22].

A hatékonyság elemzését mérésenként is elvégeztük, illetve összereakció-hatékonyságot is számoltunk. Mindkét mérési módnál azonos vagy nagyon közeli arányokat tapasztaltunk, az összes eredményt kiértékelve pedig végeredményként 99,3%-os hatékonyságot kaptunk.

A hatékonyság ellenőrzésére relatív pontosságot, relatív specifikusságot és relatív érzékenységet is számoltunk, amelynek eredményei mintákra lebontva a **2. táblázatban** láthatók.

A polimeráz-láncreakcióval végzett *Salmonella*-kimutatásról számos olyan tanulmány jelent meg, amely a módszer hatékonyságát is elemzi. Ezen szakcikkek írói a vizsgálat során ismert *Salmonella* titerrel (CFU/25 g minta) dolgoztak, ezért a mi kísérleteinkhez képest pontosabb hatékonyságszámítást végeztek [26, 27, 28].

Következtetések

Kutatásunk célja az volt, hogy gyakorlattal is alátámasszuk a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Debreceni Regionális Élelmiszerlánc Laboratóriumában (Élelmiszerlánc-biztonsági Centrum Nonprofit Kft.) bevezetésre kerülő Real-Time PCR-készülék szükségességét és előnyét. A kísérletek során húsból, nyakbőrökből és húskészítményekből történő kimutatást végeztünk, mivel döntő többségben ezek az élelmiszerek okoznak szalmonellózist. A laboratóriumban az MSZ EN ISO 6579-1:2017 szabvány szerinti *Salmonella*-kimutatás a mai napig a főbb mikrobiológiai vizsgálatok közé sorolható, hiszen az egyik legismertebb patogén baktérium, amely szennyezett élelmiszerrel a szervezetbe jutva enyhe, de akár súlyos tünetekkel járó megbetegedést is okozhat.

A baktérium kimutatását a horizontális módszerrel párhuzamosan egy Real-Time PCR-készülék segítségével ugyanazon mintákból végeztük, majd összehasonlítottuk a kétféle módszer által kapott eredményeket. Összegzésként elmondhatjuk, hogy a 109 db mintából egyetlen esetben kaptunk az említett szabvány szerinti módszerrel végzett kimutatás eredményeitől eltérő eredményt. Eredményeink szerint a valós idejű polimeráz-láncreakció megbízható és precíz módszer. A készülék bevezetésének és alkalmazásának további előnyei az egyszerű, könnyen elsajátítható használat, a kis helyigény, a kevesebb vegyszerigény és -anyagfelhasználás. További előnye, hogy a módszer gyors, hiszen 20 db minta esetén 3,5 óra alatt juthatunk eredményhez. Sokkal inkább szenzitív és pontos, mint a horizontális módszer, ugyanakkor hátránya, hogy a holt baktériumsejtek jelenléte, az élelmiszer magas cukor-, illetve zsírtartalma fals pozitív eredményhez vezethet.

A molekuláris biológiai módszer előnyeinek alátámasztásához egyedi- és összreakció-hatékonyságot is számoltunk, utóbbi esetén 99,3%-os értéket kaptunk eredmény gyanánt. A hatékonyság mellett a relatív pontosságot, a specifikusságot és az érzékenységet is meghatároztuk, amelynek értékei rendre 100%, 98,7% és 100% voltak. Ezek alapján a Real-Time PCR-módszer hatékonysága kiválónak mondható.

Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Keszler Ibolya társszerzőnek, hogy lehetőséget nyújtott a kísérlet végrehajtásához. A szerző, Ozsváth Xénia Erika szeretné megköszönni Rigó Karolinának és Pál Károlynak a laboratóriumi vizsgálat során nyújtott segítségüket és hasznos tanácsaikat.

2. táblázat: Hatékonyság-számítás: relatív pontosság, specifikusság és érzékenység (%)
Table 2 Efficiency calculation: relative accuracy, specificity and sensitivity (%)

Összes vizsgált minta Total no. of samples	Relatív pontosság Relative accuracy	Relatív specifikusság Relative specificity	Relatív érzékenység Relative sensitivity
109 db	100 %	98.7 %	100 %

Forrás: saját szerkesztés / Source: own calculation