

Salmonella meghatározása ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) módszerrel

Weglárzné Gasztonyi Katalin

Fogyasztóvédelmi Főfelügyelőség

Érkezett: 2001. április 15.

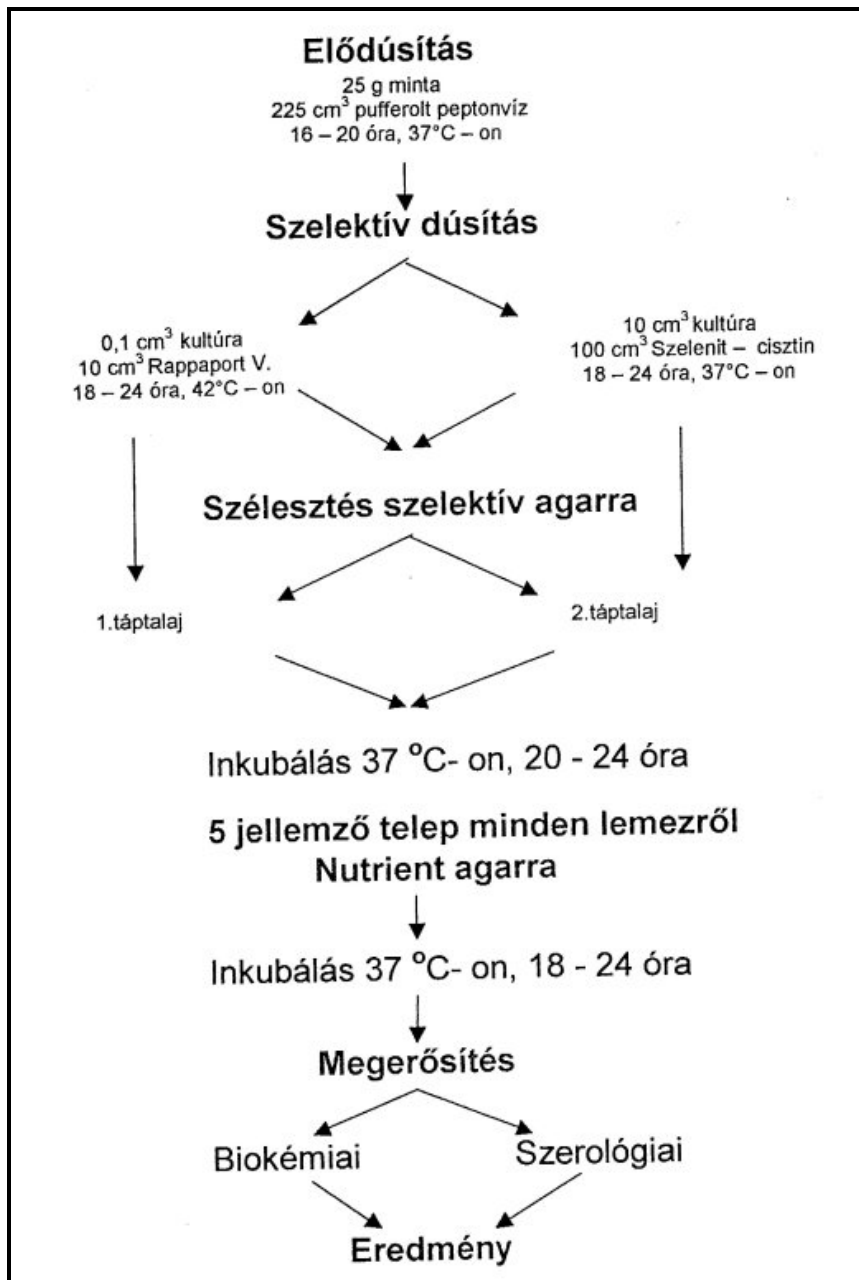
Mint ismeretes, az *Enterobacteriaceae* családba tartozó Salmonella-baktériumok (*S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *S. enterica*, *S. bongori* stb.) által termelt endotoxinok ételfertőzést okozhatnak, amelynek tünetei – az érintett személy életkorától és ellenállóképességétől függően – különböző súlyosságúak lehetnek. A fertőzés terjedését a gondatlanul kezelt nyersanyagok (pl. ürülékes tojás, rosszul tisztított belsőségek) felhasználása elősegíti. Főként a húsos, tojásos és tejes ételek okozhatnak megbetegedést. Mindezek indokoltá teszik, hogy napjainkban az élelmiszer-mikrobiológia egyik legjelentősebb feladata a kórokozó szalmonellák jelenlétének gyors és megbízható kimutatása.

A legtöbb laboratóriumban a szalmonella meghatározása még ma is a hagyományos tenyésztési módszerrel történik. Ehhez sokféle táptalaj, eszköz és több szakaszból álló laborművelet szükséges, és az eredményt csak öt nap múlva kapjuk meg (1. ábra). Így gyakran előfordulhat, hogy a szalmonella jelenlétének megállapítása esetén szükséges technológiai vagy esetleges gyógyászati beavatkozások – a hosszú vizsgálati idő miatt – nagy késedelmet szenvednek és esetleg hatástalanná válnak. Ennek megváltoztatása érdekében a szalmonella meghatározás folyamatának lerövidítése és leegyszerűsítése céljából az elmúlt években számos eljárást próbáltak ki és vezettek be. Ezen gyors módszerek között kiemelkedő jelentősége van az ún. immunológiai elveken alapuló mikrobiológiai eljárásoknak (2. ábra). Ezeknek a módszereknek a rövid ismertetése után részletesen bemutatásra kerül az ún. ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) módszer.

Immunológiai elven alapuló vizsgálatok

Az egészségkárosító patogén mikrobák jól definiálható antigén sajátosságokkal rendelkeznek, amelyek az egyes kórokozókra nézve jellemzőek és a megtámadott szervezetben választ, vagyis specifikus antitestképződést indukálnak. A patogén és a megtámadott szervezet között tehát molekuláris szinten specifikus szerológiai antigén-antitest reakció játszódik le. Ezek a reakciók reverzibilisek, amelyeknek keretében az immunglobulin-molekulák antigén-kötő helyei és az epitópok között kialakuló kapcsolatok nem kovalens, hanem gyenge kölcsönhatások (pl.

hidrogén-hidak, hidrofób kötések) által stabilizálódnak. A reverzibilitásból adódóan, ebben a rendszerben az egymáshoz kötött és a szabad komponensek egymással egyensúlyban vannak.



1. ábra: Szalmonella kimutatás tenyésztéses módszerrel
(MSZ EN ISO 12824:1999)

Az egyes antigén-antitest kapcsolatokban az affinitás (pontosabban az antigén felismerés) különböző, sőt igen széles határok között váltakozhat, amelyet természetesen a rendszer hőmérséklete, pH-ja és az oldószer összetétele nagymértékben befolyásolhat. A szerológiai tesztekben általában a nagy affinitású ellenanyagok használhatók jobban. Megjegyzendő, hogy egy monoklonális ellenanyag estében az affinitás egyértelműen meghatározható, míg az antitestek keverékét tartalmazó

poliklonális ellenanyagokra ez a megállapítás nem érvényes. Az affinitás alapján tisztított ellenanyagkészítmények természetesen homogénebbek (és drágábbak!).



2. ábra: Immunológiai módszerek

Az *in vitro* szerológiai reakciók – attól függően, hogy a lezajlott folyamat eredménye szabad szemmel látható-e – két nagy csoportra oszthatók:

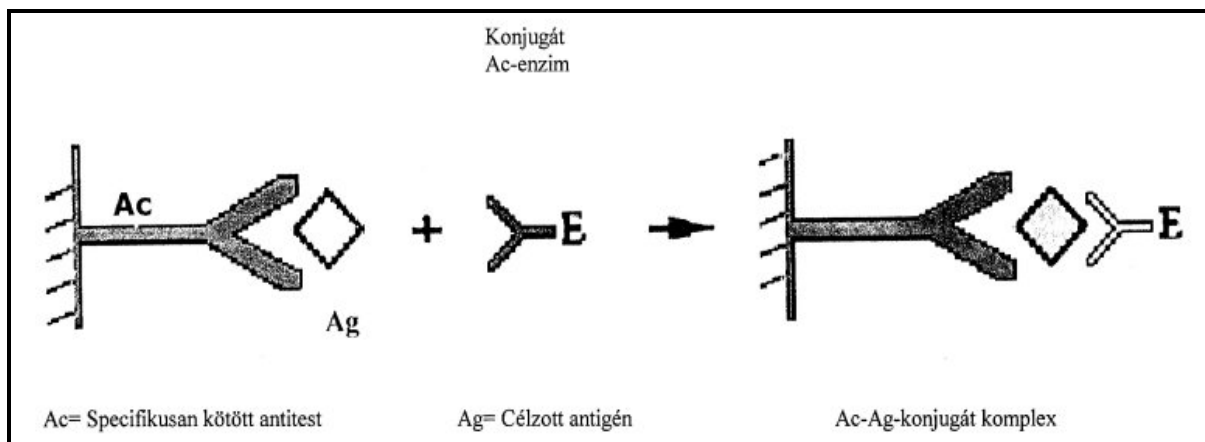
- I. Az első csoportba tartozó reakciónál az antigén-antitest kapcsolódás során szabad szemmel is látható térhálós, háromdimenziós rácsszerkezet alakul ki. Ennek az a feltétele, hogy az antigén és az ellenanyag több epitóp (kötő) hellyel rendelkezzen, továbbá, hogy a komponensek a reakcióelegyben optimális arányban legyenek jelen. Ebbe a csoportba tartoznak pl. az agglutinációs reakciók.
- II. A második csoport reakcióinál az antigén-antitest komplex kialakulását valamilyen jelző-rendszer beiktatásával tesszük láthatóvá. Ez történhet egy megfelelő molekulának (pl. fluoreszkáló anyagnak, enzimnek, izotópnak) a reakció egyik komponenséhez, az estek többségében az antitesthez (immunglobulinhoz) való kötésével. Ide tartoznak a RIA, az ELISA, az EIA és az immunfluoreszcenciás módszerek.

Tárgylemez agglutináció

A leggyakoribb és a legegyszerűbb a szerológiai eljárás, amellyel a színtenyészetben lévő, biokémiailag identifikált baktériumok antigénjeinek azonosítását végezhetjük el. A módszer során a tipizálandó mikroba színtenyészetéből egy keveset vagy közvetlenül a tárgylemezre cseppentett savóba vagy fiziológias NaCl-oldat egy cseppjébe keverünk, majd az antitestet tartalmazó savóval homogén szuszpenzióvá elegyítjük. A pozitív reakciót a rövid időn belül láthatóvá váló kicsapódás (agglutináció) jelzi.

Standard ELISA módszer

Az immunológiai elven alapuló mikrobiológiai vizsgálati módszerek között standard ELISA módszert alkalmaznak a leggyakrabban (3. ábra). Ennél az eljárásnál a keresett baktériumra specifikus antitestet szilárd hordozóra, például mikroküveték felületére rögzítjük. Ezzel hozzuk kapcsolatba az előzőleg dúsított ($10^5 - 10^6/\text{cm}^3$) vizsgálandó mintát. Amennyiben a minta tartalmazza a kérdéses antigént, az az antitest felületén megkötődik. Mosási művelet után olyan reagenst adunk a rendszerhez, amely megfelelően kiválasztott enzimmel konjugált antitesteket tartalmaz. Ezek szintén hozzákötődnek az előzőekben már létrejött antitest-antigén komplexekhez. Újabb mosás után az enzim kromogén szubsztrátját adjuk a rendszerhez, amely színreakciót eredményez. A szín intenzitását, megfelelő nm-en, spektrofotométerrel mérjük, vagy vizuálisan screening módszerrel értékeljük (pl.: TECRA kitnél a zöld szín pozitív, a színtelen negatív eredményt jelent).



3. ábra: Szalmonella meghatározása ELISA teszttel

Az ELISA módszernél az antitest jelölésére leggyakrabban az alkalikus-foszfátáz enzimet alkalmazzuk, amelyhez a p-nitrofenil-foszfát a megfelelő kromogén szubsztrátum. A meghatározás időtartama 48 óra.

Az ELISA teszthez hasonló elven működnek a RIA és a FIA módszerek, ahol a jelző anyagok különböző izotópok, illetve fluoreszkáló anyagok.

RIA módszer (Radio Immuno Assay)

Radioaktív anyaggal jelzett antitest felhasználásával az antigén-antitest kapcsolódás, radioaktív sugárzás mérésére szolgáló készülék segítségével, meghatározható. Leggyakrabban a jód ^{125}I , illetve a ^3H , a ^{14}C izotópot alkalmazzák.

A radioimmunológiai eljárások nagy érzékenységgűek, de a sugárzó reagensek egészségkárosító hatása, valamint a radioaktivitás mérésére szolgáló berendezések magas ára miatt az élelmiszeripari mikrobiológiában nem nagyon terjedtek el. További nehézséget jelent, hogy a ^{125}I izotóp rövid felezési ideje (60 nap) meghatározza a reagensek eltarthatósági idejét, amely így csak néhány hónap. A radioaktív sugárzás a hordozó molekulák eltarthatóságát is csökkenti, ami miatt a reagensek gyakoribb kalibrálására van szükség.

FIA módszer (Fluorescent Immuno Assay)

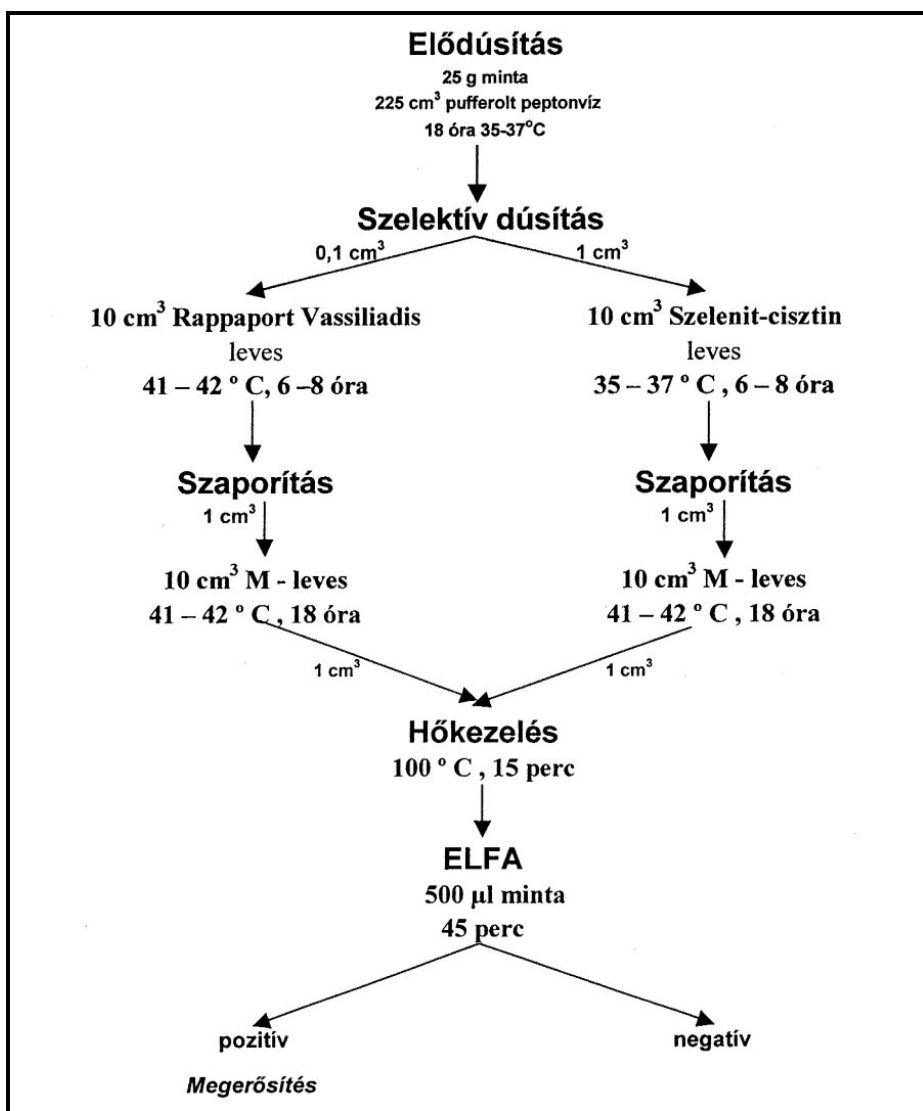
Fluoreszkáló festékekkel jelzett antitest segítségével az antigén-antitest kapcsolódás fluoreszcens mikroszkóppal megfigyelhető. Az UV-sugarakkal megvilágított anyag ugyanis látható fényt bocsát ki, ami a mikroszkóp sötét látóterében jól tanulmányozható. Az ilyen célra leggyakrabban használt fluoreszkáló festékek a fluoreszcein-izotiocianát és a tetrametil-rodamin-izotiocianát. A módszer érzékenysége kisebb, mint a RIA eljárásé (10^7 - $10^8/\text{cm}^3$). A fluoreszcens mikroszkóp magas költsége, valamint az eredmény leolvasásának szubjektív jellege miatt a FIA módszer kevésbé terjedt el.

ELFA módszer (Enzyme Linked Fluorescent Assay)

Az enzimhez kapcsolt immunológiai eljárások egyik legkorszerűbb változata az ún. ELFA módszerrel történő szalmonella meghatározás (4. ábra). A Fogyasztóvédelmi Főfelügyelőség mikrobiológiai laboratóriumában – közel egy éve – ezt a módszert használjuk, a miniVIDAS készülék segítségével. Ennek működése olyan immunológiai eljárás alapul, amelyben a szalmonella antigéneket egy enzimszubsztrátum komplex fluoreszcenciás mérésével határozzuk meg.

A vizsgálat teljesen automatizált rendszerben történik. Az eljárás az ELISA teszthez hasonlóan kezdődik. A minta elődúsítása, majd szelektív dúsítása után $1-1\text{ cm}^3$ -t 15 percig hőkezelünk 100 °C -on, majd $500\text{ }\mu\text{l}$ -t

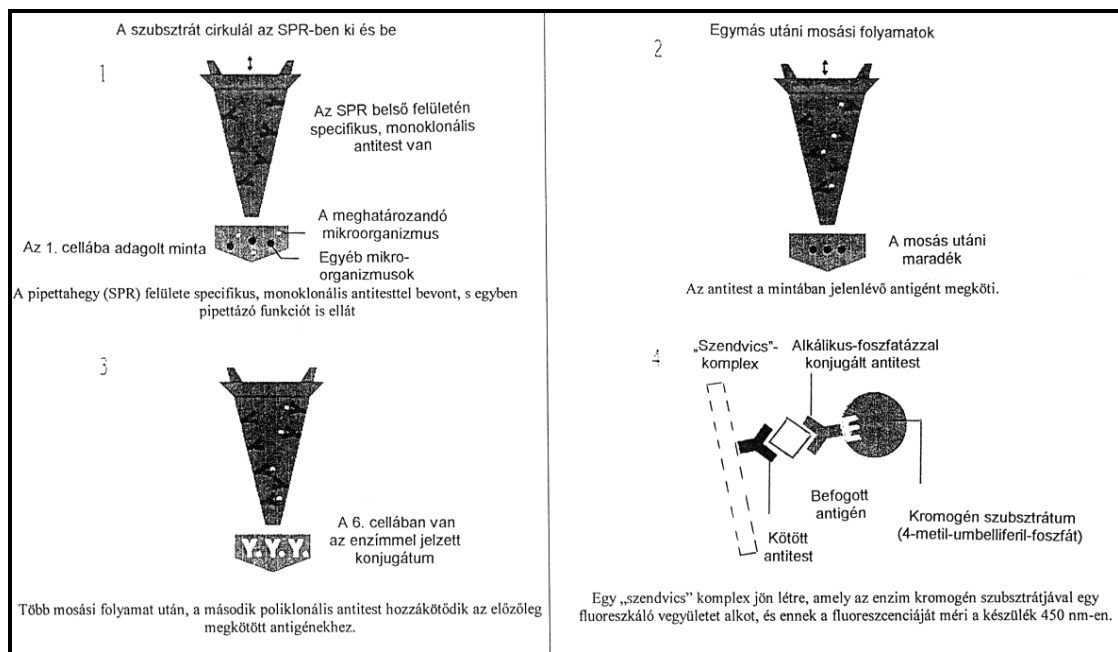
pipettázunk a készülék mérőcsíkjának (Reagent strip) első cellájába. A 2. cella előmosó, a 3., 4. és 5. cella mosóoldatokat tartalmaz. A 6. cellában található az enzimmel jelzett poliklonális antitest, a konjugát. Az utolsó cella a mérőküvetta, amelyben 4-metil-umbelliferil-foszfát található, és amelyben az optikai egység méri a fluoreszcenciát.



4. ábra: Szalmonella kimutatás VIDAS ELFA módszerrel

Az első lépésben a megfelelő monoklonális antitesttel bevont pipettahegyek felületén megkötődnek az antigének, majd a mosási műveletek után az alkalikus foszfátazzal jelzett poliklonális antitest a pipettázó egység falán előzetesen megkötött valamennyi antigénnel reakcióba lép és egy „szendvics” komplex képződik. A következő lépésben a nem kötött konjugátum mosással eltávolításra kerül (7., 8. és 9. cella). Ezután szubsztrátumként 4-metil-umbelliferil-foszfát cirkulál a pipettázó rendszerben. Az alkalikus foszfátáz hidrolizálja a szubsztrátumot és egy

fluoreszkáló vegyület, a 4-metil-umbelliferon keletkezik. A fluoreszcenciát 450 nm-en mérjük (5. ábra).



5. ábra: A VIDAS immunanalizátor működési elve

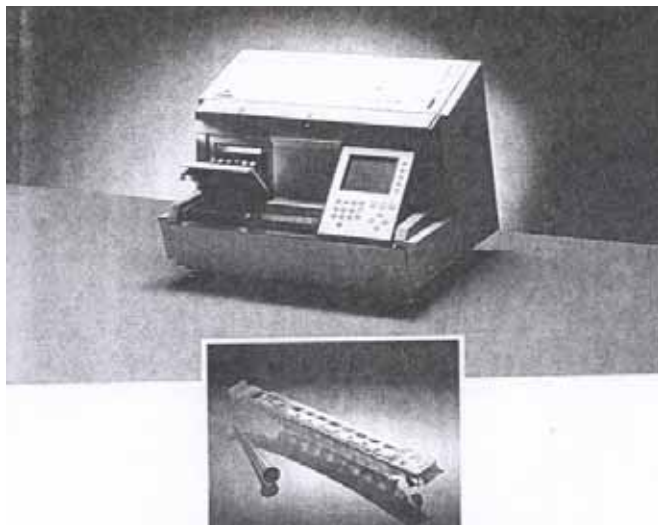
Az eredményt a vizsgálati mintánál és a hitelesítő (standard) mintánál mért fluoreszcencia érték összehasonlításával kapjuk meg (RFV=Relative Fluorescence Value). A műszer ezt a hányadost hasonlítja össze a szalmonellára kísérleti és tapasztalati úton meghatározott 0,23-as küszöbértékkel. Amennyiben a kapott hányados eléri vagy meghaladja ezt a küszöböt, úgy a készülék a mintát pozitívnak minősíti. Ellenkező esetben az anyag nem tartalmaz szalmonellát. Pozitív vizsgálati eredmény esetén a fertőzöttnek ítélt minta hagyományos biokémiai és szerológiai ellenőrzése is elvégezhető.

A miniVIDAS készülék ismertetése

A készülék (6. ábra) két, egymástól teljesen függetlenül üzemelő, A és B mérőblokkból áll. A mérőblokkok felbillenthető teteje alatt van a 6 részre osztott mérőtálca, ami egyidejűleg 12 minta vizsgálatát teszi lehetővé. A készülék központi számítógépségén kívül mindegyik mérőblokk saját mikroprocesszoros vezérléssel is rendelkezik. Ezek irányítják a vizsgálatok menetét.

A mérőblokk felső részén, egy lehajtható ajtó belső oldalán helyezkedik el az ugyancsak 6 részből álló pipettázó egység. Ennek a csövecskéibe kell azokat a pipettahegyeket elhelyezni, amelyek belső felülete az egyes vizsgálatokhoz szükséges bevonattal van ellátva (SPR = Solid Phase Receptacle). A pipettázó egység mérés közben keveri és a mérőcsík egyes

küvettaiba átviszi a reagenseket. Hegyes vége átszúrja a mérőcsíkot borító alumíniumfóliát. Az SPR csak függőlegesen mozdul el, és az alatta lévő mérőtálca vízszintes mozgása teszi lehetővé, hogy mindig a megfelelő küvetta kerüljön az SPR alá. A végeredmény leolvasása fluoreszcens mérési elven történik. Az optikai rendszer sín pályán mozgó állványra van szerelve és így lehetővé válik mindegyik mérőcsík optikai küvettajának fluoreszcenciás értékelése.



6. ábra: A miniVIDAS immunanalizátor

A készülék billentyűzete teljesen lapos, ún. fólia-billentyűzet. A hozzá tartozó folyadékkristályos képernyőn keresztül adhatunk utasításokat a készüléknek, mégpedig a jobb oldalon lévő nyomógombok segítségével. Az eredmények a jobb felső sarokban lévő nyomtatón regisztrálhatók. A miniVIDAS berendezés egész működését a központi számítógép irányítja, beleértve a mérési adatok feldolgozását, valamint a mechanikai és optikai rendszerek felügyeletét.

Minden méréshez egy-egy mérőkészlet tartozik, amely a következőket tartalmazza:

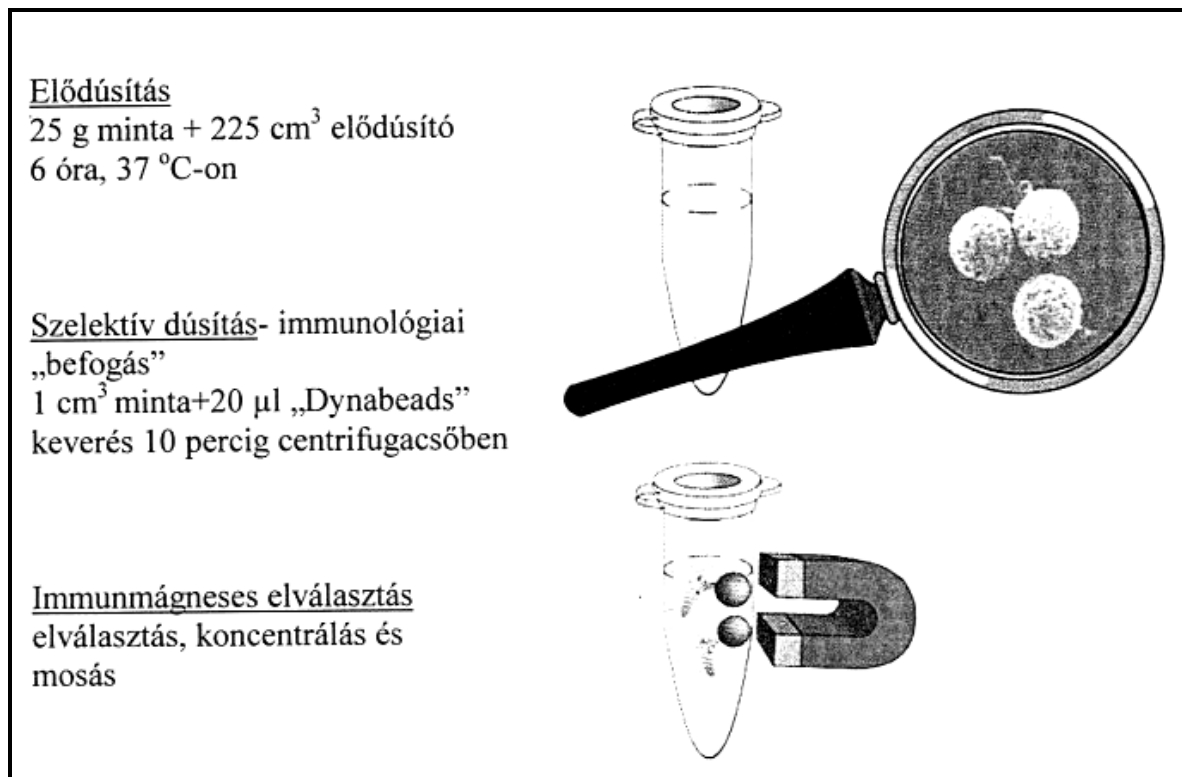
- törzsadat kártya,
- standard minta,
- negatív és pozitív kontroll minták,
- pipetta hegyek és
- mérőcsíkok.

A műszerrel először a törzsadat kártya (Master Card) adatait kell beolvastatni, amely egyben a hitelesítési görbe bevitelét is biztosítja. A hitelesítő mérést a standard mintával (ismert töménységű és RFV értékű oldat, amelyet a hitelesítő görbe beállításához használunk), illetve a pozitív és negatív kontroll mintákkal végezzük. A hitelesítő mérés 14 napig érvényes, ezután meg kell ismételni. Új sorozatszámú mérőkészlet esetén

szintén újra el kell végezni a hitelesítést. Az ELFA módszerrel 48 óra alatt kapunk negatív, illetve esetlegesen pozitív eredményt.

Immunmágneseles technika

A korszerű minőségbiztosítási eljárásokat (pl. HACCP) alkalmazó vállalatoknál azonban 48 óránál rövidebb időre van szükség ahhoz, hogy ezen rendszerek működtetéséhez a mikrobiológusok megfelelő információval rendelkezzenek. Ennek megvalósítására szolgál az immunmágneseles technika (7. ábra), amely az elődúsítás és dúsítás műveletét gyorsítja meg.



7. ábra: Az immunmágneseles szeparáció (IMS) folyamata

A módszernek az a lényege, hogy a keresett mikróbára specifikus antitestet ferromágneseles gyöngyök felületén rögzítik. Ezek a gyöngyök közvetlenül a vizsgálandó élelmiszermintákhoz vagy a belőlük készített szuszpenzióhoz keverhetők. Abban az esetben, ha az élelmiszer tartalmazza a kérdéses mikróbát, akkor az az antigéndetermináns (epitop) csoportja révén hozzákötődik a gyöngyök felületére rögzített antitestekhez.

A ferromágneseles gyöngyök – egy mágnes segítségével – az edény falához vonzhatók, felületük lemosható, majd az így „összegyűjtött” baktériumsejtek – megfelelő tápoldatba (M broth) helyezve – elszaporíthatók. Ezután ELISA vagy ELFA módszerrel a baktériumok

azonosítása elvégezhető. Így a vizsgálat 24 órán belül befejezhető, vagyis a feltehetően pozitív, illetve a negatív eredmény megadható.

Eredmények és tapasztalatok

A Fogyasztóvédelmi Főfelügyelőség mikrobiológiai laboratóriumában közel egy éve rendszeresen végzünk szalmonella meghatározásokat a miniVIDAS készülékkel. Az egyes témavizsgálatoknál kapott eredményeket az 1. táblázat tartalmazza, melyből leolvasható, hogy a 60 húsminta 28 %-a és a száraztészták 5 %-a volt szalmonella pozitív, viszont a fagylaltok között nem találtunk fertőzötteket. Az ELFA módszer és a miniVIDAS készülék megbízhatóságát igazolja, hogy a hagyományos módszerekkel párhuzamosan lefolytatott ellenőrzés során egyszer sem tapasztaltunk hamis pozitív vagy hamis negatív eredményt.

1. táblázat: ELFA módszerrel történő szalmonella meghatározás vizsgálati eredményei

Mintacsoport	Mintaszám (db)	Szalmonella pozitív
Húsok	60	28 %
Száraztészták	60	5 %
Fagylaltok	50	0 %

Végezetül megállapítható, hogy a miniVIDAS készülékkel végezhető, enzimhez kapcsolt immunológiai ELFA eljárás kiválóan alkalmas élelmiszerek szalmonellás fertőzöttségének vizsgálatára. A módszer megbízható, gyors, kevéssé munkaigényes és jelentősen megkönnyíti az élelmiszer-mikrobiológusok munkáját.

IRODALOM

1. PATEL et al.: Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology (1994) 68-75
2. CURIALE et al.: Journal of AOAC (1997) 469-504
3. CZIRÓK: Klinikai és járványügyi bakteriológia (1999) 201-208
4. MiniVIDAS – User Manual (1996)