*Praca oryginalna* *Original paper*

# Ocena efektywności tradycyjnych i molekularnych metod wykrywania pałeczek Salmonella w surowym i ogrzewanym mięsie drobiu

MAREK NOWICKI, JACEK SZCZAWIŃSKI

Katedra Higieny Żywności i Ochrony Zdrowia Publicznego Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Nowicki M., Szczawiński J.

**Evaluation of the efficacy of traditional and molecular methods for Salmonella detection in raw and heated poultry meat**

Summary

**Samples of poultry meat were artificially contaminated with Salmonella and subjected to heat treatment: pasteurization, cooking and sterilization. Subsequently both raw and heated samples were tested for the presence of Salmonella with the standard culture method, according to EN-ISO 6579:2002, and with direct application of PCR as well as PCR with preenrichment incubation. The presence of Salmonella was detected in all samples of raw meat by the use of the culture method and PCR with the preenrichment incubation. Salmonellae were not found in the portion of samples containing a low number of bacteria when direct PCR method was applied. Salmonellae were not detected by the standard culture method and PCR with preenrichment incubation in all heated samples. When direct PCR method was used, the presence of Salmonella was found in all samples subjected to pasteurization, cooking and sterilization at 121°C for 15 and 30 minutes. However, DNA of Salmonella was not detected in the portion of the samples heated at 121°C for 45 minutes and in all samples heated at 130°C for 45 minutes, which was probably caused by thermal degradation of DNA to such an extent that its detection by PCR was impossible. One of the most important advantages of PCR is the short time of Salmonella detection. The most important disadvantage, besides difficulties in differentiating between live and dead bacteria, seems to be the relatively high cost of tests.**

**Keywords: Salmonella, poultry meat**

Obecnie przy oficjalnym, rutynowym badaniu mikrobiologicznym żywności najczęściej wykorzystuje się klasyczne metody hodowlane, które są kosztowne, a także pracochłonne i czasochłonne. Opracowanie i zastosowanie w praktyce łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) umożliwiło wykorzystanie do identyfikacji drobnoustrojów sond genetycznych (7), co spowodowało przełom w diagnostyce mikrobiologicznej. Obecnie dostępnych jest na rynku wiele testów do wykrywania *Salmonella*, opartych na PCR. W badaniach wykorzystuje się dostępne komercyjnie lub opracowane indywidualnie do celów doświadczalnych protokoły izolacji bakteryjnego DNA. Różnice w większości przypadków dotyczą zastosowanych starterów i ich specyficzności oraz odczynników optymalizujących przebieg reakcji. Jedną z największych zalet PCR jest możliwość uzyskania wyniku już po ok. 4-8 godzinach. Podstawową wadą tej metody, z punktu widzenia higieny żywności, jest fakt, że DNA wykryte w próbce produktu spożywczego może pochodzić zarówno z żywych, jak i martwych pałeczek *Salmonella*. Kolejną wadą testów opartych na PCR jest stosunkowo mała ilość materiału pobierana do oznaczeń. Trudności te próbuje się przezwyciężyć poprzez połączenie wstępnej inkubacji próbek żywności w płynnym podłożu z techniką PCR.

Celem badań było określenie i porównanie częstotliwości wykrywania pałeczek *Salmonella* przy wykorzystaniu metody hodowlanej i PCR w:

a) surowym mięsie drobiu, sztucznie zanieczyszczonym tymi drobnoustrojami,

b) mięsie drobiu poddanym obróbce termicznej o różnej intensywności (pasteryzacji, gotowaniu i sterylizacji).

## Materiał i metody

Do badań użyto szczepu *Salmonella enterica* subspecies *enterica* serotyp Enteritidis – szczep nr 271/97 z kolekcji Pracowni Pałeczek Jelitowych Zakładu Bakteriologii PZH w Warszawie.

Mięso drobiowe, pochodzące z mięśni piersiowych kurcząt, rozdrabniano za pomocą maszynki do mielenia mięsa z użyciem siatki o średnicy oczek 4 mm, a następnie dzielono na próbki po 25 g każda, które umieszczano w sterylnych torebkach z polietylenu. Następnie próbki skażano 24-godzinną hodowlą bulionową pałeczek *Salmonella*, dążąc do uzyskania ino-

culum 3,5 × 10, 3,5 × $10^2$ oraz 3,5 × $10^3$ komórek bakteryjnych w 1 próbce. Torebki zamykano próżniowo (Vacuum Verpackungs Maschinen 1000), a następnie poddawano obróbce termicznej – pasteryzacji, gotowaniu i sterylizacji.

Pasteryzację przeprowadzono w ultratermostacie z ciągłym przepływem wody destylowanej i regulacją temperatury z dokładnością ± 0,5°C. Próbki ogrzewano w temperaturze 72°C w ciągu 10 minut. Wartość pasteryzacyjna procesu termicznego wynosiła 11,70. Określano ją za pomocą urządzenia Pasteurization Value Meter APEK AL154PM01/93 W.1.

Gotowanie przeprowadzono w urządzeniu opisanym powyżej, stosując 3 warianty ogrzewania o następujących parametrach: 100°C/10 minut, 100°C/15 minut oraz 100°C/20 minut.

Sterylizację przeprowadzono w autoklawach ciśnieniowych, stosując 4 następujące kombinacje czasu i temperatury: 121°C/15 minut, 121°C/30 minut, 121°C/45 minut, 130°C/30 minut.

Badanie metodą hodowlaną przeprowadzano zgodnie z normą EN-ISO 6579: 2002 (2). Po przednamnażaniu w nieselektywnej pożywce płynnej materiał przenoszono do namnażającej pożywki selektywnej RVS, którą inkubowano w temperaturze 41,5°C przez 24 godziny. Z otrzymanej hodowli wykonywano przesiewy na selektywną pożywkę stałą – agar z ksylozą i lizyną (XLD), którą inkubowano w temperaturze 37°C przez 24 godziny.

Metodę PCR stosowano w dwojaki sposób: bezpośrednio, tj. bez przednamnażania drobnoustrojów zawartych w badanym materiale i po ich przednamnażaniu w zbuforowanej wodzie peptonowej.

Izolację genomowego DNA przeprowadzono przy użyciu zestawu Genomic DNA Prep Plus (A&A Biotechnology). Do reakcji PCR zostały użyte komercyjne zestawy firmy DNA-Gdańsk II s.c. Zestaw diagnostyczny PCR – Salmonella.

Amplifikacja prowadzona była przy użyciu termocyklera Mastercykler personal firmy Eppendorf. Dla każdej serii badań wykonano kontrolę pozytywną, przygotowaną z materiału dostarczonego wraz z zestawem oraz kontrolę negatywną. Jako kontroli negatywnej użyto roztworu TE. Rozdział produktów reakcji PCR został wykonany metodą elektroforezy w 2% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny przy napięciu 10 V/cm żelu. Elektroforezę przeprowadzono przy użyciu zestawu Wide Mini-Sub cell GT firmy Bio-Rad. Jako źródło napięcia wykorzystano zasilacz Power Pac 200 firmy Bio-Rad. Na żel agarozowy nanoszono próbki przygotowane przez zmieszanie 3 µl barwnika i 10 µl mieszaniny reakcyjnej PCR badanej próbki. Marker wielkości fragmentów DNA przygotowywano przez zmieszanie 2 µl barwnika i 5 µl markera DNA M100-500. Produkty reakcji PCR były uwidaczniane przez wzbudzenie fluorescencji przy użyciu transiluminatora UV. Za wynik pozytywny testu uznawano obecność w żelu produktu reakcji PCR o wielkości 429 par zasad. Archiwizacja wyników prowadzona była przy pomocy cyfrowego aparatu fotograficznego Minolta Dimage Z1.

Przy określaniu obecności pałeczek Salmonella w mięsie drobiowym metodą PCR po etapie przednamnażania próbki o masie 25 g dodawano do 225 ml zbuforowanej wody peptonowej, którą inkubowano w temperaturze 37°C w ciągu 18 godzin. Nastepnie pobierano 1 ml hodowli, którą odwirowywano. Osad zawieszano w 100 µl roztworu TE, do którego dodawano 200 µl roztworu LT i 20 µl roztworu proteinazy K. Uzyskaną mieszaninę inkubowano w 37°C przez 30 minut. Dalej postępowano zgodnie z podanym wcześniej opisem metody PCR bez przednamnażania.

## Wyniki i omówienie

Na podstawie wyników dotyczących surowego mięsa drobiu (tab. 1) można stwierdzić, że metodą hodowlaną oraz metodą PCR z przednamnażaniem wykryto salmonelle we wszystkich celowo zanieczyszczanych próbkach niezależnie od poziomu inokulum. Znacznie gorsze wyniki uzyskano przy metodzie PCR stosowanej bezpośrednio. W przypadku tej metody występuje wyraźny związek pomiędzy liczbą komórek salmonelli wprowadzonych do próbek i liczbą wyników pozytywnych. Im niższy był poziom inokulum, tym większa liczba próbek, w których nie stwierdzono salmonelli. Przyczyną tego faktu wydaje się mała masa materiału pobieranego do oznaczeń metodą PCR. Przy pobieraniu z próbki zanieczyszczonego mięsa 20-miligramowej naważki może się zdarzyć, że przy niewielkiej liczbie pałeczek *Salmonella* ich obecność pozostanie nie wykryta. Dopiero przy najwyższym poziomie inokulum (3,5 × $10^3$ na 25 g) we wszystkich próbkach stwierdzono obecność salmonelli (tab. 1).

**Tab. 1. Wpływ inokulum i metody oznaczania na wyniki badania surowego mięsa drobiu w kierunku obecności pałeczek *Salmonella***

| Inokulum – liczba pałeczek *Salmonella* w 25 g mięsa | Liczba próbek pozytywnych/liczba próbek badanych<br>Metoda oznaczania obecności pałeczek *Salmonella* | | |
|---|---|---|---|
| | metoda hodowlana – według EN-ISO 6579:2002 | PCR – metoda bezpośrednia | PCR – metoda z przednamnażaniem |
| 0 (kontrola) | 0/9 | 0/9 | 0/9 |
| 3,5 × 10 | 9/9 | 3/9 | 9/9 |
| 3,5 × $10^2$ | 9/9 | 8/9 | 9/9 |
| 3,5 × $10^3$ | 9/9 | 9/9 | 9/9 |

Wysoką zgodność metody hodowlanej z metodą PCR połączoną z przednamnażaniem (76%) obserwował również Feder i wsp. (5) podczas badań terenowych w kierunku obecności pałeczek *Salmonella* w kale świń. Zdaniem niektórych autorów (1, 9, 11), połączenie metody PCR i przednamnażania daje nawet lepsze rezultaty niż metoda hodowlana. Czułość metody zależy również od wizualizacji produktów amplifikacji. Stosując elektroforezę agarozową upraszcza się procedurę, jednak, jak podają niektórzy autorzy, można zwiększyć jej czułość przez zastosowanie PCR-OLA – procedury łączenia oligonukleotydów i uwidocznienia produktów w immunoenzymatycznej reakcji ELISA (11). Specyficzność i czułość metody PCR z przednamnażaniem w badaniach międzylaboratoryjnych określono na 97,5% i zaproponowano ją jako standard międzynarodowy (6).

Na podstawie wyników dotyczących ogrzewanego mięsa drobiu (tab. 2) można stwierdzić, że we wszystkich próbkach poddanych obróbce termicznej nie stwierdzono obecności salmonelli zarówno metodą hodowlaną, jak i metodą PCR połączoną z przednamnażaniem. Stosując bezpośrednią metodę PCR uzyskano wyniki pozytywne we wszystkich próbkach poddanych pasteryzacji, gotowaniu oraz sterylizacji w temp. 121°C przez 15 i 30 minut. W próbkach sterylizowanych w temp. 121°C przez 45 minut pojawiły się wyniki ujemne przy niskim poziomie inokulum, natomiast przy ogrzewaniu w temp. 130°C przez 30 minut wszystkie wyniki były ujemne (tab. 2), co było zapewne spowodowane termiczną degradacją DNA.

**Tab. 2. Wpływ rodzaju obróbki termicznej, inokulum i metody oznaczania na wyniki badania ogrzewanego mięsa drobiu w kierunku obecności pałeczek *Salmonella***

| Sposób ogrzewania | Inokulum – liczba pałeczek *Salmonella* w 25 g mięsa | Liczba próbek pozytywnych/liczba próbek badanych<br>Metoda oznaczania obecności pałeczek *Salmonella* | | |
|---|---|---|---|---|
| | | metoda hodowlana – według EN-ISO 6579:2002 | PCR – metoda bezpośrednia | PCR – metoda z przednamnażaniem |
| Kontrola (bez ogrzewania) | $3,5 \times 10^2$ | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 3/3 | 3/3 | 3/3 |
| Pasteryzacja (72°C/10 min. PV 11,70) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Gotowanie 1 (100°C/10 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Gotowanie 2 (100°C/15 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Gotowanie 3 (100°C/20 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Sterylizacja 1 (121°C/15 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Sterylizacja 2 (121°C/30 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Sterylizacja 3 (121°C/45 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 1/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 3/3 | 0/3 |
| Sterylizacja 4 (130°C/30 min.) | $3,5 \times 10^2$ | 0/3 | 0/3 | 0/3 |
| | $3,5 \times 10^3$ | 0/3 | 0/3 | 0/3 |

Uzyskane wyniki wykazują, że wszystkie rodzaje stosowanej obróbki termicznej doprowadzały do pełnej inaktywacji salmonelli oraz że pozytywne wyniki uzyskane metodą bezpośrednią PCR odnoszą się do DNA pochodzącego z martwych komórek bakteryjnych, które nie stanowią już zagrożenia dla zdrowia konsumentów. Podobne prawidłowości obserwowali inni autorzy (4).

Należy podkreślić, że zastosowanie w praktyce równoległego badania próbek żywności tradycyjną metodą hodowlaną oraz metodą PCR umożliwiłoby nie tylko uzyskanie informacji, czy pałeczki *Salmonella* przeżyły obróbkę termiczną, ale też czy były one obecne w surowcach i półproduktach przed ogrzewaniem. Wyniki przedstawione w tab. 2 wskazują, że uzyskanie takiej informacji byłoby możliwe w przypadku próbek poddanych pasteryzacji, gotowaniu i sterylizacji w temperaturze 121°C w ciągu 15 i 30 minut. Bardziej intensywna obróbka termiczna może doprowadzać do uszkodzenia DNA salmonelli w stopniu uniemożliwiającym jego wykrycie metodą PCR.

Interesujący wydaje się fakt, że stosując metodę tradycyjną oraz metodę PCR z przednamnażaniem stwierdzono pełną zgodność uzyskanych wyników, tj. obecność salmonelli jedynie w próbkach kontrolnych i ich brak we wszystkich próbkach ogrzewanych. Wydaje się to świadczyć o tym, że podczas procesu przednamnażania dochodzi do takiej dezintegracji DNA inaktywowanych salmonelli, że nie można go wykryć metodą PCR. W przeciwnym wypadku powinny wystąpić wyniki pozytywne i niezgodność z wynikami uzyskanymi metodą hodowlaną. Zdaniem niektórych autorów, przy stosowaniu przednamnażania i PCR może mieć miejsce pojawianie się wyników fałszywie pozytywnych (3, 10). Wydaje się, że do wyjaśnienia tego zjawiska potrzebne są dalsze badania.

Obserwowane ostatnio postępy w normalizacji metod wykrywania patogenów w żywności opartych na PCR (np. ISO 20837:2006, ISO 20838:2006) i dynamiczny rozwój prac badawczych w tej dziedzinie z pewnością doprowadzą do masowego stosowania metod molekularnych w rutynowej kontroli żywności i pasz. Jedną z najważniejszych zalet tych metod jest krótki czas wykonywania oznaczeń, a najistotniejszym ograniczeniem, oprócz trudności ze zróżnicowaniem żywych i martwych bakterii, wydają się obecnie stosukowo wysokie koszty. Według własnych wyliczeń, oznaczenie obecności pałeczek *Salmonella* w 25 próbkach mięsa metodą hodowlaną wymaga 74 h, metodą PCR – 9 h, a metodą PCR połączoną z przednamnażaniem – 27 h. Koszt jednego oznaczenia z wykorzystaniem metody PCR jest od 4,8 (metoda bezpośrednia) do 4,9 (PCR z przednamnażaniem) raza wyższy od kosztów oznaczenia wykonanego tradycyjną metodą hodowlaną (8).

## Piśmiennictwo


1. *Aabo S., Andersen J. K., Olsen J. E.*: Research note: detection of Salmonella in minced meat by the polymerase chain reaction method. Lett. appl. Microbiol. 1995, 2, 180-182.
2. *Anon.*: Polska Norma PN-EN ISO 6579:2002: Mikrobiologia żywności i pasz, Horyzontalna metoda wykrywania Salmonella spp. (ISO 6579:2002). Polski Komitet Normalizacyjny, Warszawa 2002.
3. *Czajkowska D., Sikorska I., Witkowska-Gwiazdowska A.*: Problemy w wykrywaniu bakterii Salmonella w żywności. Przem. Spoż. 2002, 56, 2-6.
4. *Dąbrowski W., Grochulska I., Mędrala D., Czeszejko K.*: The Effect of Food--Processing Conditions on Detection of The iap Gene of Listeria Monocytogenes Performed Using Polymerase Chain Reaction Technique (PCR), Elect. J. Pol. Agr. Univ., Fd Sci. Technol. 2002, 5, issue 2.
5. *Feder I., Nietfeld I., Jerome C., Galland J., Yeary T., Sargeant J. M., Oberst R., Tamplin M. L., Luchansky J. B.*: Comparison of cultivation and pcr-hybridization for detection of Salmonella in porcine fecal and water samples. J. Clin. Microbiol. 2001, 39, 2477-2484.
6. *Malorny B., Hoorfar J., Hugas M., Heuvelink A., Fach P., Ellerbroek L., Bunge C., Dorn C., Helmuth R.*: Interlaboratory diagnostic accuracy of a Salmonella specific PCR-based method. Int. J. Fd Microbiol. 2003, 89, 241-249.
7. *Mullis K. B., Faloona F.*: Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase--catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 1987, 155, 335-350.
8. *Nowicki M.*: Ocena efektywności tradycyjnych i molekularnych metod wykrywania pałeczek Salmonella w żywności pochodzenia zwierzęcego. Praca dokt. Wydz. Medycyny Weterynaryjnej, SGGW, Warszawa 2005.
9. *Piknova L., Stefanovicova A., Drahovska H., Sasik M., Kuchta L.*: Detection of Salmonella in food, equivalent to ISO 6579, by a three-days polymerase chain reaction – based method. Fd Control 2002, 13, 191-194.
10. *Rys P. N., Persing D. H.*: Preventing False Positives: Quantitive Evaluation of Three Protocols for Inactivation of Polymerase Chain Reaction Amplification Products. J. Clin. Microbiol. 1993, 31, 2356-2360.
11. *Stone G. G., Oberst R. D., Hays M. P., Mcvey S., Galland J. C., Curtiss R., Kelly S. M., Chengappa M. M.*: Detection of Salmonella Typhimurium from Rectal Swabs of Experimentally Infected Beagles by Short Cultivation and PCR--Hybridization. J. Clin. Microbiol. 1995, 33, 1292-1295.


**Adres autora: dr Marek Nowicki, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: marek_nowicki@sggw.pl**