

Wykrywanie pałeczek *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* sp. w rybach i produktach rybnych z użyciem aparatu mini Vidas

ANNA ZADERNOWSKA, ŁUCJA ŁANIEWSKA-TROKENHEIM, WIOLETA CHAJĘCKA

Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności Wydziału Nauki o Żywności UWM, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn

Zadernowska A., Łaniewska-Trokenheim Ł., Chajęcka W.

Detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. rods in fish and fish products using the mini Vidas system

Summary

The aim of the study was to evaluate the level of microbial contamination with *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* sp. rods of fresh fish, smoked fish and sushi. Samples were purchased from retailers and restaurants. Indications were performed using a standard method, i.e. a horizontal method for detection and quantitative determination of *Listeria monocytogenes* according to PN-EN ISO 11290-1:1999 / A1: 2005 and *Salmonella* sp. according to the standard ISO-6579: 2003 and the mini Vidas immunoassay (bioMérieux) method. Mini-VIDAS is a fully automated system that uses fluorescent ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) technology for detection of pathogen antigens in food. It can be a rapid screening method alternative to time consuming classical ISO procedures based on isolation and identification. The mini-VIDAS-LMO detected 4 positive samples. The classical method confirmed these results for two samples. The mini-VIDAS-SLM detected 2 positive samples but they were excluded according to the classical method as a confirmation procedure. The study showed that the mini-Vidas can be used for such studies; however, it is necessary to confirm the results of the standard method, because it can give false positive results.

Keywords: mini Vidas, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* sp., fish

Spożycie ryb w Polsce kształtuje się na poziomie około 11-12 kg ryb na mieszkańca, co nie odbiega znacząco od konsumpcji w Niemczech, Austrii, Czechach i na Łotwie. W ostatnich latach nastąpiły znaczne zmiany w asortymencie spożywanych ryb i produktów rybnych. Obserwuje się spadek spożycia śledzia i makreli na korzyść tuńczyka oraz ryb słodkowodnych, m.in. pstrąga. Szczególnie jednak wzrosła podaż łososia (19). Polacy, choć powoli, przekonują się również do owoców morza, o czym świadczy ich duży asortyment w sklepach rybnych oraz pojawienie się licznych orientalnych restauracji oferujących sushi.

Mikroflora ryb i produktów rybnych zależy od wielu czynników: zanieczyszczenia bakteryjnego surowca, przebiegu procesu technologicznego i warunków przechowywania. Do wtórnych zanieczyszczeń dochodzi często podczas sprawiania ryb, transportu, kontaktu z materiałem do pakowania (18). Ryby mogą być źródłem zróżnicowanej mikroflory saprofitycznej i chorobotwórczej. Do najczęściej izolowanych patogenów należą *Listeria monocytogenes* i *Salmonella* sp. (15). Po 14 dniach przechowywania w temperaturze 7°C w mięsie ryb liczebność komórek *Listeria monocyto-*

genes może sięgać rzędu 10⁸ jtk/g (20), podczas gdy dawka zakaźna u osób z obniżoną odpornością mięści się w granicach 10¹-10⁵ komórek (16). Liczebność komórek *L. monocytogenes* w rybach i produktach rybnych zależy od wielu czynników, m.in. stężenia NaCl, temperatury, aktywności wody i dostępu powietrza. Azotyny w stężeniach dopuszczonych przepisami nie hamują jej rozwoju (21). Jak wynika z danych piśmiennictwa, występowanie *L. monocytogenes* w produktach wędzonych na zimno jest znacznie większe niż wędzonych na gorąco, z uwagi na fakt, że komórki bakteryjne nie są niszczone podczas procesu technologicznego. W produktach wędzonych *Listeria monocytogenes* może występować nie tylko jako pozostałość pierwotnej mikroflory, ale także może być skutkiem wtórnych zanieczyszczeń, do których dochodzi chociażby podczas plasterkowania. Obserwowano także wyższy odsetek zakażonych ryb, które były pakowane próżniowo w porównaniu z produktami nie poddanymi temu zabiegowi (14). Bardzo często już świeże ryby są zanieczyszczone *L. monocytogenes* i pomimo niskiej temperatury przechowywania oraz pakowania próżniowego populacja komórek może

osiągać wysoką liczebność (22). Istotny wpływ na rozwój *Listeria sp.* w mięsie ryb wywierają także inne drobnoustroje, szczególnie z rodzaju *Lactobacillus sp.* i *Carnobacterium sp.*, które, produkując kwas mlekowy i bakteriocyny, mogą hamować rozwój bakterii chorobotwórczych (17).

W ostatnich latach rosnąca konsumpcja produktów rybnych mało przetworzonych, gotowych do spożycia może prowadzić do wzrostu liczby ognisk salmonellozy. Z racji tego, iż naturalnym miejscem występowania *Salmonella sp.* jest przewód pokarmowy ludzi i zwierząt (1), obecność tych pałeczek zarówno w środowisku wodnym, jak i lądowym jest powszechna (23). Łagodne warunki obróbki technologicznej ryb i owoców morza, przy jednoczesnym bogactwie składników pokarmowych mogą prowadzić do szybkiego namnażania się tych bakterii.

Standardowe metody wykrywania obecności pałeczek *Salmonella sp.* i *Listeria monocytogenes* według PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz PN-ISO-6579:2003 w produktach spożywczych wymagają od 4 do 5 dni w celu uzyskania wstępnych pozytywnych lub negatywnych wyników i mogą trwać do 7 dni w zależności od potrzeby realizacji biochemicznych i serologicznych potwierdzeń (3). Jako alternatywę czasochłonnych badań opracowuje się nowe metody w celu przyspieszenia wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności. Między innymi stosuje się metody hybrydyzacji (4), reakcje łańcuchowe polimerazy (3, 4) i wiele metod opartych na reakcjach immunoenzymatycznych np. system mini VIDAS (bioMérieux).

Celem podjętych badań było wykrycie obecności *Listeria monocytogenes* i *Salmonella sp.* w rybach surowych, wędzonych oraz sushi metodą immunoenzymatyczną z zastosowaniem aparatu mini Vidas oraz metodą klasyczną w oparciu o obowiązujące normy ISO.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono ogółem na 112 próbkach ryb oraz sushi. próbki do badań pochodziły ze sprzedaży detalicznej oraz restauracji. Przebadano 34 próbki ryb wędzonych na zimno, 38 próbek ryb wędzonych na ciepło, 34 próbki ryb surowych (ze względu na możliwość przyrządzenia z nich sushi), 14 próbek spośród ryb pakowanych w zmodyfikowanej atmosferze oraz 26 próbek sushi. Wszystkie próbki były posiewane w dniu zakupu. Zastosowano tradycyjną metodę hodowlaną, tj. horyzontalną metodę wykrywania i ilościowego oznaczania *Listeria monocytogenes* wg normy PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 oraz *Salmonella sp.* wg normy PN-ISO-6579:2003 oraz metodą alternatywną z wykorzystaniem immunoanalizatora mini Vidas (bioMérieux).

Testy Vidas służą do wykrywania antygenów na zasadzie immunoenzymatycznej, w których wynik oparty jest o odczyt fluorescencyjny (ELFA). Zarówno w przypadku wykrywania *Salmonella sp.*, jak i *L. monocytogenes* zasada testu opiera się na określeniu specyficznych antygenów

obecnych w badanej próbce. Metoda oparta jest o wieloetapową reakcję. W skład zestawu wchodzi tzw. paski testowe, czyli zestaw studzienek ze szczelnie zamkniętymi w nich odczynnikami oraz pipetki, których wewnętrzne ścianki opłaskowane są przeciwciałami przeciwko określonemu antygenom. Do pierwszej studzienki wprowadza się 0,5 ml badanej próbki po etapie namnażania i pasek wkłada się do immunoanalizatora. Zawiesina reakcyjna jest cyklicznie podciągana i opuszczana przez pipetki. Przeciwciała łączą się z antygenami obecnymi w próbce i znakowane są fosfatazą alkaliczną. Podczas ostatniego etapu pipetka podciąga substrat (fosforan-4-metylobelliferylu). Koniugat enzymu katalizuje hydrolizę tego substratu do produktu fluorescencyjnego. Intensywność fluorescencji mierzona jest przy długości fali 450 nm. Na jej podstawie urządzenie wylicza wynik testu i interpretuje go jako dodatni lub ujemny. Zarówno w metodzie klasycznej, jak i przy użyciu aparatu mini Vidas pierwszym etapem oznaczenia jest przednamnażanie próbki w wodzie peptonowej -37°C przez 18 ± 2 h, (dla *Salmonella sp.*) oraz wstępne namnażanie selektywne na podłożu Pół-Frasera i Fradera (dla *L. monocytogenes*).

Procedura badawcza z użyciem testów Vidas przebiegała zgodnie z zaleceniami producenta. Do oznaczania *L. monocytogenes* zastosowano test LMO II. Po etapie wstępnego namnażania 0,5 ml hodowli przenoszono do wchodzącego w skład zestawu paska testowego, a następnie ogrzewano do temperatury 100°C przez 15 minut i ochłodzono. Pasek umieszczano w aparacie, a dalsze czynności były już wykonywane automatycznie. Po 45 minutach otrzymano wyniki.

Zgodnie z metodyką normy ISO PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005, po etapie namnażania wykonywano posiewy izolacyjne na podłoża Oxford (Merck) i ALOA (Merck) i inkubowano w 37°C przez 48 ± 3 h. Charakterystyczne kolonie przesiewano na agar sojowy. Następnie identyfikowano szczepy. Zakres badań potwierdzających obejmował barwienie metodą Grama, test na katalazę, zdolność ruchu, fermentację cukrów: ramnozy i ksylozy oraz test na hemolizę na agarze krwawym.

Do oznaczania *Salmonella sp.* posłużył test SLM. Po inkubacji naważek na wodzie peptonowej pobierano $0,1 \text{ cm}^3$ i posiewano do 10 ml pożywki selektywnej Rapaporta-Vassiliadisa (Merck) z soją oraz do pożywki MKTTn (Merck). Po inkubacji w temperaturze 37°C przez 48 godzin przenoszono $0,1 \text{ ml}$ bulionu MKTTn do 10 ml bulionu M ogrzanego wstępnie do 41°C . Inkubowano przez 6 godzin w temperaturze 41°C . Następnie $0,5 \text{ ml}$ hodowli przeniesiono do studzienki paska testowego i ogrzewano przez 15 minut w bloku grzejnym Vidas Heat and Go. Wykonano test Vidas SLM.

W oparciu o metodykę normy ISO PN-ISO-6579:2003, po etapie przednamnażania wykonywano posiewy na podłoża selektywne: XLD (Merck) i Hektoen (Merck) i inkubowano przez 48 ± 3 h w temperaturze 37°C .

Wyniki i omówienie

Po przeprowadzeniu analizy 112 próbek ryb surowych, wędzonych i dań z ryb surowych (sushi) obecność *L. monocytogenes* metodą klasyczną wykryto

Tab. 1. Porównanie wyników uzyskanych przy użyciu dwóch metod oznaczania obecności *L. monocytogenes* i *Salmonella* sp. w rybach i daniach z ryb

Badany produkt	Liczba próbek	Liczba próbek dodatnich			
		mini VIDAS		metoda klasyczna	
		<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> sp.	<i>L. monocytogenes</i>	<i>Salmonella</i> sp.
Ryby wędzone na zimno, pakowane w atmosferze zmodyfikowanej	14	3	–	2	–
Ryby wędzone na zimno	38	–	–	–	–
Ryby wędzone na ciepło	34	1	–	–	–
Ryby surowe	6	–	1	–	–
Sushi	26	–	1	–	–

w 2 próbkach ryb wędzonych na zimno pakowanych w atmosferze zmodyfikowanej. Przy użyciu aparatu mini Vidas pałeczki te wykryto w 3 próbkach ryb wędzonych na zimno pakowanych w atmosferze zmodyfikowanej oraz 1 próbce z ryb wędzonych na ciepło. Wyniki fałszywie dodatnie, otrzymane przy zastosowaniu aparatu mini Vidas, mogły być spowodowane występowaniem innych gatunków bakterii rodzaju *Listeria*, których obecność potwierdził wzrost na podłożach ALOA i Oxford. Wynik fałszywie dodatni potwierdza konieczność wykonywania posiewów potwierdzających po analizie mini Vidas.

Procedura walidacji AFNOR dla aparatu mini Vidas wskazuje, że optymalny poziom wykrywalności *L. monocytogenes* mieści się w przedziale pomiędzy 4×10^5 a 10^6 kom./ml. W celu określenia minimalnego poziomu wykrywalności przebadano 82 próbki żywności zanieczyszczonej *L. monocytogenes*. Przy zastosowaniu mini Vidas wykryto obecność patogenu w 71 próbkach, z czego metodą klasyczną otrzymano potwierdzenie dla 66 próbek. Żadna z metod nie wykryła tych pałeczek w 5 zanieczyszczonych próbkach. Powyższe wyniki wskazują na brak metody skutecznej w 100% i jednocześnie konieczność ciągłego doskonalenia metod wykrywania patogenów.

W żadnej próbce ryb surowych ani w sushi nie stwierdzono obecności pałeczek *Listeria monocytogenes*. Dane literaturowe określają częstość występowania *L. monocytogenes* w granicach od 0,1% do 10% (9, 11). Często pojawiają się doniesienia o zanieczyszczeniach *L. monocytogenes* podczas procesu produkcyjnego np. wędzenia. Bywa, że po przebadaniu świeżych ryb nie stwierdzano obecności patogenu, który wykrywany był w tych samych rybach po procesie wędzenia (8, 10). Pojawienie się tych zanieczyszczeń może być spowodowane zanieczyszczeniami powierzchni w zakładach przetwórczych, z którymi stykają się surowce. Punktem krytycznym jest też proces filetowania (18).

Z uwagi na bardziej drastyczne warunki technologiczne podczas przygotowywania ryb wędzonych na gorąco, najczęściej zanieczyszczenie jest niższe niż ryb wędzonych na zimno. Potwierdzają to wyniki badań własnych – w 43 badanych próbkach nie stwierdzono obecności tych pałeczek – oraz dane piśmiennictwa,

których autorzy (1, 7) są zgodni, że mniejsze zanieczyszczenie pałeczkami *L. monocytogenes* odnotowuje się w rybach wędzonych na gorąco. Przedstawione wyniki badań świadczą, że wędzenie na gorąco, przeprowadzone w temperaturze 60°C przez 30 min. znacznie obniża poziom zanieczyszczenia przetworów rybnych przez *L. monocytogenes*.

Zakażenia ryb, których źródłem byłyby pałeczki *Salmonella* sp. są stosunkowo rzadziej notowane aniżeli zakażenia wywołane przez *L. monocytogenes*. Niniejsze badania wykazały brak zanieczyszczeń pałeczkami z rodzaju *Salmonella* sp. we wszystkich 112 przebadanych próbkach. Analiza mini Vidas wskazywała na obecność *Salmonella* sp. w próbce ryb surowych i sushi (tab. 1). Fałszywie dodatnie wyniki mogły być spowodowane obecnością licznej mikroflory towarzyszącej z rodziny *Enterobacteriaceae*, co potwierdzano w innych badaniach własnych. Inni autorzy również wskazywali na niewielkie zanieczyszczenie pałeczkami *Salmonella* sp. ryb i produktów rybnych (6, 7, 24). Tak niskiej częstotliwości występowania *Salmonella* sp. w rybach i produktach rybnych nie należy jednak bagatelizować, szczególnie przy zmieniającym się rynku tych produktów i systematycznym zwiększaniu asortymentu ryb mało przetworzonych i produktów zawierających surowe ryby i owoce morza (2, 18).

Podsumowanie

Monitorowanie zanieczyszczenia bakteriami patogennymi ryb i produktów rybnych jest konieczne, co potwierdziły przeprowadzone badania. Aparat mini Vidas może być wykorzystywany do tego typu badań, jednak niezbędne jest potwierdzenie wyników metodą standardową, ponieważ może on dawać wyniki fałszywie dodatnie. Nie stwierdzono jednak sytuacji odwrotnej, kiedy otrzymano wynik dodatni metodą standardową, a brak było takiego wyniku przy badaniu aparatem mini Vidas.

Piśmiennictwo

1. Ben Embarek P. K.: Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 1994, 23, 17-34.
2. Chatopadhyay P.: Fish – catching and handling. Robinson R. K.: *Encyclopedia of Food Microbiology*. Academic Press, London 2000, 2, 1547.
3. Elizaquivel P., Gabaldon J. A., Nazar R.: Comparative evaluation of RTi-PCR and Mini-VIDAS SLM system as predictive tools for the routine

- detection of *Salmonella* spp. in naturally contaminated food products. Food Anal. Methods 2009, 2, 102-109.
4. Feder I., Nietfeld J. 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.
 5. Ferreti R., Mannazzu I., Coccolin L., Comi G., Clementi F.: Twelve-hour PCR-based method for detection of *Salmonella* spp. in food. Appl. Environ. Microbiol. 2001, 67, 977-978.
 6. González-Rodríguez M., Sanz J., Santos J., Otero A., García-López M.: Numbers and types of microorganisms in vacuum-packed cold-smoked freshwater fish and the retail level. Int. J. Food Microbiol. 2002, 77, 161-168.
 7. Heintz M. L., Johnson J. M.: The incidence of *Listeria* spp., *Salmonella* spp., and *Clostridium botulinum* in smoked fish and shellfish. J. Food Prot. 1998, 61, 318-323.
 8. Hoffman A. D., Gall K. L., Norton D. M., Wiedmann M.: *Listeria monocytogenes* contamination patterns for the smoked fish processing environment and for raw fish. J. Food Prot. 2003, 66, 52-60.
 9. Jemmi T., Keusch A.: Occurrence of *Listeria monocytogenes* in freshwater fish farms and fish-smoking plants. Food Microbiol. 1994, 11, 309-316.
 10. Jin M., Kusunoki K., Ikejima N., Arai T., Irikura Y., Suzuki K., Hirata I., Kokubo Y., Maruyama T.: Incidence of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon. Jpn. J. Food Microbiol. 1994, 11, 107-111.
 11. Johansson T., Rantala L., Palmu L., Honkanen-Buzalski T.: Occurrence and typing of *Listeria monocytogenes* strains in retail vacuum-packed fish products and production plant. Int. J. Food Microbiol. 1999, 47, 111-119.
 12. Jørgensen L. V., Huss H. H.: Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated seafood. Int. J. Food Microbiol. 1998, 42, 127-131.
 13. Metz H.: Water as a vector of infection: waterborne bacteria. Zentralbl. Bakteriologie. Mikrobiol. Hyg. B. 1980, 172, 255-274.
 14. Miettinen M. K., Palmu L., Björkroth K. J., Korkeala H.: Prevalence of *Listeria monocytogenes* in broilers at the abattoir, processing plant and retail level. J. Food Prot. 2001, 64, 994-999.
 15. Nowotny L., Dvorska L., Lorencova A., Beran V., Pavlik I.: Fish a potential source of bacterial pathogens for human beings. Vet. Med. – Czech. 2004, 49, 343-358.
 16. Osek J.: *Listeria monocytogenes* – groźny czynnik zakażeń pokarmowych. Medycyna Wet. 2005, 61, 243-248.
 17. Pilet M. F., Dousset X., Barre' R., Novel G., Desmazeaud M., Piard J. C.: Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 1994, 58, 256-262.
 18. Rorvick L. M.: *Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry. Int. J. Food Microbiol. 2000, 62, 183-190.
 19. Seremak-Bulge J.: Rynek i spożycie ryb w 2007 roku oraz perspektywy ich rozwoju. Przegląd rybacki. 2007, 10, 16-19.
 20. Sikorski Z. E.: *Listeria monocytogenes* w rybach wędzonych. Medycyna Wet. 1996, 52, 295-297.
 21. Sikorski Z. E.: The nutritional and safety aspects of smoked fish. Bull. Sea Fish. Inst. 1998, 1, 137.
 22. Sun E., Aristimun C., Fernandez-Galian B.: Activity of smoke wood condensates against *Aeromonas hydrophila* and *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged, cold-smoked rainbow trout stored at 4°C. Food Res. Int. 2003, 36, 111-116.
 23. Toze S.: Reuse of effluent water – benefits and risks. Agric. Water Manage 2006, 80, 147-159.
 24. Vishwanath W., Lillabati H., Bijen M.: Biochemical, nutritional and microbiological quality of fresh and smoked mudeel fish *Monopterus albus*: a comparative study. Food Chem. 1998, 61, 153-156.

Adres autora: dr inż. Anna Zadernowska, pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn; e-mail: anna.zadernowska@uwm.edu.pl