

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

Érkezett: 2018. október – Elfogadva: 2019. január

Real-Time PCR készülék bevezetése a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal debreceni laboratóriumában Salmonella kimutatás 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 *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 precízse 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 képesek

A kép illusztráció / Picture is for illustration only
Fotó/Photo: Pixabay

¹ Debreceni Egyetem Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
² Élelmiszerlánc-biztonsági Centrum Nonprofit Kft.
³ DE MÉK ÉTI

túlnéni 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 septicémiát 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 (fekél – orál terjedés) [13]. Kockázatot jelenthet továbbá a fertőzött, nem megfelelően hőkezelt húsrak 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 baromfi szektor 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 jeleknek 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 1x20 ml
 - o B reagens: fluoreszcens próba 1x0,55 ml
 - o C reagens: amplifikációs mix 1x4,4 ml
 - o D reagens: negatív PCR kontroll 1x0,5 ml
 - o E reagens: pozitív PCR kontroll 1x0,25 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 minta előkészítés 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-csővekbe 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 mellékelte 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 45µl mennyiséget a PCR plate mélyedéseibe:

- „B” reagensből 5µl/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 jelenség eléréséhez 49 PCR ciklusra volt szükség.

Az általunk használt készülék 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 logaritmus 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:

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

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

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

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

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

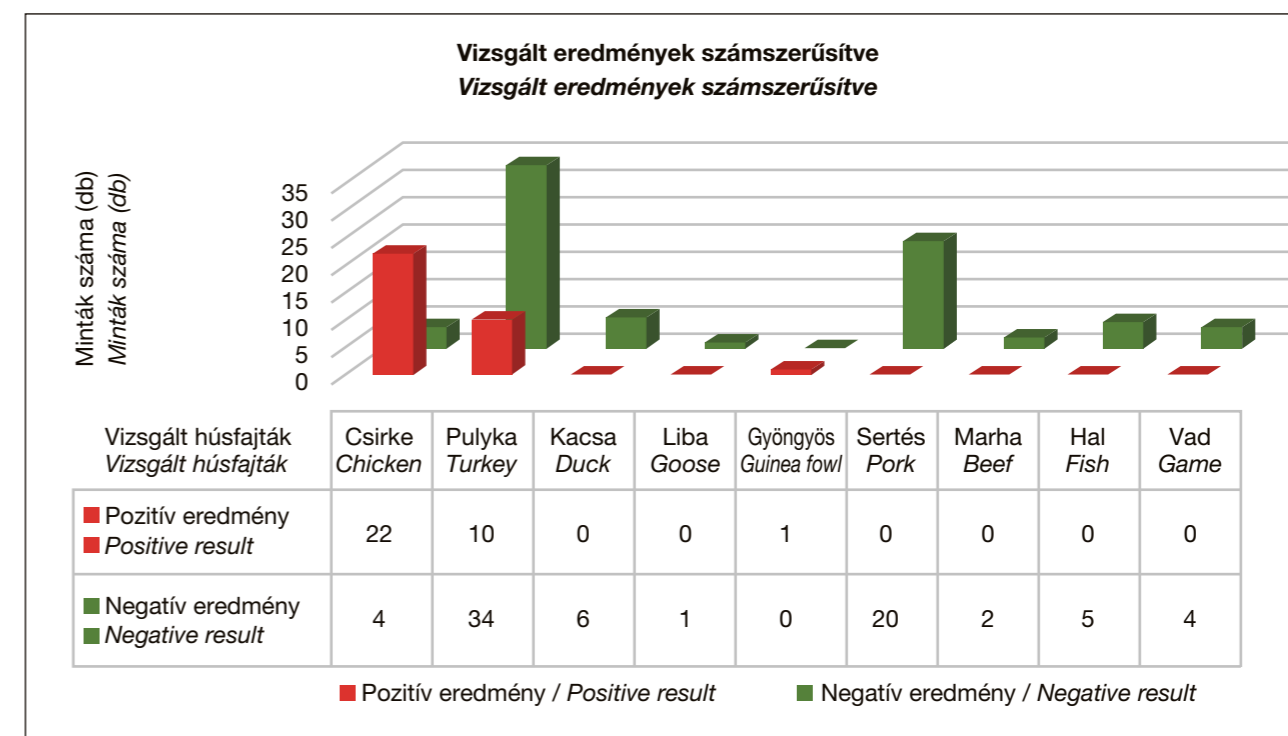
ismertük, hiszen a kimutatást horizontális módszerrel korábban már elvégeztük. Ezt követően egyetlen mérés kivételével a Real-Time PCR-rel végzett (vagyis a molekuláris biológiai módszerrel kapott) *Salmonella* kimutatási eredményeink megegyeztek a horizontális módszerrel végzett vizsgálatok eredményeivel. 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 tyúktojásból 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 mintaszámban 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 kacsa-, 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 Real-Time PCR-technika alkalmazása, 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 kithoz egyszerű mintaelőkészítési protokollt mellékel a gyártó, így könnyen elsajátítható a vizsgálat folyamata, viszont a DNS-izolálás és a plate összeállítása fegyvermezzett, 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

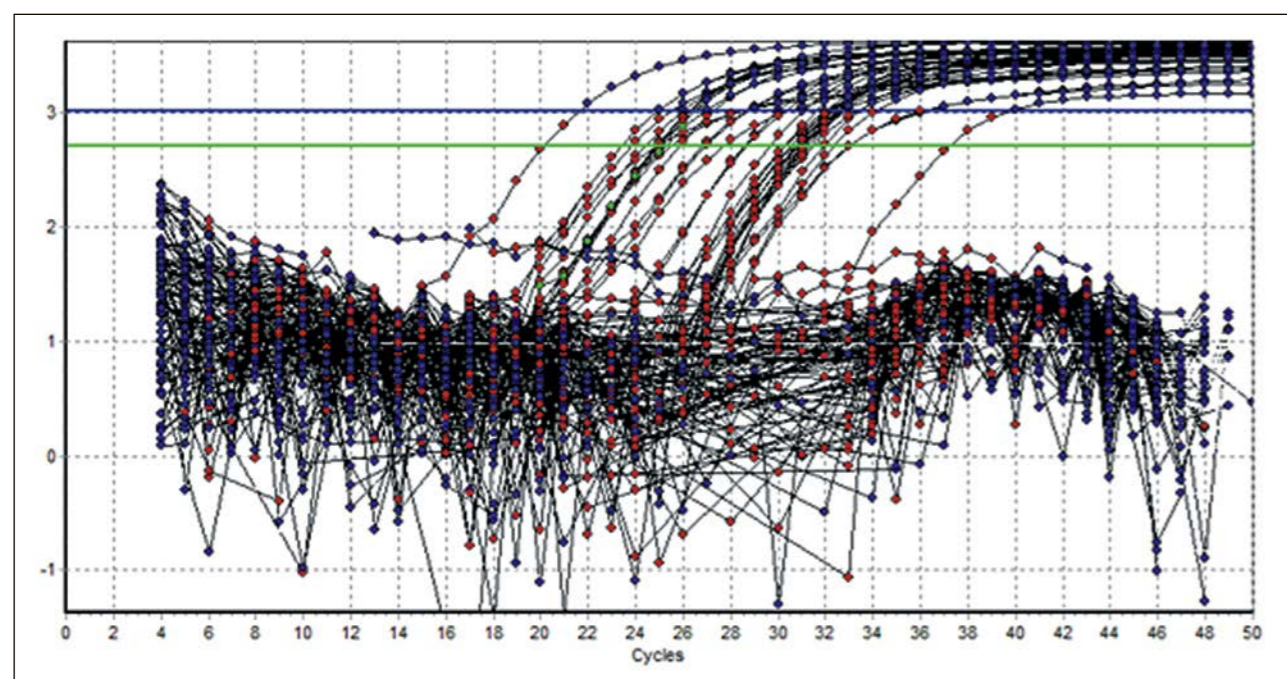
bizonyul. Ezekben az esetekben ugyanis a kimutatást horizontális módszerrel is meg kell ismételni. A Real-Time PCR technikával egy munkanapon belül akár 40 minta vizsgálata is elvégezhető: mialatt a készülék az első mintasor elemzését végzi, addig elkészíthető a következő mintasor DNS izolálása és a 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 keresztzennyeződés 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: Hatékonyság számítás: 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, amelyek a módszer hatékonyságát is elemzik. Ezen szakkikkek 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 Laboratóriumban (Élelmiszerlánc-biztonsági Centrum Nonprofit Kft.) bevezetésre kerülő Real-Time PCR készülék szükségességét és előnyét. A kísérletek során húsból, nyakbőről 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.

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

A baktérium kimutatását a horizontális módszerrel párhuzamosan egy Real-Time PCR készülék segítségével ugyanazon mintákból végeztük, majd összehasonlítottuk a kétféle módszer által kapott eredményeket. Összegzőként 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 kiválóan 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.

Xénia Erika Ozsváth¹, Ibolya Keszler², Karolina Rigó², Károly Pál³

Received: October 2018 – Accepted: January 2019

Introduction of a real-time PCR instrument in the Debrecen laboratory of the National Food Chain Safety Office for *Salmonella* detection

KEYWORDS: *Salmonella*, salmonellosis, real-time PCR, detection of pathogenic bacteria

SUMMARY

Salmonellosis is one of the most widespread zoonoses, being the animal disease spreading to humans encountered most often all over Europe [1]. Consequently, the detection of *Salmonella* spp. in foods can be classified as a microbiological analysis of primary importance in the Debrecen Regional Food Chain Laboratory of the National Food Chain Safety Office, using the horizontal method. However, the *Salmonella* detection method according to standard MSZ EN ISO 6579-1:2017 requires a long time, at least 3 working days. Therefore, it was decided in the Debrecen Regional Food Chain Laboratory of the National Food Chain Safety Office to introduce a rapid method based on the use of a real-time PCR instrument. The applicability of the method was tested on the basis of the results of *Salmonella* detection in meat samples. There was little difference when comparing the results obtained using horizontal and molecular biological methods. The results of the two methods were 99% identical. Considering the efficiency of real-time PCR (99.3%), encouraging conclusions can be drawn regarding the introduction of the new method.

INTRODUCTION

With the rise in living standards, the number of food safety requirements increases and they become more stringent. In relation with this, the detection of pathogens of food industrial source in the food chain process is important, for which fast and reliable methods must be used [2, 3]. Sufficient speed, acceptable precision and sensitivity of the methods used are essential both for safe food supply and the timely informing of consumers in case of a recognized emergency [3, 4].

LITERATURE REVIEW

CHARACTERISTICS OF THE GENUS *SALMONELLA*

The genus *Salmonella* consists of facultative anaerobic, Gram-negative, linear, rod-shaped microorganisms of the *Enterobacteriaceae* family moving with peritrichous flagella, with more than 2,500 serotypes known [5, 6]. They are possible inhabitants of the human and animal alimentary canal, and when released into the environment, they can be found in waters and soil, on plants and in

raw materials of animal origin. *Salmonella* species proliferate at temperatures between 6 and 47 °C and in the pH range 3.8-9.5, and can survive long periods under dry conditions, thus remaining viable for months or even years for example in egg powder or dry pasta [7]. In dry straw on which poultry litter is based, *Salmonella* can remain viable for up to 11 months [8]. For this reason, it is important to comply with the general and hygiene rules applicable to animal farming.

SALMONELLOSIS

Since the 1990s, considerable attention has been paid to *Salmonella* strains, which play an important role in the development of infectious diseases [9]. Overall, it can be said that of the 2,500 *Salmonella* serotypes, the ones that merit attention from a public health point of view are those that cause paratyphoid in animals and diseases of varying course and severity in the human body. These include *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium, the microorganisms that cause the most prevalent human disease in the world [1, 10].

Most often the pathogen enters the environment with the faeces of animals or humans that are either diseased or asymptomatic, but excreting the pathogen. The symptoms of salmonellosis appear within 6 to 48 hours after the consumption of food contaminated with *Salmonella*, and they include in mild cases headache, lethargy, vomiting and diarrhea. In individuals with a strong immune system, these symptoms disappear within 2 to 5 days without medication, but in some cases, latency and recovery may take a longer time. In severe cases, the consumption of food contaminated with *Salmonella* can cause a high fever and even septicemia [11, 12]. More than half of human salmonellosis cases are infections caused by poultry, especially by eggs contaminated with faeces. Other sources of infection can be any raw material of animal origin, drinking water, fruits and vegetables that are either contaminated with faeces or are unwashed, seasonings and spices [1]. An asymptomatic form of the disease is also common, during which the pathogenic *Salmonella* bacterium proliferates in the alimentary canal and then excreted from the body with the faeces. In the event of a breach of personal and manufacturing hygiene, food consumers may be infected by faecal *Salmonella* via the oral route through foods or their raw materials (faecal-oral transmission) [13]. Further risks include the distribution and consumption of contaminated and insufficiently heat-treated meat products, as well as the use and consumption of raw milk without pasteurization and without further heat treatment. In addition to improper heat treatment, the survival and proliferation of the pathogen may also be helped by the improper storage of foodstuffs in warm, humid places [1, 11]. An additional hygiene hazard is that, similarly to *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* is also able to form a biofilm on metal,

glass, rubber and plastic surfaces used in the food industry, therefore, continuous cleaning and disinfection of all equipment and the connecting piping, valves and other fixtures intended to come into contact with food is essential [14].

Salmonellosis is not limited to being a human disease. The disease can also occur in animals, such as pigs or poultry. Related to this, a *Salmonella* eradication program has been in place in poultry flocks in Hungary since 1997 against *Salmonella* Enteritidis and *Salmonella* Typhimurium [11]. In addition to the correct choice of livestock farming technology, continuous health monitoring and compliance with hygiene rules, an integrated protection program was also required. Using Council Directive 92/117/EEC and World Health Organization guidelines, the so-called “White book” was prepared, a publication titled „An integrated quality management system for the control of *Salmonella* in the poultry sector in Hungary” [15].

An important part of *Salmonella* eradication is to provide animals with drinking water and feed that is *Salmonella* free. Sources of infection among feed raw materials may include oilseeds, during the processing of which conditions favorable for the permanent colony formation and proliferation of *Salmonella* could develop through the humid, dusty and warm climate of the extraction plants [16].

The main supervisor of *Salmonella* monitoring in Hungary is the National Food Chain Safety Office (NÉBIH), which performs full *Salmonella* testing of livestock, meat and various foodstuffs with its official laboratories and with the involvement of certain officially approved private laboratories [11].

REAL-TIME PCR

The availability of reliable, fast and accurate detection methods has become increasingly important for agriculture and the food industry in recent years. Such methods allow the simultaneous detection of several pathogenic microorganisms and provide validated results, similar to the “conventional” microbiological methods described in the standards [17].

The polymerase chain reaction (PCR) is the basis for a rapid diagnostic method that is used to detect the pathogenic DNA that is suspected to be present in the sample, and so it can also be used for the direct detection of *Salmonella* bacteria in food samples [18]. There are several variations of the PCR method, including the real-time PCR technique used by us. Compared to the conventional polymerase chain reaction, in the case of the real-time technique, amplification and detection are accomplished simultaneously thanks to the fluorescent moieties used. During the measurement, a fluorescent signal is emitted by the highlighted DNA sections of the sample, which can be detected by the system,

¹ Doctoral School of Animal Science of the University of Debrecen
² Food Chain Safety Center Nonprofit Kft.
³ DE MÉK ÉTI

thus making the detection process faster and more sensitive than the „conventional” methods [19, 20]. By today, real-time PCR technology has become a routine laboratory analysis. The net time requirement for testing a sample package consisting of 50 items can be reduced to 9 to 10 hours [21].

MATERIALS AND METHODS

Measurements were carried out in the Debrecen Regional Food Chain Laboratory of the National Food chain Safety Office (Food Chain Safety Center Nonprofit Kft.) between January and May 2018.

KIT AND EQUIPMENT USED FOR REAL-TIME PCR

- Bio-Rad iQ-Check *Salmonella* II kit: reagents are sufficient for 96 tests
 - o Reagent A: lysis reagent 1x20 ml
 - o Reagent B: fluorescent probe 1x0.55 ml
 - o Reagent C: amplification mix 1x4.4 ml
 - o Reagent D: negative PCR control 1x0.5 ml
 - o Reagent E: positive PCR control 1x0.25 ml
- bioSan TS-100 Thermo-shaker
- Sigma 1-16 centrifuge
- Velp scientifica (Rx³) vortex mixer
- Yellowline MST basic C magnetic stirrer
- Bio-Rad CFX93 Real-Time System PCR instrument
 - o C1000 Touch Thermal Cycler
- pipet4U pro automatic pipette

METHOD

SAMPLE PREPARATION

During sample preparation, in the case of ground or prepared (marinated, seasoned) pork or beef, 10 g of the sample was weighed on a laboratory balance, while 25 g of the sample was weighed in all other cases.

Following a 10:1 ratio, 25 g samples were weered filled to 250 g and 10 g sample were filled to 100 g with buffered peptone water, then they were suspended in a Stomacher machine for 30 seconds.

DETECTION OF SALMONELLA SPP. USING THE REAL-TIME PCR METHOD

Detection was performed according to the description of the MB/12/2010 *Salmonella* kit. Bio-Rad iQ-Check *Salmonella* II kit was used for isolation. The kit contains 4 reagents, as described at the beginning of the **Materials and methods** section.

Following 18 ± 2 hours of incubation, DNA was isolated from a pre-enrichment fluid of buffered peptone water incubated at 37 °C. For some products, to prevent inhibition, it is advisable to add 20 µl of the pre-enrichment medium to 1 ml of the peptone water buffered at 37 °C, which should then be incubated at 37 °C for 4 ± 1 hours.

DNA extraction

DNA was extracted from the digested sample in a thermomixer at 99 °C. 1 ml of the incubated buffered peptone water was transferred into an Eppendorf tube, and it was centrifuged at 12,000 g for 5 minutes. During centrifugation, Reagent A was stirred on a magnetic stirrer.

Following centrifugation, the supernatant of the sample was removed, and 200 µl of Reagent A was added to the pellet, while the reagent was constantly agitated on the stirrer for homogenization. This was necessary, because the reagent use has a beaded structure and a uniform distribution needs to be ensured when used. The pellet and the Reagent A added were suspended with the help of a pipette, then it was vortexed for at least 20 seconds until the pellet was completely dissolved. The samples thus prepared were heat treated in a thermomixer for 15 minutes at 99 °C and 1,400 rpm. The samples were then taken out from the thermomixer and vortexed for at least 20 seconds while holding the top of the Eppendorf tubes, then they were centrifuged again at 12,000 g for 5 minutes. Finally, 50 µl of the supernatant was pipetted into an Eppendorf tube. Samples can be stored until the measurement at -20 °C for 1 day.

Real-time PCR

The reagents of the PCR plate were weighed in a sterile box. Reagents B and C were weighed into the sterile Eppendorf tube according to the table provided with the kit, including the positive and negative control samples, which are essential for the measurement. The reaction mixture put together can be stored at 4 °C for up to 1 hour.

45 µl amounts of the mixtures were added to the PCR plate wells at the following ratios:

- 5 µl/sample of Reagent B,
- 40 µl/sample of Reagent C.

Subsequently, 5 µl each of Reagent D (negative control), Reagent E (positive control) and the unknown sample were added, in an identifiable order, to the mixtures under the liquid level using a pipette. As a final step of the isolation, the plate was sealed and bubbles were removed.

Following this, the plate containing the reaction mixtures was placed in the Bio-Rad CFX93 Real-Time System PCR instrument. The polymerase chain reaction was run and the results were evaluated using the Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2 program. For the detection, i.e., to achieve measurable signal size, 49 PCR cycles were required.

The device used by us was equipped with a FAM (Fluorescein amidite) filter. During the evaluation, the result is positive, if a characteristic sigmoidal curve crossing the threshold value is displayed. In most cases, if the value is positive, the curve will appear after the 30th cycle. For curves appearing during the 28th cycle (too early) or after the 40th cycle (too late), the reliability of the results obtained was not satisfactory. The affected questionable samples were also analyzed by the microbiological method described in the standard.

Calculation of the efficiency of the PCR reaction

To calculate the efficiency of the polymerase chain reaction, the LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data software was used, which calculates the individual reaction efficiency for a particular gene tested and averages the results to give the total reaction efficiency. Its advantage is that it does not require a separate standard curve, since it uses the slope of the straight line fitted to the linear portion of the amplification curve plotted in a logarithmic view in the following formula:

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

where „E” is the efficiency and „m” is the slope [22].

In order to verify the efficiency, relative accuracy, specificity and sensitivity were also calculated for all of the samples tested using the formulas contained in standard MSZ EN ISO 1640:

- Relative accuracy (%): $\frac{(p + n)}{N} * 100$
- Relative specificity (%): $\frac{n}{(n + fp)} * 100$
- Relative sensitivity (%): $\frac{n}{(n + fp)} * 100,$

where „N” is the total number of samples tested, „n” is the number of negative samples, „p” is the number of positive samples, „fn” is the number of false negative samples and „fp” is the number of false positive samples [23].

RESULTS AND EVALUATION

SAMPLE PREPARATION, DNA ISOLATION

In the course of our experiments, a total of 109 samples were tested for *Salmonella* using a real-time PCR instrument. Grouping of the samples is shown in **Table 1**. The majority of the samples to be examined were poultry, namely chicken and turkey neck skin, meat and meat products.

1 ml of the incubated buffered peptone water was used for DNA isolation, the rest was used when applying the horizontal method. The incubated buffered peptone water samples were stored in Eppendorf tubes in a refrigerator at 4 °C until use. The optimal proliferation temperature for *Salmonella* is 37 °C, but it can proliferate between 5 and 47 °C. Our subsequent experience has shown that storage at low temperatures may have inhibited proliferation, but a significant proportion of bacterial cells have remained viable.

RESULTS OF THE DETECTION

Samples were evaluated using the Bio-Rad CFX Manager Industrial Diagnostic Edition 2.2 program. All results are summarized by the program in a report.

For the assay using the real-time PCR method, all sample preparation steps were carried out according to the protocol provided with the kit. During the observation, a total of 8 measurements were performed. In the first series of measurements, the expected results of the samples were known, since the detection had already been carried out previously using the horizontal method. Following this, with the exception of one measurement, the detection results of *Salmonella* obtained using real-time PCR, i.e., the molecular biological method, were identical to the results obtained with the horizontal method. The first and only difference between the two methods was found in the case of the fourth measurement. As a result of the bacterial detection by the molecular biological method, the fresh, ground turkey drumstick fillet was positive, whereas the classical method gave a negative result. When using the real-time PCR technique, inconclusive samples and those that are positive for *Salmonella* require a „classical” confirmation test, which was performed according to the method prescribed by standard MSZ EN ISO 6579-1:2017. The experiment of Wang-Mustapha was aimed at the elimination of false positive results, during which *Salmonella* detection was carried out on hen eggs. As an addition, during the sample preparation and isolation of the conventional PCR technique, ethidium bromide monoazide was used to stain dead bacterial cells. In the stained bacterial cells, the reaction between the DNA polymerase enzyme and the hereditary material is prevented by the ethidium bromide monoazide, thus, their DNA content is unable to participate in the polymerase

chain reaction. This way the probability of false positive results caused by dead *Salmonella* cells can be effectively reduced [24].

Most of the samples received by the laboratory were poultry meat. Among these, both in the case of chicken and turkey samples, neck skin analyses were carried out in the largest numbers. The need for testing neck skin is justified, since in 2011, 86% of broiler chicken neck skin samples were positive for the presence of *Salmonella* [25]. As shown in **Figure 1**, the pathogenic bacterium could be detected in 84.6% of the chicken samples, including neck skin, wings and fresh whole chicken leg, examined by us using the real-time PCR instrument. Of the 44 samples of turkey meat and neck skin, 10 positive results were obtained, including positive results from neck skin, ground drumstick fillet and breast. Like guineafowl, turkey breast came to the laboratory for testing frozen. The presence of *Salmonella* could be detected in both meats. This confirms the fact that although *Salmonella* is unable to proliferate below 5 °C, it remains viable, as inactive cells were activated during the pre-enrichment before the test and the pathogenic microbe began to proliferate.

Of poultry, duck, goose and pheasant meat were also received for *Salmonella* detection. All of these samples were found to be negative.

In the case of red meat, mainly pork was examined, as well as beef and game meat. Fish samples arrived for examination mostly frozen, but their number was negligible. A total of 29 samples belonged to the red meat and fish category, all of which provided negative results by both the horizontal and the molecular biological method.

The distribution of the positive and negative test results by meat type is shown in **Figure 1**. It should be noted that a comparison between the meat and meat product samples was not possible because of the hectic distribution of the samples received by the laboratory.

Based on the comparison of the results obtained by us using the real-time PCR technique and the results obtained in the course of *Salmonella* detection according to standard MSZ EN ISO 6579-1:2017 it can be stated that the introduction of the use of a real-time polymerase chain reaction instrument at the Debrecen Regional Food Chain Laboratory is beneficial. A simple sample preparation protocol is provided by the manufacturer with the BioRad iQ-Check *Salmonella* II kit used, thus the assay process can be mastered easily, but DNA isolation and plate assembly require disciplined, accurate work.

The PCR technique allows the detection in multiple samples in less time than the „conventional” method. While the horizontal method takes 3 days in case of a negative result and 5 days in case of a positive result,

the procedure based on the use of the real-time PCR instrument requires approximately 3.5 hours for the analysis of 20 samples, assuming negative results. Testing may take longer if the result is inconclusive using the molecular biological method, or if the sample is positive for *Salmonella*. In these cases, the detection must be repeated using the horizontal method. With real-time PCR, one can analyze up to 40 samples in one working day: while the first sample series is analyzed by the instrument, DNA isolation and plate assembly for the next sample series can be carried out.

EFFICIENCY OF THE PCR REACTION

In connection with the introduction of the new method, a total of 109 samples were tested for *Salmonella*, the result of which differed only in a single case from the result obtained using the horizontal detection. The false positive results suggest that the real-time PCR method is much more sensitive than the classical method. However, cross-contamination or the presence of dead *Salmonella* cells can lead to false positive results.

The effectiveness of the reaction was not only evaluated by observing and comparing the results. For this purpose, the LinRegPCR: Analysis of quantitative RT-PCR Data software was used, with the help of which the reaction efficiency was obtained as a percentage. During the evaluation, it was found that the efficiency of the polymerase chain reaction was either too low (below 88%) or too high (above 105%) for low sample number measurements. One of the reasons for this is the pipetting error or the fact that the mastermix has more primer than the optimum amount, considering the sample number to be examined.

Results read by the evaluation software are illustrated in **Figure 2**. It can be clearly seen that the positive samples and positive control samples give a logarithmic curve and the efficiency is calculated by the program from the slope of the straight line fitted to the linear section of these curves, using the following formula:

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

where „E” is the efficiency and „m” is the slope [22].

Efficiency analysis was also performed by measurement, and total reaction efficiency was also calculated. The same or very close ratios were found for both measurement methods, and by evaluating all of the results, a final result of 99.3% efficiency was obtained.

To check the efficiency, relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity were also calculated, the results of which by sample are shown in **Table 2**.

Numerous studies have been published on the detection of *Salmonella* using the polymerase chain reaction, which also analyzes the effectiveness of the method. The authors of these articles worked with a known *Salmonella* titer (CFU/25 g sample) during their studies, so they were able to perform more accurate efficiency calculations compared to our experiments [26, 27, 28].

CONCLUSIONS

The objective of our research was to substantiate the necessity and advantage of the real-time PCR instrument to be introduced at the Debrecen Regional Food Chain Laboratory of the National Food Chain Safety Office (Food Chain Safety Center Nonprofit Kft.). In the course of the experiments, detections were carried out in meat, neck skin and meat products, since salmonellosis is primarily caused by these foodstuffs. In the laboratory, *Salmonella* detection according to standard MSZ EN ISO 6579-1:2017 is one of the main microbiological tests to date, as it is one of the most well-known pathogenic bacteria that can cause mild or even severe symptoms when entering the body.

The detection of the bacterium was performed in parallel using the horizontal method and by a real-time PCR instrument in the same samples, and then the results obtained using the two methods were compared. In conclusion, it can be stated that a different result compared to the result of the detection performed using the method according to the above-mentioned standard was obtained in a single case out of 109. According to our results, real-time polymerase chain reaction is a reliable and accurate method. In addition, the advantages of the introduction and use of the instrument include simplicity, ease of use, low space requirement, as well as less chemical and material consumption. A further advantage is that the method is fast, as test results for 20 samples can be obtained within 3.5 hours. It is much more sensitive and accurate than the horizontal method, but it has the disadvantage that the presence of dead bacterial cells or high levels of sugar or fat in the foods may lead to false positive results.

To support the advantages of the molecular biological method, both individual and total reaction efficiency calculations were performed, with 99.3% being the result of the latter. In addition to efficiency, relative accuracy, specificity and sensitivity were also determined, the results of which were 100%, 98.7% and 100%, respectively. Based on these, the efficiency of the real-time PCR method is considered to be excellent,

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank co-author Ibolya Keszler for providing the opportunity to conduct the experiment. Xénia Erika Ozsváth would like to thank Karolina Rigó and Károly Pál for their help and useful advice in the course of the laboratory analyses.

LITERATURE

- [1] Böő, I. (2005): Zoonózisok <http://www.agraroldal.hu/szalmonella.html> (Hozzáférés / Acquired: 2018. 10. 10.)
- [2] Mangal, M., Bansal, S., Sharma, S., Gupta, R. (2015): Molecular Detection of Food Borne Pathogens: A Rapid and Accurate Answer to Food Safety. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 56. évf. 9. sz. pp. 1568-1584.
- [3] Fung, F., Wang, H., Menon, S. (2018): Food Safety in the 21st Century. *Biomedical Journal*. 41. évf. 2. sz. pp. 88-95.
- [4] NÉBIH: Ismerje meg hivatalunkat <http://portal.nebih.gov.hu/hivatalunk/bemutakozas/ismerje-meg-hivatalunkat> (Hozzáférés / Acquired: 2018. 04. 11.)
- [5] Bíró S., Hornok L., Kevei F., Kucsera J., Maráz A., Pesti M., Szűcs Gy., Vágvolgyi Cs. (2001): Általános mikrobiológia. Dialóg Campus Kiadó. Budapest-Pécs. 310 p. ISBN 9639123714
- [6] Sándor E., Peles F. (2015): Élelmiszer minőség és biztonság mikrobiológiai vonatkozásai, egyetemi jegyzet. Debreceni Egyetem Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar Élelmiszertudományi Intézet, Debrecen. 150 p.
- [7] Laczay P. (2015): Élelmiszer-higiéniá, élelmiszerlánc-biztonság. Mezőgazda Kiadó. Budapest. 676 p. ISBN 9789632866895
- [8] Woernle, H., Jodas, S. (2013): Gyakori baromfibeetegségek. Megelőzés és kezelés. Mezőgazda kiadó. Budapest. 170 p. ISBN 9789632866840
- [9] Kagambéga, A., Thibodeau, A., Trinetta, V., Soro, D., Sama, F., N., Bako, É. Bouda, C., N'Diaye, A., W., Fravallo, P., Barro, N. (2018): *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. in poultry feces and carcasses in Ouagadougou, Burkina Faso. *Food Science and Nutrition*. 16. évf. 6. sz. pp. 1601-1606. DOI: 10.1002/fsn3.725

- [10] Lee, K., Runyon, M., Herman, T., Phillips, R., Hsieh, J. (2015): Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*. 47. sz. pp. 264-276.
- [11] NÉBIH: Kérdezz-felelek a szalmonella okozta megbetegedésekről <http://portal.nebih.gov.hu/-/kerdezz-felelek-a-szalmonella-okozta-megbetegedesekekről> (Hozzáférés / Aquired: 2018. 11. 14.)
- [12] Madigan, M., Martinko, J., Bender, K., Buckley, D., Stahl, D. (2014): *Brock Biology of Microorganisms*. Global Edition. Pearson HigherEd. USA. 1040p. ISBN9781292018317
- [13] Nemes Z. (2013): *Salmonella*-mentesítési program a húshibrid-baromfi ágazatban. Országos Mezőgazdasági Szakfolyóirat. <https://www.agronaplo.hu/szakfolyoirat/2001/7/allategeszsegugy/salmonella-mentesitesi-program-a-hushibrid-baromfi-agazatban> (Hozzáférés / Aquired: 2018. 11. 02.)
- [14] Stephanovic, S., Cirkovic, I., Ranin, L., Svabic-Vlahovic, M. (2004): Biofilm Formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on Plastic Surface. *Letter in Applied Microbiology*. 38. évf. 5. sz. pp. 428-432.
- [15] Fehér Könyv (1997): A *Salmonella* elleni védekezést célzó integrált minőség szabályozási rendszer a baromfiszektor számára Magyarországon. Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal. http://portal.nebih.gov.hu/documents/10182/21336/Feherkonyv_II_kiadas_honlapra.pdf/a640d86f-8fce-45d3-9861-60ca0cdc93b2 (Hozzáférés / Aquired: 2018. 03. 07.)
- [16] Conchello, L. (2012): Szalmonella elleni védekezés a takarmányozási láncban. *Baromfiágazat*. 13. évf. 3. sz. pp. 40-41.
- [17] Szmolka, A., Kaszanyitzky, É., Nagy, B. (2006): Improved Diagnostic and Real-Time PCR in Rapid Screening for *Salmonella* in the Poultry Food Chain. *Acta Veterinaria Hungarica*. 54. évf. 3. sz. pp. 297-312.
- [18] Catellá, J., Darwich, L., Domingo M., Mateu, E., Martín, M., Sibila, M. (2013): Sertésbetegségek laboratóriumi diagnosztikai kézikönyve. Intervet Hungária Kft, Budapest. 119 p.

- [19] Ranjbar, R., Naghoni, A., Farshad, S., Lashini, H., Najafi, A., Sadeghifard, N., Mammuna, C. (2014): Use of TaqMan® Real-Time PCR for Rapid Detection of *Salmonella enterica* serovar Typhi. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*. 61. évf. 2. sz. pp. 121-130. <https://doi.org/10.1556/AMicr.61.2014.2.3> (Hozzáférés / Aquired: 2018. 03. 02.)
- [20] Cheng, C., Chi, J., Lin, S., Chou, C., Huang, C. (2009): Rapid Quantification of *Salmonella typhimurium* Inoculated to Meat Products by Real-Time PCR. *Acta Veterinaria Hungarica*. 57. évf. 1. sz. pp. 25-38.
- [21] Fachmann, M.,S.,R., Löfström, C., Hoorfar, J., Hansen, F., Christensen, J.,Mansdal, S., Josefsen, M.,H. (2016): Detection of *Salmonella enterica* in Meat in Less than 5 Hours by a Low-Cost and Noncomplex Sample Preparation Method. *American Society for Microbiology*. 83. évf. 5. sz.
- [22] Tóth, G. (2013): Kvantitatív Real-Time PCR. In: Növényélettani vizsgáló módszerek: Dr. Tamás László, Dr. Fodor Ferenc, Dr. Nyitrai Péter, Dr. Oszvald Mária, Dr. Rudnóy Szabolcs, Dr. Sárvári Éva, Dr. Solti Ádám, Dr. Szigeti Zoltán, Tóth Gábor. Eötvös Lóránd Tudományegyetem. Egyetemi jegyzet. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/NovenyélettaniVizsgModsz/index.html> (Hozzáférés / Aquired: 2018. 09. 06.)
- [23] Rohonczy, K., Zoller, L., Fodor, A., Pintér, V.: Patogén mikroorganizmusok vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel. Wessling FoodMicro Kft. <http://gmp.tabajdi.eu/letolt/Modszertan/E140%20PCR%20EOQ%202008.pdf> (Hozzáférés / Aquired: 2018. 10. 18.)
- [24] Wang, L. Mustapha, A. (2010): EMA-Real-Time PCR as a Reliable Method for Detection of Viable *Salmonella* in Chicken and Eggs. *Journal of Food Science*. 75. évf. 3. sz. pp. 134-139.
- [25] Lancz, Zs. (2011): A zoonotikus kórokozók elleni védekezés aktuális kérdései a baromfi-ágazatban - helyzetkép, várható jogszabályi változások <https://hungalimentaria.hu/Default.aspx?tabid=165> (Hozzáférés / Aquired: 2018.07.12)

- [26] Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C.,A.,M., Jansen, C.,C.,C., Castelijjn, G.,A.,A., van der Voort, M., Biesta-Peters, E.,G. (2018): Rapid detection and differentiation of *Salmonella* species, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis by multiplex quantitative PCR. *PLoS One* 13(10):e0206316. DOI: 10.1371/journal.pone.0206316.

- [27] Fachmann, M.,S.,R., Josefsen, M.,H., Hoorfar, J., Nielsen, M.,T., Löfström, C. (2015): Cost-effective optimization of real-time PCR-based detection of *Campylobacter* and *Salmonella* with inhibitor tolerant DNA polymerases. *Journal of Applied Microbiology*. 119. évf. 5. sz. pp. 1391-1402.

- [28] Umeha, S., Manukumar, H.,M. (2018): Advanced Molecular Diagnostic Techniques for Detection of Food-borne Pathogens; Current Applications and Future Challenges. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 58. évf. 1. sz. pp. 84-104.

Innovate System Hygiene

GYORS MIKROBIÁLIS SZŰRŐ RENDSZER



Inkubációs periódust követően kevesebb, mint 1 óra alatt biztosítja a minőség-ellenőrzés eredményét tej-, élelmiszer- és üdítőital gyártók számára, hogy gyors visszajelzést kapjanak termékeik minőségéről és azok minél hamarabb a vásárlók rendelkezésére álljanak.

Működési elv

Az adenzin-trifoszfát (ATP) biolumineszcenciája az alapja, ami elfogadott szűrőrendszer tej-, élelmiszer- és italtermék gyártók körében gyors mikrobiológiai ellenőrzésére.

A legszélesebb körben alkalmazható

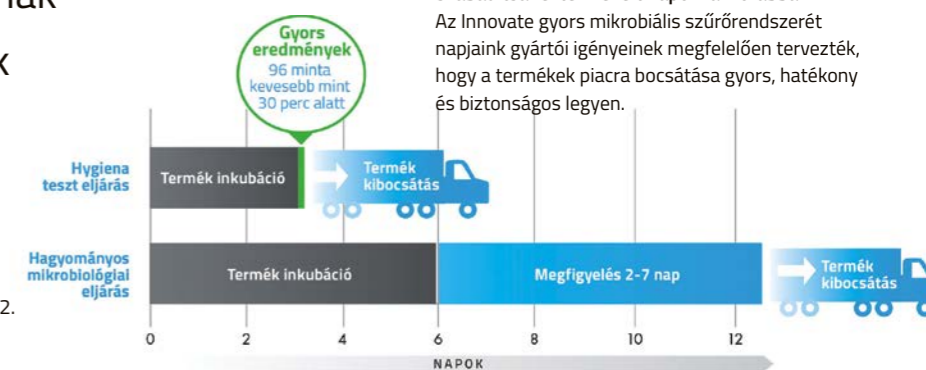
Sajt mártás, pépes gyümölcslevek, sűrű pudingok.

Az Innovate alkalmas a tesztelésükre. Egyetlen egyéb gyors módszer sem képes lefedni ilyen mértékben a tesztelhető termékek és alkalmazások körét. Az Innovative System rugalmas és könnyen használható, még a nehezen tesztelhető terméktípusok esetében is.



Szabadítsa fel termékeit napokkal korábban

Az Innovate gyors mikrobiális szűrőrendszerét napjaink gyártói igényeinek megfelelően tervezték, hogy a termékek piacra bocsátása gyors, hatékony és biztonságos legyen.



BENTLEY
MAGYARORSZÁG
bentleyhungary.hu

Bentley Magyarország Kft.
8000 Székesfehérvár, Kálmos utca 2.
labor@bentleyinstruments.com
Tel.: +36 22 414 100