M – 51

MIKROBIOLÓGIA POTRAVÍN

Detekcia vybraných mikroorganizmov v potravinách pomocou prístroja VIDAS

1. Úvod

Vidas *Campylobacter*

- je automatizovaný kvalitatívny test na použitie na prístroji VIDAS/miniVIDAS na detekciu *campylobakterov* vo vzorkách potravín a vzorkách odobratých z prostredia použitím ELFA techniky.

Vidas *E.coli O157*

- je automatizovaný kvalitatívny test na použitie na prístroji VIDAS/miniVIDAS na detekciu *E.coli O157* vo vzorkách potravín a vzorkách odobratých z prostredia použitím ELFA techniky.

Vidas *Salmonella*

- je automatizovaný kvalitatívny test na použitie na prístroji VIDAS/miniVIDAS na detekciu *salmonel* vo vzorkách potravín a vzorkách odobratých z prostredia použitím ELFA techniky.

Vidas *Listeria monocytogenes*

- je automatizovaný kvalitatívny test na použitie na prístroji VIDAS/miniVIDAS na špecifický dôkaz *Listeria monocytogenes* v potravinách a vzorkách z prostredia použitím ELFA techniky.

2. Princíp metódy

VIDAS® je enzýmová fluorescenčná imunoanalýza (ELFA) ktorá sa vykonáva na automatizovanom prístroji VIDAS/miniVIDAS k špecifickej detekcii jednotlivých druhov mikroorganizmov, resp. ich toxínov. Nádobka pevnej fázy (Solid Phase Receptacle SPR®) slúži jednak ako fáza pevná a zároveň aj ako pipetovacie zariadenie. Vnútro SPR® je pokryté špecifickými protilátkami proti antigénom jednotlivých druhov mikroorganizmov, resp. ich toxínom. Činidlá na stanovenie sú pripravené na použitie a dodané v uzavretých reagenčných stripoch. Všetky kroky testu prebiehajú automaticky na prístroji. Reakčné médium je cyklované dnu a von z SPR® niekoľko krát. Časť extraktu sa naviaže na vnútro reagenčného prúžku. Prítomné antigény v extrakte sa počas analýzy naväzujú na protilátky, imobilizované na stenách SPR®. Nenaviazané komponenty sa odstraňujú premývacími krokmi. Sekundárne protilátky konjugované s alkalickou fosfatázou /konjugát/ cyklujú do a von z SPR® a naväzujú sa na antigény mikroorganizmov/toxíny, ktoré sa v prvom kroku už naviazali na

protilátky na stenách SPR®. Posledný krok premývania odstráni nespotrebovaný konjugát. Počas záverečného kroku detekcie je do a von z SPR® vpravovaný substrát (4-metylumbelliferylfosfát). Konjugátový enzým /alkalická fosfatáza/ katalyzuje hydrolýzu substrátu na fluorescenčný produkt (4- metylumbelliferón), ktorého fluorescencia sa meria pri 450nm. Na konci testu prístroj výsledky automaticky vyhodnotí. Pre každú vzorku sa vygeneruje testovaná hodnota TV, ktorá sa porovnáva s uloženými štandardmi (hraničnými hodnotami) a jej interpretácia (pozitívne / negatívne).

3. Materiál a chemikálie

3.1 VIDAS súprava

Obsah súpravy VIDAS® 30 testov

30 prúžkov	**STR**	**Pripravené k priamemu použitiu**
30 SPR ®	**SPR**	**Pripravené k priamemu použitiu** **Vnútro SPR je pokryté špecifickými protilátkami**
1x Štandard (6ml)	**S1**	**Pripravené k priamemu použitiu** **Interval spoľahlivosti je vyznačený na MLE karte po nasledujúcej poznámke „Standard S1 RFV Range“**
Pozitívna kontrola (6ml)	**C1**	**Pripravené k priamemu použitiu** **Interval spoľahlivosti je vyznačený na MLE karte po nasledujúcej poznámke „Control C1 (+) Test Value Range“**
Negatívna kontrola (6ml)	**C2**	**Pripravené k priamemu použitiu** **Najvyššia prípustná hodnota je vyznačená na MLE karte po nasledujúcej poznámke „Control C2 (-) Test Value Range“**
1 MLE karta /Master Lot Entry, Zadanie hlavnej šarže/		**Špecifikačný hárok, obsahujúci kalibračné údaje výrobcu potrebné pre kalibráciu testu.**
1 informácia pre užívateľa		

Strip pozostáva z jamiek potiahnutých fóliovým uzáverom. Potlač obsahuje čiarový kód, ktorý uvádza typ testu, číslo šarže a dátum expirácie. Fólia prvej jamky je perforovaná, čo uľahčuje zavedenie vzorky. Posledná jamka je kyveta, v ktorej sa prevedie fluorometrické odčítanie. Jamky v strednej časti stripu obsahujú rôzne činidlá potrebné na stanovenie.
VIDAS sety sa skladujú pri teplote 2-8°C, činidlá nezmrazovať. Všetky nespotrebované činidlá skladovať pri teplote 2-8°C. Po otvorení kitu skontrolovať, či je púzdro SPR správne uzatvorené a nepoškodené. Ak to tak nie je, nepoužívať! Púzdro po použití uzavrieť s desikantom vo vnútri a vrátiť kompletný kit do prostredia 2-8°C.

3.2 Kultivačné médiá

3.2.1. Campylobacter

3.3.1.1. Tekuté kultivačné médium – Boltonovo tekuté médium
Zloženie a príprava jednotlivých médií viď STN EN ISO 10272-1.

3.2.2. E.coli O157

3.3.2.1.Médium pre selektívne množenie – pufrovaná peptónová voda (viď STN EN ISO 6579) + vankomycín (8mg/l) – **všetky potravinové produkty okrem surového mäsa, surového mlieka a syrov zo surového mlieka, a surovej zeleniny**
3.3.2.2. Médium pre selektívne množenie – pufrovaná peptónová voda + vankomycín (8mg/l) + cefixím (0,05mg/l) + cefsulodín (10mg/l) – **vzorky surového mlieka, syrov zo surového mlieka, kŕmne produkty a vzorky z výrobného prostredia**
3.3.2.3. Médium pre selektívne množenie – pufrovaná peptónová voda + vankomycín (8mg/l) **- surová zelenina**

3.2.3. Salmonella

3.3.3.1.Médium na neselektívne pomnoženie – tlmivá peptónová voda
3.3.3.2. Prvé selektívne pomnožovacie médium – Rappaport – Vassiliadis medium so sójou (RVS médium)
3.3.3.3. Druhé selektívne pomnožovacie médium – Muller-Kauffman s novobiocínom (MKTT)
Zloženie a príprava jednotlivých médií viď STN EN ISO 6579.

3.2.4. Listeria monocytogenes

3.3.4.1. Selektívne médium na primárne množenie so zníženou koncentráciou selektívneho činidla: polovičné Fraserovo tekuté médium
3.3.4.2. Selektívne médium na sekundárne množenie s plnou koncentráciou selektívneho činidla (Fraserovo tekuté médium)
Zloženie a príprava jednotlivých médií viď STN EN ISO 11290-1.

4. Prístroje a pomôcky

1. mixér, homogenizátor (turrax/stomacher)
2. laboratórne sklo (lievik, kadička, vialka ...)
3. Vidas/miniVidas reader
5. automatické a sklenené pipety
6. autokláv
7. sušička s teplotou 37°C a 55°C
8. termostat s teplotou 37+/-1°C
9. termostat s teplotou 41,5+/-1°C
10. vodné kúpele s teplotou 44-47°C
11. vodný kúpeľ s teplotou 37+/-1°C
12. sterilné kľučky s priemerom 3 mm alebo 10ul alebo sterilné pipety
13. delené pipety alebo automatické pipety s veľkosťou 10ml a 1 ml delené po 0,5 ml a 0,1ml
14. Petriho misky – priemer 90-100 mm alebo väčšie (priemer 140 mm)
15. špičky typu Micro-La-Steper sterilné 2,5 ml
16. pH papieriky

5. Príprava vzorky

5.1 Campylobacter

1. *Všetky typy potravín*: asepticky pridať 25g/ml vzorky do 225 ml bujónu

2. Inkubovať pri teplote 37+/-1°C 4 – 6 h, potom pri 41,5 °C +/-1°C 44 h +/ 4 h za mikroaerofilných podmienok.
3. Po inkubácii preniesť 1- 2 ml pomnožovacieho bujónu do skúmavky a 15+/-1 min. zahrievať pri teplote 95-100°C vo vodnom kúpeli. Skúmavky ochladiť na izbovú teplotu a opatrne premiešať pomocou vortexu na rozrušenie vytvorenej zrazeniny.
4. 0,5 ml preniesť do stripu s činidlami VIDAS CAM. Zvyšné množstvo bujónu uchovať pri teplote 2-8°C na potvrdenie pozitívnych výsledkov testu. Potvrdenie sa vykoná kultivačne, prípadne PCR metódami.

5.2 E.coli O157:

1. Pufrovanú peptónovú vodu predhriať na 41,5 +/-1°C
2. Sterilne vložiť 25g alebo 25ml vzorky do zásobného vrecka
3. Premiešať a inkubovať 8hod. pri 41+/-1°C a potom ďalších 12-18h
4. Po inkubácii homogenizovať a preniesť 1ml bujónu do skúmavky, ohrievať vo vodnom kúpeli pri 95-100°C počas 5+/-1 min.
5. Nechať vychladnúť a uskutočniť VIDAS test
6. Zvyšok bujónu uskladniť pri 2-8°C pre potvrdenie pozitívnych výsledkov

5.3 Salmonella:

1. *Predbežné pomnoženie:* asepticky pridať 25g/ml vzorky do 225ml tlmivej peptónovej vody alebo jeden objem vzorky do deviatich objemov pomnožovacieho bujónu. Inkubovať 16-20 hod. pri 37+/-1°C.
2. **Pozn. : mlieko v prášku** – na úplné rozpustenie pridať peptónovú vodu, nechať 30 min. pri izbovej teplote, aby pred inkubáciou došlo k rehydratácii.
3. *Pomnoženie:* po inkubácii preniesť 1 ml suspenzie do 10ml Muller-Kauffman bujónu s novobiocínom (MKTTn). Inkubovať 6-8 hod. pri teplote 37+/-1°C. Súbežne preniesť 0,1ml suspenzie do 10ml Rappaport Vassiliadis Soy bujón (RVS). Inkubovať 6-8 hod. pri 41,5+/-1°C. Zvyšný MKTTn aj RVS nechať doinkubovať podľa platnej normy.
4. *Následné pomnoženie:* po inkubácii preniesť 0,1ml bujónu MKTTn do 10ml M bujónu (komerčne pripravovaný). Do ďalšieho M bujónu preniesť 1ml bujónu RVS. Inkubovať oba M bujóny 16-20 hod. pri teplote 41,5+/-1°C. Po inkubácii každý M bujón premiešať a z každého preniesť 1 ml do spoločnej skúmavky. Uzatvoriť a 15+/-1 min. zahrievať vo vodnom kúpeli pri teplote 95-100°C. Nechať vychladnúť a vykonať Vidas test. Bujóny MKTTn a RVS uchovať pri 2-8°C na prípadné potvrdenie.

5.4 Listeria monocytogenes:

1. *Všetky typy vzoriek vrátane vzoriek z prostredia:* asepticky pridať 25g/ml vzorky do 225ml polovičného Fraseroho bujónu.
2. Premiešať a inkubovať 24-26 hod. pri 30+/-1°C.
3. Po inkubácii premiešať a premiestniť 1ml suspenzie do 10ml koncentrovaného Fraserovho média. Inkubovať 24-26 hod. pri 30+/-1°C.
4. *Mlieko:* asepticky pridať 25ml surového mlieka do 225ml Frasera
5. Premiešať a inkubovať 22-24 hod. pri 37+/-1°C.

Pozn.: neohriaty pomnožený bujón môže byť skladovaný 48 hod. pri 2-8°C pred uskutočnením testu VIDAS. Potvrdzovanie treba začať do 48 hod. po ukončení

inkubácie. Potvrdenie pozitívnych výsledkov VIDAS sa vykonáva kultivačne, príp. metódami PCR.

6. Postup VIDAS testu

6.1 Návod na použitie

Pre úplné inštrukcie pozrieť príručku pre používateľa VIDAS® alebo mini VIDAS®.

6.1.1 Zápis kmeňových údajov

Pred použitím každej novej série reagencií sa musí do pamäti zariadenia (VIDAS®, alebo mini-VIDAS®) uložiť špecifikácia (alebo výrobcove údaje kalibračnej krivky) s použitím karty kmeňových údajov o sérii (MLE) (špecifikačný hárok), ktorá je súčasťou každej súpravy. Ak táto operácia **neprebehne pred začiatkom testovania**, nebude môcť prístroj výsledky testu vyhodnotiť. Kmeňové údaje o sérii môžu byť zapísané len raz pre každú sériu. Údaje je možné vložiť automaticky s použitím karty MLE, alebo manuálne.

6.1.2 Kalibrácia

Kalibráciu, s použitím štandardu, ktorý je súčasťou súpravy, je potrebné previesť po prevzatí novej série reagencií potom, ako boli do pamäti uložené kmeňové údaje série. Kalibrácia by nasledovne mala byť vykonaná každých **14 dní.** Táto operácia poskytuje kalibračné krivky špecifické pre zariadenie a vyrovnáva menšie možné odchýlky v signáli testu počas skladovania súpravy.
Štandard, identifikovaný ako S1, musí byť testovaný v **duplikátoch** (viď Príručku používateľa). Štandardná hodnota sa musí nachádzať v rámci stanoveného rozpätia RFV (Relative Fluorescence Value). Ak tomu tak nie je, treba rekalibrovať.

6.2 Postup analýzy

1. Z chladničky vybrať požadovaný počet testovacích prúžkov, SPR a reagencií a nechať aspoň 30 min. ohriať pri izbovej teplote.
2. Stripy a SPR vložiť do polohy, ktoré zodpovedajú vyznačenej sekcii.
3. Do prístroja zadať čísla testovaných vzoriek, štandardy a kontroly na príslušných pozíciách jednotlivých sekcií.
4. Štandard, kontroly a pripravené vzorky pred použitím zamiešať. Napipetovať presne 0,5 ml štandardu S1 v duplikátoch /2 stripy/, C1, C2 kontroly /ak sa uskutočňuje kalibrácia/ a pripravených vzoriek.
5. Stanovenie začať podľa pokynov v manuáli. Všetky kroky vykoná prístroj automaticky. Stanovenie trvá do 70 min, v prípade ECPT *E. coli O157* 50 minút.
6. Použité SPR a stripy zlikvidovať a prístroj vydezinfikovať.

Postupuje sa podľa aktuálneho manuálu dodaného vždy s testovacou súpravou!

7. Výsledky a interpretácia

Po ukončení testu sa výsledky automaticky analyzujú na počítači. Fluorescencia sa meria dvakrát v kyvete reagenčného prúžku pre každú testovanú vzorku. Prvé odčítanie je odčítanie pozadia kyvety substrátu pred zavedením SPR® do substrátu.
Druhé odčítanie sa prevádza po inkubácii substrátu s enzýmom, ktorý ostal na vnútornej stene SPR®. RFV sa vypočítava odčítaním hodnoty pozadia od konečného výsledku. Tento výpočet sa zapíše do výsledkového hárku.

RFV získaná pre každú vzorku je interpretovaná VIDAS® systémom nasledovne:

$$\frac{\textbf{RFV vzorky}}{\textbf{Štandardná RFV}} = \textbf{hodnota testu TV /test value/}$$

7.1 Prahové hranice a interpretácie

Hodnota hranice testu - Interpretácia
< **X** Negatívny
≥ **X** Pozitívny
X – prahová hodnota pre konkrétny test /E. coli, Campylobacter,.../

Tlačený výpis zahŕňa:
• typ vykonaného testu,
• identifikáciu vzorky,
• dátum a čas,
• číslo šarže a dátum expirácie súpravy,
• RVF, Testovú hodnotu a interpretáciu výsledku pre každú vzorku.
Výsledok s testovou hodnotou nižšou ako hraničná hodnota svedčí o tom, že vzorka neobsahuje antigén, alebo obsahuje stanovovaný antigén v koncentrácii nižšej ako je detekčný limit.
Výsledok s hodnotou testu vyššou alebo rovnajúcou sa hraničnej hodnote indikuje vzorku kontaminovanú *antigénom.* V takomto prípade si pozrite príslušnú časť "Potvrdenie pozitívnych výsledkov".
Neplatné výsledky sú zaznamenané:
• ak je hodnota pozadia nad vopred stanovenou hranicou (čo indikuje kontamináciu substrátu nízkeho stupňa).V tomto prípade analýzu opakujte so zahriatym bujónom
alebo s použitou reagenciou (S1, C1 alebo C2).
• ak pre číslo šarže prúžku stanovenia vzorky nie je k dispozícii štandard.
V tomto prípade otestujte štandardu dvojmo v prúžkoch s rovnakým číslom šarže, ako má neplatný test vzorky. Výsledok stanovenia vzorky sa potom môže prepočítať
pomocou novouloženej štandardy. Úplné informácie nájdete v Príručke používateľa VIDAS®.

7.2 Interpretácia výsledkov:

TEST	Hraničná hodnota	Negatívny výsledok	Pozitívny výsledok
Campylobacter	**0.10**	<0.10	≥0.10
E.coli O 157	**0.04**	<0.04	≥0.04
Salmonella	**0.23**	<0.23	≥0.23
Listeria monocytogenes	**0.05**	<0.05	≥0.05

Vytlačí sa správa, ktorá zaznamenáva typ testu, identifikáciu vzorky, dátum a čas, číslo série a dátum expirácie súpravy a RFV každej vzorky, hodnotu testu a interpretovaný výsledok.

Poznámka:
- Kit VIDAS CAM detekuje tri patogénne druhy: *Campylobacter jejuni, coli, lari*.

- Kit VIDAS Salmonella detekuje pohyblivé aj nepohyblivé salmonely, vrátane sérotypov *Typhi a Paratyphi*. Pomocou testu Vidas bolo testovaných a detekovaných viac ako 300 kmeňov pokrývajúcich hlavné O a H antigény
- testy umožňujú získať výsledok skôr ako klasické kultivačné metódy
- je alternatívnou, podpornou metódou ku špecifickým STN ISO
- KIT VIDAS® ECPT detekuje pohyblivé ako aj nepohyblivé kmene *E. coli* O157. Upozorňuje užívateľa na možnú prítomnosť *E. coli* O157:H7 a zamerá na ňu pozornosť pripotvrdzovacích testoch. Detekčný limit: detekčný limit sa pohybuje v rozhraní 8 x 10^2 až 8 x 10^3 CFU/ml.

9. Kontrola kvality

V každej súprave VIDAS® sa nachádza jedna pozitívna a jedna negatívna kontrola.
Tieto kontroly musia byť vykonané ihneď po otvorení novej súpravy, aby sa zabezpečilo, že vlastnosti reagencií neboli zmenené. Každá kalibrácia musí byť skontrolovaná použitím týchto kontrol. Prístroj je schopný skontrolovať kontrolné hodnoty len ak sú označené ako C1 a C2. Výsledky nemôžu byť potvrdené, ak sa kontrolné hodnoty odchyľujú od rozmedzia očakávaných hodnôt.

10. Použitá literatúra

10.1. BioMérieux® VIDAS® Campylobacter, 2004

10.2. BioMérieux® VIDAS® UP *E. coli* O157:H7 (ECPT), 2008

10.3. BioMérieux® VIDAS® Salmonella, 2004

10.4. BioMérieux® VIDAS® Listeria M.2, 2004