

PCR alapú patogén kimutatás az élelmiszeriparban

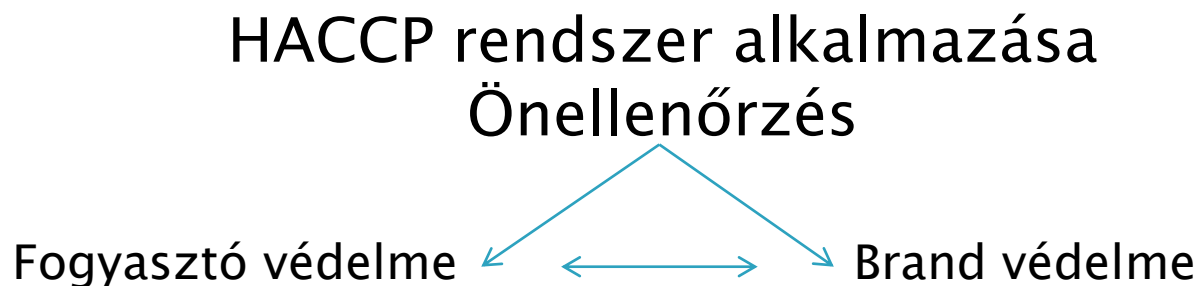


Mráz Balázs
Bentley Magyarország Kft.

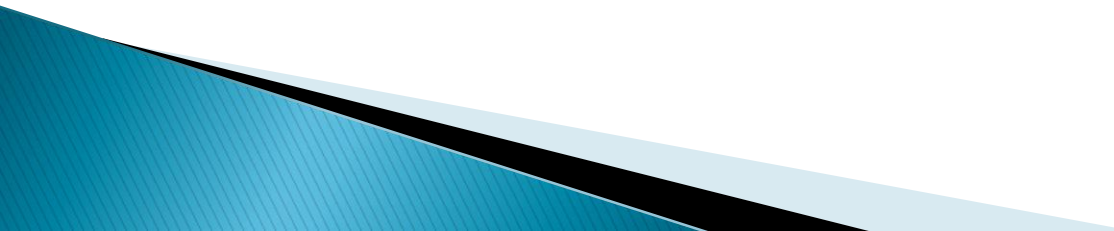
2018.05.17.

Élelmiszerekkel szemben támasztott követelmény

- ▶ Egészségre ártalmatlan
- ▶ Jó minőség
(érzékszervi tulajdonságok, tartalom)
- ▶ Gazdaságosan előállítható



Vizsgálati módszerrel szembeni elvárások

- ▶ Gyors
 - ▶ Pontos (specifikus és érzékeny)
 - kísérő mikrobák mellett működjön
 - károsodott sejtek, VNC kimutatása
 - ▶ Takarékos (munka/anyag/eszköz)
 - ▶ Egyszerű
 - ▶ Elfogadott (hatóság, partner)
- 

Patogén kimutatás időigénye

	Hagyományos	PCR
Elődúsítás	18 – 24 h	Salmonella 8 – 24 (+3) h Listeria 22 – 28 h
Szelektív dúsítás	24 – 48 h	Salmonella – Listeria 18 – 24 (+3) h
Szelektív tápközeg	24 – 48 h	–
Megerősítő vizsgálatok	Min. 24 – 48 h	–

Cél: a negatív eredményt a lehető legkorábban kommunikálni

PCR alapú patogén kimutatás lépései



Mintavétel



Dúsítás



Mintaelőkészítés
(Sejtfeltárás - Lízis)

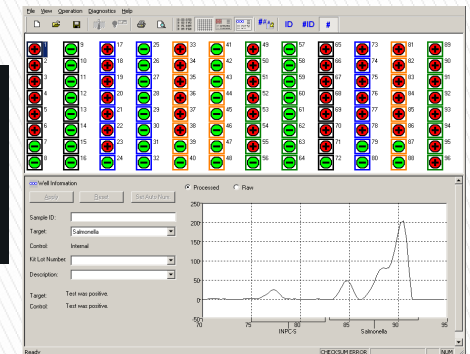
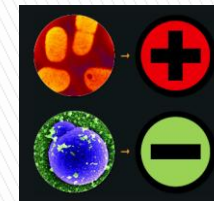


PCR

Eredmények



Utódúsítás
(opcionális)



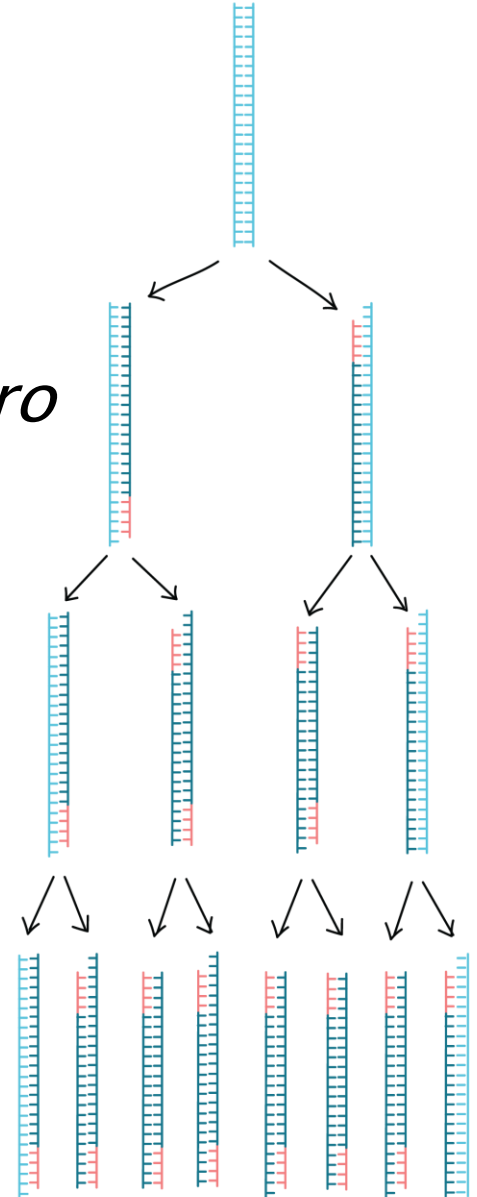
PCR technika

Felfedezése 1983, Kary Mullis

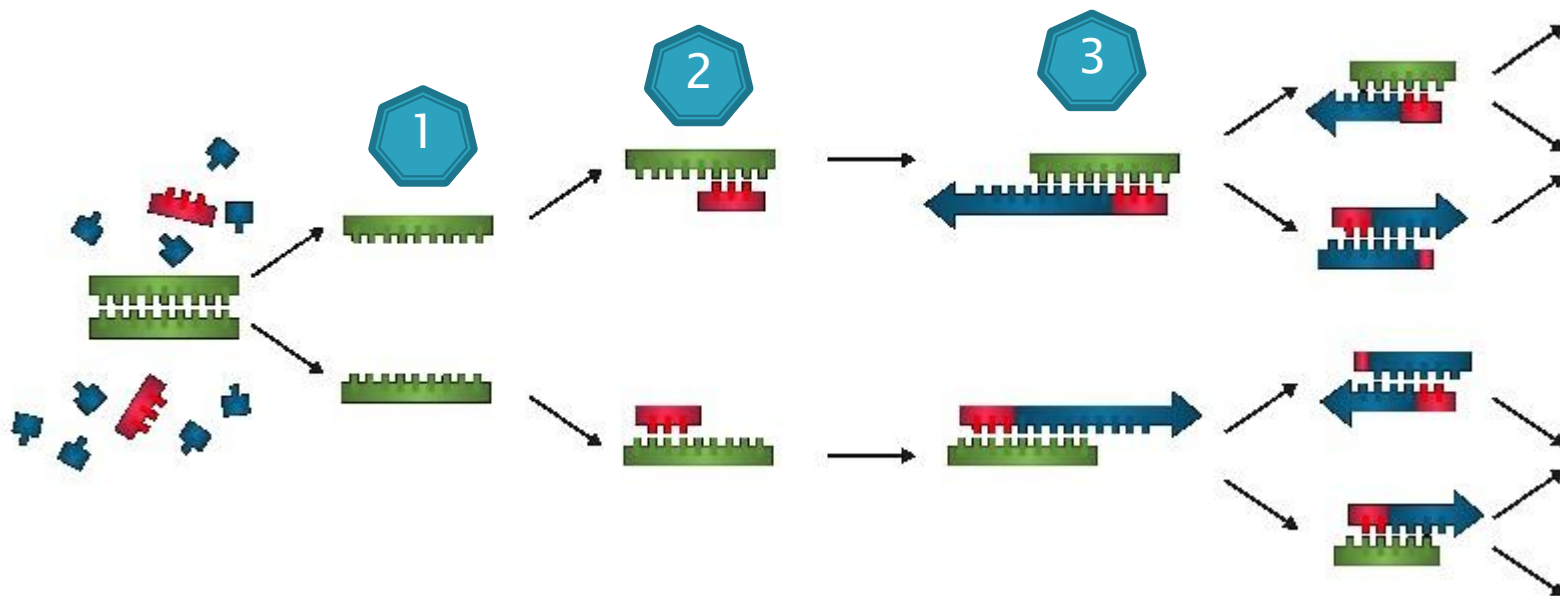
Ismert DNS szekvenciájú szakasz *in vitro* felerősíthető egy ciklikusan ismétlődő módszerrel.

Szükséges vegyületek:

- ▶ legalább 1 db cél DNS molekula
- ▶ Hőstabil polimeráz enzim
- ▶ primerek (szintetikus)
- ▶ Nukleotid bázisok (dNTP)
- ▶ Anionok



PCR lépései



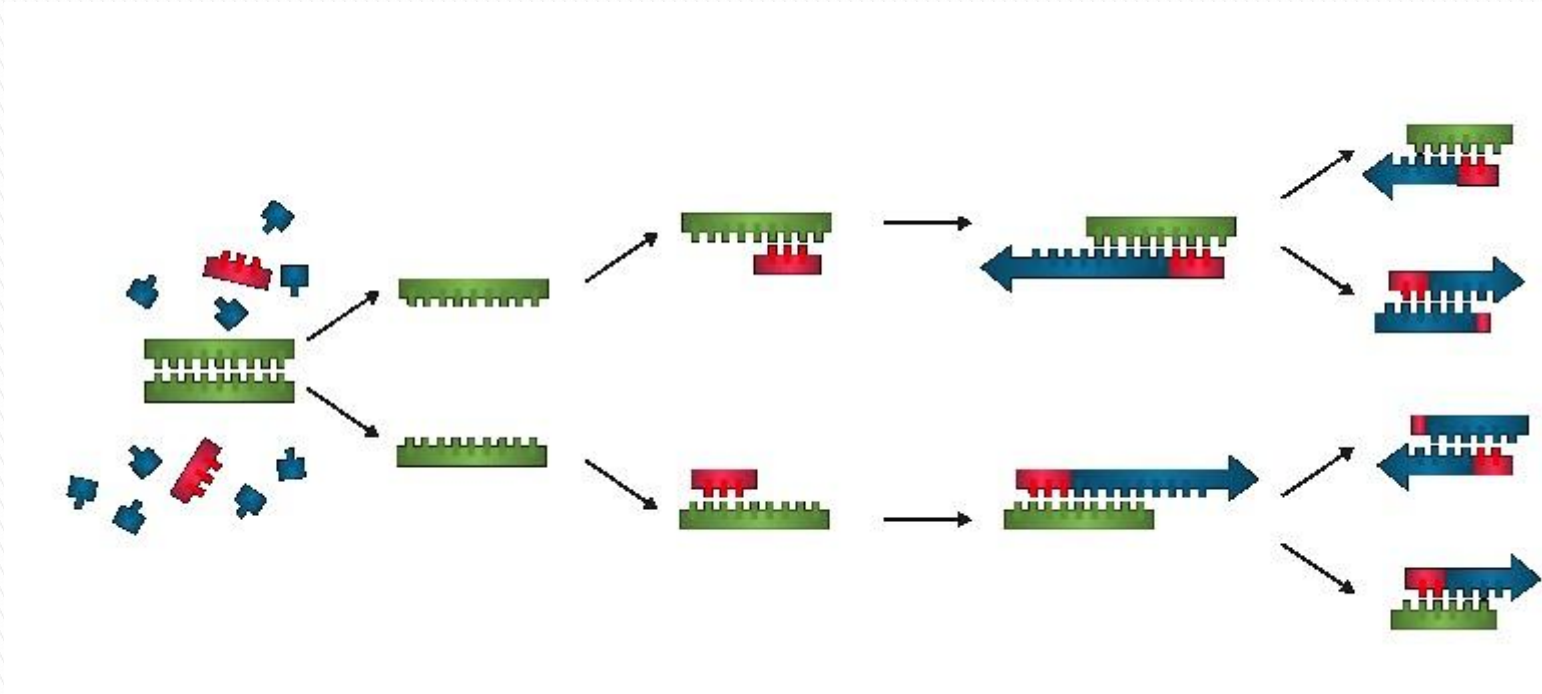
1. Denaturálás (T: $>90^{\circ}\text{C}$) A hőmérséklet emelésével a DNS szálak szétválnak.

2. Annealing (T: $\sim 50^{\circ}\text{C}$) A hőmérséklet csökkenésével a primerek a DNS szálakhoz kötődnek

3. Lánc hosszabbítás T: 72°C

A DNS-polimeráz enzim hőmérsékleti optimumán megtörténik a célzott DNS szakasz megkettőződése

PCR lépései



A ciklus előrehaladtával 2^x DNS molekula képződik

40 ciklus esetén 2^{39} db azaz 1099511627776 db DNS molekula keletkezik 1 db DNS molekulából.

$1,099 \times 10^{11}$ db DNS molekula

PCR technika – Detektálás

- ▶ Végpontjelzéses PCR

A folyamat végén (pl. 40 ciklus) után mérjük a fluoreszcens jelet.

Jelenlét / **Hiány** tesztek

- ▶ Real-time PCR

A specifikus DNS szakaszok felszaporítása és detektálása egy időben történik.

Kvantitatív meghatározás lehetséges

Végpontjelzéses PCR

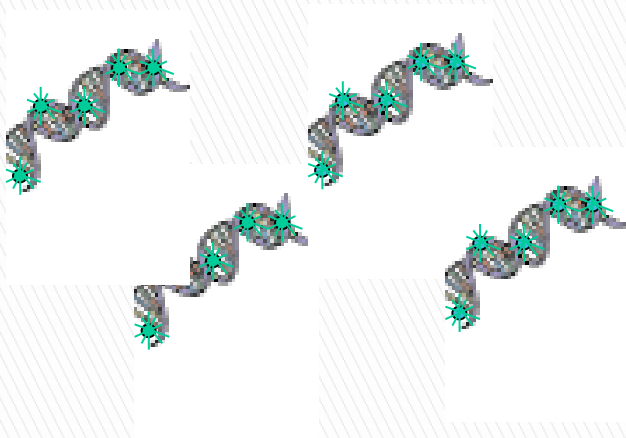
Detektálás

A DNS „olvadásával” a szálak szétválnak.

Az interkaláló festék fluoreszcens jele a hőmérséklet emelkedésével csökken (pl. SYBR Green)

Az interkaláló festék a kétszálú DNS-hez kötődve fluoreszcens jelet ad

A DNS-hez nem kötött festék nem ad jelet

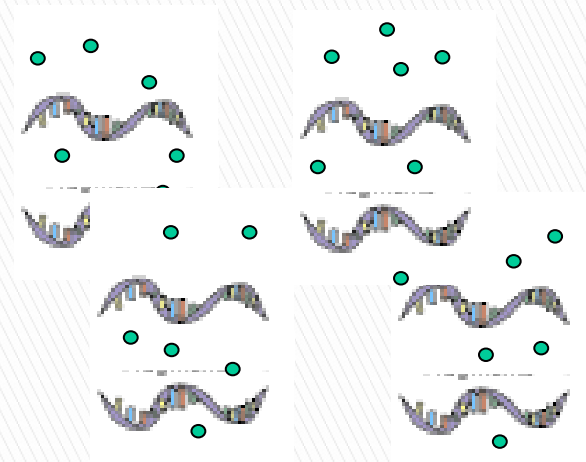


Jel

Emelkedő hőmérséklet



Nincs Jel

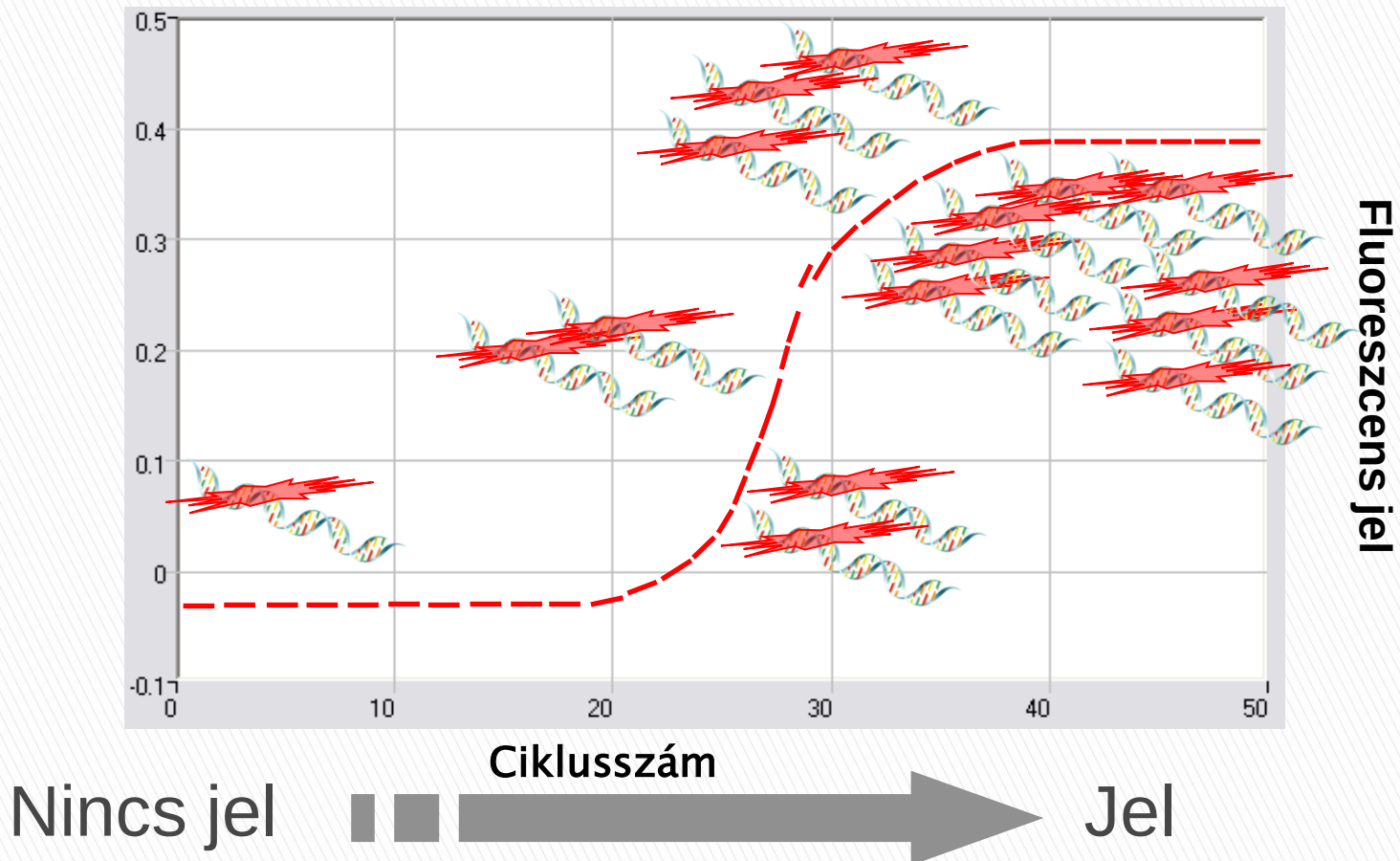


Real Time PCR

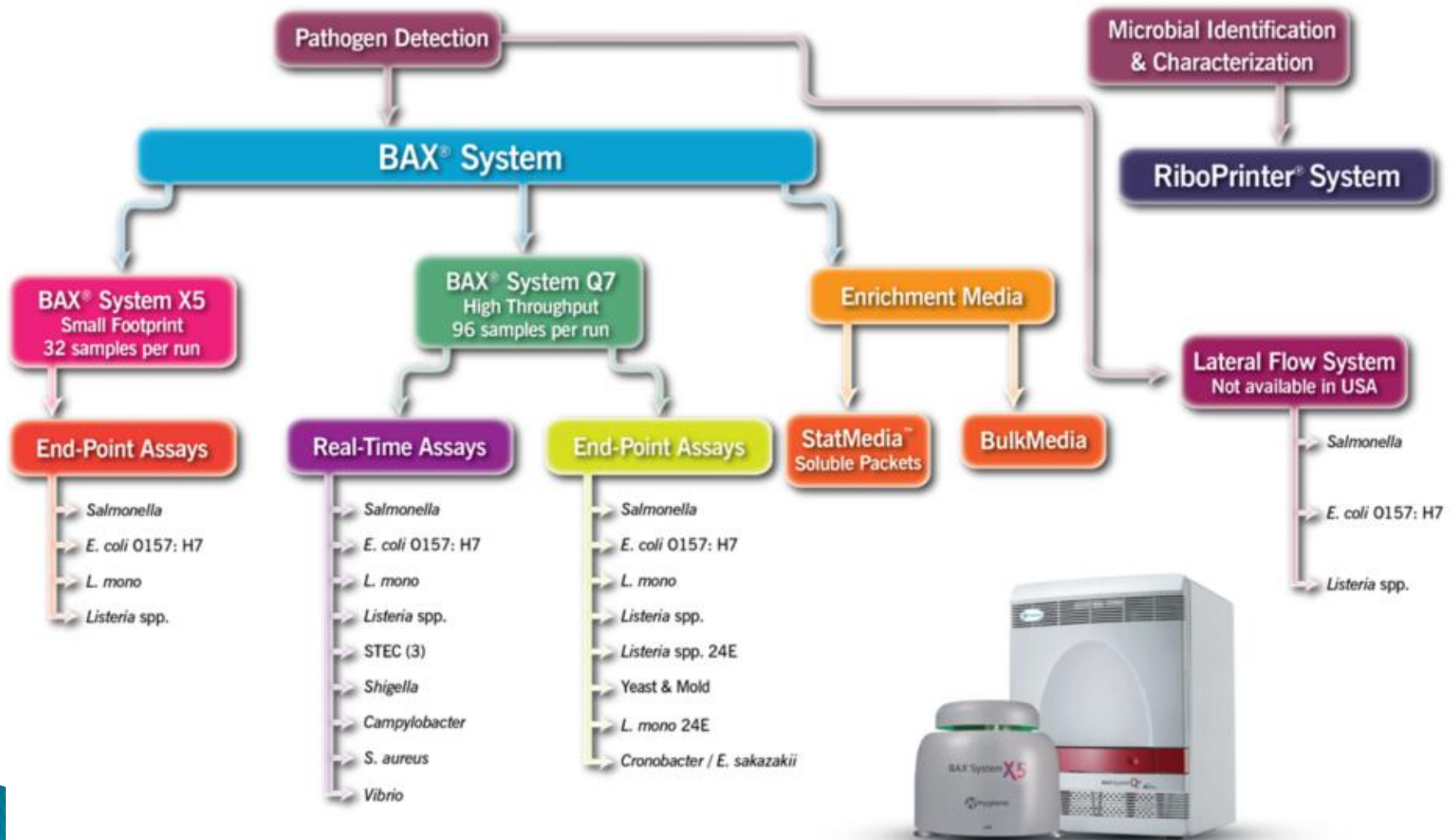
Detektálás

A fluoreszcens jel a ciklusok előrehaladtával növekszik, amennyiben jelen van a célzott DNS.

Szoftveresen történik a mikrobaszám meghatározása a szigmoid görbe alapján.



Élelmiszer vizsgálatok



A BAX több mint 20 év innovációval rendelkezik a DNS alapú PCR technika területén élelmiszer eredetű patogének kimutatásában

2017

Hygiena akvizícióval megszerezte a DuPont Diagnosticat



2015

Az új, kisebb méretű BAX® System X5 elérhetővé teszi a könnyű, pontos és megbízható patogén kimutatást



2010

Az első Scorpion™ próbával gyártott BAX megjelenése.

2005

A Q7-es BAX® System real-time tesztekkel.

2001

Az első automata BAX® System (BAX® System Classic) megjelenése.



1995 – Az eredeti, gél-alapú BAX System megjelenése

Tablettázott PCR reagenszek

✓ Minden PCR-hoz szükséges reagens a csőben

■ Taq polimeráz

■ Nukleotidok

■ Primerek

■ Pozitív belső kontroll

■ Fluoreszens festék

→ PCR csövekbe csomagolva

→ Beépített folyamatkontroll

→ Nincs szükség többszörös reagens adagolásra

→ Csökken a pipetázási hibalehetőség

→ PCR-t stabilizáló anyagok a mátrix gátlóhatásának megelőzésére

→ A zárt reakciócsövek csökkentik az amplikon-szennyezés lehetőségét



BAX® System X5

Az X5-ös BAX® System platform ugyanazt a gyors, pontos könnyen használható patogén kimutatást teszi lehetővé amit egy BAX® System-től várhatunk, azonban a kisebb méret és a pehelysúlyú konstrukció rugalmasabb.



BAX® System Q7

Standard kitek:

Salmonella

Salmonella 2

E. coli O157:H7 MP (multiplex)

Genus *Listeria* 24E

Listeria monocytogenes 24E

Enterobacter sakazakii

Yeast and mold – Élesztő és Penész

Real-time kitek:

- ✓ *Campylobacter jejuni/coli/lari*
- ✓ *Salmonella* spp.
- ✓ *E. coli* O157:H7
- ✓ *E. coli* STEC: *E. coli* STEC: atx1, stx2 & eae
 - ✓ STEC ID Panel 1: O26, O111, O121
 - ✓ STEC ID Panel 2: O45, O103, O145
- ✓ *Staphylococcus aureus*
- ✓ *Vibrio*
cholerae/parahaemolyticus/vulnificus
- ✓ *Shigella*
- ✓ Genus *Listeria*
- ✓ *Listeria monocytogenes*

A kitek 96 tesztre elég:

- PCR csövet a tablettázott reagenst
- Optikai tetőt
- Lízis reagenst tartalmaznak



BAX® Standard vs. BAX® Real-Time kitek

BAX® Standard PCR tesztek (Végpont jelzéses PCR):

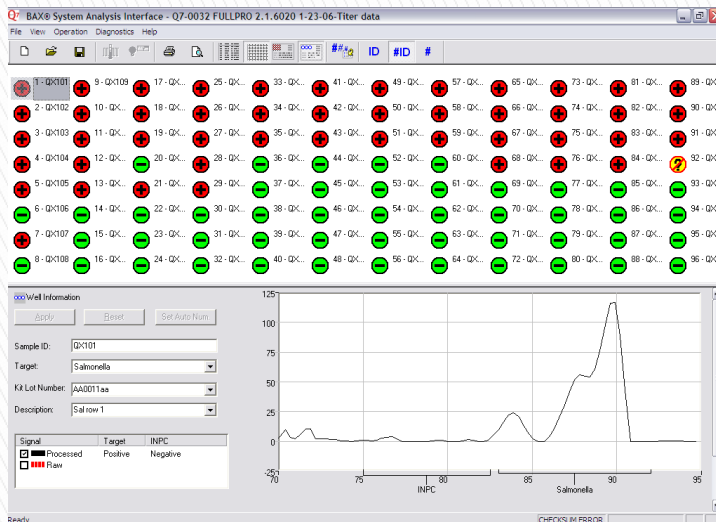
- Olvadási görbe elemzés, folyamat ideje 3.5 óra.
- A számítógépes algoritmus + vagy - eredményt ad.
- *Salmonella*, *Listeria* Genus 24E, *Listeria monocytogenes* 24E, Yeast & Mould, *Enterobacter sakazakii*

BAX® Real Time PCR tesztek:

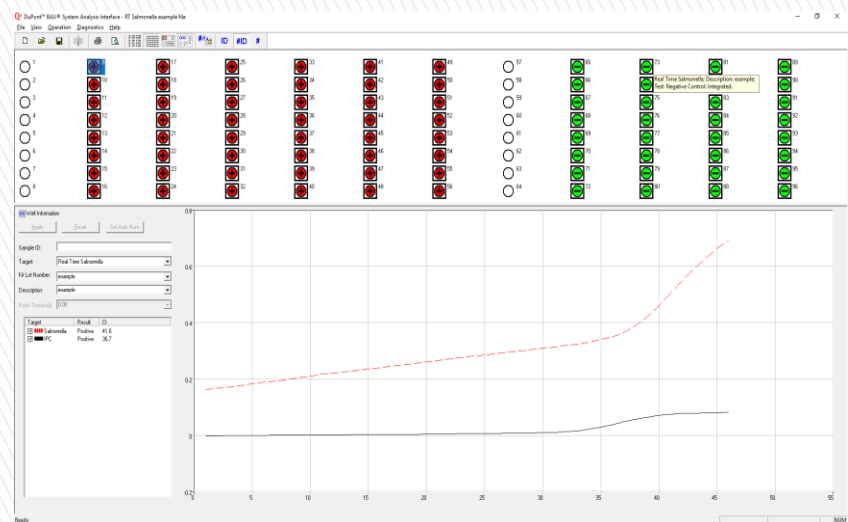
5 festék csatorna többféle próba alkalmazását teszi lehetővé egy reakciónál. A folyamat ideje 55–90 perc. Kvalitatív és kvantitativ információ egyaránt nyerhető vele.

Campylobacter coli/jejuni/lari, *Staph. aureus*, *Vibrio vul/para/cholerae*, *E. coli* O157:H7, *STEC*, *Salmonella* spp, *Shigella*, Genus *Listeria*, *Listeria monocytogenes*

Standard BAX® kit



Real-Time BAX® kit



Jóváhagyások és validációk

Hatósági jóváhagyások



USA



Brazília



Kínai Népköztársaság



Kanada



Dánia



Japán

Validációk

AOAC International



AOAC Research
Institute



AFNOR



NordVal



Módszer átvétel

USDA-FSIS



Jóváhagyások és validációk

Végpontjelzéses PCR Salmonella	• Az USDA FSIS által átvett módszer MLG 4C • Az USDA NPIP által javasolt baromfi környezeti minták esetén • Az FDA Egg Safety Action terv által javasolt egységes tojáslé minták esetén
Végpontjelzéses PCR L. monocytogenes	• Az USDA FSIS által átvett módszer MLG 8A • A Brazil MAPA, • Kínai AQSIQ • Orosz Rospotrebnadzor • és a Japán Egészségügyi Minisztérium által elismert módszer
Real-Time PCR E. coli O157:H7	• Az USDA FSIS által átvett módszer MLG 5A darált marhahús és hasított marhahúsokra
Real-Time PCR Campylobacter jejuni, coli, lari	Kloáka kenet: • Direkt módszer <2 óra fajonkénti sejtszám • Kínai AQSIQ, Orosz Rospotrebnadzor által elismert módszer

Köszönöm megtisztelő
figyelmüket!

