

ANNA ZADERNOWSKA, WIOLETA CHAJĘCKA-WIERZCHOWSKA,
LUCYNA KLĘBUKOWSKA

FLUORESCENCYJNA HYBRYDYZACJA *IN SITU* JAKO ALTERNATYWNA METODA OZNACZANIA OBECNOŚCI PAŁECZEK *SALMONELLA* SP. W MIĘSIE DROBIOWYM

Streszczenie

Salmonella sp. jest jedną z głównych przyczyn zatruc pokarmowych. Z uwagi na czasochłonność standardowej metody wykrywania tego patogenu w żywności istnieje potrzeba doskonalenia metod alternatywnych. W badaniach zastosowano fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (FISH) z użyciem sondy Sal3 do wykrywania obecności *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym (zaszczepionym *Salmonella* sp. oraz innymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*) i porównano ją z immunodiagnostyczną metodą enzymo-immunofluorescencyjną (VIDAS® SLMX) oraz metodą wg PN-ISO-6579. Metodami: FISH i VIDAS nie otrzymano wyników fałszywie negatywnych. Metodą VIDAS uzyskano jednak kilka wyników fałszywie pozytywnych. W metodzie FISH nie zaobserwowano hybrydyzacji ze szczepami innymi niż *Salmonella* sp. Wyniki wskazują na możliwość zastosowania FISH jako szybkiej metody wykrywania *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym.

Słowa kluczowe: mięso drobiowe, *Salmonella* sp., FISH, VIDAS, PN-ISO-6579

Wprowadzenie

Pałeczki *Salmonella* sp., będące główną przyczyną zatruc pokarmowych, są wskaźnikiem bezpieczeństwa żywności. Wymieniane są w corocznych raportach EFSA – European Food Safety Authority jako główny enteropatogen odpowiedzialny za epidemie zatruc pokarmowych. Główne źródło tych bakterii stanowią: mięso drobiowe, mięso wieprzowe, jaja, produkty mleczarskie, a w mniejszym stopniu: owoce i warzywa [6, 21]. Sprostanie standardom z zakresu zapewnienia bezpieczeństwa żywności oraz zarządzania ryzykiem w łańcuchu żywnościowym zmusza do opracowywania nowych, szybkich i pewnych metod identyfikacji zagrożeń mikrobiologicznych.

Dr inż. A. Zadernowska, mgr inż. W. Chajęcka-Wierzchowska, dr inż. L. Klębukowska, Katedra Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, Wydz. Nauki o Żywności, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Pl. Cieszyński 1, 10-726 Olsztyn. Kontakt: anna.zadernowska@uwm.edu.pl

Standardowe metody hodowlane wykrywania *Salmonella* sp. w żywności uważa się za dobrze opracowane, ale są one wieloetapowe i wymagają od 4 do 5 dni analizy w celu uzyskania wstępnych pozytywnych lub negatywnych wyników. Niezbędne jest także wykonanie szeregu potwierdzeń biochemicznych, co znacznie wydłuża czas analizy i w konsekwencji wynik ostateczny otrzymuje się po 7 dniach. Wszystko to może sprzyjać popełnianiu błędów w interpretacji wyników [15]. Długi czas oznaczeń jest ponadto znacznym utrudnieniem w obrocie żywnością. Również możliwość zachowania aktywności metabolicznej drobnoustrojów, mimo utraty zdolności do tworzenia kolonii na podłożach stałych w wyniku np. warunków stresowych – tzw. stan VBNC (*viable but nonculturable*), przemawia za koniecznością doskonalenia metod diagnostycznych [5]. Problemem jest również możliwość występowania w produktach komórek subletalnie uszkodzonych podczas przeprowadzanych procesów technologicznych [8]. Alternatywą dla analiz tradycyjnych są techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH), polegające na zastosowaniu sond stanowiących krótkie sekwencje oligonukleotydów, łączących się z kwasami nukleinowymi komórki [10]. Sondy są znakowane markerami fluorescencyjnymi, łączą się z materiałem genetycznym bakterii o sekwencji komplementarnej do sondy. Z uwagi na to, że sondy zawierają znaczniki fluorescencyjne, połączenie materiału zawartego w próbce z komplementarną sondą obserwuje się w mikroskopie epifluorescencyjnym. Technika ta jest dość powszechnie wykorzystywana w medycynie i w badaniach środowiskowych [13]. Jest również stosowana w badaniach złożonych układów populacji mikroorganizmów, jakimi są biofilmy [2].

Niezbędnym warunkiem zastosowania techniki FISH do skutecznego wykrywania drobnoustrojów chorobotwórczych w żywności jest dobranie optymalnych warunków przygotowania prób z uwagi na bardzo zróżnicowaną matrycę, tj. skład chemiczny żywności oraz mikroflorę towarzyszącą, które mogą prowadzić do odczytów obarczonych dużym błędem. Jeśli w żywności znajdują się pałeczki *Salmonella* sp., to najczęściej żywność ta jest znacznie zanieczyszczona innymi drobnoustrojami w tym pałeczkami Gram-ujemnymi. Dlatego do stosunkowo szybkiej oceny jakości i bezpieczeństwa żywności konieczny wydaje się dobór nie tylko sond dla poszczególnych gatunków drobnoustrojów, ale przede wszystkim zoptymalizowanie przygotowania prób żywności do badań w zależności od matrycy [4].

Celem pracy była ocena możliwości zastosowania techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) do wykrywania obecności pałeczek *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym oraz porównanie tej metody z techniką immunoenzymatyczną (VIDAS[®] SLMX) oraz standardową metodą wg PN-ISO-6579:2003.

Material i metody badań

Szczepy

Podczas badań stosowano monokultury i kultury mieszane szczepów: *Salmonella bongori* ATCC[®] 43975, *Salmonella enterica* subsp. *anatum* ATCC[®] 9270, *Salmonella* Typhimurium ATCC[®] 14028, *Salmonella* Enteritidis ATCC[®] 13076, *Escherichia coli* ATCC[®] 11229, *Escherichia coli* ATCC[®] 14169, *Escherichia coli* ATCC[®] 23848, *Proteus mirabilis* ATCC[®] 25933, *Proteus vulgaris* ATCC[®] 33420, *Klebsiella pneumoniae* NCTC[®] 9633, *Citrobacter freundii* NCTC[®] 9750, *Enterobacter aerogenes* ATCC[®] 13048, *Enterobacter cloacae* ATCC[®] 35030. Ponadto badaniom poddano 3 szczepy *Salmonella* sp. wyizolowane z mięsa drobiowego i zidentyfikowane w Katedrze Mikrobiologii Przemysłowej i Żywności, WNoŻ, Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego. Szczepy uaktywniano na podłożu bulionowym (Merck)/37 °C/24 h.

Sondy

W badaniach zastosowano sondy oligonukleotydowe, syntetyzowane na zamówienie w firmie Bionovo (tab. 1). Wszystkie sondy znakowane były barwnikami fluorescencyjnymi (Cy5, Cy3) na końcach 5' odpowiednio: EUB₃₃₈ – Cy5, NON₃₃₈ – Cy5, Sal3 – Cy3.

Tabela 1. Sondy oligonukleotydowe zastosowane w badaniach.
Table 1. Oligonucleotide probes used in research.

Sonda Probe	Specyficzność Specificity	Sekwencja nukleotydów (5'-3') Nucleotide sequence (5'-3')	Pozycja rRNA rRNA position	Literatura Literature
EUB ₃₃₈	Eubacteria	GCT GCC TCC CGT AGG AGT	16S (338-355)	[1]
NON ₃₃₈	–	ACT CCT ACG GGA GGC AGC	–	[20]
Sal3	<i>Salmonella enterica</i>	AAT CAC TTC ACC TAC GTG	23S (1713-1730)	[11]

Etapy badań

Badania prowadzono w dwóch etapach. W pierwszym materiał badawczy stanowiły namnożone hodowle szczepów. Stosowano 24-godzinne hodowle w bulionie odżywczym (Merck) szczepów izolowanych z żywności i szczepów referencyjnych wymienionych w punkcie 2.1. Kolejny etap obejmował badania zainfekowanego mięsa drobiowego zakupionego w sklepie na terenie Olsztyna (wykluczono w nim występowanie pałeczek *Salmonella* sp. zgodnie z PN-ISO-6579:2003 [12]). Procedura obejmowała jałowe przygotowanie 25-gramowej naważki mięsa w worku do Stomachera i zaszczepianie mięsa bakteriami w liczbie 100 - 500 jtk/g (stosując dziesięciokrotne

rozcieńczenia hodowli). Następnie dodawano 225 ml zbuforowanej wody peptonowej (Merck), przednamnażanie prowadzono w temp. 41,5 °C/24 h. Po tym czasie wykonywano dalsze analizy zgodnie z PN-ISO-6579:2003 [12], immunoanalizatorem miniVidas oraz techniką FISH.

Fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH)

Pobierano 1000 µl 24-godzinnej hodowli szczepów lub przednamnożonej próby, wirowano – 12000 obr./10 min. Zlewano supernatant, osad dwukrotnie przemywano 1000 µl PBS (Sigma). Tak przygotowane komórki zawieszano w 4-procentowym paraformaldehydzie (Sigma) i przetrzymywano w temp. 4 °C przez 4 h, a następnie przemywano dwukrotnie w roztworze etanolu i PBS (1 : 1). Komórki zawieszano w 500 µl mieszaniny etanol-PBS, nanoszono 10 µl tej mieszaniny na ośmiodołkowe szkiełka teflonowe (Thermo Scientific) i suszono. Przepłukiwano je w barwiaczu typu Hellendhala przez 3 min, w roztworze o stężeniu 50, 80, i 96 % etanolu. Na wysuszone preparaty nanoszono 10 µl buforu hybrydyzacyjnego (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, ddH₂O, 0,01 % SDS), zawierającego 5 ng/µl sondy Sal3 oraz 5 ng/µl sondy EUB₃₃₈. Hybrydyzację prowadzono w wilgotnych komorach, w piecu hybrydyzacyjnym przez 3h/45 °C. Po inkubacji szkiełka przemywano w buforze płuczącym (0,9 M NaCl, 20 mM Tris/HCl, ddH₂O, 0,01 % SDS) – 45 °C/15 min. Następnie nanoszono olejek Vectashield HardSet Mounting Medium z 4',6-diamidyno-2-fenylindolem – DAPI (Vector) i przetrzymywano w temp. 4 °C/15 min. W badaniach zastosowano metodę FISH wg Vieira-Pinto i wsp. [16] w modyfikacji własnej. Preparaty analizowano przy użyciu mikroskopu epifluorescencyjnego OLYMPUS BX51, wyposażonego w 100-watowy palnik rtęciowy, kolorową kamerę cyfrową XC10 do obserwacji w IR, chłodzoną układem Peltiera z elementem światłoczułym CCD oraz odpowiednie zestawy filtrów dla fluorochromów: Cy3 (U-M41007 w zakresie 530 – 560 nm), Cy5 (U-M41008 w zakresie 590 - 650 nm), DAPI (U-MNU2 w zakresie 360 - 370 nm). Analizę obrazu prowadzono z wykorzystaniem oprogramowania wersji CellSens Dimension plus Solution Multi Channel 5D. Zdjęcia preparatów wykonywano przy stałym czasie naświetlania.

Analiza z użyciem immunoanalizatora miniVIDAS

Salmonella Xpress (SLMX) jest testem immunoenzymatycznym polegającym na wykrywaniu w badanej próbce specyficznych antygenów. Zasada testu polega na zdolności do tworzenia kompleksów między przeciwciałami a antygenami obecnymi w próbce, które następnie znakowane są fosfatazą alkaliczną. Aparat odczytuje wyniki na podstawie intensywności fluorescencji (ELFA) powstałej w trakcie reakcji. Poszczególne etapy analizy wykonywano analogicznie jak w poprzednim opracowaniu [3].

Wyniki i dyskusja

Oznaczanie *Salmonella* sp. w żywności polega na wykrywaniu obecności tych pałeczek w określonej ilości produktu – z reguły w 25 g (25 ml) [7]. Nie przeprowadza się natomiast oznaczania liczby tych drobnoustrojów w żywności. Zarówno w metodzie klasycznej (PN-ISO-6579:2003), jak i jej modyfikacjach, pierwszym etapem oznaczenia jest etap nieselektywnego namnażania. Jest on niezmiernie ważny, ponieważ produkcja żywności wiąże się z jej obróbką technologiczną np. ogrzewaniem, co może spowodować śmierć większości komórek lub ich subletalne uszkodzenie [14]. Ponadto, żywność jest specyficznym środowiskiem rozwoju dla mikroorganizmów ze względu na zróżnicowaną zawartość soli, konserwantów, pH itp. Pominięcie etapu przednamnażania próbki i posiew materiału bezpośrednio na podłoże stałe może wpłynąć na uzyskanie wyników fałszywie negatywnych. Również podczas badań techniką FISH wskazany jest ten etap z uwagi na próg wykrywalności metody tj. około 10^3 jtk/g. Czułość metody tradycyjnej, jak i techniki FISH jest znacznie większa, jeśli stosowany jest etap przednamnażania, co potwierdzają badania [12].

W technice FISH niezwykle istotnym etapem jest dobór parametrów permeabilizacji komórek. Sondy są dużymi cząsteczkami, a zatem trudno przenikają do wnętrza komórki bakteryjnej. Penetrację sond może dodatkowo utrudniać etap utrwalania komórek. Ważny jest zatem odpowiedni dobór procedury permeabilizacji, która ma na celu łatwiejsze wnikanie sondy do komórki poprzez zwiększenie jej „porowatości”. W przeprowadzonych badaniach monokultur *Salmonella* sp. obserwowano całkowite pokrycie sygnału komórek wizualizowanych z zastosowaniem sondy specyficznej znakowanej fluorescencyjnie Cy3 i sondy uniwersalnej EUB₃₃₈ znakowanej Cy5 oraz z DAPI. Interkalator DAPI (4',6-diamidyno-2-fenylindol), to fluorochrom wiążący się selektywnie z parami zasad adenina-tymina [9]. Jest to barwnik stosowany do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów. Obserwowane pokrycie wszystkich sygnałów wskazuje na prawidłowo przeprowadzoną permeabilizację komórek *Salmonella* sp. I związanie się wszystkich obecnych w preparacie komórek z sondą Sal3. Natomiast specyficzność sondy Sal3 potwierdzono w badaniach kultur mieszanych, gdzie obserwowano całkowite pokrycie się sygnałów komórek związanych z EUB₃₃₈ i DAPI oraz fluorescencją wybranych komórek (*Salmonella* sp.) znakowanych sondą Sal3 (fot. 1). Niespecyficzne wiązania sond oligonukleotydowych zweryfikowano sondą NON₃₃₈, stanowiącą kontrolę negatywną. Dodatkowo potwierdzono pokrywanie się sygnałów pochodzących od fluorochromów: Cy3 i Cy5 z fluorochromem DAPI.



Fot. 1. Wykrywanie *Salmonella* sp. w hodowlach bulionowych z użyciem sondy Sal3. Niebieska fluorescencja (DAPI) – mieszanina pałeczek *Enterobacteriaceae*; żółta fluorescencja (Sal3-Cy3) – *Salmonella* sp.; czerwona fluorescencja (EUB338-Cy5) – mieszanina pałeczek *Enterobacteriaceae*; nałożony obraz (Sal3-Cy3 oraz Eub338).

Phot. 1. Detection of *Salmonella* sp. in broth culture samples using Sal3 probe. Blue fluorescence (DAPI) – mixed *Enterobacteriaceae* rods; yellow fluorescence (Sal3-Cy3) – *Salmonella* sp.; red fluorescence (EUB338-Cy5) - mixed *Enterobacteriaceae* rods; imposed image (Sal3-Cy3 and Eub338).

Aplikacja techniki FISH do badań żywności jest możliwa po odpowiednim przygotowaniu próby [4]. W związku z tym przed rozpoczęciem badań właściwych prowadzono analizy wstępne mające na celu optymalizację każdego z etapów przygotowania próby do analizy techniką FISH (dane niepublikowane). Niezwykle istotnymi parametrami okazały się: dobór odpowiedniej membrany do sączenia próby po procesie homogenizacji (worki z perforowanym filtrem bocznym – Interscience), czas i prędkość wirowania, etap opłukiwania komórek oraz czas i temperatura ich utrwalania. Takie podejście pozwoliło na oddzielenie komórek od występujących w mięsie cząstek białek, tłuszczów itp. Efektem było uzyskanie obrazu mikroskopowego bez elementów

wykazujących autofluorescencję, co ułatwiło obserwację i interpretację obrazu mikroskopowego.

Tabela 2. Wyniki analiz otrzymane metodami FISH, VIDAS i ISO w hodowlach na bulionie.
Table 2. Results of FISH, VIDAS, and ISO analyses obtained in broth cultures.

Układ szczepów Composition of strains	Hodowle na bulionie Broth cultures						
	Liczba prób / Quantity of samples						
	ogółem total	pozytywnych positive			negatywnych negative		
		FISH	ISO	VIDAS	FISH	ISO	VIDAS
Monokultury / Monocultures							
- <i>Salmonella</i> sp.	7	7	7	7	0	0	0
- ENT	9	0	0	0	9	9	9
Kultury mieszane / Mixed cultures							
- S+ENT	32	32	32	32	0	0	0
- ENT+ENT	36	0	0	0	36	36	36
Razem / Total	84	39	39	39	45	45	45

Objaśnienia: / Explanatory notes:

ENT – pozostałe pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* / other *Enterobacteriaceae* rods; S+ENT – *Salmonella* sp. i dwie inne pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* / *Salmonella* sp. and two other rods from *Enterobacteriaceae* family; ENT+ENT – pozostałe pałeczki z rodziny *Enterobacteriaceae* w układach po dwie / other *Enterobacteriaceae* rods arranged in twos.

W pierwszym etapie badań, prowadzonym w hodowlach na bulionie, wyniki uzyskane trzema metodami (FISH, SLMX, ISO) całkowicie się pokrywały (tab. 2). Potwierdza to wysoką specyficzność metod alternatywnych. W badaniach kontaminowanego mięsa obserwowano pewne rozbieżności w wynikach uzyskanych poszczególnymi metodami (tab. 3). Dotyczyły one próbek mięsa kontaminowanego mieszaniną pałeczek *Salmonella* sp. i innych z rodziny *Enterobacteriaceae*. Zarówno techniką FISH, jak i immunoenzymatyczną wykryto obecność pałeczek *Salmonella* sp. we wszystkich próbach, do których została dodana. Technika FISH nie uzyskano wyników pozytywnych w próbach kontaminowanych innymi niż *Salmonella* sp. pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae*, podczas gdy testy SLMX wykazały 5 wyników fałszywie pozytywnych. Na możliwość otrzymania wyników fałszywie pozytywnych przez immunoanalizator VIDAS wskazywano także w innych badaniach [3, 18]. Może to być spowodowane reakcjami krzyżowymi z innymi pałeczkami z rodziny *Enterobacteriaceae* znajdującymi się w matrycy (mięsie). Z uwagi na skład oraz pH mięso drobiowe z reguły jest wysoko obciążone różnorodną mikroflorą [19].

Tabela 3. Wyniki analiz otrzymane metodami FISH, VIDAS i ISO w kontaminowanym mięsie.

Table 3. Results of FISH, VIDAS, and ISO analyses obtained in inoculated meat.

Układ szczepów Composition of strains	Zaszczepione mięso Inoculated meat						
	Liczba prób / Quantity of samples						
	ogółem total	pozytywnych positive			negatywnych negative		
		FISH	ISO	VIDAS	FISH	ISO	VIDAS
Monokultury / Monocultures							
- <i>Salmonella</i> sp.	7	7	7	7	0	0	0
- ENT	9	0	0	0	9	9	9
Kultury mieszane / Mixed cultures							
- S+ENT	32	32	31	32	0	1*	0
- ENT+ENT	36	0	0	5	36	36	31
Razem / Total	84	39	38	44	45	46	40

Objaśnienia jak pod tab. 2: / Explanatory notes as in Tab. 2.

*Wynik fałszywie negatywny w mieszaninie *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, *Proteus mirabilis* / False negative result in *Salmonella enteritidis*, *Proteus vulgaris*, and *Proteus mirabilis* mixture

Spośród 39 próbek mięsa kontaminowanych pałeczkami *Salmonella* sp. zarówno techniką FISH, jak i testem SLMX, wszystkie próbki oznaczono jako pozytywne. Metodą standardową otrzymano natomiast jeden wynik fałszywie negatywny. Jego przyczyną była prawdopodobnie duża liczba mikroflory towarzyszącej, której obfity wzrost na płytkach z podłożami wybiórczymi utrudniał interpretację wyników. Na podłożu XLD niektóre pałeczki z rodzaju *Proteus* sp. rosną w postaci kolonii charakterystycznych dla *Salmonella* sp. Błędny wybór kolonii do dalszych potwierdzeń może być przyczyną wyników fałszywie negatywnych.

Zastosowanie sondy oligonukleotydowej w oznaczaniu pałeczek *Salmonella* sp. W mięsie pozwoliło na otrzymanie wiarygodnych wyników. Porównując FISH oraz testy SLMX z metodą standardową uwagę zwraca czas analizy. Zarówno w technice FISH, jak i w metodzie immunoenzymatycznej można wykluczyć występowanie pałeczek *Salmonella* sp. w ciągu 20 - 26 h, podczas gdy metodą standardową etap ten zajmuje około 70 h. Niewątpliwą zaletą obu metod alternatywnych jest brak wyników fałszywie negatywnych, jednak otrzymywanie wyników fałszywie pozytywnych metodą immunoenzymatyczną wydłuża czas i generuje koszty.

Vieira-Pinto i wsp. [17] badali próbki naturalnie kontaminowanej wieprzowiny techniką FISH oraz metodą standardową. Techniką FISH wykryli pałeczki *Salmonella* sp. w 16 (34 %) na 47 badanych próbek, podczas gdy metodą płytkową zaledwie w 6 próbkach – przy czym w jednej z próbek pozytywnych oznaczonych metodą standardową nie wykryto obecności tych pałeczek, stosując technikę FISH. Znaczące różnice

w liczbie próbek pozytywnych otrzymanych stosowanymi metodami autorzy tłumaczą możliwością występowania komórek subletalnie uszkodzonych bądź komórek w stanie VBNC, które były „niehodowalne” na podłożach stałych, ale zawierały odpowiednią ilość rRNA niezbędnego do związania z sondą. Jest to jednak domniemanie autorów, które nie zostało potwierdzone empirycznie. Z uwagi na to, że badaniom poddano mięso naturalnie kontaminowane, być może uzyskiwali oni wyniki fałszywie pozytywne na skutek niespecyficznego wiązania sondy, co nie zostało przez cytowanych autorów sprawdzone. W badaniach własnych stworzono warunki modelowe – mięso zaszczepiano żywymi, aktywnymi i hodowlanymi komórkami *Salmonella* sp. Zatem powodem większej liczby wyników pozytywnych otrzymanych metodą FISH w porównaniu z metodą ISO może być raczej większa specyficzność metody, aniżeli zdolność do wykrywania komórek w stadium VBNC.

Wnioski

1. Technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z zastosowaniem sondy Sal3 do wykrywania pałeczek *Salmonella* sp. w mięsie drobiowym, przy odpowiednim przygotowaniu próbki oraz doborze warunków hybrydyzacji, może być stosowana jako specyficzna metoda alternatywna.
2. Zastosowanie techniki FISH pozwala na skrócenie czasu oczekiwania na wyniki, co ma szczególne znaczenie podczas badań surowców i produktów o krótkim terminie przydatności do spożycia.
3. Zarówno analiza żywności techniką FISH, jak i z zastosowaniem urządzenia miniVIDAS wymaga nakładów finansowych na niezbędny sprzęt. Po odpowiednim wyposażeniu laboratorium, koszty pojedynczych analiz metodą standardową (ISO-6579), FISH i miniVIDAS są porównywalne.

Praca badawcza finansowana ze środków Narodowego Centrum Nauki w ramach projektu nr NN 312 491340.

Literatura

- [1] Amann R.I., Binder B.J., Olson R.J., Chisholm S.W.: Combination of 16S rRNA targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1990, **56**, 1919-1925.
- [2] Aoi Y.: *In situ* identification of microorganisms in biofilm communities. *J. Biosci. Bioeng.*, 2002, **94** (6), 552-556.
- [3] Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowska A., Kłębukowska L., Łaniewska-Trokenheim Ł.: *Salmonella* detection in poultry meat – validation of VIDAS Xpress Automatic Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay-Based Method. *J. Food Safety*, 2012, **32** (4), 407-414.

- [4] Cocolin L., Diez A., Urso R., Rantsiou K., Comi G., Bergmaier I., Beimfohr C.: Optimization of conditions for profiling bacterial populations in food by culture-independent methods. *Int. J. Food Microbiol.*, 2007, **120**, 100-109.
- [5] Dahm H., Strzelczyk E.: Żyjące, lecz nie dające się hodować bakterie. *Post. Mikrobiol.*, 2004, **43** (3), 251-265.
- [6] EFSA: A quantitative microbiological risk assessment on *Salmonella* in meat: source attribution for human salmonellosis from meat. *Eur. Food Saf. Auth. J.*, 2008, **625**, 1-32.
- [7] Eijkelkamp J.M., Aarts H.J.M., van der Fels-Klerx H.J.: Suitability of rapid detection methods for *Salmonella* in poultry slaughterhouses. *Food Anal. Methods*, 2009, **2**, 1-13.
- [8] Jasson V., Baert L., Uyttendaele M.: Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *Int. J. Food Microbiol.*, 2011, **145**, 488-491.
- [9] McNamara Ch.J., Lemke M.J., Leff L.G.: Underestimation of bacterial numbers in starvation-survival mode using the nucleic acid stain DAPI. *Arch. Hydrobiol.*, 2003, **157** (3), 309-319.
- [10] Moter A., Göbel U.F.: Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms. *J. Microbiol. Meth.*, 2000, **41**, 85-112.
- [11] Nordentoft S., Christensen H., Wegener H.C.: Evaluation of a fluorescence-labelled oligonucleotide probe targeting 23S rRNA for in situ detection of *Salmonella* serovars in paraffin-embedded tissue sections and their rapid identification in bacterial smears. *J. Clin. Microbiol.*, 1997, **35**, 2642-2649.
- [12] PN-ISO-6579:2003. Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.
- [13] Rathnayaka R.M.U.S.K.: Effect of sample pre-enrichment and characters of food samples on the examination for the *Salmonella* by plate count method and fluorescent in-situ hybridization technique. *Am. J. Food Technol.*, 2011, **6** (9), 851-856.
- [14] Skowrońska A., Zmysłowska I.: Współczesne metody identyfikacji bakterii stosowane w ekologii mikroorganizmów wodnych. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH). *Post. Mikrobiol.*, 2006, **45**, 183-193.
- [15] Taskila S., Tuomola M., Ojamo H.: Enrichment cultivation in detection of food-borne *Salmonella*. *Food Control*, 2012, **26**, 369-377.
- [16] Tomás D., Rodrigo A., Hernández M., Ferrús M.A.: Validation of Real-Time PCR and Enzyme-Linked Fluorescent Assay-Based Methods for Detection of *Salmonella* spp. in chicken feces samples. *Food Anal. Methods*, 2009, **2**, 180-189.
- [17] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Aranha J., Martins C., Bernardo F.: Influence of an enrichment step on *Salmonella* sp. detection by fluorescent in situ hybridization on pork samples. *Food Control*, 2008, **19**, 286-290.
- [18] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Bernardo F., Martins C.: Evaluation of Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) as a rapid screening method for detection of *Salmonella* in tonsils of slaughtered pigs for consumption: a comparison with conventional culture method. *J. Food Safety*, 2005, **25**, 109-119.
- [19] Vieira-Pinto M., Oliveira M., Bernardo F., Martins C.: Rapid detection of *Salmonella* sp. in pork samples using fluorescent in situ hybridization: a comparison with VIDAS®-SLM system and ISO 6579 cultural method. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, 2007, **59** (6), 1388-1393.
- [20] Wachowicz I.: Wpływ rozmrażania solankowego na jakość mikrobiologiczną mięsa kurcząt. *Żywność. Nauka. Technologia. Jakość*, 2005, **2** (43), 253-264.
- [21] Wallner G., Amann R., Beisker W.: Optimizing fluorescent in situ hybridisation with rRNA-targeted oligonucleotide probes for flow cytometric identification of microorganisms. *Cytometry*, 1993, **14** (2), 136-143.
- [22] Zadernowska A., Chajęcka-Wierzchowska W., Zadernowski M.: Drobnoustroje chorobotwórcze i zatrucia pokarmowe w krajach UE. *Przem. Spoż.*, 2012, **66**, 26-29.

**FLUORESCENCE *IN SITU* HYBRIDIZATION AS ALTERNATIVE SCREENING
METHOD FOR DETERMINING PRESENCE OF *SALMONELLA* SP.
IN CHICKEN MEAT**

S u m m a r y

Salmonella sp. is one of the main causes of food poisoning. Since the standard method for detecting that pathogen in food is time-consuming, it is necessary to perfect alternative methods. In the research study, a fluorescent in situ hybridization method (FISH) was utilized with the use of a Sal3 probe to detect *Salmonella* sp. in chicken meat (inoculated with *Salmonella* sp. and with other Enterobacteriaceae rods) and compared with an Enzyme-Linked Fluorescent Immunoassay-Based Method (VIDAS® SLMX) and with an ISO method. While using the FISH and VIDAS methods, no false negative results were obtained. With the use of the VIDAS method, several false positive results were obtained. In the FISH method, no hybridization was reported to any strains other than *Salmonella* sp. The results obtained indicate that the FISH method could, possibly, be utilized as a rapid screening method for detecting *Salmonella* sp. in chicken meat.

Key words: chicken meat, *Salmonella* sp., FISH, VIDAS, ISO-6579 ☒