

METODE RAPIDE DE DETECTARE A TULPINILOR DE *SALMONELLA* ÎN PRELEVATE

(revista literaturii)

¹Greta Bălan, ²Olga Burduniuc, ²Radu Cojocaru

¹Catedra Microbiologie, Virusologie, Imunologie USMF "Nicolae Testemițanu",

²Centrul Național de Sănătate Publică

Summary

Rapid methods of detection of Salmonella strains in samplers

The genus *Salmonella* contains only two species, but includes around 2500 serovars, many of which can cause human illness, often food borne. Traditional detection and confirmation methods of *Salmonella* are long established and typically take 3-5 days to obtain a result. For this reason a substantial number of alternative rapid screening methods have been developed to produce results more quickly. Rapid detection and confirmation methods are widely available and are capable of reducing detection times to 48 hours or less.

Key words: rapid methods, *Salmonella* spp., food poisoning.

Rezumat

Genul *Salmonella* conține numai două specii, dar include în jur de 2500 de serovariante, multe dintre care pot provoca boli umane, deseori alimentare. Metodele tradiționale de detectare și confirmare a salmonelelor sânt de durată și de obicei necesită 3-5 zile pentru a obține rezultatul. Din acest motiv, pentru a primi rezultate mai rapide, au fost elaborate un număr substanțial de metode alternative rapide. Metodele rapide de detectare și confirmare sânt disponibile pe scară largă și sânt capabile de a reduce timpul de detectare până la 48 de ore și mai puțin.

Cuvinte cheie: metode rapide, *Salmonella* spp., toxiinfecții alimentare.

Actualitatea

În ciuda progreselor evidente înregistrate în ultimul timp atât în domeniul medical cât și în cel al tehnologiilor alimentare, toxiinfecțiile alimentare, continuă să reprezinte o problemă de sănătate publică majoră.

În ultimii ani, izbucnirile epidemice de toxiinfecții alimentare au crescut, fiind rezultatul infectării în masă a unui grup de oameni care au consumat același aliment contaminat. Alimentele cel mai frecvent contaminate sunt carnea și produsele din carne, peștele, laptele și produsele lactate, ouăle, dar și preparatele culinare, ca maioneză, creme, prăjituri, înghețată.

Categoriile cele mai expuse la riscul de a dezvolta o infecție cu *Salmonella* spp. sunt copiii, vârstnicii și persoanele cu probleme ale sistemului imunitar. În plus, și persoanele care au un pH gastric mai bazic pot fi mai predispuse la infecție.

Centrul European de Prevenire și Control al Bolilor (ECDC) și Autoritatea Europeană pentru Siguranța Alimentară (EFSA) au raportat în 2007, în cele 27 de state membre ale Uniunii Europene, un număr de 151 995 de cazuri de salmoneloză la om, reprezentând o incidență de 31,1 cazuri la 100 000 de locuitori. Totuși, este evident că numărul cazurilor la om este puternic subestimat și subraportat [2].

Necesitatea evidențierii rapide a agentului etiologic în prelevate umane și alimentare este determinată de mai mulți factori. Bacilii Gram negativi sânt recunoscuți ca cea mai agresivă grupă de patogeni enterici, responsabili de peste 60% din izbucnirile de toxiinfecții alimentare în întreaga lume. Datorită răspândirii largi și a nespecificității de gazdă, bacilii Gram negativi sânt cei mai frecvenți contaminanți alimentari. Alimentele de origine animală sânt cel mai frecvent contaminate și reprezintă totodată calea majoră în determinarea evenimentelor epidemiologice. În acest context s-a impus extinderea continuă a investigației de control alimentar și adoptarea unor metode de detecție mai rapide și mai eficiente, cunoscute fiind perisabilitatea mare a

produselor alimentare precum și inconveniențele legate de detectarea și identificarea, îndeosebi a salmonelelor, prin metode fenotipice convenționale.

Obiectivele majore ale preocupărilor de îmbunătățire a performanțelor metodelor de detectare și identificare a salmonelelor în prelevate au fost axate pe reducerea atât a duratei diagnosticului cât și a costurilor legate de volumul imens al investigațiilor din rețeaua de control alimentar.

Sistemele multitest. Aceste sisteme au fost propuse încă din 1918 când Kligler a propus un sistem de lucru cu trei teste asociate într-o singură eprubetă. Sistemul oferea posibilitatea ca printr-o singură manoperă să se obțină informații referitoare la degradarea glucozei cu sau fără producere de gaz și producerea de H₂S și acid din lactoză. Mai târziu, mediul a fost modificat prin adaosul de zaharoză (Triple Sugar Iron), care este cel mai longeviv mediu multitest în practica de identificare a enterobacteriilor și altor bacili Gram negativi.

Utilizarea mediilor multitest oferă informații esențiale pentru diferențierea patogenilor enterici (*Enterobacteriaceae*, *Vibrio*, *Plesiomonas*, *Aeromonas*). Inocularea mediilor se face direct din colonii de pe mediile de izolare, fără cultivări intermediare.

Prin utilizarea mediilor multitest s-a făcut un progres considerabil premergător promovării metodelor microtest și automatizate de identificare fenotipică.

Sistemele microtest. Sistemele microtest au reprezentat după anul 1980 un salt remarcabil în practica de identificare a patogenilor enterici. Testele comercializate sub forma unor dispozitive gata de folosit, în volum mic, reprezintă o reducere considerabilă a costurilor materiale și de execuție. Acestea oferă o interpretare rapidă (în unele sisteme în 4-6 ore). Astfel, capacitatea de lucru a laboratoarelor a crescut imens. Costurile per investigare sânt reduse prin simplificarea manoperelor de preparare și execuție. În plus, s-au creat premisele trecerii la etapa ulterioară a tehnicizării și automatizării identificării fenotipice prin teste metabolice.

Sistemele microtest mai larg utilizate sânt: sistemul API, Micro ID, Rap ID, Minitex, Microbact, Enterotube II, Cobas-ID. Fiecare dintre aceste sisteme are avantaje și dezavantaje în concordanță cu testările "monotest", considerate "de referință".

Gama acestor sisteme este foarte largă și alegerea celui mai convenabil este dependentă de mai mulți factori, frecvent de ordin economic.

Sistemul API a fost printre primele lansate și a rămas cel mai longeviv. Promovat inițial pentru identificarea germenilor din familia *Enterobacteriaceae*, a fost ulterior extins și la alte grupe de bacterii și fungi datorită simplității în execuție, prețului de cost redus, concordanței reacțiilor.

Exceptând sistemul Enterotube II (care identifică colonii izolate, dar care nu permite tipizarea serologică, testarea sensibilității la antibiotice), majoritatea celorlalte sisteme propuse necesită densități bacteriene mari în vederea testării ($1-4 \times 10^9$ ufc), motiv pentru care coloniile suspecte trebuie subcultivate pe medii nutritive timp de 6-18 ore, ceea ce reduce din avantajul rapidității rezultatelor, intens speculat la promovarea acestor sisteme.

Sisteme test automatizate de identificare exoenzimatică. Promovate în practică de peste 25 de ani, au fost lansate inițial pentru investigații bacteriologice în spațiul cosmic.

Cerințele reducerii costurilor prin tehnicizarea operațiilor de execuție, incubare, citire a reacțiilor au depășit nesiguranța privind acceptarea sistemelor automatizate de investigare exoenzimatică a izolatelor în cultură pură. Costurile inițiale și chiar actuale ale acestor sisteme de procesare și identificare computerizată sânt inaccesibile pentru laboratoarele cu volum redus de investigații. Amploarea investigațiilor în aparatură și reactivi funcționali justifică introducerea echipamentelor automate numai în laboratoare de mari dimensiuni, cu un volum foarte mare de testări zilnice.

Deși performanțele sistemelor automatizate sânt remarcabile, controlul utilizării necesită o supraveghere de către specialiști de înaltă calificare, prin proceduri bine definite.

Sisteme de detecție rapidă. Multitudinea de metode propuse pentru detectarea rapidă a enterobacteriilor, direct în prelevate a fost determinată de necesitatea investigării operative a alimentului.

Detectarea antigenelor specifice diverșilor patogeni direct în prelevatul alimentar a fost aleasă ca o posibilitate convenabilă de orientare privind gradul de contaminare a produselor. Imensitatea încărcăturii și diversitatea microflorei intestinale a limitat însă în mare măsură utilizarea acestor metode la investigarea materiilor fecale.

Acuratețea sistemelor depinde deopotrivă de calitățile reactivilor (specificitate, sensibilitate), de performanța sistemelor de evidențiere a reacțiilor antigen-anticorp și de cantitățile de antigene prezente în produsul de cercetat.

Valoarea orientativă, îndeosebi a datelor pozitive, este considerabilă pentru fundamentarea deciziilor clinice și epidemiologice în contextul unor izbucniri de mari proporții.

O metodă recentă de imunodectie, rezonanța plasmonică de suprafață (SPR-surface plasmon resonance), a fost recomandată în mod particular pentru detecția salmonelelor în aliment. Principiul metodei constă în reacția specifică a anticorpilor monoclonali, cuplați pe un biocip, cu antigenele din mediu. Reacția este evidențiată cu ajutorul unui echipament de rezonanță plasmonică ce detectează nivelul anticorpilor capturați specific. Înalta sensibilitate și specificitatea strictă sunt atribute pe care se sprijină detecția rapidă, prin această metodă, a patogenilor în produsele alimentare.

Metode rapide de detecție moleculară. Progresele înregistrate în ultimii ani în domeniul biologiei moleculare au permis dezvoltarea unor metode rapide de diagnostic bazate pe studiul acizilor nucleici, depozitării informației genetice la toate organismele vii. Analiza acizilor nucleici are ca scop descifrarea informației genetice utilizate în studii taxonomice și/sau epidemiologice pentru instituirea unor strategii de prevenire și control al infecțiilor microbiene.

Avantajele oferite de studiul acizilor nucleici recomandă metodele moleculare de analiză în practica curentă a laboratoarelor de diagnostic microbiologic.

Utilizarea structurii moleculelor depozitare ale informației genetice drept criteriu de încadrare taxonomică a pus sub semnul întrebării clasificări mai vechi, bazate pe proprietățile fenotipice ale acestora.

Existența unor bănci de date privind genomul complet al principalelor entități implicate în patologia infecțioasă, incluzând și agenți etiologici ai îmbolnăvirilor consecutive consumului de alimente și/sau apă contaminate (*Salmonella* spp., *E.coli*, *Shigella* spp, *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp.) a permis dezvoltarea unor metode standardizate de analiză moleculară, utilizând kituri comerciale și aparatură dedicată, astfel încât rezultatele obținute să poată fi comparate și validate.

Trebuie subliniat însă că detecția în prelevat prin metodele cu amplificare întâmpină dificultăți, datorită potențialilor contaminanți din prelevate, care pot inhiba reacția de amplificare.

Metodele rapide “vis-a-vis” convenționale de detectare și identificare. În tabelul 1 este prezentată o comparație între performanțele sistemelor rapide fenotipice și genotipice față de metodele de diagnostic “clasice”, bazată pe criterii fenotipice.

Tabelul 1

Metode rapide “vis-a-vis” metode „clasice” de detecție și identificare a patogenilor enterici

Criterii de evaluare	Metode rapide		Metode clasice
	Fenotipice	Genotipice	
Durata	4 – 24 h	6 – 20 h	2 – 7 zile
Costuri / reagenți	Joase	Medii	Ridicate
Execuție / test	Automată/manuală	Manuală	Manuală
Specificitate	Variabilă 60 – 90%	Foarte bună	Referință
Sensibilitate	Variabilă	Foarte bună	Referință
Accesibilitate	Accesibile comercial	Bună	Scăzută
Cheltueli adiționale	Reduse	Reduse	importante

Majoritatea metodelor rapide au fost concepute pentru detectarea rapidă a unei entități cu caracter patogen (bacterie sau toxină) și examinarea unui număr mare de probe.

Un rezultat pozitiv prin aceste metode rapide este considerat însă prezumptiv și trebuie confirmat prin metodele fenotipice de referință.

Atât sensibilitatea cât și specificitatea metodelor rapide, indiferent de principiul lor, se îmbunătățesc substanțial după o etapă de izolare ori îmbogățire a prelevatului. Această etapă se adaugă însă ca durată și reduce din avantajul de timp al metodelor rapide.

Concluzii

Cerințele diagnosticului bacteriologic în toxiinfecțiile alimentare sunt determinate de caracterul supraacut al îmbolnăvirilor și necesitatea stabilirii filiației și arealului epidemic al focarului. Aceste cerințe imprimă motivația majoră a preocupărilor investigației de laborator care trebuie să furnizeze rezultate rapide, operative, utile în motivarea și inițierea deciziilor terapeutice și antiepidemice. Evoluția tehnologică induce progrese surprinzătoare și ne așteptăm la noi generații de metode rapide cu performanțe mult îmbogățite.

Bibliografie

1. Buiuc D., Neguț M. Diagnosticul de laborator al toxiinfecțiilor alimentare. În: *Tratat de Microbiologie Clinică*, Ed. A III-a, București 2009, p. 363-386.
2. Cheasty T. et al. *Escherichia*. In Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed., vol.2, Bacteriology 2005, p. 1360-1385.
3. Ciufescu C. Toxiinfecția alimentară cu *Salmonella*.
4. Comunicare a Comisiei către Parlamentul European și către Consiliu referitoare la situația actuală privind toxiinfecția alimentară cu *Salmonella* în UE. Bruxelles, 29.5.2009.
5. Damian M., Neguț M. Diagnosticul de laborator în toxiinfecțiile alimentare produse de bacili gram negativi. București 2011, 302 p.
6. Farmer J. et al. *The Enterobacteriaceae*; General Characteristics. In Topley and Wilson's *Microbiology and Microbial Infections*, 10th ed., vol.2, Bacteriology 2005, p.1317-1359.
7. Farmer J. et al. *Enterobacteriaceae* Infections – Diagnostic Procedures for Bacterial Infections, 7th ed. Amer. Health Assoc. Inc. Washington D.C.
8. Kalamaki M. et al. Rapid methods for identifying sea food microbial pathogens and toxins. *Rapid Methods and Automation in Microbiology* 1997, p. 87-137.
9. Malorny B., et al. Multicenter validation of PCR-based Method for Detection of *Salmonella* in Chicken and Pig Samples. *J.APAC Internatl.* 2004, p. 861-866.
10. Nășcuțiu A-M. Toxiinfecțiile alimentare determinate de bacterii din genul *Salmonella* (II). Diagnosticul de laborator. *Medicina modernă*, 2010, p. 624-631.
11. Neguț M. Diagnosticul de laborator în sindromul diareic infecțios. În: *Tratat de Microbiologie Clinică*, Ed.a III-a, București 2009, p.327-362.
12. Threlfall E. *Salmonella*, In Topley and Wilson's *Microbiology and microbial Infections*, 10th ed., vol.2, Bacteriology 2005, p. 1398-1434.
13. Washington J. *Laboratory Procedures in Clinical Microbiology*, 2^{ed} ed., Springer Verlag, N.Y. 1985.
14. Watts L. et al. Identification of Veterinary Pathogens by Use of Commercial Identification Systems and New Trends in Antimicrobial Susceptibility Testing of Veterinary Pathogens. *Clinical Microbiology Review*. 1994, p. 346-356.
15. Сергевнин Л. С. И др. Микробиологическая оценка продукта питания из куриного мяса «шаверма» как фактора передачи сальмонелл. *Гигиена и санитария* 2012, с. 121.