

**Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Doktori Iskola**

**Gyors mikrobiológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása  
élelmiszer- és környezet-higiéniai vizsgálatokban**

PhD értekezés tézisei

Dr. Erdősi Orsolya

2014

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Reichart Olivér

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Kar

Élelmiszer-higiéniai Tanszék

témavezető

Dr. Szita Géza

Szent István Egyetem

Állatorvos-tudományi Kar

Élelmiszer-higiéniai Tanszék

témabizottság tagja

Juhászné Dr. Román Mariann

Budapesti Corvinus Egyetem

Élelmiszer-tudományi Kar

Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

témabizottság tagja

## **Bevezetés, célkitűzés**

A közegészség magas szintű védelme az élelmiszerjog egyik alapvető célkitűzése. Az élelmiszerekben lévő mikrobiológiai veszélyek az élelmiszer eredetű megbetegedések egyik fő forrását jelentik. Az élelmiszerek nem tartalmazhatnak mikroorganizmusokat, azok által termelt toxinokat vagy anyagcseretermékeket olyan mennyiségben, amely elfogadhatatlan mértékű kockázatot jelent az ember egészségére.

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatok időigénye az adott mikroorganizmusoktól függően általában 1-4 nap. Napjainkban, az élelmiszertételek gyors minősítése, az átmeneti tárolás időszükségletének csökkentése, és a HACCP-rendszerek hatékony működtetése is feltétlenül igényli a mikrobiológiai kiértékelés gyorsítását, automatizálását, lehetőség szerinti költségcsökkentéssel együtt.

Annak érdekében, hogy a fogyasztók fertőződésének kockázata csökkenjen és az élelmiszerlánc mikrobiológiai ellenőrzésének hatékonyságát fokozni lehessen, megbízható, gyors vizsgálati módszerekre van szükség, amelyekkel az élelmiszerekben megtalálható patogének jelenléte vagy hiánya eldönthető, a technológiai higiéniai szempontból fontos mikrobák számának meghatározása pedig lerövidíthető. A gyors módszerekkel nyert mikrobiológiai eredmények HACCP-rendszerbe való visszacsatolásával kiszűrhetővé válna az esetlegesen nem megfelelő minőségű termék, időben megakadályozva annak az élelmiszerláncba történő bekerülését.

A jelenleg alkalmazott mikrobiológiai gyorsmódszerek többnyire drága berendezéseket és jól képzett laboratóriumi személyzetet igényelnek. A kisvállalkozások, vagy kisüzemek általában nem engedhetik meg maguknak saját minőségellenőrző mikrobiológiai laboratórium működtetését. A Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Élelmiszer-higiéniai Tanszékének és a Corvinus Egyetem Élelmiszer-tudományi Kar Fizika és Automatizálás Tanszékének munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatott MicroTester berendezés egy lehetséges megoldást jelent a mikrobiológiai vizsgálatok időigényének jelentős mértékű lerövidítésére, egyszerűsítésére és költségeinek csökkentésére.

A módszert víz- és környezet-higiéniai mikrobiológiai vizsgálatok céljára vízmű-laboratóriumok, valamint palackozó-üzemek Magyarországon és néhány európai országban is sikerrel alkalmazzák.

Munkám célja a redoxpotenciál változásának mérésén alapuló gyors vizsgálati módszer élelmiszeripari alkalmazhatóságának bizonyítása állati eredetű (tej és hús) termékek, illetve környezeti minták mikrobiológiai vizsgálatánál technológiai higiéniai és élelmiszer-biztonsági

szempontból jelentős mikroorganizmusok kimutatásához, számszerű meghatározásához kapcsolódóan az alábbiak szerint.

- Technológiai higiéniai szempontból fontos mikrobák számának gyors meghatározása redoxpotenciál-változás mérésén alapuló módszerrel:
  - tej összcsíraszámának és Enterobacterium-számának gyors meghatározása;
  - hús összcsíraszámának és Enterobacterium-számának gyors meghatározása.
- Felületek mikrobiológiai szennyezettségének gyors meghatározása redoxpotenciál-méréssel.
- Élelmiszerbiztonsági szempontból fontosabb mikrobák gyors kimutatása:
  - redoxpotenciál-mérésen alapuló- és real-time PCR módszer kombinációjának fejlesztése és alkalmazása *Listeria monocytogenes* és *Salmonella sp.* kimutatására.

## Anyag és módszer

A klasszikus mikrobiológiai vizsgálatokat az alábbi szabványok szerint végeztem:

Mezofil aerob és fakultatív anaerob baktériumok számának (összcsoíraszám) meghatározása: MSZ EN ISO 4833:2003.

*Listeria monocytogenes* kimutatása: MSZ EN ISO 11290-1:1998 (módosítás: MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005).

*Salmonella* kimutatása: MSZ EN ISO 6579:2006.

Felületek vizsgálata tamponos mintavétellel: MSZ ISO 18593:2008.

Enterobacterium szám meghatározása: MSZ ISO 21528-2:2007.

A redoxpotenciál-mérések a SZIE-ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék Mikrobiológia laboratóriumában, MicroTester berendezéssel történtek.

A mérési eljárás elvi alapja az, hogy a baktériumok szaporodása folyamán az energia-termelő biológiai oxidációs reakciók eredményeként a környezet redoxpotenciálja egy meghatározott mikroba koncentráció felett jól detektálhatóan csökken. Meghatározva az egyes hígításokhoz tartozó induló mikrobaszámot, szoros lineáris korreláció állapítható meg a detektációs idő (TTD) és a kezdeti sejtszámok logaritmus (lg N<sub>0</sub>) között. Az összefüggés lehetővé teszi a mikrobaszám detektációs idő alapján történő meghatározását.

Abban az esetben, amikor nem tudunk előzetesen felvett kalibrációs görbét használni, mert a mikroflóra összetétele nem ismert, belső kalibrációs görbét alkalmazunk. A mintából 10-es léptékű hígítási sort készítünk úgy, hogy az utolsó hígítás(ok)ban már ne legyen élősejt kimutatható (MPN módszer). A hígítási sor minden tagját mérőcellába oltjuk és műszeresen meghatározzuk a TTD értékeket. A szoftver automatikusan tárolja a különböző hígítási szintekhez tartozó TTD értékeket, és az utolsó még pozitív (TTD-t adó) hígítás függvényében kiszámítja a hígítatlan minta legvalószínűbb mikrobaszámát, MPN(0). Az összetartozó TTD – lgMPN értékpárokból lineáris regresszióval kiszámított összefüggés adja a mérési görbe egyenletét, a lgMPN – TTD összefüggés a kalibrációs görbét. A belső kalibrációs görbe felvételével lehetőségünk van teljesen ismeretlen minták mikrobaszámának tájékoztató jellegű meghatározására. A módszer szelektivitását a választott tápközeg határozza meg.

## **Összcsíra- és Enterobacterium-szám meghatározás**

### *Nyerstej-minták feldolgozása*

Külső kalibrációs görbe felvételéhez nyers tejből izolált vegyes *Enterobacterium*-tenyészetet használtam. A műszeres mérést Brillantzöld-Glükóz-Epe (Merck) tápoldatban (BBG táptalaj) végeztem 37 °C-on.

Belső kalibrációs görbe felvétele estén a műszeres mérést feles koncentrációjú Trypton-Soya Broth, (Merck 105459) tápoldatban (TSB) végeztem 30 °C hőmérsékleten.

### *Vörösáru-minták előkészítése*

A vörösáru gyártása közben vett mintákból 10 g-ot 90 ml pepton vízzel homogenizáltam, majd 1 ml-t 9 ml feles erősségű TSB táplevesbe oltottam. Kalibrációs görbe készítéséhez tízes alapú hígítási sort készítettem, és a hígítási sor minden tagjából egy mérőcellába oltottam. Inkubációs hőmérséklet 30 °C. A TTD-értékekből és a lemezöntéssel, vagy MPN módszerrel meghatározott mikrobaszámokból elkészítettem a kalibrációs görbéket.

## **Környezeti higiéniai vizsgálatok**

Redoxpotenciál-mérést alkalmazva a felületek mikrobaszámának meghatározása kétféleképpen történhet:

- a hígítófolyadékból a tampon lemosása után
- közvetlenül a tamponról; lemosás nélkül

Az összcsíraszám meghatározásához feles erősségű TSB levest használtam.

A mintavétel a húsipari tanműhelyben kijelölt felületekről ( 10 pontról) az ISO 18593:2004 szabvány szerint, 10x10 cm-es mintavételi felületről, vagy ennél kisebb felszínű eszköz (kés, fűrész), illetve a modell felületek esetében azok teljes felületéről történt. Mintavételi eszközként „Eurotubo® collection swab” tampont használtam.

## ***Listeria monocytogenes* kimutatása**

### *Szelektív táptalajok összehasonlítása*

*Listeria monocytogenes* vegyes mikroflórából való kimutatásához a következő mikrobákat használtam: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 7644, NCAIM B1935), *Listeria ivanovii* (ATCC 19119), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Staphylococcus aureus* (ATCC

12600), *Escherichia coli* (ATCC 105369), *Bacillus cereus* (NCAIM B1827), *Bacillus subtilis* (NCAIM B1095).

Három szelektív táplevest vizsgáltam:

- a) Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck) és Oxford Listeria Selective Supplement (Merck)
- b) Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck) és Listeria Selective Enrichment Supplement acc. to FDA-BAM 1995/IDF-FIL (Merck)
- c) Fraser Listeria Selective Enrichment Broth (Merck) és Fraser Listeria Supplement (Merck)

### *Élelmiszer-minták vizsgálata*

25 g lágy sajtot vagy 25 ml nyers tejet homogenizáltam 225 ml Oxford Listeria Selective Supplementet (Merck) tartalmazó Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck) táplevessel, amely az előzetes vizsgálatok alapján az összehasonlított három táptalaj közül a legszelektívebbnek bizonyult. A nyers tej és lágy sajt minták a helyi piacról származtak.

A mintákat beoltottam a vizsgált mikrobbal, három fertőzöttségi szinten (alacsony, közepes, magas). Az egyes mikrobbák 24 órás ferde-agaros tenyésztését lemostam 9 ml peptonvízzel és tízes alapú hígítási sort készítettem. A mintákat (25 g-ot 225 ml táptalajban homogenizálva) beoltottam az egyes mikrobatenyészetek 1 ml-ével a 9., 6. és az 1. hígítási fokokból, annak érdekében, hogy a kívánt alacsony, közepes és magas fertőzöttségi szinteket beállítsam. Az inkubációs hőmérséklet 37 °C volt.

Az inokulum tényleges mikrobaszáma lemezöntéssel került meghatározásra a hígítási sorból, 3 párhuzamosban, a minta 1 ml-ére vagy grammjára vonatkozóan.

Kísérleti elrendezés

2 termék (tej és lágy sajt)

8 mikroba (természetes mikroflóra + 7 teszt mikroba)

3 fertőzöttségi szint (alacsony, közepes, magas)

3 párhuzamosban

Minta szám: n = 144

A redoxpotenciál-mérés mint dúsító lépés kiszűri azokat a mintákat, amelyek nagy valószínűséggel nem tartalmaznak *Listeria monocytogenes*. Csak a *Listeria monocytogenes* jelenlétére gyanús mintákat kell tovább vizsgálni real-time PCR módszerrel, annak érdekében, hogy azonosítsuk a baktériumot.

## **Salmonella-kimutatás**

Az RVS tápleves szelektivitásának esetleges változását tej hozzáadásával vizsgáltam. 25 ml tejet adtam 225 ml RVS tápleveshez, majd homogenizáltam. A szelektivitást *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Typhimurium mikrobák szintenyészeteivel mért redoxgörbék összehasonlításával értékeltem.

## **Élelmiszerminták-vizsgálata**

Tojásminták esetén az egész tojásokat homogenizáltam, majd *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Typhimurium baktériummal fertőztem, három különböző koncentrációban:

- alacsony:  $10^0$  cfu/25g
- közepes:  $10^2$  cfu/25g
- magas:  $10^4$  cfu/25g.

A 25 gramm élelmiszermintát (tojás, hús) 225 ml RVS táplevesben homogenizáltam. Az inkubációs hőmérséklet  $42^\circ\text{C}$  volt.

A redoxpotenciál-méréssel pozitívnak bizonyult minták klasszikus biokémiai megerősítése helyett real-time PCR berendezést alkalmaztam.

## **Real-time PCR**

1 ml mintából kiindulva *L. monocytogenes* esetén "Mericon DNA Bacteria Plus Kit" (Qiagen), *Salmonella* esetén "Mericon DNA Bacteria Kit" (Qiagen) segítségével 400  $\mu\text{l}$  DNS izolátumot állítottam elő, melyből a PCR mérést a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékén lévő SLAN® Real-Time PCR System (Hongshi) berendezés használatával végeztem el, *Mericon L. monocytogenes* Kit-et (Qiagen) illetve *Mericon Salmonella* Kit-et (Qiagen) alkalmazva. A PCR reakció 20  $\mu\text{l}$  mennyiségű reakcióelegyben ment végbe, amely 10,8  $\mu\text{l}$  Multiplex PCR Master Mix-et és 9,2  $\mu\text{l}$  DNS izolátumot tartalmazott.

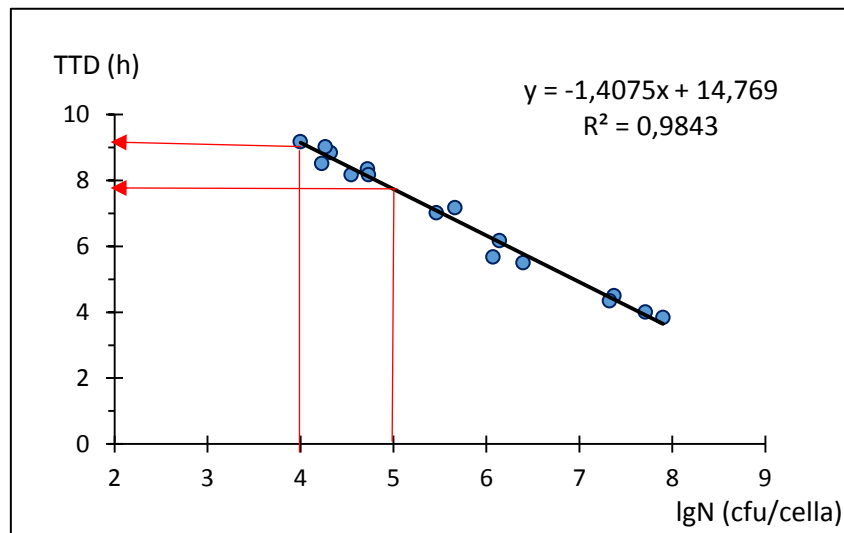
A ciklusparaméterek a következők: kezdeti PCR aktivizációs lépés, HotStarTaq Plus DNS polimeráz aktivizációja, (5 min,  $95^\circ\text{C}$ ), melyet 40 x 3 lépésből álló ciklus követ: denaturáció (15 sec  $95^\circ\text{C}$ -on), primer kötődés 23 másodperc  $60^\circ\text{C}$ -on, és lánchosszabbítás 10 sec  $72^\circ\text{C}$ -on. A fluoreszcens detektáció minden egyes ciklus annealing szakaszában történik.



## Eredmények

### Összcsíra és Enterobacterium-szám meghatározása

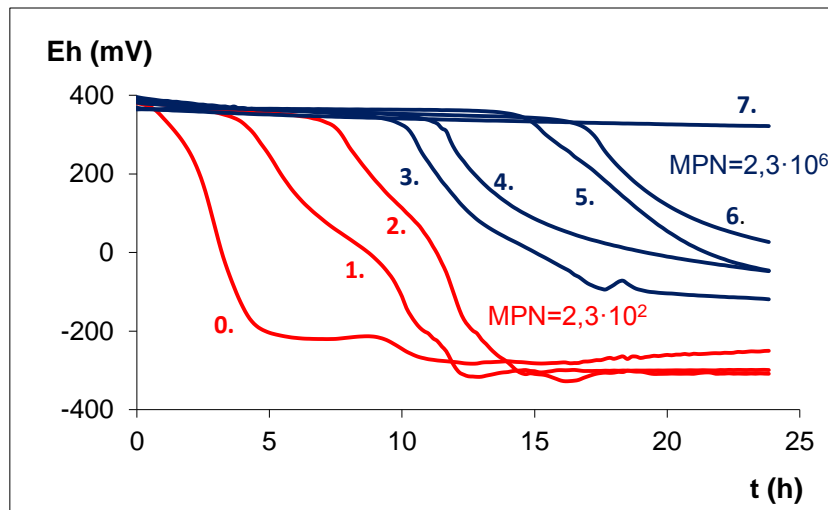
Tej összcsíraszámának tenyésztéses meghatározása 72 órás inkubációt igényel. Bár a különböző nyers tejek mikroba-összetétele elvileg különböző, a független mintákból készült kalibrációs görbe alapján a kiindulási sejtszám logaritmusára és a TTD értékek közötti lineáris korreláció igen szorosnak bizonyult. Különböző helyekről származó (piac, tehenészeti telepek) és különböző sejtszámú tejek esetében is felvehető tájékoztató jellegű mérési görbe (1. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy a nyers tej, az ipar által leggyakrabban mikrobiológiai határértékként megállapított,  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml körüli összcsíraszámának műszeres meghatározása 8-9 órát vesz igénybe.



1. ábra Nyers tej összcsíraszámának külső mérési görbéje (1/2 TSB, T=30°C)

### Összcsíra- és Enterobacterium-szám meghatározása belső mérési görbével

Abban az esetben, ha nincs előzetesen felvett kalibrációs görbe, alkalmazható a hígítási sor redox-görbéinek felvételén alapuló MPN módszer (2. ábra).



**2. ábra** Nyers tej redoxgörbéi a hígítás függvényében (1/2TSB,  $T=30^\circ$ )

A 7. hígításban már nem mérhető TTD érték, Ennek megfelelően a tej határhígítással meghatározott mikrobaszáma  $MPN=2,3 \cdot 10^6$  sejt/ml volt.

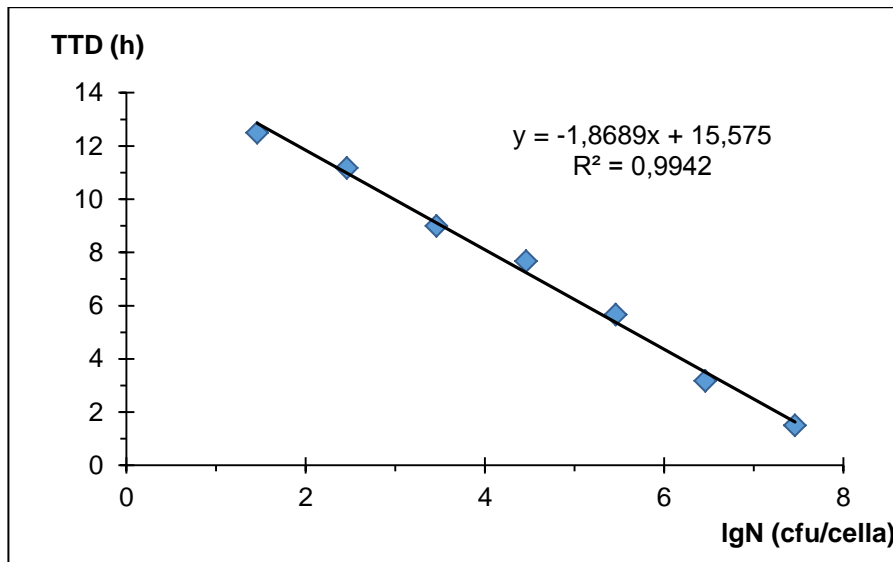
Kihasnálva azt a széleskörű előzetes vizsgálatokon alapuló tapasztalatot, hogy csak az Enterobacteriumok csökkentik a táptalaj redoxpotenciálját  $-300$  mV alá, lehetőség van egyetlen hígítási sorból az összes mikroba- és az Enterobacterium-szám egyidejű meghatározására. A görbék lefutása alapján megállapítható, hogy az Enterobacteriumok a 2. hígításig vannak jelen (a 2. ábrán pirossal jelölve), a további hígítások görbéi nem jellemzőek az Enterobacteriumokra. Ennek megfelelően a vizsgált tejminta Enterobacterium száma  $10^2$  sejt/ml nagyságrendű volt. A 2. ábrán feltüntetett adatok alapján az összcsíraszám részhalmazaként az Enterobacterium szám is meghatározó.

Mérési eredményeink szerint a különböző helyekről származó nyerstej minták lemezöntéses módszerrel felvett külső- és MPN-módszerrel meghatározott, összetartozó TTD – IgMPN adatokból számított belső mérési görbéi – statisztikai hibahatáron belül – nem különböznek egymástól szignifikánsan, ezért közös egyenesben ábrázolhatók.

A vizsgált tejminták esetén a szabványos és redoxpotenciál-mérésen alapuló módszerrel mért mikrobaszámok között nincs szignifikáns különbség, azonban a műszeres mérés időigénye lényegesen kisebb.

### Vörösáruk gyártási fázisainak vizsgálata

A vörösáruk gyártási fázisainak vizsgálata során, mivel nem ismert a minták mikrobiota összetétele, belső kalibrációs görbe felvételére van szükség.

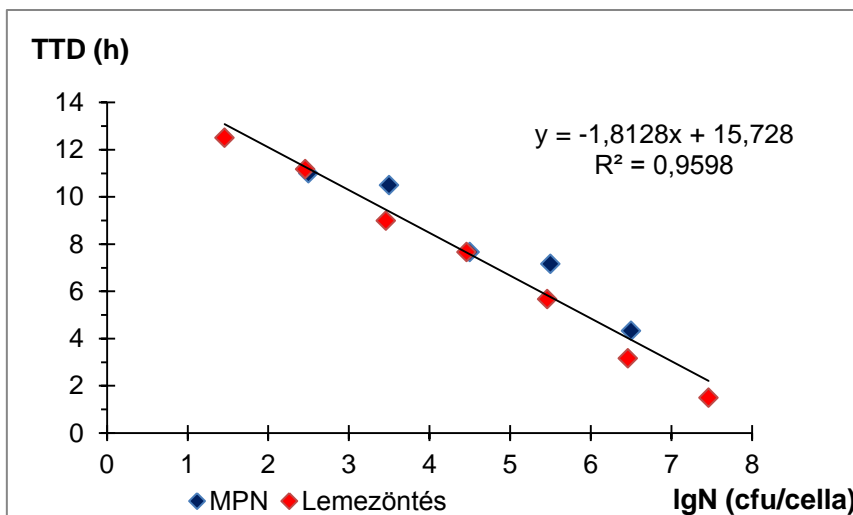


**3. ábra** Virsli pép mérési görbéje (1/2 TSB, T=30 °C)

Kiszámítva a kalibrációs egyenletet:  $\lg N = -0,532 \cdot \text{TTD} + 8,3114$ , az egyes fázispontokban vett minták redox-görbéinek TTD értéke alapján a minták összcsíraszámja meghatározható.

### Közös kalibrációs görbe meghatározása

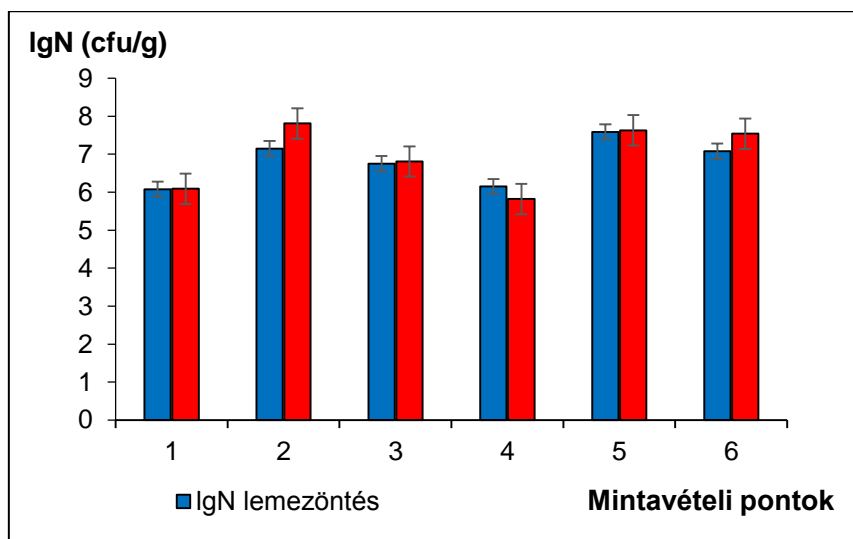
Feltételezve, hogy a különböző időpontokban történt gyártás során az egyes fázispontok mikrobiotájának összetétele nem változik lényegesen, a különböző időpontokban felvett mérési görbék egyesíthetők. Az egyesített mérési görbe a 4. ábrán látható.



4. ábra Vörösáru gyártás fázisvizsgálatok egyesített mérési görbéje

A kalibrációs görbe egyenlete:  $\lg N(\text{cfu/cella}) = -0,5294 \cdot \text{TTD}(\text{h}) + 8,507$

Az egyesített kalibrációs görbe ellenőrzésére mintákat vettem egy gyártás fázispontjaiból. Az összcsíraszámot redoxpotenciál-méréssel és lemezöntéssel is meghatároztam. A fázisminták lemezöntéssel és műszeres méréssel meghatározott lgN értékeit a hozzájuk tartozó SD értékekkel az 5. ábrán mutatom be.



5. ábra Vörösáru gyártás fázispontok lemezöntéssel (lemezöntés) és műszeres (redox) méréssel meghatározott logaritmus-összcsíra szám értékei ( $\lg N \pm \text{SD}$ )

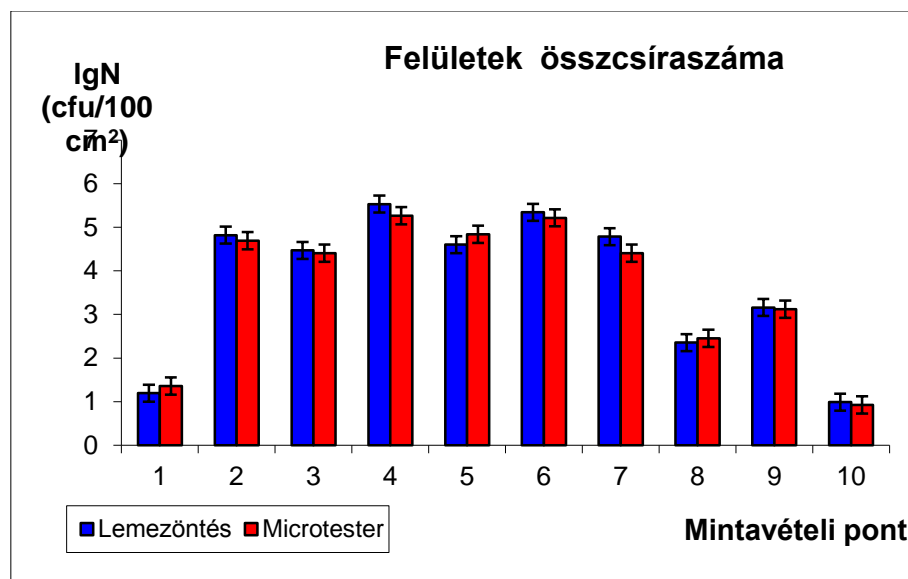
## Környezet-higiéniai vizsgálatok redoxpotenciál-méréssel

Húsüzemi kutterfelület belső mérési görbéinek felhasználásával meghatároztam a kalibrációs görbét, amelynek egyenlete a következő:

$$\text{IgN} = -0,2859 \cdot \text{TTD} + 7,2672 \quad R^2 = 0,9574$$

A kalibrációs görbe alapján meghatároztam a húsüzemi felületek mikrobaszámát. Az összes mintavételi ponthoz tartozó mintából szabványos lemezöntéses módszerrel is meghatároztam a mikrobaszámokat.

A két módszerrel kapott mérési eredmények a 95 %-os konfidencia-intervallumok feltüntetésével, a 6. ábrán láthatók.



**6. ábra** Felületi mikrobaszámok összehasonlítása (IgN ± konf. intervallum)

A tamponos mintavételi módszerrel végzett felületi mikrobiológiai vizsgálatok időigénye jelentősen csökkenthető a redoxpotenciál-méréseken alapuló új módszer segítségével. A belső kalibrációs görbe segítségével az összcsíraszám, ismeretlen összetételű mikroflóra esetén is biztonsággal becsülhető. A belső kalibrációs görbe felvételének időigénye a felületek mikrobiológiai szennyezettségétől függően 15-20 óra, mely ugyan nagyobb mintha külső kalibrációs görbével végzett vizsgálatok időigénye, de még így is jelentősen kisebb, mint a hagyományos lemezöntéses mikrobaszám meghatározáshoz szükséges idő (72 óra összcsíraszám, 24 óra Enterobacteriaceae-szám).

Feltételezve, hogy adott üzemben, adott felületen, a szokásos munkarend megtartásával a mikrobiota összetétele alapvetően változatlan, a későbbi méréseknél külső kalibrációs görbe használata is elegendő. Ez jelentősen tovább rövidíti a vizsgálatokhoz szükséges időt. A húsüzem esetében a kimutatási idők a mikrobiológiai kontamináció mértékétől függően az 1. táblázatban összefoglaltak szerint változtak.

**1. Táblázat** Szabványos és redoxpotenciál-mérésen alapuló módszerek időigénye

lgN = cfu/100 cm <sup>2</sup>	Kimutatási idő (h)	
	Szabványos	Redox
5,76	72	7
5,57		8,17
5,25		8,5
5,25		9
4,82		10
4,98		10
4,93		11,17
3,93		14,17
2,86		16,83

A későbbi külső kalibrációs görbe használat további előnye, hogy a mikrobaszám meghatározáshoz nem kell hígítási sort készíteni, így ezzel további jelentős idő és eszköz megtakarítás érhető el.

### **Listeria monocytogenes kimutatás**

A MicroTester alkalmazásával a mikrobák kimutatásának szelektivitása az alkalmazott táptalajokon, valamint a mikrobák redoxgörbéjének jellegzetességén múlik.

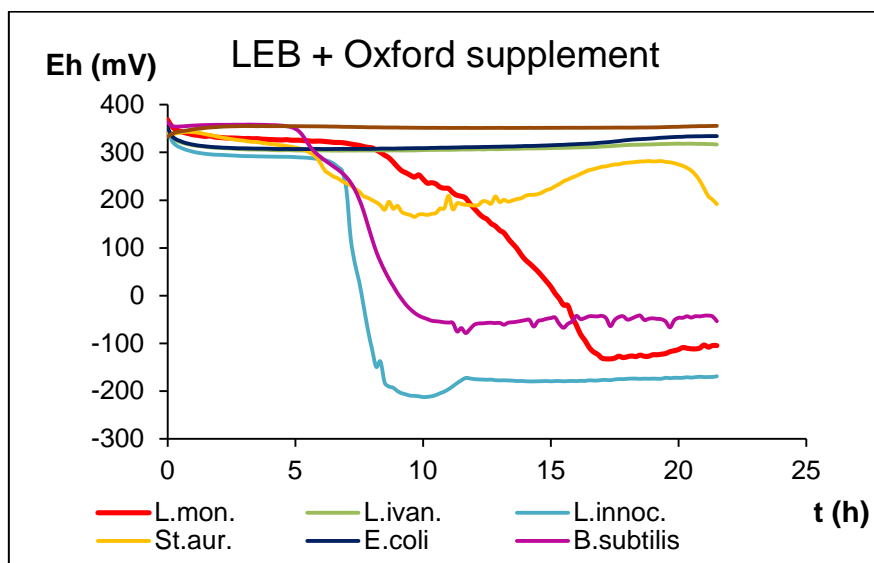
Három különböző táplevesben vizsgáltam baktériumok szaporodását 37°C-on. A 250 ml-nyi tápleveseket 1 ml (kb. 10<sup>6</sup> cfu) tenyésztel oltottam be. A szaporodást a redoxgörbék felvételével mértem.

Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck) + Oxford Listeria Selective Supplement (Merck107006).

Baktériumszaporodás: mindhárom *L. monocytogenes* törzs, *L. innocua*.

Nem szaporodik: *L. ivanovii*, *E. coli*. Gátolt: *Staphylococcus aureus*.

*L. monocytogenes* kimutatására a LEB + Oxford Listeria Selective Supplement bizonyult a legszelektívebbnek.



**7. ábra** Oxford supplementet tartalmazó LEB szelektivitása

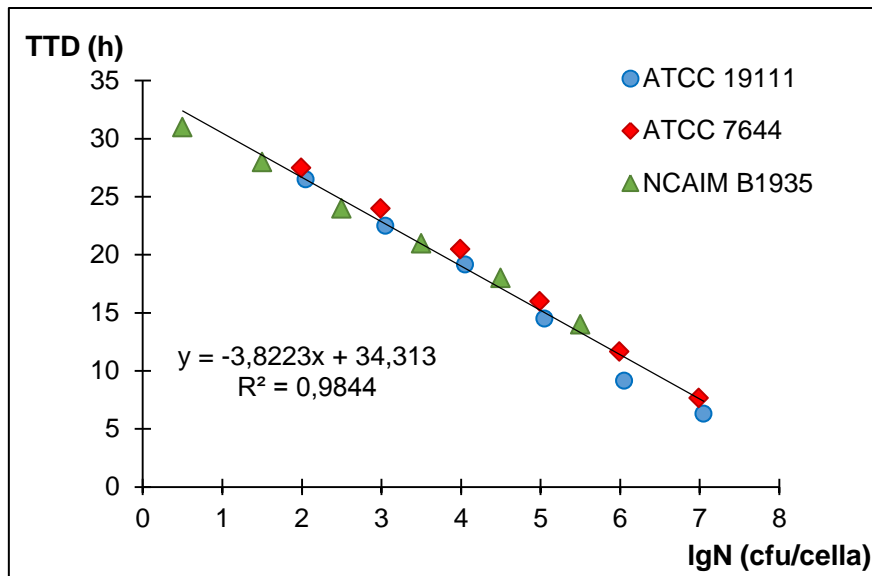
Mivel az *E. coli* és a *Bacillus cereus* szaporodása teljes mértékben gátlódik, a részlegesen gátolt *Staphylococcus aureus* pedig nem csökkenti a táptalaj redoxpotenciálját a *Listeria* fajokhoz hasonló mértékben, a jellemző redox görbe alapján azonosítható a *L. monocytogenes* és a *L. innocua*.

A *Bacillus subtilis* szaporodása esetén a redoxpotenciál a *Listeria* fajok szintje alá csökken, ebben az esetben a *L. monocytogenes* jelenléte nem zárható ki.

A differenciálás nehézsége miatt, abban az esetben, ha a *L. monocytogenes* jelenléte nem zárható ki, az identifikálást el kell végezni. A *L. monocytogenes* jelenlétének megerősítésére real-time PCR-t alkalmaztam

#### *Listeria* fajok és *L. monocytogenes* törzsek redox kalibrációs görbéinek meghatározása

A redoxpotenciál-mérés Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben történt. Ábrázolva az egyes hígítási fokozatokhoz tartozó IgN értékek függvényében a mért TTD értékeket, a 8. ábrán látható mérési görbét kapjuk.



**8. ábra** *Listeria monocytogenes* törzsek mérési görbéje Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben

A három különböző *Listeria* törzssel történt mérés (ATCC 19111, ATCC 7644, NCAIM B1935) eredménye egyetlen közös egyenessel ábrázolható.

Az egyenes egyenlete:

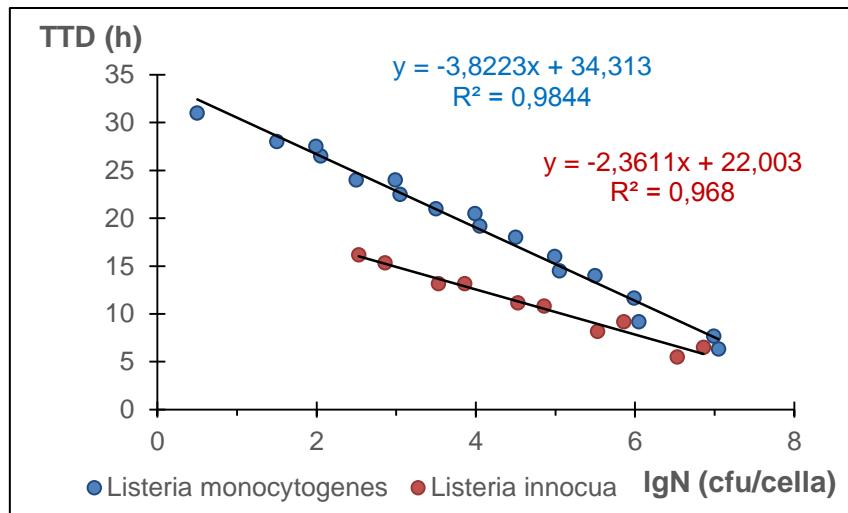
$$\text{TTD} = 34,31 - 3,8223 \cdot \text{IgN}$$

Az egy sejt kimutatásához szükséges időigény ( $\text{IgN}=0$ ) a mérési görbe tengelymetszetéből számítható ki:  $\text{TTD} = 34,31$  h.

A regresszió variancia táblázatából meghatározható a tengelymetszet 99 %-os konfidencia intervalluma, amelynek felső értéke az egyetlen élő *L. monocytogenes* sejt kimutatásához szükséges idő maximuma, 36 óra.

Közös ábrán ábrázolva a *Listeria monocytogenes* és a *Listeria innocua* mérési eredményeit, megállapíthatjuk, hogy a két görbe szignifikánsan különbözik egymástól (9. ábra).





9. ábra *Listeria monocytogenes* és *Listeria innocua* mérési görbéi Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben

Tekintve, hogy a *L. monocytogenes* szaporodik lassabban és figyelembe véve a konfidencia intervallum felső határát, kijelenthetjük, hogy ha nincs TTD 36 órán belül, akkor a minta *L. monocytogenes* mentes. A *L. monocytogenes*-negatív minták kiszűrésének időigénye 36 óra. Kontamináció esetén ez az idő lényegesen rövidül. A TTD a lehetséges pozitív mintát jelenti.

*L. monocytogenes* jelenlétének megerősítésére real-time PCR módszert alkalmaztam. Mivel a TTD-hez legalább  $10^6$  cfu/ml mikrobakoncentráció szükséges a mérőcellában, ez a szuszpenzió közvetlenül használható real-time PCR vizsgálathoz.

#### *L. monocytogenes* redox-elődúsítás utáni identifikálása PCR-módszerrel

A vizsgálatok során a Mericon *L. monocytogenes* Kit specificitásának köszönhetően csak azok a minták bizonyultak pozitívnak, amelyeket *L. monocytogenes*-sel oltottam be. Azok a minták, amelyek redoxpotenciál-méréssel gyanúsak voltak, de *L. innocua*-t vagy *B. subtilis*-t tartalmaztak, minden esetben negatív eredményt adtak real-time PCR vizsgálattal. A beoltott minták eredményei (pozitív vagy negatív) alacsony szennyezettségi szint esetén, a redoxpotenciál-mérés és a real-time PCR, valamint kombinációjuk időigénye összehasonlítva a konvencionális ISO 11290-1 standard módszerrel 2. táblázatban látható.

## 2. Táblázat *L. monocytogenes* kimutatás és azonosítás (alacsony szennyezettségi szint)

Módszer	N (cfu/ml)	Szabványos	Redoxpotenciál		RT-PCR		Összesen idő (h)
		szaporodás	TTD (h)		idő (h)		
Tej		---	---	36<		-	36
<i>L. monocytogenes</i>	2,1·10 <sup>0</sup>	+++	+++	31	+++	3	34
<i>L. ivanovii</i>	4,1·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>L. innocua</i>	3,3·10 <sup>0</sup>	---	+++	20	---	3	23
<i>Staph. aureus</i>	4,2·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>E. coli</i>	5,6·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus cereus</i>	1,5·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus subtilis</i>	2,5·10 <sup>0</sup>	---	+++	25	---	3	28
Lágy sajt		---	---	36<		-	36
<i>L. monocytogenes</i>	9,5·10 <sup>0</sup>	+++	+++	29	+++	3	32
<i>L. ivanovii</i>	3,6·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>L. innocua</i>	5,7·10 <sup>0</sup>	---	+++	21	---	3	24
<i>Staph. aureus</i>	6,3·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>E. coli</i>	2,1·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus cereus</i>	2,1·10 <sup>0</sup>	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus subtilis</i>	3,1·10 <sup>0</sup>	---	+++	24	---	3	27

N: inokulum mikrobaszáma, 3 párhuzamos átlaga, CV(N) = ±15%

Összesen: identifikálás teljes időigénye, Redox + PCR

Standard: MSZ EN ISO 11290-1

TTD: Time to Detection,

SD(TTD) = 0,25 h

### Salmonella kimutatás

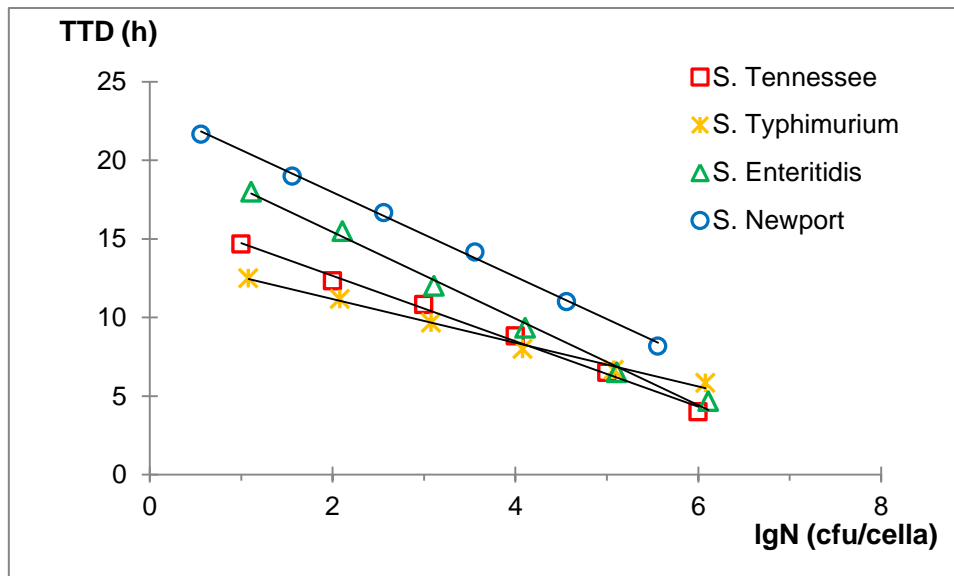
Zavaró mikrobák vizsgálata során azt tapasztaltam, hogy az *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* sem tej nélkül, sem tejjel nem szaporodik RVS-ben.

Megállapítottam, hogy a különböző *Salmonella* szerotípusok mérési görbéik alapján 4 csoportba oszthatók, az egyes csoportokon belül közös görbe alkalmazható.

Közös kalibrációval jellemezhető *Salmonella* csoportok:

- I. *S. Bredeney*, *S. Kottbus*, *S. Senftenberg*, *S. Stanley*, *S. Tennessee*\*
- II. *S. Kentucky*, *S. Montevideo*, *S. Ohio*, *S. Saintpaul*, *S. Thompson*, *S. Typhimurium*\*
- III. *S. Cerro*, *S. Enteritidis*\*, *S. Infantis*, *S. Livingstone*
- IV. *S. Newport*\*

A \*-gal jelölt szerotípusok mérési görbéit RVS táplevesben is meghatároztam (10. ábra)



10. ábra *Salmonella* szerotípusok mérési görbéi RVS táplevesben

3. Táblázat *Salmonella* szerotípusok mérési görbéinek egyenletei (RVS tápleves)

Mikroba	n	Egyenlet	R <sup>2</sup>	SD (h)
I. <i>S. Tennessee</i>	6	TTD(h) = 13,93 - 1,386·lgN	0,9926	0,250
II. <i>S. Typhimurium</i>	6	TTD(h) = 16,81 - 2,081·lgN	0,9947	0,319
III. <i>S. Enteritidis</i>	6	TTD(h) = 20,93 - 2,752·lgN	0,9938	0,453
IV. <i>S. Newport</i>	6	TTD(h) = 23,33 - 2,686·lgN	0,9976	0,278

A mérőcellában lévő egy sejt kimutatásához szükséges idő meghatározható a mérési görbe tengelymetszetéből (lgN=0). A legnagyobb érték, 23,3 óra a *S. Newport*-hoz tartozik. Számításba véve a TTD értékek standard hibáját (0,278 h), a maximális kimutatási idő 24 óra. Ha ez alatt az időtartam alatt nincs TTD, a mérőcellában található minta nem tartalmaz élő célmikrobát.

*Salmonella* kimutatás mesterségesen fertőzött tojásban

Az eredmények (pozitív vagy negatív), a redoxpotenciál-mérés és real-time PCR módszerek, valamint kombinációjuk időigénye összehasonlítva az ISO 6579 standard módszerrel a.4. táblázatban látható.

**4 Táblázat** *Salmonella*-kimutatás tojásban (3 párhuzamos mérés átlaga)

Módszer	Szabványos		Redoxpotenciál		Real-time PCR		Összesen
	eredmény	idő (h)	eredmény	idő(h)	eredmény	idő(h)	idő (h)
<i>természetes mikroflóra</i>	-	66	-	24*	-	3**	27
alacsony koncentráció							
<i>S. Enteritidis</i>	+	114	+	20,6 <sup>a</sup>	+	3	23,6
<i>S. Typhimurium</i>	+	114	+	16,2 <sup>b</sup>	+	3	19,2
közepes koncentráció							
<i>S. Enteritidis</i>	+	114	+	16,7 <sup>a</sup>	+	3	19,7
<i>S. Typhimurium</i>	+	114	+	11,7 <sup>b</sup>	+	3	14,7
magas koncentráció							
<i>S. Enteritidis</i>	+	114	+	13,2 <sup>a</sup>	+	3	16,2
<i>S. Typhimurium</i>	+	114	+	8,7 <sup>b</sup>	+	3	11,7
Mintasám	21		21		21		21

\*: nincs redox görbe

\*\* : nincs jel

<sup>a</sup>: SD=0,45 h,

<sup>b</sup>: SD=0,32 h

#### *Salmonella* kimutatás csirkehúsban

Kereskedelmi forgalomban kapható, helyi piacról származó csirkemell *Salmonella* fertőzőtségét vizsgáltam (20 minta, 3 párhuzamos vizsgálat). Minden mintát a klasszikus tenyésztéses módszerrel is megvizsgáltam, párhuzamosan a redoxpotenciál-mérés és real-time PCR kombinált módszerrel. Az eredmények az 5. táblázatban láthatók. A 3 módszer minden esetben azonos eredményt adott.

**5.Táblázat** *Salmonella* kimutatás csirkehúsban. 3 párhuzamos mérés kimutatási időinek átlaga (h).

Minta	Szabványos		Redoxpotenciál-mérés			Real-Time PCR		Összesen <sup>a</sup>
	eredmény	idő	eredmény	idő	SD (h)	eredmény	idő	idő
1.	+	114	+	11,7	0,123	+	3	14,7
2.	+	114	+	10,2	0,423	+	3	13,2
3.	+	114	+	15,8	0,113	+	3	18,8
4.	+	114	+	14,3	0,192	+	3	17,3
5.	+	114	+	13,6	0,280	+	3	16,6
6.	+	114	+	11,6	0,260	+	3	14,6
7.	+	114	+	9,2	0,323	+	3	12,2
8.	+	114	+	15,0	0,413	+	3	18,0
9.	-	66	-	24*		-	3**	27
10.	+	114	+	11,0	0,390	+	3	14,0
11.	+	114	+	11,8	0,303	+	3	14,8
12.	+	114	+	11,5	0,250	+	3	14,5
13.	+	114	+	13,0	0,250	+	3	16,0
14.	+	114	+	13,7	0,123	+	3	16,7
15.	+	114	+	12,3	0,333	+	3	15,3
16.	+	114	+	10,3	0,333	+	3	13,3
17.	+	114	+	8,8	0,250	+	3	11,8
18.	+	114	+	8,8	0,178	+	3	11,8
19.	+	114	+	15,2	0,373	+	3	18,2
20.	+	114	+	10,3	0,161	+	3	13,3

<sup>a</sup>: Összesen = Redox + PCR módszer

\* : nincs redoxgörbe

\*\* : nincs jel

A kombinált módszerben a redoxpotenciál-mérés szelektív dúsítóként működött a real-time PCR számára. A biztosan negatív *Salmonella* minták redoxpotenciál-méréssel történő kiszűrésének időigénye 24 óra. Ezek a negatív minták mind PCR módszerrel, mind standard szabványos módszerrel negatívnak bizonyultak. Megállapítható, hogy negatív esetben a PCR-vizsgálat elhagyható.

*Salmonella*-pozitív redoxpotenciál-mérési eredmény esetén a redox mérőcella dúsított szuszpenziójából a klasszikus biokémiai identifikálás helyett real-time PCR-módszerrel történő azonosítást végeztem, 3 óra alatt. Összehasonlítva a kombinált módszert az ISO 6579 standard módszerrel, a teljes *Salmonella* jelenlét-hiány kimutatási idő kevesebb, mint 24 óra, szemben a 114 órás klasszikus módszer időigényével.

## Következtetések

### Összcsíra és Enterobacterium-szám meghatározás

Redoxpotenciál-mérés alkalmazásakor a nyers tej mikrobaszámának meghatározása külső és belső kalibrációs görbével egyaránt lehetséges. A két módszerrel nyert adatokból közös kalibrációs görbe határozható meg. A tenyésztéses módszerrel és a műszeresen kapott mikrobaszámok között nincs szignifikáns különbség.

A meghatározás időigényét tekintve a műszeres módszer jelentősen gyorsabb, különösen akkor, ha külső kalibrációs görbével dolgozhatunk. Ebben az esetben a nyers tejre technológiai szempontból határértéknek tekintett  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml 8-9 óra alatt (nagyobb sejtkoncentráció rövidebb idő alatt) meghatározható.

Belső kalibrációs görbe alkalmazása esetén lehetőség van az összcsíraszámokon belül az Enterobacteriumok számának egyidejű meghatározására is. A műszeres mérés időigénye legfeljebb 20 óra, szemben a tenyésztéses módszer (MSZ ISO 21528-2) 72 órás időszükségletével.

Redoxpotenciál-mérésen alapuló gyorsmódszer használható húsok, illetve húskészítmények vizsgálatára is. A 2073/2005/EK rendeletben az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló 2.1. pontjában előírt aerob mikrobák számának meghatározása 6-10 órát vesz igénybe, szemben a klasszikus lemezöntéses eljárás által előírt 72 órás inkubációval. Mivel a vizsgálat sokkal gyorsabb a jelenleg használt klasszikus módszernél, hatékonyabban lehetne használni az élelmiszer-mikrobiológiai szempontból kockázatos termékek vizsgálatára. Gyorsabban kiszűrhető lenne az esetlegesen nem megfelelő minőségű termék, így időben megakadályozhatóvá válna annak az élelmiszerláncba történő bekerülése.

### Környezethigiéniai vizsgálatok

A legtöbb vágóhídon és húsipari üzemben a tamponos mintavételi módszerrel végzett felületi mikrobiológia vizsgálatokat alkalmazzák.

A belső kalibrációs görbe segítségével az összcsíraszám ismeretlen összetételű mikroflóra esetén is biztonsággal meghatározható, amelynek időigénye a felületek mikrobiológiai szennyezettségétől függően 15-20 óra. Nem szelektív táptalaj használatakor a hígítási sorból a redox-görbék alapján az *Enterobacteriaceae*-szám és összcsíraszám esetenként egyidejűleg meghatározható.

Ismert környezeti mintáknál előzetesen meghatározott külső kalibrációs görbét alkalmazva nincs szükség a felületi szennyezést hordozó tampon alapos lemosására, hígítási sor készítésére. A hordozó közvetlenül behelyezhető a mérőcellában lévő táptalajba és a mérés elvégezhető. A módszer időigénye a szabványos eljárás 72 órájával szemben 7-14 óra.

### **Listeria monocytogenes kimutatás**

Gyors, megbízható *L. monocytogenes* kimutatás lehetőségét jelenti a redoxpotenciál és real-time PCR-módszer kombinációja, amely az elengedhetetlen dúsítási folyamat során lehetővé teszi a *L. monocytogenes* jelenlétének valószínűsítését/kizárását.

Mivel a redoxpotenciál-mérés alapján az egyes *Listeria* fajokat és a *B. subtilis* nem tudjuk egymástól elkülöníteni, a pozitív minták esetén további azonosításra van szükség real-time PCR-módszer segítségével.

A szelektív táptalajként alkalmazott, Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben a *L. ivanovii* nem volt detektálható, így a *L. monocytogenes*től elkülöníthető.

A redoxpotenciál-mérési görbéjének alapján megállapítható, hogy *L. monocytogenes* jelenlétének esetén max. 36 órán belül eredményt kapunk. Abban az esetben, ha nincs TTD 36 órán belül, a mintánk nagy valószínűséggel nem tartalmaz élő *L. monocytogenes*-t.

A redoxpotenciál-méréssel pozitív minták real-time PCR vizsgálata minden esetben különbséget tett a *L. monocytogenes* jelenléte és a zavaró mikrobák között, fals eredmények nélkül.

A kombinált módszerrel és a klasszikus módszerrel nyert eredmények teljesen megegyeztek, az időigény viszont szignifikánsan rövidebb a kombinált módszerrel.

Alacsony kontaminációs szint esetén ( $N < 10$  cfu/g) a PCR-technika kimutatási határa alatt, a kombinált módszerrel történő *L. monocytogenes* kimutatási ideje 34 óra.

Közepes kontaminációs szint esetén ( $10^3$ - $10^4$  cfu/g) a műszeres meghatározás kb. 24 órát igényelt, magas kontaminációs szint esetén ( $10^7$ - $10^8$  cfu/g) az időigény kb. 8 óra.

Összehasonlítva a konvencionális módszer (MSZ EN ISO 11290-1) 120 órás időigényét a "nincs *Listeria*" vagy a 168 óra "nincs *L. monocytogenes*" kimutatására a kombinált módszer maximum 36 órás időigényével megállapítható, hogy a módszer nagy segítséget nyújthat a gyártóknak az élelmiszerbiztonsági kritérium (a termék 25 grammja nem tartalmazhat *L. monocytogenes*-t) ellenőrzésére.

A redoxpotenciál-mérés, mint dúsító eljárás, képes kiszűrni a *L. monocytogenes* negatív mintákat, csak a pozitív gyanúsakat kell a drága PCR-módszerrel tovább vizsgálni. A kombinált módszer előnye, hogy negatív minták esetén a PCR-azonosítás költsége megtakarítható.

## **Salmonella-kimutatás**

A redoxpotenciál-mérés, mint dúsító eljárás kiszűri a pozitív *Salmonella*-mintákat. A biokémiai megerősítés helyett a további azonosítás real-time PCR-rel történt. Negatív minták esetén redoxpotenciál-méréssel 24 órán belül eredményt kapunk. Összehasonlítva a standard módszer (MSZ EN ISO 6579) 114 órás időigényét a kombinált módszer 27 órás időigényével látható, hogy negatív *Salmonella*-minták esetén, a 2073/2005/EK rendeletben szereplő kritérium, miszerint a forgalomba hozott termék 25 grammjában az eltarthatósági ideje alatt nincs jelen *Salmonella*, lényegesen gyorsabban bizonyítható a kombinált módszerrel.

A redoxpotenciál-mérésen alapuló és real-time PCR módszer kombinációja egy költség-, munka- és időtakarékos megoldást jelent a *Salmonella* kimutatására élelmiszerekben.



## Új tudományos eredmények

- A redoxpotenciál-mérésre alapozott vizsgálati módszer továbbfejlesztését végeztem el, amely a módszert alkalmassá teszi a hús és tejipar területén technológiai higiéniai, környezet mikrobiológiai és élelmiszer-biztonsági vizsgálatokra. Bizonyítottam, hogy a módszer a vizsgált esetekben a szabványos tenyésztéses eljárásoktól szignifikánsan nem különböző eredményeket szolgáltat, jelentősen rövidebb (általában 1 napon belüli) idő alatt.
- Adaptáltam a redoxpotenciál-mérésen alapuló mikrobiológiai módszert a legfontosabb technológiai higiéniai kritériumok, összes mikroba és Enterobacterium-szám gyors, (esetenként 6-8 óra alatti), egyszerű és költséghatékony meghatározására. Vizsgálatokkal bizonyítottam annak alkalmazhatóságát nyers tej, hús és húskészítmények, valamint környezeti higiéniai minták mikrobiológiai ellenőrzésében. A módszer lehetővé teszi a felhasználásával nyert mikrobiológiai eredmények HACCP rendszerbe való gyors visszacsatolását.
- A redoxpotenciál-mérés és Real-time PCR módszerek kombinációjával módszert dolgoztam ki *L. monocytogenes* élelmiszer mintákból történő költség- és időtakarékos, gyors kimutatására. A kombinált módszer előnye, hogy a dúsítási lépésként alkalmazott redox-módszer kiszűri a negatív mintákat így a felesleges PCR azonosítás költsége megtakarítható.
- Kifejlesztettem a redoxpotenciál-mérésen alapuló és a Real-time PCR módszer kombinációját költség-, munka- és időtakarékos megoldásként *Salmonella* kimutatására élelmiszerekben. A redoxpotenciál-mérés, mint dúsító eljárás kiszűri a pozitív *Salmonella* mintákat, a biokémiai megerősítés helyett a további azonosítás real-time PCR-rel történik. A pozitív minták azonosítása 5 napról 1 napra csökkenthető.

## A doktori kutatás eredményeinek közlései

Erdősi O., Szakmár K., Reichart O., Székely-Körmöczy P., Laczay P.: **Application of the redox potential measurement based rapid method in the microbial hygienic control.** Acta Aliment. Hung., 41. 45-55, 2012.

Erdősi O., Szili Zs., Szita G., Kovács É., Szakmár K.: **Redox-potenciál-méréseken alapuló mikrobiológiai gyorsmódszer alkalmazása vadhús vizsgálatára.** Magyar Állatorvosok Lapja, 135. 436-440, 2013.

Erdősi O., Szakmár K., Reichart O., Szili Zs., László N., Balogh Z., Székely Körmöczy P., Laczay P.: **Rapid detection of Salmonella in food by redox-potential measurement based method combined with real-time PCR.** Acta Alimentaria, közlésre elfogadva 2013. augusztus 22.

Erdősi O., Szakmár K., Reichart O., Szili Zs., László N., Székely Körmöczy P., Laczay P.: **Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in raw milk and soft cheese by a redox-potential measurement based method combined with real-time PCR.** Acta Veterinaria Hungarica, közlésre elfogadva 2014. március 12.

Szakmár K., Reichart O., Erdősi O., Fekete Z.: **Redox-potenciál mérésen alapuló gyorsmódszer nyers tej mikrobaszámának meghatározására.** Magyar Állatorvosok Lapja, 131. 365–372, 2009.

### Előadások:

Erdősi O., Szakmár K.: **Redoxpotenciál-méréseken alapuló gyors mikrobiológia módszer alkalmazása nyers hús és nyers tej vizsgálatára.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK, 2008.

Erdősi O., Szakmár K., Fekete Z.: **Nyers tej mikrobaszámának redoxpotenciál-mérésre alapozott gyors meghatározása.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK, 2009.

Erdősi O., Szakmár K.: **Nyerstej Clostridium számának redoxpotenciál mérésre alapozott gyors meghatározása.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK, 2010.

Erdősi O., Szakmár K., Kovács É.: **Vadhús mikrobiológiai vizsgálata MicroTester berendezéssel.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK 2011.

Erdősi O., Szakmár K., Reichart O.: **Salmonella kimutatása élelmiszerekből redoxpotenciál-méréseken alapuló gyors mikrobiológiai módszerrel.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK, 2012.

Erdősi O., Szakmár K., Reichart O.: **Listeria monocytogenes kimutatása és számának meghatározása tejből és tejtermékekből.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK, 2013.

Szakmár K., Erdősi O., Reichart O.: **2007-2012 évi Mikrobiológiai Jártassági Vizsgálatok Értékelése,** Akadémiai beszámolók, SzIE ÁOTK., 2013.

Szakmár K., Erdősi O., Reichart O.: **Listeria monocytogenes szám kvantitatív PCR technikával történő meghatározásának teljesítmény jellemzői.** Akadémiai beszámolók SZIE-ÁOTK , 2014.

## **Köszönetnyilvánítás**

Értekezésemhez kapcsolódó munkám során nyújtott segítségért, konzultációkért szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Reichart Olivérnek, továbbá Dr. Szakmár Katalinnak az elvégzett vizsgálatokban és kiértékelésekben nyújtott segítségért, valamint az Élelmiszer-higiéniai Tanszék összes munkatársának a támogatásért.