

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Élelmiszer-higiéniai Tanszék

**Antibiotikum maradványanyag tartalmú tej gátló hatásának vizsgálata
gyors módszerekkel**

Készítette: Dobos Attila Balázs

Témavezető: Dr. László Noémi
SZIE ÁOTK; Élelmiszer-higiéniai Tanszék

Budapest

2014

- 0 -

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	2
2. Irodalmi áttekintés	3
2.1. A tejágazat statisztikai áttekintése	5
2.2. Tejelő tehenek mastitise, annak formái és kezelési lehetőségei	8
2.3. Az Élelmezés-Egészségügyi Várakozási Időről és a jogi háttéréről.	9
2.4. A maradványanyag tartalmú tej megsemmisítéséből eredő gazdasági kárról.	10
2.5.1. A nyerstej tartósítása, hőkezelése	12
2.5.2. Forgalomban lévő tehéntejváltozatok feldolgozásuk alapján (Európai Unión belül)	12
2.6. A tejfogyasztási szokásokról.	13
2.7.1. A cefalosporinok (cefemek) és a cefalexin.	16
2.7.2. A béta laktám antibiotikumok (cefalexin) hőérzékenységről, hőbomlása.....	17
2.8. Az emberi bélflóra	18
2.9. Antibiotikumok bélflórára gyakorolt hatása és a cefalexin mellékhatásai	20
3. Anyag és módszer	21
3.1. A kiválasztott telep jellemzői és a telepi munka	21
3.2. A minták hőkezelése.....	23
3.3. A hőkezelt és kontroll minták analitikai feldolgozása.....	25
3.4. Bélfلóráról, és a további kísérletekhez kiválasztott modell-mikróbák	26
3.5.1. Bifidobacterium adolescentis	27
3.5.2. Escherichia coli.....	27
3.6. Mikroba-szaporodás mérése MicroTester készülékkel.	28
3.6. Delvotest SP-NT.....	34
4. Eredmények.....	36
4.1. HPLC-MS/MS eredmények és értékelésük	36
4.2. Microtester eredmények az E. coli-ról.	39
4.3. Microtester eredmények a B. adolescentis-ról.....	39
4.4. Delvotest eredmények az antibiotikum standard hígítássorokból.	40
5. Megbeszélés (következtetések)	41
6. Összefoglalás	42
7. Angol nyelvű cím és rövid összefoglaló	43
8. Mellékletek	44
9. Irodalomjegyzék	47
10. Köszönetnyilvánítás	49

1. Bevezetés

Az emberi táplálkozás jelentős részét teszik ki különböző tejtermékek, így a tej is. Az intenzíven tartott, holstein-fríz fajtájú tejlő tehének gyakran szenvednek különböző oktanú klinikai, vagy szubklinikai tügygyulladásról, melyet, ha az indokolt antibiotikum tartalmú tügyinfúziókkal kezelnek. Ezen antibiotikumok tekintetében jogszabályban meghatározott élelmezés egészségügyi várakozási idő letelte előtt nem lehet az állatok tejét sem ipari célra, sem közfogyasztásra használni, sem más állatnak (például borjaknak) takarmányozási célból adni; hanem meg kell annak teljes mennyiségét semmisíteni.

Jelentős témáról lévén szó, egyrészt, mert az antibiotikum maradványanyagok a fogyasztókra potenciális veszélyforrást jelentenek, (például az É.E.V.I. alatt fogyasztott tej miatt) másrészt, ebből a kockázatból kifolyólag az élelmezés egészségügyi várakozási időn (É.E.V.I. -n) belül megsemmisített tej komoly gazdasági kárt okoz a tehenészeteknek.

Egy Budapest közelében lévő közepes nagyságú tehéntelevélről származó, előzőleg (cefalexin tartalmú) antibiotikummal kezelt tehének, maradványanyag tartalmú tejjével végeztünk különböző hőkezelési és analitikai vizsgálatokat.

A tehéntelevélben lévő antibiotikum maradványanyagok (cefalexin) mikroba gátló hatását vizsgáltuk gyorsmódszerekkel, mint a redox-potenciál mérésen alapuló MicroTester –rel és a Delvotest SP-NT-vel.

2. Irodalmi áttekintés

Az irodalmi áttekintést a tejágazatnak a statisztikai áttekintésével kezdem, itt kitérnék a főbb agrárgazdasági mutatókra, a többéves tendenciák tükrében, kiemelve a hazai helyzetet.

Ezek után a tőgyegészségügyről, tőgybetegségekről és kezelésükről írok összefoglalást. Ebben a részben foglalkoznék az élelmiszertermelő állatok kezelésre használt antibakteriális készítmények élelmezés egészségügyi várakozási idejével, valamint a megtermelt tejben lévő maradványanyag szintre (MRL -re) vonatkozó EU-s jogszabályokkal.

Írnék továbbá a nyerstej hőkezeléséről is, továbbá, a fejezet tárgyát képezi, a kísérleteinkben is szereplő cefalosporinokról (cefalexinről) elérhető szakirodalmi háttérből szemelvények ismertetése.

Kiemelten foglalkoznék még a fiziológiás emberi bélflórával, a per-orálisan alkalmazott antibiotikumok (cephalexin) okozta betegségekkel és mellékhatásokkal, melynek tükrében szemléltethető, a tejtermékekben (tágabb értelemben véve az élelmiszerekben) lévő kémiai szennyezők (mint például az antibiotikum maradványanyagok) élelmiszerbiztonsági jelentősége, közegészségügyi kockázata miatt.

2.1. A tejágazat statisztikai áttekintése.

Állattartással hazánkban, 2013-ban 2179 gazdasági szervezet és 310.252 egyéni gazdaság foglalkozott. Ez a szám a gazdasági szervezetek esetében némi növekedést, míg az egyéni gazdaságok esetén majd 20%-os csökkenést mutatott régióként gyakorlatilag azonos mértékben. [1.]

Az ország egész területét tekintve 2013-ban a gazdaságok szarvasmarha állománya 751.400 állat, ebből 330.800 tehén. A legtöbb szarvasmarhát egyértelműen Hajdú Bihar Megyében tartják, de kiemelendő még Pest Megye (Budapesten kívül), ahol a gazdaságok relatív alacsony száma mellett a megyék átlagát meghaladó számú a szarvasmarha állatállomány. Elmondható továbbá, hogy szarvasmarhatartással foglalkozó gazdasági szervezetek közül azokból volt 2013-ban a legtöbb, aki 500 és 999 közötti állatállomány nagysággal bírt; míg az egyéni gazdaságokból a legtöbben 3-5 állatot tartottak. A számok alapján az egyéni gazdaságokra nagyságrendekkel jobban jellemző a 49 szarvasmarha alatti állomány. [1.]

Megemlítendő továbbá, hogy az összes szarvasmarhából 100.265 darabot trágyakezeléses kötött, 420.962 darabot trágyakezeléses kötetlen, illetve 229.890 darab állatot egyéb módon tartottak. Tehát a domináns az ágazatban még mindig a nagyüzemi jellegű intenzív, kötetlen tartásmód. [1.]

Az Eurostat nyilvántartása szerint 2013-ban az EU-28 tagállamokban összesen több mint 87 millió szarvasmarhát tartottak, ezen országok közül kiemelendő Franciaország, a majdnem 20 milliós, Németország, a több mint 12 milliós illetve Nagy-Britannia a majdnem 10 milliós állatállományával. A társult tag Törökországban is 14,5 millió szarvasmarhát tartottak nyilván becslő adatok alapján. Magyarországon a fent említett több mint 330 ezer tehénből 244 ezer tejhasznosítású tehén, ez a szám az EU-28 tagállamok között (becslő adatok alapján) több mint 23 millió állat. Itt is megállapítható, hogy Németországban és Franciaországban van a legtöbb tejhasznosítású tehén (több mint 4,2 és majdnem 3,7 millió nyilvántartott állat). [2.]

Magyarországon a begyűjtött tehéntej mennyisége 1.364.230 tonna volt 2013-ban. Összehasonlításképp a többi EU-s ország 2010 és 2013 közötti időszakában a begyűjtött tehéntejjel kapcsolatos adatokat alább az **1. táblázatban** foglalom össze [1] [2]

A jelenleg EU-28-hoz tartozó országokban, statisztikai adatok alapján, megfigyelhető az 1980-as években kezdődő tendencia, mely során függetlenül az országok aktuális politikai berendezkedésétől, mind a tejhasznosítású szarvasmarha állatállomány (beleértve a tehénlétszámot), mind a tejelő teheneket tartó gazdaságok (gazdasági szervezetek és egyéni gazdaságok) száma csökken. Pontosabb adatok tejhasznú állatállományokat tartó gazdaságok esetén csak 1989 és 2005 között vannak. Ezen időszakban (a jelenlegi EU28-országokon belül) a legnagyobb tejelő tehén állományokkal bíró Németország (NDK+NSZK) és Franciaország; tejelő teheneket tartó gazdaságainak száma majd a 40%-ra csökkent (2005-re). A 2000-es évek elejétől (2005-2006) a tejelő tehenek száma látványosan lassabb mértékben csökkent, mint korábban. [2.]

Globálisan tekintve a fejlett országok (USA, Új-Zéland, Ausztrália, Németország és Franciaország) gazdaságokra vonatkoztatott relatív állományát, az 1990-es évektől folyamatos növekedést mutat. [3.]

Levonható tehát az a következtetés, a jelen állapotról a fenti adatok tükrében, hogy jóval kevesebb gazdaságban tartanak némileg kevesebb, nagyjából azonos mennyiségű állatot. Vagyis egyes gazdaságok esetén megnőtt az egyedlétszám.

	2010	2011	2012	2013
EU-28 tagállamok	Bizalmas adat	Bizalmas adat	Bizalmas adat	141 243,19 (előzetes adat)
Belgium	3.066.630	3.101.050	3.071.720	3.474.330
Bulgária	564.550	549.130	513.980	510.990
Csehország	2.312.230	2.366.100	2.428.770	2.358.420
Dánia	4.830.200	4.799.900	4.926.800	5.025.800
Németország	29.075.970	29.764.480	29.703.460	30.301.300
Észtország	621.100	642.300	665.090	705.500
Írország	5.327.010	5.536.450	5.379.300	5.581.140
Görögország	672.900	639.000	637.400	606.600
Spanyolország	5.877.100	5.838.200 (előzetes adat)	6.089.030 (előzetes adat)	5.948.800 (előzetes adat)
Franciaország	23.576.310	24.697.750	24.252.760	23.990.610
Horvátország	623.880	626.410	602.360	503.850
Olaszország	10.500.000	10.479.650	10.500.000	10.397.470
Ciprus	150.980	152.860	153.500	157.080
Lettország	625.240	661.930	718.360	735.660
Litvánia	1.278.130	1.317.440	1.359.920	1.339.390
Luxemburg	281.790	281.040	277.530	286.910
Magyarország	1.321.860	1.307.920	1.398.240	1.364.230
Málta	Bizalmas adat	Bizalmas adat	Bizalmas adat	40.920
Hollandia	11.626.120	11.641.700	11.675.400	12.212.700
Ausztria	2.771.020	2.895.520	2.964.250	2.932.930
Lengyelország	9.002.410	9.309.160	9.857.660	9.921.660
Portugália	1.828.850	1.841.790	1.861.400	1.777.090
Románia	903.750	897.350	887.850	882.380
Szlovénia	519.500	525.590	535.060	516.970
Szlovákia	799.950	811.500	851.250	826.640
Finnország	2.288.560	2.255.310	2.254.040	2.286.800
Svédország	2.862.210	2.850.400	2.861.170	2.869.580
Nagy-Britannia	13.581.900	13.804.500	13.590.7000	13.687.400

1. táblázat Az Európai Unió tagállamok begyűjtött tejmenyisége tonnában, 2010-2013 [2.]

2.2. Tejelő tehenek mastitise, annak formái és kezelési lehetőségei

Napjainkban, az intenzív termelésű tehenészetekben majdnem mindenütt a holstein fríz szarvasmarhák valamilyen fajtaváltozatát tartják.

A tejelő teheneket tartó tehenészetek legfontosabb feladata, -az állatjóléti szabályok betartása mellett-, hogy a lakosság megnövekedett tejfogyasztási igényeit kielégítse, jó minőségű és élelmiszerhigiéniaailag biztonságos tej termelésével, természetesen a gazdaságossági

szempontok figyelembe vétele mellett. Ezen állományokban sok állategészségügyi probléma adódik, az egyik legjelentősebb talán a tejlő tehének tőgygyulladás (mastitis), mert ez közvetlenül (a megtermelt tej mennyisége által) és közvetve (szövődmények, és az idő előtti selejtezés által) is kihat a gazdaság költséggazdálkodására, bevételeire. [3.], [5.]

Az intenzív tartási körülményekből, a „csúcsra járatott” maximális tejtermelésből és az esetleges takarmányozási - hibákból, - hiányosságokból, anyagcsere zavarokból és egyéb szisztémás betegségekből illetve környezeti, hajlamosító tényezőkből (mint fejési-higiénia, - technológia és istállóhigiénia) vezethető le a tejlő tehének tőgygyulladása.

A mastitis összetett oktanú és multifaktoriális kórkép, egyes állatok (vagy állományok) esetén a mastitisre jellemző klinikai képet az alábbi tényezők alakítják ki: [5.]

- Az állat külső környezete (tartási körülmények (stressz, higiénia), fejési higiénia, fejőgépek megfelelő működése, és az istálló, fejőház klímaviszonyai) és a takarmányozás (különleges takarmányozási igényűek a tejlő tehének, fontos továbbá az etetett takarmányok minősége is).

- Az állat genetikailag meghatározott adottságai is hajlamosíthatnak, mint a tőgy, tőgybimbók és felfüggesztő készülékének alakulása, a tőgy (és az állat) ellenálló képessége, az állat életkora és laktációs fázisa. Társfertőzések (paralel betegségek) megléte.

- A kórokozó mikroorganizmus milyensége (rendszerint hova tartozik, termel-e toxinokat, milyen a virulenciája és hordoz-e rezisztencia géneket). Kórokozók csoportosítása:

- o Állatról állatra terjedni képes fertőző kórokozók:

- *Streptococcus agalactiae*, (pyogén *Streptococcus*)
- *Staphylococcus aureus*
- *Corynebacterium bovis*
- Ezeken kívüli nyári mastitist okozók (*Arcanobacterium pyogenes*, *Peptostreptococcus* fajok, *Bacteroides* fajok)

- o Környezeti kórokozók, (melyek a külső környezetből fertőződnek be a tőgybe):

- *Escherichia coli*, és más coliform baktériumok (*Enterobacteriaceae* család)
- *Streptococcus uberis*, *Str. Bovis*,
- *Enterococcus faecalis*, *Lactococcus graviae*,
- Egyéb *Corynebacterium*-ok,
- *Bacillus cereus*
- *Nocardia* fajok

- Prototheca zopfi
- Átmeneti kórokozók, (melyek bizonyos feltételek mellett állatról-állatra terjedni képes környezeti kórokozók, például a normál bőrflóra alkotók)
 - Streptococcus dysgalactiae
 - Coaguláz negatív Staphylococcusok (CNS)
 - Pseudomonas aeruginosa
 - Micrococcus-ok [5.]

Megkülönböztethetünk klinikai tünetekben megnyilvánuló mastitist és szubklinikai formát, mely során ugyan látható tünetek még nincsenek, de a tejtermelés csökken, a tej minősége romlik, szomatikus sejtszáma emelkedett. Az ilyen (egyébként nagyobb számban előforduló) szubklinikai mastitiseket csak valamilyen mastitis – marker vizsgálatával lehetséges kimutatni (például a tej pH, tejcukorszint, ion összetétel (például kloridion koncentráció emelkedése) és egyes fehérjék, enzimek mennyiségének változása, vagy a szomatikus sejtszám emelkedése). Ha a szomatikus sejtszám (SCC) a tejben 200-250 ezer/ml fölé emelkedik, az adott tőgynegyed, amiből ki lett fejve, tekinthető betegnek. [5.], [6.]

A gyulladás kiterjedhet egy tőgynegyedre, vagy a teljes tőgyre is, egyes tőgynegyedekről terjedhet a többire. Istállópróbák állnak rendelkezésre az SCC emelkedés (ez által a tőgygyulladás fokának) szemikvantitatív bírálatára, mint például a California- Mastitis- Test (Mastitest), vagy a Whiteside-próba. [5.], [6.]

A mastitis kórjelzésében fontos a mikrobiológiai vizsgálat a pontos oki diagnózis felállítása és a későbbi kezelési terv megválasztása miatt (erre nagyüzemi körülménynek között általában nem kerül sor). A felismert klinikai és szubklinikai tőgygyulladásos egyedeket el kell esetlegesen különíteni, ha fertőző kórokozóról van szó, és külön kell őket fejni legutoljára, valamint haladéktalanul meg kell kezdeni az adekvát antibakteriális hatóanyagot is tartalmazó készítménnyel történő kezelést (például tőgyinfúzió). Továbbá törekedni kell a hajlamosító környezeti és takarmányozási tényezők kiküszöbölésére és esetleges egyéb betegségek, anyagforgalmi zavarok orvoslására.

Ha egy tehén hosszas ideig nem gyógyul, vagy éppen többször visszatérő (gyakran exacerbáló, rekurrens) makacs tőgygyulladással küzd és következetesen tejtermelése sem megfelelő, akkor selejtezésre kerül. [5.]

A telepspecifikus tőgyegészségügyi állományprogramok nagyon fontos szerepet töltenek be a tőgygyulladások állományszintű kezelésben, a terjedés megakadályozásában és a megelőzésében. [5.]

2.3. Az Élelmezés-Egészségügyi Várakozási Időről és a jogi háttéréről.

A 128/2009. (X.6.) FVM rendelet az Állatgyógyászati termékekről, a következőképpen fogalmaz 4. §-nak, 1., 10. és 11. bekezdésében:

„1. Állatgyógyászati készítmény: az élelmiszerláncról és hatósági felügyeletéről szóló 2008. évi XLVI. törvény (a továbbiakban: Éltv.) Mellékletének 3. pontjában meghatározott anyag vagy anyagok keveréke, beleértve a gyógypremixeket is.”

„10. Élelmezés-egészségügyi várakozási idő: azon időtartam, amelynek a közegészségügy védelme érdekében el kell telnie az állatgyógyászati készítmény állatokon való rendeltetésszerű és e rendelet előírásainak megfelelő utolsó alkalmazása és a kezelt állatból származó állati eredetű élelmiszer előállítása között annak biztosítása érdekében, hogy az ilyen élelmiszer ne tartalmazzon maradékanyagokat az állati eredetű élelmiszerekben található állatgyógyászati készítmények maximális maradékanyag-határértékeinek megállapítására szolgáló közösségi eljárás kialakításáról szóló, 2009. május 6-i 470/2009/EK tanácsi rendeletben (a továbbiakban: 470/2009/EK rendelet) megállapított maximális határértéket meghaladó mennyiségben.” [7.]

„11. Élelmiszer-termelő állat: olyan állat, amelynek húsa vagy egyéb terméke az európai étkezési szokásokat figyelembe véve emberi fogyasztásra kerülhet.”

Élelmiszertermelő állatoknak csak olyan engedélyezett és törzskönyvezett állatgyógyászati készítmény adható, melynek az adott állatfajra van élelmezés-egészségügyi várakozási ideje. Ha nem áll rendelkezésre az adott faj, valamely bántalmára indikált, törzskönyvezett állatgyógyászati készítmény, akkor „az ellátó (szolgáltató) állatorvos – saját felelősségére – az állat elfogadhatatlan mértékű szenvedésének elkerülése érdekében alkalmazhat más állatfajra, vagy ugyanazon állatfajra, de más bántalom kezelésére engedélyezett állatgyógyászati készítményt; vagy ezek hiányában, humán (-gyógyászatban) törzskönyvezett készítményt, illetve FoNo, FoNoVet, magisztrális vagy officinális készítményt, ha azok hatóanyagai szerepelnek a 37/2010/EK rendelet I. mellékletében”. [7.]

Amennyiben a kezelő (szolgáltató) állatorvos a fent említett okokból és céllal készítményt off label (azaz nem a használati utasításban leírtak szerint) használ, (élelmiszertermelő) gazdasági haszonállat gyógykezelésére, az élelmezés egészségügyi várakozási időt neki kell meghatároznia. Ekkor az É.E.V.I.-nek tej és tojás esetében minimum 7 napnak, baromfi és emlős állatok ehető szövetei esetén minimum 28 napnak és halhús esetén minimum 500 lebomlási napnak kell lennie. [6.], [7.]

A 37/2010/EK rendeletben, 470/2009/EK rendeletben előírt osztályozási rendszer alapján szerepelnek azon hatóanyagok, melyeknek korábban történt maximális maradékanyag

meghatározása, és melyek esetében nem volt szükség maximális maradékanyag-határérték megállapításra; valamint azon hatóanyagokat is tartalmazza, melyek esetén ideiglenes maradékanyag-határérték került megállapításra (37/2010/EK rendelet/mellékletek/1. táblázat). A mellékletek 2. táblázata, pedig azon hatóanyagokat tartalmazza, melyek esetében nem lehet maradékanyag-határérték megállapítani, mivel bármilyen koncentrációban való jelenléte komoly közegészségügyi kockázatot hordoz. Ez a tiltott anyagok listája.

A szakdolgozat keretében vizsgált cefalexin például az 1. táblázatban szerepel, mint olyan hatóanyag, melyre korábban maximális maradékanyag határértéket (MRL-t) állapítottak meg. Szarvasmarhafélékben az MRL értékek cefalexinre:

- Izomszövetben: 200 µg/kg.
- Zsír(szövet)ben: 200 µg/kg.
- Májban: 200 µg/kg.
- Vesében: 1000 µg/kg.
- Tejben: 100 µg/kg.

A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Élelmiszer- és Takarmány-biztonsági Igazgatóság referencia laboratóriumaiban országszerte folyamatosan monitoring vizsgálatokat végeznek többek között tejben található MRL-lel rendelkező, vagy éppen tiltott kémiai kontamináció kiszűrésére, kockázatbecslések alapján. [6.], [8.]

Ha megállapításra kerül bármilyen gátlóanyag (maradványanyag MRL-nél nagyobb mennyiségben), tejben, vagy tejtermékben, akkor az adott terméket egyáltalán nem lehet forgalomba hozni, vagy ha már forgalomba került, onnan haladéktalanul ki kell vonni, pontosan dokumentált körülmények között szállítani és megsemmisíteni hatósági állatorvosi felügyelet mellett. (Ez kiderülhet a tehenészet (tejgyűjtőjének), tejfeldolgozó üzem, és az élelmiszerlánc egyéb területeinek, például a kereskedelemből vett minták ellenőrzése során.)

[6.], [8.]

2.4. A maradványanyag tartalmú tej megsemmisítéséből eredő gazdasági kárról.

Tejelő tehenek számára antibiotikumok adását igénylő tőgyegészségügyi (és egyéb) kezelések után É.E.V.I.-n belül az adott állati eredetű termék (például tej) elkülönítésre, majd megsemmisítésre kerül. Az ebből és a tőgygyulladás kapcsán felmerülő egyéb gazdasági veszteségekről számszerű adatokat és összefoglalót Dr. Ózsvári László Doktori értekezésében olvashatunk.

Általánosságban elmondható, hogy a tőgygyulladások okozta veszteség jelentős részét (80%-át) az állat csökkent tejtermelésére és az elkülönített (később megsemmisített) tejjre vezetik vissza. (Az összveszteség 11%-a adódik a maradványanyag tartalmú tej elkülönítéséből.) Több modell dolgoztak ki a kár becslésére, az alkalmazott modellekben különféle veszteség-kategóriákkal számoltak. [9.]

Ez a gazdasági kár az egyik számítási módszer szerint 1976-ban az Egyesült Államokban 12,88 USD tehemenként, évente. Egy másik számítási modell szerint 1968-ban a „magasabb” veszteség 4,04 USD tehemenként évente; míg ugyanezen modellt alkalmazó 1976-os becslés szerint a „magasabb” veszteség 7,72 USD tehemenként évente (összveszteség 294,46 USD tehemenként évente).[9.]

Hazai statisztika kevés áll rendelkezésre a témában. [5.], [9.]

2.5.1. A nyerstej tartósítása, hőkezelése

A fentebb említettek tükrében érthető, hogy a nyers, hőkezeletlen és tartósítás nélküli tej potenciális közegészségügyi kockázatot hordozhat a fogyasztója számára még a legkörültekintőbben történő hűtési szabályok betartása melletti tárolás és szállítás esetén is (mivel maga a tej összetételéből adódóan kiváló táptalajt jelent különféle mikrobák számára, amelyek ab ovo (a tehénből), fejés közben bekerülve (másodlagos szennyeződés), vagy akár utólagosan kontaminálják a tejet). [6.]

A tejbe esetlegesen bekerülő kórokozók származhatnak a tehén valamely szisztémás fertőzéséből (ahonnan bakteriális áttétellel (szóródással) kerülhetnek el a tőgy állományába), vagy helyi tőgygyulladásból.

A teljesség igénye nélkül néhány zoonotikus kórokozó, melyek kiválasztódhatnak a tejjel: Salmonella fajok (komoly hasmenéssel járó megbetegedést okozhat), Mycobacterium fajok (például az M.avium komplexbe tartozók, melyek a humán paratuberkulózist okozhatják, de ürülhet a tejbe más TBC-t okozó kórokozó is), Brucella fajok (ugyan a B. melitensis előfordulása itthon nem gyakori, de súlyos megbetegedést okoz), a Coxiella burnetti (Q-láz okozója) valamint Leptospirák. Tőgygyulladások kórokozói (lásd fent a **2.2. fejezetben**) értelemszerűen ürülnek a tejbe, szakirodalmi adatok szerint ez szubklinikai mastitis esetén pár tízezer/ml élőcsírákat jelent, de klinikai mastitis esetében akár meghaladhatja a 10^8 /ml-es élőcsíra számot is. [6.]

A tejet másodlagosan szennyező kórokozó fajok szintén származhatnak a tehénből, bekerülhetnek a tejbe a bélsárral, vizelettel és egyéb testnedvekkel (méhből ürülő tartalom,

nyál), továbbá az állat környezetéből, így például az istállók porából, a fejőház levegőjéből és a fejőgépek részeiről. [5.], [6.]

Ilyen kórokozók például a *Campylobacter* fajok, (melyek akár gasztroenterális kórképeket, vagy szélsőséges esetekben vetélést is okozhatnak), enterohaemorrhágiás *E.coli* tözsek és *Listeria monocytogenes*, valamint egyéb mikrobák.

Kontaminálódhat még a tej bármilyen fertőző eredetű humán megbetegedés kórokozójával, amennyiben az bekerül a dolgozókból, például az elegytejbe, súlyos személyi-higiéniái hiányosságok esetén. Történhet még kontamináció különféle vírusokkal is (veszettség), viszont a BSE-prionok nem tudnak bejutni a tejbe. [6.]

Komoly hagyományokra tekint vissza, mely manapság is fokozatosan előtérbe kerül, a nyerstej forralása, vagyis 100°C fölé melegítése és pár percig (például többszöri felfutásig) való hűntartása. Az ipar ezt a hőkezelési eljárást nem tudja jól alkalmazni, mert a tej beltartalmi- és élvezeti értéke jelentősen romlik ezen hőkezelés során. Az ipari hőkezelések többségénél a legfontosabb szempont az élő mikróbaszám minimálása mellett, a különböző, esetlegesen a tejben lévő *Mycobacterium*-ok elpusztításához szükséges optimális hőmérséklet és hűntartási idő kiválasztása. [6.]

Az tejipar által alkalmazott hőkezelési technikák: [6.]

- Termizálás (57-68°C, 15 másodperces hűntartási idővel)
- Tartós pasztörözés (62-65°C, 30 perces hűntartási idővel)
- Gyorspasztörözés (72-76°C, 15-40 másodperces hűntartási idővel)
- Pillanatpasztörözés, vagy magas hőmérsékletű pasztörözés (80-98°C, 1-180 másodperces hűntartási idővel)
- Nagyon magas hőmérsékleten hőkezelés (ESL) (100-134°C, 0,1 másodperces hűntartási idővel)
- Ultramagas hőmérsékleten történő hőkezelés (UHT) (136-142°C, 2-6 másodperces hűntartási idővel)
- Sterilizálás (115-121°C, 15-30 perces hűntartási idővel). (Manapság ezt a módszert általában előzetes UHT hőkezelés után végzik, ekkor csak 136-142°C-on, 2-6 másodperces hűntartási idővel.)

[6.]

2.5.2 Forgalomban lévő tehéntejváltozatok feldolgozásuk alapján (Európai Unión belül)

[6.], [10.]

Zsírtartalom alapján (megkülönböztethetünk kezelt és kezeletlen tejet):

- Házi-, vagy nyers- tej. Semmilyen technológiával nem dolgozták fel, illetve nem kezelték, zsírtartalma 3-5% (-tól akár 6-7%-os is) lehet attól függően, hogy az elegytej milyen fajtájú tehenektől származott (jellemzően piacokon, mobil árusítóhelyeken forgalmazzák).
- Standard teljes tej. Általában homogénezett, valamilyen módon hőkezelt, zsírtartalma 3,5(-4)%-is lehet.
- Félig fölözött (félzsíros) tej. Homogénezett, hőkezelt, a tejszír hozzávetőlegesen felét eltávolítják, így az 1,5 (-1,8)%-os.
- Fölözött, (vagy zsírszegény) tej. Homogénezett, hőkezelt. A tejszín nagy részét eltávolítják a tejből, így tejszírtartalma 0,5% alatti.

Vannak továbbá kereskedelmi forgalomban csökkentett laktóztartalmú, vagy laktózmentes tejek is.

Hőkezelttség milyensége alapján forgalmazznak:

- Nyers (házi) tejet. (Hőkezeletlen, hűtve tárolják forgalmazásig).
- Pasztörözött tejet (gyorspasztörözött és pillanatpasztörözött tejek) (6°C alatti hűtve tárolást igényelnek)
- ESL (nagyon magas hőmérsékleten hőkezelt) tejet. Kiterjesztett eltarthatósági idejű tej.
- UHT (Ultramagas hőmérsékleten hőkezelt) tejet. Csomagolásuk alapján tartós vagy féltartós tejek. (20-25°C-on lehetséges tárolásuk).
- Sterilizált (sterilizált) tejet.

2.6. A tejfogyasztási szokásokról.

[11.]

Huszka Péter 2005-ös, doktori értekezéséből néhány példával szemléltetném a hazai és külföldi tejfogyasztási szokásokat és a bennük zajló változásokat.

A Szocio-Gráf Piac és Közvélemény Kutató Intézet (1998-as) felmérése azt mutatja, hogy a magyar fogyasztók a tejtermékek közül leggyakrabban folyadéktej fogyasztanak. Megállapítható továbbá, hogy a nők nagyobb gyakorisággal fogyasztanak tejterméket, mint a férfiak.[11.]

Egy 1998-as Ausztrál telefonos közvélemény-kutatással egybekötött felmérés szerint, a megkérdezett lakosok 2/3 kóstolt már UHT-tejet. Viszont rendszeresen a felmérésben résztvevők csupán 10%-a fogyaszt UHT tejet, ellenben pasztörözöttet a 80%-uk, vélt

tápanyagtartalmi különbségekre és ízbeli hiányosságokra hivatkozva. Ugyanakkor a kisebbségben lévő, csak UHT tejet rendszeresen fogyasztók éppen ellenkezőleg ítélik meg az UHT-s tejek ízvilágát. [11.]

1997-es Németországból származó felmérések alapján kijelenthető, hogy ott egyre fontosabbá vált az egészségtudatos táplálkozás, (így a konyhakész, pl. reszelt sajtermék és az élő flórát tartalmazó, probiotikus tejtermékek fogyasztása növekedett), a folyadéktej fogyasztásának csökkenése mellett. Továbbá a német fogyasztók lojálisak a hazai termékekkel szemben és bizonyos „márkahűséget” mutattak nagy számban. [11.]

2001-es hazai adat a Mai Piac cikkéből, a hazai folyadéktej fogyasztás gyakorisága 1988-tól 1999-re heti 5,2 alkalomról 4,1-re (férfiaknál 3,6 alkalomra, a nők 4,6 alkalomra) csökkent. A férfiak 74%-a és a nők 84%-a körében volt különösen kedvelt a tej. [11.]

Érdekes adat az is, hogy minél magasabb valakinek az iskolai végzettsége, annál ritkábban fogyaszt tejet, illetve az egészségtudatos fogyasztók sem kedvelik jobban a tejet az átlagnál.

Kiderült egy új-zélandi 2003-as felmérés eredményéből, miszerint ott a tejet egyáltalán nem fogyasztók aránya a fiatal nők körében volt a legmagasabb (több mint 15%). [11.]

2.7.1. A cefalosporinok (cefemek) és a cefalexin.

[12.], [13.]

A cefalosporinok, a kémiai szerkezetükben β -laktám vázat tartalmazó antibiotikumok közé sorolhatók, a penicillin származékokkal, β -laktamáz inhibitorokkal, penemekkel, karbopenemekkel és a monobaktámokkal együttesen. Történetüket tekintve igen régi hatóanyagcsoportról van szó, az első cefalosporint (cefalosporin - C-t) 1945-ben a *Cephalosporium acremonium* gombatenyészetből izolálták. Azóta kutatások tárgyát képezi ez a hatóanyagcsoport, napjainkra 5 generációjukat különböztetjük meg, valamint a szakirodalom kiter még csak állatorvosi használatra törzskönyvezett hatóanyagokra is (például a cefovecin).

Azon cefalosporinok alaplomolekulájától egy metil csoportban különböző molekulákat, melyeket először a *Streptomyces lactamdurans* gombatenyészetből vontak ki cefamicineknak nevezik, első képviselőjük a cefamicin – C, (mint alaplomolekula) volt.

A cefalosporinokat és a cefamicineket együttesen cefemeknek nevezik.

A cefemek alapszerkezete 7-amino-cefalosporánsav (mely β -laktám gyűrűhöz kapcsolt dihidrotiazin gyűrűből áll) és az ehhez kapcsolódó különböző funkciócsoportok, (oldalláncok) határozzák meg az adott hatóanyagokat.

Hatásmechanizmusukat tekintve a többi β -laktám antibiotikumhoz hasonlóan bakteriális sejtfal szintézis gátlók. A baktériumok sejtfalának (peptidoglikán vázának) szintézisét a

bakteriális sejt oligopeptidekből végzi transzpeptidáz és karboxipeptidáz enzimei segítségével; ezen enzimeket gátolják a cefemek. Leegyszerűsítve, így a bakteriális sejtfa nem tud tökéletesen összeépülni, nem funkcionál megfelelően, a sejt ozmotikusan áteresztővé válik, vizet veszít, majd elpusztul. Ez által fejtik ki baktericidhatásukat. [12.], [13.]

A cefalosporinok ellen, (ahogy a többi β -laktám antibiotikum ellen is) kialakulhat rezisztencia a baktériumok részéről három úton keresztül. A baktériumok lehetnek eleve (ab ovo) ellenállóak oly módon, hogy a molekula nem tud átjutni a sejtfa (Mycobacteriumok, Pseudomonas aeruginosa), vagy éppen nincsen sejtfa (Mycoplasma), vagy a gazdaszervezetben intracellulárisan élőködnek (Rickettsiák, Chlamydia). Kialakulhat még rezisztencia a baktérium kromoszómáján, illetve plazmidján kódolt β -laktamáz enzim segítségével, ami a bakteriális sejtbe kerülő β -laktám gyűrűt hasítja, így hatástalanná téve azt. (A baktériumok számára komoly szelekciós nyomást jelent az antibiotikumok alkalmazása, így evolúciójuk részeként már több mint 400 β -laktamáz izoenzimet tudtak izolálni belőlük.) A különböző kórokozók által termelt β -laktamázokra a más-más generációkhoz tartozó cefalosporinok és cefamicinek eltérő mértékben érzékenyek, például az 1. generációs cefalosporinok, (így a cefalexin is) ellenállóbbak a Staphylococcusok által (Bush – féle 2A), míg jobban érzékenyek a Gram negatív baktériumok által termelt különféle β -laktamázokkal (pennicilinázokkal) szemben. [12.]

Továbbá az összes cefalosporinra és cefamicinre (a ceftobiprol kivételével) rezisztensek azon baktériumok, melyek cytoplasmájában lévő Penicillin Binding Protein (PBP) -ket irányító gének (baktériumok számára) sikeres mutációja bekövetkezett. Ezekben a törzsek kis affinitással képesek a β -laktám antibiotikumok megkötésére, így alakul ki a rezisztencia. Ezen kórokozók, mint a Meticillin Rezisztens Staphylococcus Aureus , Meticillin Rezisztens Staphylococcus Epidermidis és egyéb kórokozók, komoly közegészségügyi és állategészségügyi kockázatot jelentenek. [12.]

A Cefalexin: [13.], [14.]

A szakirodalom a cefalexinról 1967-ben [14.] tesz először említést, mint új hatóanyagról. Szerkezetileg a legközelebb a cefaglicinhez áll. Az első generációs cefalosporinok közé tartozik, per orálisan és parenterálisan is alkalmazható, mind az állatorvoslásban, mind a humán medicinában használják.

Farmakokinetikáját tekintve, biológiai hasznosulása közepes vagy jó (per os adva körülbelül 75%), jól felszívódik a bélrendszerből is (állatoknál az etetés, vagy embernél az étkezés nem befolyásolja a felszívódását, a vérben 15%-ban kötődik plazmafehérjékhez,) hamar érik el a

maximális plazmaszintet (kutyában per os adva 1-2 óra alatt); felezési idejük viszont rövid. Parenterálisan adva a szövetekben jól megoszlik, viszont a speciális barriereken (mint vér-agy gát, vér-here, és vér-tej barrier) kis mértékben, nehezen jutnak át (még gyulladós folyamatok esetén is), így például tőgygyulladás esetén teheneiben lokálisan, intramammálisan (tőgyinfúzió) formájában célszerű alkalmazni. Szisztémás alkalmazás esetén, csak igen kis mértékben metabolizálódik és a vesén keresztül ürül 80%-ban változatlan formában, az adást követő körülbelül 6 óra múltán (emberben). [12.]

A cefalexin alkalmazási (indikációs) területei:

Kiemelkedő a hatása a Gram-pozitív baktériumok (leginkább a coccoïdok) és gyengébb, mérsékelt a Gram-negatív baktériumok elleni hatása. Gram-negatív baktériumok közül főképp bizonyos E.coli törzsekre, Salmonella-, Klebsiella és Proteus- fajokra és a tápigényesekre hat (mérsékelt), mint egyes Pasteurella-, Mannheimia-, és egyéb fajok. Szűk hatásspektrumú antibiotikumnak számít, viszont a toxicitása szelektív (lévén - a fent említett hatásmechanizmusa alapján - legfőképp a bakteriális enzimekre hat). [12.]

Ily formán állatorvoslásban az arra érzékeny baktériumok okozta fertőzések esetén alkalmazzák; a teljesség igénye nélkül társállat és egzotikus állat praxisban különféle Streptococcusok és Staphylococcusok és egyéb kórokozók okozta légyszöveti (Például bőr-, tüdő-, húgyúti-) és a támasztó szöveteket érintő fertőzések kezelésére, míg gazdasági haszonállatok esetén az előzőekkel azonos indikáción kívül például méhgyulladások, vagy gyakrabban helyileg szarvasmarhák tőgygyulladásának, esetleg tályogok kezelésére használják. (Lovaknak és növényevő rágcsálóknak fokozott óvatossággal adható csupán.)

[12.]

Humán gyógyászatban is igen elterjedt az alkalmazása, 2012-ben az Egyesült Államokban a 100, Ausztráliában, pedig a 15 leggyakrabban felírt hatóanyag (gyógyszer) egyike volt. Szerepel a „World Health Organization's List of Essential Medicine” listáján, ami a közegészségügyileg elengedhetetlen fontosságú hatóanyagokat tartalmazza. [13.], [15.], [16.]

Használják többek között otitis media, Streptococcusok okozta (laryngo-) pharyngitis, pneumonia, bakteriális eredetű cellulitis és csontokat, ízületeket érintő bakteriális fertőzések esetén is, továbbá akut és recurrens húgyúti fertőzésekben ((Recurrent Urinary Tract Infection). Ortopédiai, traumatológiai műtétek esetén alkalmazzák (pre-), peroperatíván prophylaktikusan. Valamint az indikációjában szerepel még a bakteriális áttét miatt kialakuló Endocarditis és szövődményeinek a megelőzése.

Penicillin érzékeny betegek esetén is adható antibiotikum, de óvatossággal alkalmazandó, mert a betegek 1 – 10 %-ban kereszt- érzékenységet és allergiás reakciót dokumentáltak; (nem penicillin-érzékeny betegek esetén a cefalexinre adott allergiás reakció a betegek kevesebb, mint 0,1 %-ban fordult elő).

Generikum lévén, mind állatorvoslásban, mind humán-orvoslásban számtalan gyógyszergyártó által készített termék és gyógyszerformának a hatóanyaga.

[13.]

- Néhány cefalexin tartalmú, Magyarországon forgalomban lévő állatgyógyászati készítmény: [17.]
 - Ceporex inj. A.U.V. (Szarvasmarhára, sertésre, kutyára és macskára törzskönyvezve)
 - Insporin inj. A.U.V. (Szarvasmarhára, sertésre, kutyára és macskára törzskönyvezve)
 - Solvasol inj. A.U.V. (Szarvasmarhára és kutyára törzskönyvezve)
 - Tsefalen 500/1000mg filmtabletta kutyák részére A.U.V.
 - Rilexine 200 mg/g belsőleges paszta A.U.V.
 - Rilexine 75/300/600 mg ízesített tabletták A.U.V.
 - Rilexine 200 T/500 tögyinfúzió A.U.V. (Szarvasmarhára törzskönyvezve)
 - Rilexine 15% injekció A.U.V. (Szarvasmarhára törzskönyvezve)
 - Kefavet vet 250mg filmtabletta A.U.V.
 - Werfalex injekció A.U.V. (Szarvasmarhára és kutyára törzskönyvezve)

2.7.2.A béta laktám antibiotikumok (cefalexin) hőérzékenységéről, hőbomlásáról.

A β -laktám antibiotikumok (így a cefalexin) állatorvoslásban való széles elterjedtsége miatt, főleg gazdasági haszonállatoknál sok maradványanyag kerül az ehető szövetekbe és az állati termékekbe (mint például a tejbe). A fent említettek szerint, ezen, maradványanyag tartalmú termékek esetleges fogyasztása komoly közegészségügyi kockázatot jelent; megsemmisítése gazdasági kárt okoz. Már a 2001-es Codex Alimentarius Commission-ben felmerült az igény további vizsgálatokra avval kapcsolatban, hogy az ilyen állati eredetű termékek (például nyerstej) feldolgozása milyen hatással van a benne lévő maradványanyagokra. [18.]

M. A. Zorraquino és munkatársai a következőket találták a tejben lévő β -laktám antibiotikumok thermo-inaktivációjáról. [18.]

Munkájuk során 9 β -laktám antibiotikumokkal (penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin, cefoperazon, cefquinom, cefuroxim, cefalexin cefalonium) spike-olt (antibiotikummal preparált) tejmintákat vetettek alá hőkezelésnek (40°C/10perc, 83°C/10perc,

60°C/30 perc, 120°C/20perc, 140°C/ 10 másodperc). A tejmintákhoz hozzáadott antibiotikum koncentrációját, minden hatóanyagnál úgy állapították meg, hogy legyen egy, ami az akkor hatályos EU-s jogszabályok (2377/90/EGK) MRL-szintje alatt van, egy, ami valamivel fölötte és egy minta, ami jóval meghaladja, (többszöröse) az MRL koncentrációnak.

A hőkezelés során bekövetkezett hőbomlásra a *Geobacillus stearothermophilus* var. *Calidolactis* baktériumtenyészet gátlási zónáinak változásán alapuló bioassay-t (mikrobiológiai módszert) alkalmaztak. [18.]

Az eredményeik megmutatták, hogy a 40°C-on 10 percig történő kezelés a hatóanyagokban semmilyen észlelhető változást nem okozott, gyakorlatilag a tejminták homogenizálására használták. A 83°C-on 10 percig történő hőkezelés viszont 20%-os csökkenést okozott penicillin G-nél, 27%-os csökkenést cefalexinnél és 35%-os csökkenést cefuroximnál. A tejiparban használatos alacsony hőmérsékletű pasztörözés (60°C-on, 30 perc) és a 140°C-on 10 másodpercig tartó ultramagas hőmérsékleten (UHT) történő hőkezelés csupán igen szerény mértékben befolyásolták (csökkentették) az antimikrobiális hatást. Ezzel szemben a 120°C-on 20 percig zajló hőkezelés (vagyis a sterilizálás) után a penicillinek átlagban 65%-ban, míg a cefalosporinok átlagban 90%-ban inaktiválódtak. [18.]

A cikk írói szerint azért is fontos, a fogyasztásra szánt nyers tej folyamatos ellenőrzése MRL alatti maradványanyagokra, mert a tejiparban alkalmazott két leggyakoribb hőkezelési eljárás nem inaktiválja a maradványanyagokat. [18.]

M. Roca és munkatársai 2011-es cikkében a tejben lévő β -laktám antibiotikumok stabilitásáról hőkezelés hatására az alábbiakat írja. [19.]

Kutatásaik előtt a témával foglalkozók a tejben lévő β -laktám antibiotikumok hőstabilitására (hőbomlására) indirekt módon mikrobiológiai eredményekből következtettek.

M. Roca és munkatársai, kutatásukban több β -laktám antibiotikumot, köztük, az amoxicillint, ampicillint, cloxacillint, penicillinG-t, cefalexint, cefaloniumot, cefoperazont, cefapirint, és cefuroximot vizsgálták törzsoldatokból tejmintákba keverve, különböző hőkezeléssel és különböző hőtartási idő mellett; magas nyomású folyadék kromatográfiás (HPLC) technikával. Minden hatóanyagnál 60-100°C között (10°C-ként emelkedő sorban) hőkezelték különböző időintervallumokat figyelembe véve (cefalosporinok esetén 0 és 180 perc között, 30 perces időközönként) vizsgálták a koncentrációt HPLC-vel. Minden hőkezelési hőmérséklethez felezési időt számítottak ki; majd több (farmako-) kinetikai képletet felhasználva egy az antibiotikum bomlási hányadára, (adott hőmérsékleten és hőtartási időn), becslést, adó képletet állítottak fel. [19.]

A felezési időkkel kapcsolatban azt sikerült megállapítaniuk, hogy 60°-ról 100°C-ra történő hőmérsékletemeléssel a β -laktám antibiotikumok felezési ideje jelentősen csökkent). A penicillinek közül legnagyobb mértékben az ampicilliné csökkent (741-ről 26 percre). Az egyébként (60°-on) kisebb felezési idejű cefalosporinoknál szintén igen komolyan csökkent a felezési idő, cefalexinnél például 115 percről 11 percre változott. [19.]

Kiszámították továbbá az antibiotikumok hőbomlási arányát (%), 63°C 30 percig (normál (klasszikus) pasztörözés), 72°C-on 15 másodpercig (HTST), 120°C-on 20 percig (sterilizés) és 140°C-on 4 másodpercig tartó, az iparban is használt hőkezelések esetén. Ezen számítások alapján elmondható, hogy sterilizés esetén a cefalosporinok 90% fölött, míg a penicillinek 65-88%-ban inaktiválódtak. Klasszikus pasztörözés esetén a penicillinek 7-11%-ban és a cefalosporinok 6-18%-ban inaktiválódtak. 72°C-on 15 másodpercig (HTST) hőkezelés esetén a β -laktámok hőbomlása nem érte el az 1%-ot. Míg ultramagas hőmérsékleten való hőkezelés (140°C-on 4 másodpercig tartó) esetén is elenyésző a hőbomlási arány majd minden antibiotikumnál, leszámítva a maximális hőbomlást (16,8% és 8,6%) mutató cefoperazont és cefuroximot (melyek nagyobb arányú hőbomlása a molekulán belüli észterkötésekkel magyarázható). [19.]

Kiemelte még a cikk a β -laktám gyűrű térszerkezete miatti instabilitását, és „bomlási érzékenységet” több fém-ionra, melyek katalizálják a gyűrű hidrolízisét. A β -laktám gyűrű felnyílásához, töréséhez vezethet továbbá érzékenysége miatt számos savas, bázikus karakterű és oxidáló ágensek illetve oldószerek, akárcsak a víz maga. [19.]

2.8. Az emberi bélflóra

[20.][21.][22.]

A bélflóra nehezen vizsgálható (bélsár illetve székletvizsgálatokról, csak következtetni lehet az összetételére) és általánosságban elmondható róla, hogy állandóan, dinamikusan változik. Eltér egyedenként, és populációnként is. A táplálkozási szokások, az életvitel, az egészségi állapot és még sok egyéb tényező befolyásolja az összetételét. [21.]

A bélflóra, azaz a béltartusban élő endogén flóra összessége felfogható egy a gazdaszervezet számára nélkülözhetetlen külön „szervként”, de tekinthetünk rá egy külön ökoszisztémaként is. Kritikusnak tekintett, ismert feladatai közé tartozik a gazdaszervezet béltraktus-epithelének védelme a mikrosérülésektől (mucosalis flóra), a gazda zsírraktározásának szabályozása, illetve a bélben az angiogenezis serkentése; ezen kívül több immunbiológiai folyamatban és patogén mikróbák számának és szaporodásának limitálásában is részt vesznek alkotói.

A gyomor, mint a gasztrointesztinális traktus első tagja gyakorlatilag sterilnek tekinthető, nagyon kevés baktérium tud csak megtelepedni itt, részint a motilika (és passzázs) és főképp a rendkívül alacsony pH miatt. Néhány helicobacter faj (pl. H.pylori) meg tud telepedni, a mucosán és szerepet játszik a gyomorfekély kialakításában. [20.][21.]

A proximális vékonybélben alacsony a baktériumok száma különböző kutatások szerint $0 - 10^{4,5}$ CFU/ml. Az aerobok közül Streptococcusokat, Staphylococcusokt, Lactobacillusokat, és élesztőgombákat, míg az anaerobok közül Streptococcusokat és Lactobacillusokat találunk. Feltehetően a lenyelt táplálékból, szájflórából eredeztethetők melyek túlélték a gyomron történő áthaladást. [21.]

A jejunum proximális és középső szakasza is lehet megközelítőleg steril, vagy csak igen kis mennyiségű baktériumot tartalmaz. Ezek száma az ileum felé haladva (lassan) egyre növekszik. Találhatunk itt kis számban Streptococcusokat, Bakteroides fajokat és coliformokat (főleg E.coli-t), $0-10^3$ CFU/ml nagyságrendben. A luminális és a mucosális flóra nem mutatott összetételében komolyabb eltérést. [21.]

Az illeum (főleg a distalis) flórája részben hasonlatos a vastagbél flórához, gyakorlatilag egy átmenetet képez a baktériumdús vastagbél és a kis csíraszámú (vagy éppen steril) vékonybél között. A középső ileumban 10^5-10^9 CFU/ml coliformmal, hasonló mennyiségű Bakteroides fajokkal és relatíve kis számú anaerobokkal, 10^3-10^7 (átlagban $10^{4,4}$) CFU/ml számú Clostridiummal és Bifidobacteriummal.

A vastagbélnek a chymust tartó funkciója van, itt lassabb a perisztaltika, így az itt jelenlévő flóraalkotók nagyobb mennyiségben tudnak elszaporodni. A vastagbélen belül is változik a bélflóra alkotó baktériumok mennyisége, de az összetétele megközelítőleg azonos. A bizonyos feltételek mellett gyűjtött széklet mikrobiológiai összetétele reprezentálja a colon flórájának összetettségét és fajgazdagságát. Több mint 400 baktériumfajt lehetett izolálni és minimum $10^{9,6} - 10^{11}$ CFU/g-os mennyiségben. [21.]

A teljesség igénye nélkül a flóraalkotó nagyobb baktériumcsoportok:

Anaerob coccusok, Actynomyces-ek, Bakteroides-ek, Bifidobacterium-ok, Clostridiumok, Eubacterium-ok, Fusobacterium-ok, Gram-negatív fakultatív anaerobok, Lactobacillus-ok, Streptococcus-ok, és egyéb fakultatív anaerobok. [21.]

2.9. Antibiotikumok bélflórára gyakorolt hatása és a cefalexin mellékhatásai

A bélflóra, mint ökoszisztéma rendkívül sérülékeny, összetételét sok külső és belső tényező befolyásolhatja. Fő funkcióit könnyen elveszítheti összetételének felborulása (dysbiózis) által. Ez történhet egy vírusos, parazitás vagy bakteriális bélbetegség szövődményeképp, vagy egy, a külvilágból bevitt szaporodásukat befolyásoló ágens (például antibiotikum) által.

A per orálisan szedett antibiotikumok komoly szelekciót visznek végbe a béltraktusban a fogékony bélflóra alkotók körében, azok nagy számának pusztulását okozzák, felborítva ezzel a bélflóra egyensúlyát. Így alakul ki az Antibiotikumokhoz kötődő hasmenés (Antibiotic-Associated Diarrhea (AAD)) kórképe. [23.] Ennek során a megváltozott mikroba összetétel miatt elsődlegesen egy (normál esetben önmagát-limitáló) ozmotikus hasmenés alakul ki. A módosult baktérium összetétel más metabolikus utat választ a szénhidrátok lebontására, így csökken a rövid láncú zsírsavak felszívódása, és ez magyarázza a hasmenést.

Ezen AAD kórképnek egy szélsőséges formája, amikor nem csak ozmotikus hasmenés alakul ki, hanem az antibakteriális kezelés után valamilyen patogén baktérium szaporodik fel nagy mennyiségben, a vastagbélben. Ilyen betegség a *Clostridium difficile* okozta colitis. [23.-25.]

A *Clostridium difficile* okozta colitis többféle klinikai képet tud kialakítani, az egyszerű önmagát limitáló gyorsan múló hasmenéstől, a pseudomembránózus (álhártyás) colitis-en át a toxicus (septicus) megacolon-ig. Legsúlyosabb klinikai formák halállal is végződhetnek.

Leírtak ilyen megbetegedést, rövid távú kombinált cefalexin-es és cefuroxim-os kezelés esetén is annak szövődményeképp. Hasonló klinikai képet és megbetegedést (colitis pseudomembranacea) tapasztaltak ortopéd sebészeti beavatkozásra érkezett betegeknél, akik prophylacticusan (perioperatív) cefalexint kaptak. [23.-25.]

A cefalexinnek egyébként ezek mellett egyéb mellékhatásai is lehetségesek.

- Egyes vesebetegséggel is küzdő páciensekben leírták, hogy a vesében tubuláris nekrozist okozott.
- Előfordulhat allergiás reakció is alkalmazása esetén, ezek súlyosságuk szerint lehetnek egyszerű bőrkiütések, angio-oedemák, vagy akár életet veszélyeztető szisztémás anaphylaxiás állapot. Egyes források szerint a minimális antibiotikum maradványanyag tartalom fogyasztása esetén az, (arra érzékenyeket) preszenzitizálhatja későbbi, komolyabb antibiotikum allergiára (egyes β -laktám antibiotikumok esetén).

3. Anyag és módszer

Szakedolgozatomban az alábbiakban leírt kísérletek részben egy nagyobb kutatómunka részei (témavezetőm, Dr. László Noémi doktori munkájának részkitatásai), részben saját kísérleteken alapulnak. Ezért külön választom és így tárgyalom e kettő fejezetet, annak ellenére, hogy átfedések vannak bennük mind az anyagok és módszerek, illetve az eredmények tekintetében.

3.1. A kiválasztott telep jellemzői és a telepi munka

Vizsgálatainkat egy Budapest közelében, Bugyi határában (Bugyi-Juhászföldön) lévő tehéntelegen végeztük. A telepen megközelítőleg 500 holstein-fríz tehenet és utódaikat tartják. A mintavételezés előtt körülbelül 2 hónappal adták át a tehéntelep 2 új istállóját és fejőházát. A régi fejőház halszálkás elrendezésű volt, az új, pedig karusszel-es rendszerű, 30 férőhelyes. Korábban a tehénállományban rendszeres monitoring vizsgálatok alapján a mastitis prevalenciája a termelésben lévő tehenek között átlagban 5%-os volt, mikrobiológiai vizsgálatok alapján a beteg állatokból környezeti kórokozókat mutattak ki. Az új és egyértelműen korszerűbb rendszer kiépítése után szintén vizsgálták a tehenek tőgyegészségügyi állapotát és arra a megállapításra jutottak, hogy a szintén környezeti kórokozók okozta szubklinikai mastitis előfordulása 10% körülire emelkedett az állományban. Ez magyarázható azzal, hogy az új fejőrendszeren még finombeállításokat végeztek a kísérleteink ideje alatt, mind a karusszel forgási sebességét, a higiéniai elemeket (automata vízugaras tisztító), mind a fejőgépeket tekintve. Továbbá, még sem az állatok, sem az ott dolgozó, fejést végző alkalmazottak nem szoktak hozzá az új körülményekhez tökéletesen.

A tehenek fejési sorrendje ezen a telepen is a tejtermelés mennyisége szerinti csoportonként történik.

A telepi munka:

1. Az állatok kiválasztása:

A fejési csoportok közül a közepes-nagy tejtermelésű állatok közül kiválasztottunk összesen 9 (lehetőleg tőgybeteg) állatot. A tehenek kiválasztása a mastitist próba elvégzésével történt. A California Mastitis Test (Mastitest) a tej sejttartalmának szemikvantitatív bírálatára (ebből kifolyólag a szubklinikai és klinikai mastitis meglétének felderítésére) alkalmas istállópróba.

A teszt reagensében lévő NaOH a tejbe került magvas sejtekből azok DNS-ét felszabadítva, abból kocsonyás anyag képződését indukálja.

A tesztet úgy végeztük, hogy egy (nyeles) mastitest tálca külön-külön csészéibe (a tőgynegyedeknek megfelelően) hozzávetőlegesen 2-3 ml tejet fejtünk és ehhez azonos mennyiségű reagenst adtunk, majd lassú körkörös (rázó) mozdulatokkal összekevertük. A tálca mozgatása alapján lehet a mintákat elbírálni, azok elszíneződése, nyálkás csomók, pelyhek jelenléte, vagy a teljes csésze-tartalom megkocsonyásodása alapján.

Az általunk a kísérletre kiválasztott állatok közül, majd mindnek egy vagy több tőgynegyedére kiterjedő, legalább egy keresztes (+) lett a Mastitest próbája.

A kiválasztott tehének fülszámai a következők voltak:

1. csoport: 8724, 8877, 9172,
2. csoport: 8584, 7873, 5893,
3. csoport: 8707, 8535, 8487.

2. A kiválasztott állatok megjelölése:

A 9 tehénből 3 csoportot alkottunk (érkezésük alapján lettek folytatólagosan hármascsoportokba rendezve, így kiválasztásuk véletlenszerűnek tekinthető). A csoportok különböző tartós lábjelölést kaptak mindkét hátsó lábukra, így az 1. csoport piros-piros, a 2. csoport kék-kék, a 3. csoport zöld-sárga színekű lett. (Jelölésük a későbbiekben a mintákon: PP, KK, ZS)

3. Az állatok antibiotikus kezelése:

Az állatok intramammális kezelése cefalexin tartalmú Rilexine 200 T tőgyinfúzió A.U.V.-vel annak használati utasítása szerint a következő két napon, a reggeli és esti fejéskor megtörtént.

A kísérletben szereplő Rilexine 200 T tőgyinfúzió A.U.V., használati utasításnak kivonata: [27.]

- Egy injektor (10 ml) tartalmaz: Cefalexin-monohidrát: 210,4 mg (megfelel 200mg cefalexinnek)
- Gyógyszerforma: Tőgyinfúzió
- Célállat fajok: Szarvasmarha (tejelő tehén)
- Terápiás javallatok célállat fajonként: Tejelő tehének cefalexinre érzékeny alábbi baktériumok által okozott tőgygyulladására kezelésére:
 - Staphylococcus spp. (β -laktamáz termelő törzseket is beleértve)
 - Streptococcus agalactiae, Str. Dysgalactiae, Str. Uberis

- E.coli
- A vemhesség és laktáció ideje alatt is alkalmazható.
- Élelmezés-egészségügyi várakozási idő: Szarvasmarha (ehető szövetek): 4 nap; Tehéntej: 2 nap (4 fejés)

4. Mintavétel:

Az állatgyógyászati termék utolsó applikálása után az egymást követő három (1, 3. és 4.) fejés során minden általunk képzett csoporttól 50-50 liternyi tejet gyűjtöttünk be (arányosan, egy csoporton belüli 3 állat elegyített tejéből). A mennyiséget a későbbi hőkezeléshez használt pasztőr minimális kapacitása határozta meg. Az egyes állatok fejése a fejőházban, géppel történt, sajtáros technikával, így elkülönítve a kezeletlen állatok tejétől a maradékanyag tartalmú tejet.

5. Minták kezelése és szállítása:

A nagy mennyiségű tejminta szállítása és későbbi tárolása előzőleg fertőtlenített (belsejű), 10 literes, megfelelően jelölt műanyag kannákban történt. Minden mintavétel előtt a 10 literes műanyag edényeket alaposan többször forró vízzel, detergens mosogatószerrel kimostuk, majd tömény NaOH-oldattal fertőtlenítettük, amit utána (tisztá) csapvízzel többszörösen kiöblítettünk belőlük.

A kannák jelölésére az adott csoportnak megfelelő színű műanyag szalagokat használtunk. A tejet tartalmazó jelölt kannákat (3 x 50 l) 1 órán belül az Élelmiszer-higiéniai Tanszék, Oktató-kutató (élelmiszertechnológiai) Laboratóriumába szállítottuk. A hőkezelés elvégzéséig a begyűjtött mintákat 2-4°C között tároltuk.

3.2. A minták hőkezelése:

A minták hőkezelése az Élelmiszer-higiéniai Tanszék, Oktató-kutató (élelmiszertechnológiai) laboratóriumában lévő egyedi tervezésű átfolyó tejpasztőr gépen történt, melyet 2013-ban gyártott az Agrometál-Food-Tech Kft.

A berendezés típusjele: PG 015,

A berendezés rendeltetése a kézikönyv szerint: „A „PE” típusú átfolyó rendszerű lemezes pasztőröző berendezés alkalmas különböző élelmiszeripari folyadékok, elsősorban tej pasztőrözésére. A berendezés kialakítása olyan, hogy átfolyó rendszere lévén folyamatos pasztőrözést tesz lehetővé. Autonóm kialakítása folytán könnyen telepíthető. A pasztőr lemezek pontos, és megfelelő méretezése miatt nagy hatásfokú hő visszanyerés történik, így a

berendezés üzemeltetési költsége lényegesen olcsóbb a gyakorlatban elterjedt berendezésekhez képest. A berendezés fél-automata üzemmódú, kezelői felügyeletet igényel.” A berendezés minimális kapacitása 40 liter tej, emiatt a vizsgálatainkhoz állatcsoportonként 50 liter tejet gyűjtöttünk be.

A minták hőkezelése

A minták hőkezelésére kétféle hőmérséklet-idő kombinációt alkalmaztunk, melyek az iparban leggyakrabban használt hőkezelési eljárásokat reprezentálják. A pasztörözést elvégeztük minden csoport tejmintáival:

- Először 95°C-on 5 perces hőntartással.
- Majd 75°C-on 30 másodperces hőntartással.

A minták mechanikai szennyezettsége miatt, egy sűrű acélszűrőn keresztül öntöttük bele a kannákból a tejet az előtét tartályba.

Mindhárom csoport tejének pasztörözése között minden egyes alkalommal a rendszert átmostuk egy forró vizes öblítéssel.

Modellezni kívántuk az ipari hőkezelési eljárásokon kívül a háztartásokban alkalmazott klasszikus hőkezelést, a forralást is. Ennek során egy indukciós főzőlapra helyezett lábosban melegítettünk 0,5 l tejet a hőmérséklet folyamatos kontrollálása mellett. A minta állandó keverésével biztosítottuk, hogy a gyors forralás miatti felhabzás ne okozza a tejfehérjék denaturálódását és az edény peremére való kicsapódását. A 100°C-os hőmérséklet elérésétől számított 2 perc elteltével levettük tűzhelyről az edényt és még további 2-3 percig kevertük a tejet, majd körülbelül 10-15 perc alatt szobahőmérsékleten kihűtöttük.

Az ily módon hőkezelt tejet és a hőkezeletlen kontroll mintákat 50 ml-es csavaros kupakú, kis műanyag tárolóflaskákba töltöttük és az adott tételre (csoportra és hőkezelésre) jellemző jelöléssel láttuk el a további nyomon követhetőség megkönnyítése végett.

Az elkészült minták jelölése 4 tagú kóddal (balról jobbra) történt:

- 1. tag: Antibiotikum kód (III.=Rilexine 200 T tőgyinfúzió (cefalexin))
- 2. tag: Csoportszín kód (KK= Kék/Kék; vagy PP= Piros/Piros; vagy ZS= Zöld/Sárga)
- 3. tag: Hőkezelési forma (K= hőkezeletlen kontroll; vagy 95= 95°C-on hőkezelt, vagy 75= 75°C-on hőkezelt; vagy F= Forralással hőkezelt)
- 4. tag: A fejés sorszáma. (1= első fejés (első mintavétel); vagy 2= harmadik fejés (második mintavétel); vagy 3= negyedik fejés (harmadik mintavétel))

(Például: „III. / PP / 95 / 2; jelentése”: „A Rilexine 200 T tőgyinfúzióval kezelt, Piros, Piros lábjelölésű csoport második mintavételi időpontban gyűjtött és 95°C-on 5 percig hőkezelt minta.”)

Fenti különféle eshetőségek kombinációjából állt össze a 36 lehetséges minta, amely minden eleméből kétszer 50 ml-t mértünk ki és így küldtük tovább a 72 darab mintát -18°C-ra fagyasztás után a toxikológiai laboratóriumba a maradványanyagok számszerű mérésére.

3.3.A hőkezelt és kontroll minták analitikai feldolgozása:

A fagyasztott mintákból történő maradványanyag (cefalexin) kimutatásra az Élelmiszer-higiéniai Tanszék, Toxikológiai laboratóriumában került sor, magas nyomású folyadék kromatográfhoz kapcsolt tömeg spektrométer (HPLC-MS/MS) készülékkel.

Mivel nagyon komoly szaktudást igényel és igen költséges az üzemeltetése a magas-nyomású folyadék-kromatográfiával kapcsolt tandem-tömegspektrometriás analitikai gépnek (HPLC-MS/MS), ezért a vizsgálatokban csak megfigyelőként vettem részt.

Maga a műszer egy magas nyomású folyadék kromatográf és egy összetett tömegspektrométer kombinálásából áll. A tömegspektrométerbe való mintabevitelt maga a folyadékkromatográf végzi, így a tömegspektrométert a kromatográf (HPLC) a detektorának tekinthetjük.

A folyadék kromatográfban egy valamilyen oldószerben (például acetonitrilben) oldott anyagkeveréket választunk szét az időben azáltal, hogy az egész oldatot a rendszer átréseli egy adott (vizsgálatonként változó szemcseméretű és összetételű, általában „vizsgálat-specifikus”) oszlopon (kolumnán). Mivel a különböző szerkezetű (és molekula tömegű) anyagok az adott kolumnán változó idő alatt érnek át, így elkülöníthető a detektálás során az a görbe, ami adott anyagra jellemző. Ezek után az oldószert a gép elpárologtatja és a detektált molekula a tandem tömegspektrométerbe kerül (ion formában). Ez esetünkben egy tripla kvadrupólos tömegspektrométer (mely 3 egymás után kapcsolt kvadrupól analizátorból áll). Az első analizátor kiválasztja az érkező (adott) molekulát, a második analizátorban, az ütközési cellában inert gáz bevezetése hatására megtörténik az előbb kiválasztott ion fragmentációja. A megnövekedett mozgási energiájú ionok belépnek a harmadik analizátorba és ott a korábban keletkezett fragmens ionokat, tömegük és töltés töltésük szerint szétválogatódznak. Ahhoz, hogy az MS-en (tömegspektrométeren) mért intenzitásokból, koncentrációt kapjanak eredményképp, szükség van a (lentebb leírt) kalibrációra.

A HPLC-MS/MS, mint nagyműszeres analitikai technika, nagyfokú szelektivitásával, univerzalitásával, esetlegesen a molekulaszervezeti információk szolgáltatásával és kis mintaigényével egyre népszerűbb (gyakorlatilag az első számú analitikai) módszerré válik.

A cefalexin-es méréseket egy kivonási-, tisztítási- fázis előzte meg, mely során eltávolították, (a mérés szempontjából) az összes zavaró ágenszt a tejből.

Nem evaporációs kinyerési technikával dolgoztak, hanem Ecetsavas előkészítéssel cefalexin esetén, mely főbb lépései a teljesség igénye nélkül a következők. 1ml tej a kiindulás, melyet kicsapnak ecetsavval, Vortex-es keverés, centrifugálás után a felülúszó elvétele, majd NaOH-os kezelés, újabb keverés jön és centrifugálás után átszűrés 0.22 µm-es résnagyságú szűrőn.

Az előzetesen preparált standardokkal történő kalibráció (végkoncentrációik: 2, 5, 10, 50, 100, 500, 1000, 5000 ppb (µg/l)) után végezték el a tényleges mintákkal kapcsolatos méréseket.

3.4. Bélflóráról, és a további kísérletekhez kiválasztott modell-mikrobák

Ahogy az a szakirodalmi áttekintésen írtak alapján láthatjuk, a humán bélflórát alkotó összességében több mint 400 faj egységes egészként, gyakorlatilag egyfajta ökoszisztémaként, vagy más szemszögből nézve egy külön „szervként” is tekinthető. Pont ez a fajta komplexitása és komoly változatossága (populációk között, populációkon belül, sőt még egyedi szinten) teszi nehezen tanulmányozhatóvá, a sok változó tényező miatt.

Ebből kifolyólag gyakorlatilag nincs olyan alkotója, amely a teljes bélflórát magát vagy egy nagyobb területét biztosan minden egyedben reprezentálná.

A V.A. Wadsworth Medical Centerben végzett fekális flóra kutatások a következőket találták a kórházban lévő nagyszámú beteg vizsgálata során: a Bifidobacterium adolescentis (csoportba tartozó) baktériumok az össz-beteglétszám székletének 54,6%-ban, (míg Bifidobacterium-ok 79%-ban, 1010,2 CFU/g átlagos csíraszámában) voltak jelen.

Az Escherichia coli, pedig a leggyakoribb izolált bélflóra alkotó az előbb említett kórházi populációban. A kórházi betegek 92,9%-nak bélsarában megtalálták, átlagosan 108,6 CFU/g-os mennyiségben. (Érdekes, hogy a vizsgált kórházban tartózkodó páciensek közül, a teljesen vegetáriánus étrendet folytatók körében 92%-ban, a csak kevés húst fogyasztók körében 86%-ban, a „Japán diétát” folytatók körében 100%-ban, a vastagbél polipózis elváltozásában szenvedők 96%-ban, a vastagbélrákosok 83%-ban és a normál nyugati étkezésű nem gasztrointesztinális problémával kórházban lévő emberek 94%-ban izolálható volt az E.coli a bélsárból; vagyis nincs komoly eltérés az előfordulásában semelyik vizsgált populációban.)

Ezen adatok és a szakirodalmi ismertetőben leírtak szerint a kísérleteinkhez a *Bifidobacterium adolescentis* és az *E.coli*-t választottuk.

3.5.1. *Bifidobacterium adolescentis*

NCAIM (National Collection of Agricultural and Industrial Microorganism) törzsgyűjteményi szám: B.01822 (Más gyűjteményi szám: DSM 20083; ATCC 15703)

A *B. adolescentis* a *Bifidobacteriaceae* családba tartozó, az ember és állatok normál bélflórájában is élő kommenzalista baktérium. Gram-pozitív festődésű, gyakran „y” (bifid) alakban feltűnő, anaerob élőlény (a nemzetésg néhány tagja egyébként részben oxigén toleráns, szuperoxid diszmutáz és kataláz aktiviása miatt), egy sejtmembránja van, és sejtfala elsődlegesen mureinből épül fel. A sejtfalon lévő leipoteicho-savak segítségével tudnak a gazda emeber (vagy állat) bélfalához rögzülni. Egyszerű cukrokat és bonyolultabb szénhidrátokat és egyéb szerves vegyületeket is tudnak hasznosítani melyek a gazdaszervezetben nem emésztődnek meg, mint a keményítő, a cellulóz, hemicellulóz, xilán, pectinek és gumi félék. Laktóz bontó, tejben tud szaporodni, és fructóz-6-foszfoketoláz aktivitása is van lehetővé téve a baktérium számára számos szénhidrát metabolizmusát. Energia forrásként rövid szénláncú zsírsavakat is előállít, mint propionsavat, vajsavat, ecetsavat. Nitrogén forrásként képes Ammónium szulfátot felhasználni.

Számos vitamint szintetizál, szerepet játszik a bél saját immunrendszerének stimulálásában. Konjugált epesavakat, szabad epesavakká alakít át, részben ezzel részt vesz egyes a külvilágból érkező (gyomorsavat) túlélő patogén mikroorganizmusok, (mint a *Staphylococcus aureus*, a *Shigella dysenteriae*, a *Salmonella Typhi*, egyes *Proteus* fajok, és *Candida albicans*) túlszaporodásának szabályozásában.

3.5.2. *Escherichia coli*

NCAIM törzsgyűjteményi szám: B.01748 (Más gyűjteményi szám DSM 682, ATCC 10536, NCTC 10418; PCI 540; WHO 5)

Az *Escherichia coli*, az egyik legismertebb és legtöbbet tanulmányozott baktérium, a meghatározott DNS szekvenciáját már 1997-ben publikálták.

Rendszertanilag az *Enterobacteriaceae* családba tartozik, fakultatív anaerob, Gram-negatív festődésű, ostorral esetlegesen rendelkező pálca alakú baktérium. [6.]

Ha a faj számos törzsének genetikai állományát tekintjük, azt láthatjuk, hogy az összes törzs egymással körülbelül 20%-ban egyezik meg. Mivel horizontális (például konjugáció, transzdukció) és vertikális génátadásra is képes, genetikai állománya igen változékony.

Az emberben és a legtöbb homioi term állat emésztőtraktusában megtalálhatók bizonyos törzsei, kisebb számban a proximális és középső ileumban, illetve komolyabb mennyiségben a teljes colon-ban. A mucosalis flórában nagyobb arányban található meg, lévén kitapad a bélfal nyálkahártyájához. Az újszülöttek bélcsatornájának a kolonizációját, már az születés utáni 40. órára megkezd.

Anyagcseréjét tekintve, ha anaerob körülmények között van (például a béltraktusban), kevert-savas erjedést folytat, laktátot, szukcinátot, acetátot, alkoholt és szén-dioxidot állítván elő. [27.-28.]

3.6. Mikroba-szaporodás mérése MicroTester készülékkel.

Bélflóra alkotók szaporodásának gátlása, vagy kipusztulása (például perorális antibakteriális kezelés esetén), vagy csak a változás is a bélfóra összetételében (dysbacteriosis) komoly betegségekhez (szélsőséges esetekben, szövődmények esetén akár életet veszélyeztető állapotokhoz) vezethet.

Az alábbi kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy a bélflóra ezen két nagyobb gyakorisággal előforduló mikrobája (E. coli, és B. adolescentis) tud-e szaporodni különböző koncentrációjú cefalexin- tartalmú közegben. Ehhez a HPLC- MS/MS vizsgálatok alább ismertetett eredményeinek átlagos értékeiből adódó standard hígítási sorokat alkalmaztunk (akárcsak a szintén alább ismertetett Delvotest-nél). A kísérleteket redoxpotenciál-mérésen alapuló gyorsmódszerrel (MicroTester-rel) végeztük.

Ezen mérési módszer alapelveinek ismertetése [30.]

- Baktériumok, szaporodásuk során, (energiatermelő biológiai oxidációs reakciók eredményeképp) környezetük (például különféle folyékony táptalajok) redox-potenciálját egy meghatározott mikróbaszám (CFU/ml) felett jól mérhető módon csökkentik.
- Detektációs idő (TTD (Time to detection) az az idő, amikor ez az abszolútértékben vett redoxpotenciál változás-sebessége, (egy a véletlen hatásoktól eltérő) értéket meghalad. Ezt nevezik detektációs kritériumnak.
- Ezen detektációs kritériumhoz tartozó sejtszám 10^6 - 10^7 CFU/ml-es magyságrendű.

- A detektációs idő tekinthető annak az időnek, amíg a mintában lévő kiindulási koncentrációról az adott mikroba felszaporodik 10^6 - 10^7 CFU/ml-es nagyságrendre.
- A detektációs idő (TTD) és a kezdeti mikróbaszám ($\lg N$) között lineáris összefüggés van, melyet az ú.n. kalibrációs görbe ír le. A mérés kivitelezhető, előzetesen fölvetett külső kalibrációs görbével, illetve a mintából vett belső kalibrációs görbével. Belső kalibrációs görbe elkészítése a határhígítási (MPN (most probably number)) módszeren alapszik, akkor alkalmazzák, ha a minta mikroflóra összetétele előzetesen nem ismert. Az előzetesen felvett külső kalibrációs görbét, pedig előzetesen ismert célmikróba esetén alkalmazzák. Ezen kalibrációs görbe úgy vehető fel, hogy a célmikróba szintenyészetéből 10-es alapú hígítási sort készítenek melyek mikróbaszámát (CFU/ml) tenyésztési módszerekkel (lemezöntés) meghatározzák, míg evvel párhuzamosan a hígítási sor minden tagjából, a MicroTester készülék mérőcelláiban is elhelyeznek egyet-egyét a hígítási tagokhoz tartozó TTD értékek vizsgálatára. Így a műszeresen mért TTD értékek, és a tenyésztésből kapott $\lg N$ értékekből lineáris regresszióval ki lehet számítani a kalibrációs görbe egyenletét. Ezek új mikróbák (új vizsgálat) esetén betáplálásra kerülnek a programba. Ez alapján a kalibrációs görbe alapján van lehetőség a későbbiekben vizsgált minták mikróbaszámának (élősejt számának) műszeres méréssel történő meghatározására.
- A MicroTester rendszer adott hőfokon inkubált mérőcellákban végbemenő mikróbaszaporodást kísérő redoxpotenciál egy normál hidrogénelektrodra vonatkoztatott értékének időbeli változását méri és értékeli.
- Az inkubálásra használt eszköz egy 37°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$)-ra állított termosztát (de a módszer nem túlságosan érzékeny a hőmérsékletre).
- A redox-potenciál változása független a mérőedény (mérőcella) méretétől, alakjától és a táptalaj összetételétől.
- A redox-potenciál változás görbéjének alakjából egyes mikróbákra (mikróba csoportokra) lehet következtetni.
- Fontos továbbá megjegyezni, (habár, a kísérletünkben nem nyers tejjel, hanem UHT tejjel dolgoztunk), hogy mikróbaszám meghatározás során nyers tejből, annak jelentkező mikróbaszaporodást gátló, így a vizsgálatot befolyásoló hatása (példáult antibiotikum maradványanyag tartalma miatt), mely kiküszöbölhető a tej különböző hígításokban történő vizsgálatával. [30.]

Az általunk MicroTester műszerrel elvégzett mikroba-szaporodási vizsgálatokhoz, ugyan rendelkezésünkre állt a fagyasztva tárolt, cefalexin tartalmú tejminták teljes sorozata, mi mégis (egy kereskedelmi forgalomban kapható, homogénezett, 3,5 %-os zsírtartalmú) UHT –s

tejhez adtuk hozzá a toxikológiai laboratórium által cefalexin standardból készített hígítási sort (vagyis mesterségesen preparált, vagy másnéven „spike”-olt mintákkal, dolgoztunk).

Ennek oka, hogy az antibiotikum tartalmú nyers tej minták magas szomatikus sejt és élőcsíra száma nem tette lehetővé a módszerrel való mérést, (nem lehetett elkülöníteni a tesztmikrobákat a kontaminációtól).

A standard cefalexin oldatból 125, 250, 500, 1000, 1500 és 2000 $\mu\text{g/l}$ –es hígítási tagokat használtunk fel.

A hígítási sorból készült preparált minták vizsgálatonkénti 2-2 sorozatát (250-2000 $\mu\text{g/l}$) további hőkezelésnek (laboratóriumi vízfürdőben) vetettük alá 75°C-on, 30 másodpercig és 95°C-on 5 percen át, hasonlóan a pasztörözésnél alkalmazottakhoz. Ez a lépés a vizsgálatban két dolog miatt is fontos. Ebből megtudhatjuk, hogy a további hőkezelés miatt csökkent cefalexin tartalomnak, illetve a cefalexin bomlástermékeinek milyen hatása van a 2 tesztmikroba szaporodására.

A vizsgálatunkban szereplő gépnek két modulja van (A és B), egy modul 16 csatornán tudja a jelet a redox-elektrodákból elvezetni.

Az első azaz E.coli-val elvégzett kísérlet lépései:

- A kísérlet során a táptalajnak tejet használtunk.
- B.01748 törzsgyűjteményi számú E. coli –ból készült ismert élőcsíraszámú (10^5 CFU/ml –es) baktérium szuszpenzióval dolgoztunk, melynek korábban már meg volt határozva a külső kalibrációs görbéje is.
- Összesen 18 csatornán végeztünk mérést, csatornák szerint sorolom fel az alábbiakban, hogy az adott (csatornához tartozó) cellában lévő mintával előzetesen milyen kezeléseket végeztünk.
 - A1 –es csatorna: Ez volt a „nullás” minta, 10 ml tejet, és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott, nem volt benne antibiotikum.
 - A2 –es csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 125 $\mu\text{g/l}$ –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
 - A3 –as csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 250 $\mu\text{g/l}$ –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
 - A4 –es csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 500 $\mu\text{g/l}$ –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.

- A5 –ös csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A6 –os csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A7 –es csatorna: 9 ml tejet, 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A8 –as csatorna: csak 10 ml tejet tartalmazott, ez volt a kontroll (a táptalaj megfelelőségének vizsgálatára).
- A9 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 250 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A10 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A11 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A12 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A13 –as csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A14 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 250 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A15 –ös csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A16 –os csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.

- A17 –es csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
 - A18 –as csatorna: a 9 ml tejet és 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- Az összes cellát a mérések alatt 37°C (+/- 5°C) –os vízfürdőben inkubáltuk.

A második, azaz B.adolescentis -szel elvégzett kísérlet lépései:

- A kísérlet során a táptalajnak először itt is tejet használtunk.
- B.01822 törzsgyűjteményi számú B.adolescentis –ből készült ismert élőcsíraszámú (10^5 CFU/ml –es) baktérium szuszpenzióval dolgoztunk, melynek korábban már meg volt határozva a belső kalibrációs görbéje határhígításos- (MPN-) módszer segítségével.
- A vizsgálat megkezdése után rövidesen világossá vált, a „nullás” (tehát az antibiotikum mentes) minta TTD görbéje alapján, hogy a B.adolescentis nem szaporodott, valamely általunk nem vizsgált okból az E.coli –nál is használt UHT-s tejben. Ezért táptalajt váltottunk és tej helyett M –levest használtunk, amely optimálisabb feltételeket teremt a mikroba szaporodásához. Az M –leves összetételét az alábbi táblázatban ismertetem (2. táblázat).

Pepton	10,0 g
Húskivoat	10,0 g
Élesztőkivonat	5,0 g
Tween 80	1,0 g
Na-citrát	2,0 g
Na-acetát	5,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1 g
MnCl ₂	0,05 g
Na ₂ HPO ₄	2,0 g
Maltóz	10,0 g
Ciszteín-HCl	0,5 g
Desztillált víz	1000 ml

2. táblázat az M-leves összetételéről

- Összesen 18 csatornán végeztünk ez esetben is mérést, csatornák szerint sorolom fel az alábbiakban, hogy az adott (csatornához tartozó) cellában lévő mintával előzetesen milyen kezeléseket végeztünk.

- A1 –es csatorna: Ez volt a „nullás” minta, 10 ml M –levest, és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott, nem volt benne antibiotikum.
- A2 –es csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 125 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A3 –as csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 250 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A4 –es csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 500 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A5 –ös csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A6 –os csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A7 –es csatorna: 9 ml M –levest, 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot és 0,1 ml baktérium szuszpenziót tartalmazott.
- A8 –as csatorna: csak 10 ml M –levest tartalmazott, ez volt a kontroll (a táptalaj megfelelőségének vizsgálatára).
- A9 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 250 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A10 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A11 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A12 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- A13 –as csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 75°C –on, 30 másodperces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.

- A14 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 250 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
 - A15 –ös csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
 - A16 –os csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 1000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
 - A17 –es csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 1500 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
 - A18 –as csatorna: a 9 ml M –levest és 1 ml, 2000 µg/l –es cefalexin oldatot, előzetesen 95°C –on, 5 perces hőkezeltük, szobahőmérsékletre visszahűlése után került bele a 0,1 ml baktérium szuszpenzió.
- Az összes cellát a mérések alatt, az első vizsgálathoz hasonlóan 37°C (+/- 5°C) –os vízfürdőben inkubáltuk.

3.6. Delvotest SP-NT

A Mictotester-rel végzett redoxpotenciál-változás mérése után, a cefalexin törzsoldattal spikeolt tejmintáinkat egy további tesztnek (Delvotest SP-NT) vetettük alá az Élelmiszer-higiéniai Tanszék Mikrobiológiai laboratóriumában.

A Delvotest egy mikrobiológiai gátláson alapuló szemikvantitatív gyorsteszt, tejmintában lévő antibiotikum maradványanyag kimutatására. [6.]

A DSM Food Specialties B.V. cég gyártja mind a kész kiteket, mind a több féle inkubátort, mérőműszert, vagy ezek kombinációit. Kitekből Delvotest SP NT, Delvotest MCS, Delvotest T, Delvotest P, Delvotest SP, Delvotest BR Brillant, Delvotest BR Special, Delvotest SP NT DA, Delvotest MCS DA, Delvotest BR Brillant DA, Delvotest BLF érhető el kereskedelmi forgalomban; ezek érzékenységükben, specificitásukban és a használt indikátorokban térnek el egymástól. Mi az alapkészüléket (inkubátort) és ehhez a Delvotest SP-NT- kit ampullás változatát használtuk. [32.]

A Delvotest működési elve a következő: Az előre elkészített külön csomagolt ampullákban közösleges agargél, tesztbaktériumként *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*, és bromokrezol indikátor található. Ebbe az ampullába kerül bele a vizsgálandó (gátlóanyagot tartalmazó) tejminta. Amennyiben nincs, vagy kevés gátló anyag van a vizsgált mintában, az inkubációs idő alatt a tesztbaktérium szaporodik, és különféle savas karakterű anyagokat termel, ami az indikátor színváltozását okozza (sárga lesz). Viszont, ha szaporodása gátolt, nem tud megfelelő mennyiségű szerves savat termelni, és nem történik színváltozás (az agar lila színű marad). A sárga „- - -”, a lila pedig „+ + +” eredményt jelent. Vannak egyéb színátmenetek is, így a barna színváltozás „-”, a szürke pedig „+”-ként értékelhető. (A leolvasáshoz, vagyis a bírálathoz színkód kártya áll rendelkezésre.)

A Delvotest SP NT teszt érzékeny különféle Penicillinekre, Cefalosporinokra, Aminoglikozidokra, Makrolidokra, Tetraciklinekre, Szulfonamidokra és bacitracinra. (Cefalexin esetén, a teszt leírata szerint, 3 órás inkubáció után elméletileg a 70 µg/kg fölötti gátlóanyag koncentrációra reagál pozitívan.)

A vizsgálatunk menete a következő volt:

- A Microtester készülékkel végzett vizsgálatból visszamaradt cefalexin standard hígítási sort hűtve tároltuk, a véghígítási koncentrációt úgy értük el, hogy minden alaphígítási tag 0,1ml-hez 0,9ml tejet adtunk hozzá (a tej is egy véletlenszerűen kiválasztott; az egyik ismert hazai áruházlánc saját márkás, homogénezett 3,5%-os zsírtartalmú UHT-s teje volt). A mintákat ezek után vortex-el homogenizáltuk.
- Az elkészült minták (hígítási sor) végkoncentrációja: 250, 500, 1000, 1500, 2000 µg/l, (tehát 5 cefalexin tartalmú, egy pozitív és egy negatív kontrollt használtunk).
- A blokkról leválasztottunk 7 db. preparált ampullát, majd a tetejéről a védőfóliát letépvé, a tejmintákból egyenként 0,1 ml-nyi mennyiséget pipettáztunk az ampullákban az agar felszínére. (Az ampullákat megjelöltük, a szerint, hogy melyik minta került bele).
- 64°C-on 3 órán át inkubáltuk a mintákat tartalmazó ampullákat, a látható eredményekig, amit a színkártya segítségével olvastunk le. [32.]

4. Eredmények

4.1. HPLC-MS/MS eredmények és értékelésük

A toxikológiai laboratóriumból kapott HPLC-MS/MS –el végezt mérések eredményeit az alábbi **3. táblázatban** foglalom össze.

A **3. táblázatban** szereplő eredményekből számított adatok, pedig **4., 5. és 6. táblázatban** vannak feltüntetve.

A forralás maradványanyag eredményei mindenhol magasabbak a hőkezeletlen kontroll minták eredményeinél. Ez első ránézésre paradoxon, de avval magyarázható, hogy ez a hőkezelés (ellentétben a pasztörözéssel) nyílt térben történt és a tejben lévő víz párolgása miatt az egész minta betöményedett. Pontosán visszszámolni nem lehet, mert nem tudjuk, hogy a kezdeti 0,5l –es térfogatból mennyi víz párolgott el. Így ezzel az adatsorral nem számolunk a továbbiakban és a MicroTester –es vizsgálatban sem szerepel.

Megállapítható, hogy az 1. és a 2. - 3. fejés között jelentős különbség van a tejben lévő antibiotikum tartalomban, ez avval magyarázható, hogy az idő múlásával a maradványanyagoknak ki kell ürülniük élelmezés egészségügyi várakozási időn belül. Ezt a gyógyszert gyártó cég szavatolja. De látható, hogy már a második fejés összes mintájának antibiotikum koncentrációja a megengedett maradványanyag szint (100 ppb) alatt van, tehát teoretikusan fogyasztásra alkalmas.

A két különböző pasztörözés hatására egyértelműen csökkent a mintákban a maradványanyag koncentráció. Vagyis megállapíthatjuk a cefalexin hőbomlásának tényét.

Az 1. fejés esetén 75°C -os hőkezelésnél, ez több mint 54% -ra, 95°C -os hőkezelésnél, pedig 39% -ra a csökket, míg 2. fejés esetén ez 75°C -os hőkezelésnél 4% -os emelkedést láttunk (alig változott), 95°C -os hőkezelésnél, pedig 62,5% -ra csökkent a koncentráció. A 3. fejés esetén is tapasztalható volt hőkezelésre a maradványanyagok koncentrációjának csökkenése, itt 75°C -os hőkezelésnél 76,6%-ra, 95°C -os hőkezelésnél, pedig 50% -ra mérséklődött.

A legnagyobb mértékű maradványanyag fogyatkozás, tehát a 95°C –on 5 percig tartó hőkezelés mellett volt (mindhárom fejés relatív csökkenéseinek átlaga ez esetben a kontrollhoz képest 50,5% volt).

Megfigyeltük azt is, hogy az 1. fejés esetén a legnagyobb az antibiotikum maradványanyagok szórása, ez a tehenek közötti nagyobb egyedi különbségekről nyújt információt. Azonos mennyiségű hatóanyag tőgybe injektálása után, a kezelés elhagyása után változó mértékben ürül az egyes egyedekből.

Állat kód	1. fejés	2. fejés	3. fejés
KK/75/1A	1397	32	24
KK/75/1B	1400	32	15
KK/95/1A	893	22	20
KK/95/1B	899	22	15
KK/F/1A	2860	55	47
KK/F/1B	2736	49	47
PP/75/1A	663	15	41
PP/75/1B	680	14	31
PP/95/1A	481	11	18
PP/95/1B	454	9	15
PP/F/1A	995	12	39
PP/F/1B	1024	15	42
ZS/75/1A	1089	41	15
ZS/75/1B	980	15	15
ZS/95/1A	746	10	10
ZS/95/1B	697	N.D.	14
ZS/F/1A	1533	25	12
ZS/F/1B	1840	24	11

3. táblázat. A HPLC-MS/MS eredményekről (cefalexin, µg/l –ben, (ppb) –ben megadva)

N.D. jelentése: nem detektálható (analitikai okokból).

Az 1. fejés kontrolljainak átlaga	1781,333
A 2. fejés kontrolljainak átlaga	23,66667
A 3. fejés kontrolljainak átlaga	30,66667
Az 1. fejés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	962,625
A 2. fejés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	24,83333
A 3. fejés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	23,5
Az 1. fejés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	695
A 2. fejés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	14,8
A 3. fejés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga	15,33333

4. táblázat. A mintákban szereplő cefalexin koncentráció (µg/l –ben, (vagy ppb) –ben megadva) átlagértékeiről

Az 1. fejtés kontrolljainak szórása	850,3594
Az 2. fejtés kontrolljainak szórása	12,97176
Az 3. fejtés kontrolljainak szórása	18,02961
Az 1. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	326,992
A 2. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	11,98138
A 3. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	10,76569
Az 1. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	193,5469
A 2. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	6,610598
A 3. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek szórása	3,444803

5. táblázat. A mintákban szereplő cefalexin koncentráció ($\mu\text{g/l}$ –ben, (vagy ppb) –ben megadva) átlagértékeinek szórásáról (standard deviáció)

Az 1. fejtés és a 2. fejtés kontrollcsoportok átlaga közti relatív csökkenés (%)	1,328593
Az 3. fejtés és a 2. fejtés kontrollcsoportok átlaga közti relatív csökkenés (%)	129,5775
Az 1. fejtés és a 3. fejtés kontrollcsoportok átlaga közti relatív csökkenés (%)	1,721557
Az 1. fejtés és a 2. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	2,579752
Az 3. fejtés és a 2. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	94,63087
Az 1. fejtés és a 3. fejtés utáni 75°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	2,441241
Az 1. fejtés és a 2. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	2,129496
Az 3. fejtés és a 2. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	103,6036
Az 1. fejtés és a 3. fejtés utáni 95°C-os hőkezelés eredményeinek átlaga közti relatív csökkenés (%)	2,206235

6. táblázat. Az egyes fejtések közötti relatív cefalexin koncentráció csökkenések (%).

Az eredmények önmagukban is elég informatívak, de továbbiakban e szám adatok adták meg a támpontot a MicroTester -es mérésekben felhasznált kiindulási koncentrációkhoz.

4.2. Microtester eredmények az E. coli-ról.

Az alábbi **7. táblázatban** foglalom össze az E.coli vizsgálatából származó, detektációs görbéken szereplő egyes TTD értékeket vizsgált mintánként (csatornánként).

A1	4,17
A2	4,17
A3	4,5
A4	4,33
A5	4,17
A6	4
A7	4,33
A8	N.D.
A9	4
A10	4,17
A11	4
A12	4,67
A13	4
A14	0,17
A15	2,83
A16	4,5
B1	2,5
B2	3

7. táblázat. Az E.coli TTD értékei csatornánként (óra)

A vizsgált koncentrációkban a cefalexin nem mutatott semmilyen gátló hatást az általunk vizsgált E.coli törzsre, minden mintában képes volt szaporodni (megfelelő, fajra jellemző detektációs idővel (TTD) és detektációs görbével).

4.3. Microtester eredmények a B. adolescentisről.

Az alábbi **8. táblázatban** foglalom össze a B.adolescentis vizsgálatából származó, detektációs görbéken szereplő egyes TTD értékeket vizsgált mintánként (csatornánként).

A1	12,33
A2	12,17
A3	12
A4	12,33
A5	12,17
A6	12,67
A7	12,83
A8	N.D.
A9	12,67
A10	12,33
A11	12,67
A12	12,33
A13	12,83
A14	11,67
A15	11,33
A16	11,67
B1	11,33
B2	11,83

8. táblázat. Az B.adolescentis TTD értékei csatornánként (óra)

A vizsgált koncentrációkban a cefalexin nem mutatott semmilyen gátló hatást az általunk vizsgált *B.adolescentis* törzsre, minden mintában képes volt szaporodni (megfelelő, fajra jellemző detektációs idővel (TTD) és detektációs görbével).

4.4. Delvotest eredmények az antibiotikum standard hígítássorokból.

A 3 órás inkubációs idő leteltével történt a minták elbírálása. A Delvotest SP NT-teszt, a vizsgált tejminták (azaz, a 250, az 500, az 1000, az 1500 és a 2000 µg/l-es antibiotikum koncentrációjú tejmintáknál) gátló hatást mutatott ki. (A pozitív és a negatív kontroll is jól adekvát eredményt hozott.)

Azon ampullákban lévő mintáknál, ahol a gátló hatás kimutatható volt, egyenletes lila színű lett a tartalom, ez a színkártya alapján 3 keresztes pozitivitást jelent (+++).

5. Megbeszélés (következtetések)

Annak ellenére, hogy a cefalexin vizsgált (125 -2000 μ g/l) koncentrációkban sem az E.coli –nál, sem a B.adolescentis –nél nem tapasztaltunk a redox-potenciál változásos mérési eredményeink alapján (a MicroTester-rel) semmilyen mikrobaszaporodás gátlást, az antibiotikum maradványanyagokat tartalmazó tejek fogyaszthatóságának biztonságosságát még bizonyos vizsgált hőkezelési feltételek teljesülése mellett sem lehet É.E.V.I. –n belül ajánlani esetleges komoly közegészségügyi kockázata miatt. Kiemelten fontos tehát a tehéntelegeken a saját elegytej, a tejipari cégek esetén a felvásárolt tej szigorú egyfajta önellenőrzése, továbbá a hatósági monitoring vizsgálatok fenntartása maradványanyagokra, a fogyasztók egészségvédelme szempontjából.

Viszont a vizsgálati eredményeinket (HPLC –MS/MS) tekintve fontos azt megjegyezni, hogy É.E.V.I. -n belül már a második vizsgált fejésnél megengedett maradványanyag tartalom alatt volt a tejben lévő cefalexin koncentráció. Továbbá ténylegesen látszott saját eredményeinkből, (amit a szakirodalmi adatok is alátámasztanak), hogy a cefalexin normál, a tejiparban is használatos hőkezelési technikák hatására részben inaktiválódott (hőbomlott).

További eredményes kutatómunkák esetén a témában, talán a tejure vonatkoztatott É.E.V.I. –t, sokkal tágabban lehetne értelmezni, például a tejipari felhasználása szempontjából; pontosan meghatározott feltételek és szigorú hatósági ellenőrzés mellett. Lévén ez esetben némileg csökkenthető lenne a nagy gazdasági kár, ami az É.E.V.I. -n belüli a tej megsemmisítése miatt keletkezik, természetesen az élelmiszerbiztonsági normák és a fogyasztók maximális egészségvédelmét szem előtt tartva.

6. Összefoglalás

Ismert antibiotikummal (Rilexine 200 T tögyinfúzióval, cefalexin -nel) kezelt 9 tejelő tehénből, (3 állatcsoport) gyűjtöttünk tejmintákat fejés során élelmezés-egészségügyi várakozási időn (É.E.V.I.) belül.

A maradványanyag tartalmú tejmintákat különféle hőmérséklet és idő kombinációjával hőkezeltük (forralás, 75°C 30s és 95°C 5 min). Ezt követően az Élelmiszerhigiéniai Tanszék Toxikológiai Laboratóriumában HPLC-MS/MS készüléssel történt meg a mintákban lévő cefalexin koncentráció meghatározása. Mind két pasztőrözés a cefalexin koncentráció látványos csökkenését eredményezte (a forralást nem tekintve).

Ezt követően az Élelmiszerhigiéniai Tanszék Mikrobiológiai Laboratóriumában kétféle gyors tesztelési módszerrel, így redox-potenciál mérésen alapuló MicroTester -rel, és Delvotest SP-NT teszttel vizsgáltuk, cefalexin hígítási sorokkal mesterségesen kontaminált UHT –s tejmintákban a gátló hatást különböző tesztmikrobákra. A MicroTester a vizsgált koncentrációkban, a tesztmikrobákon (E.coli –n és B.adolescentis –en) semmilyen gátlóhatást nem mutatott ki; míg a Delvotest SP-NT –vel való vizsgálat gátló hatást minden esetben jelzett.

Megállapíthatjuk, hogy ugyan tapasztaltunk jelentős hőbomlást cefalexin esetén hőkezelés után, továbbá a tehének a második fejéséből származó tejmintában a maradványanyag szint már az EU –s határértékek alatt volt (É.E.V.I.-n belül), de az antibiotikum maradványanyag tartalom folytonos felülvizsgálata igen fontos azok közegészségügyi kockázata miatt.

7. Angol nyelvű cím és rövid összefoglaló

7.1. Title:

Rapid testing methods on the inhibitory effect of milk with antibiotic residue content

7.2. Summary:

During our experiments 9 dairy cows were treated intramammary with Rilexin 200 T (containing cephalexin) and their milk was sampled within the withdrawal time.

The antibiotic (cephalexin) content milk samples were heat treated in different heating-levels and time combinations (boiling 2 mins, 75°C 30sec and 95°C 5min).

Afterwards, the different heat treated samples were analyzed for the measurement of cephalexin concentration with HPLC-MS/MS technique in the Toxicology Laboratory of the Foodhygiene Department (at Szent István University, Faculty of Veterinary Sciences).

The results showed that all the heat treating methods reducing the antibiotic residue content in the milk samples collected before.

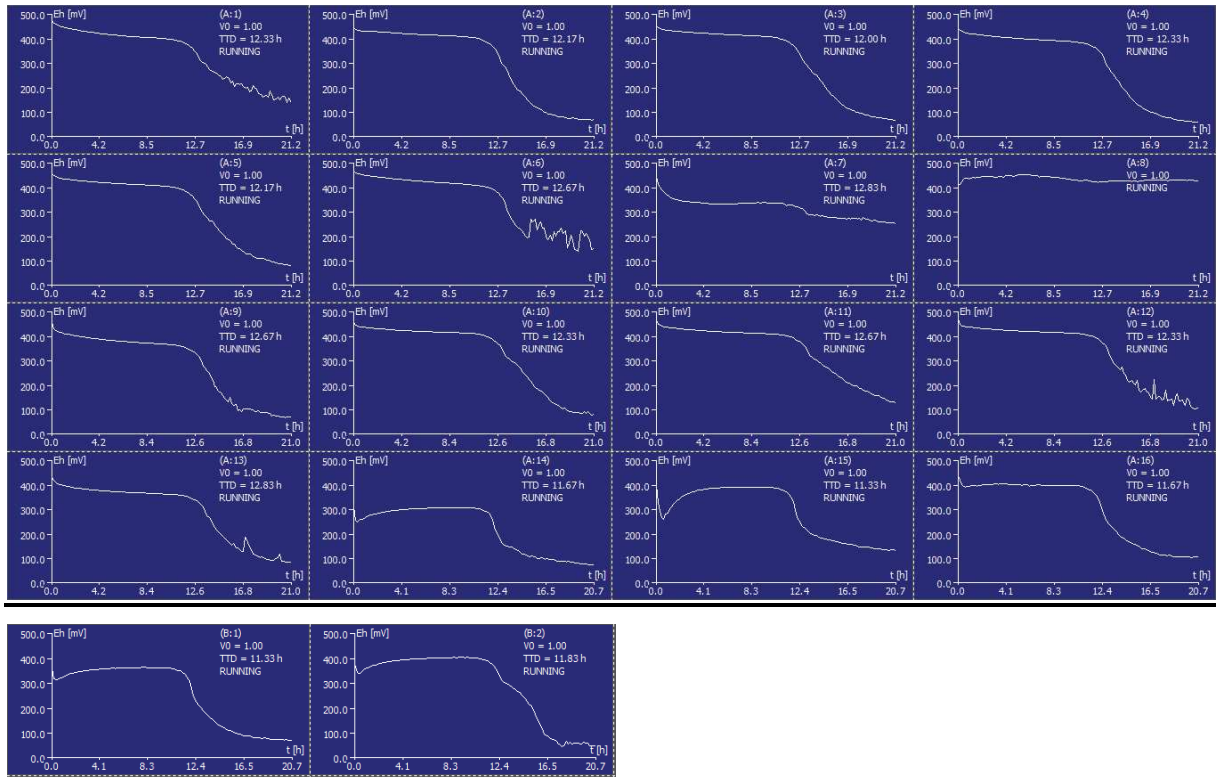
Then in the Microbiology Laboratory of the Foodhygiene Department we checked the different test microorganism's inhibition with a dilution series of cephalexin (in commercially available) milk. These tests were rapid testing methods, like Delvotest SP-NT and MicroTester method, which is based on the redox-potential alteration in case of microbial growth.

According to the outcome of the MicroTester analysis, the cephalexin in the examined concentrations didn't make any inhibitory effect on the growth of the test organisms (*Escherichia coli* and *Bifidobacterium adolescentis*).

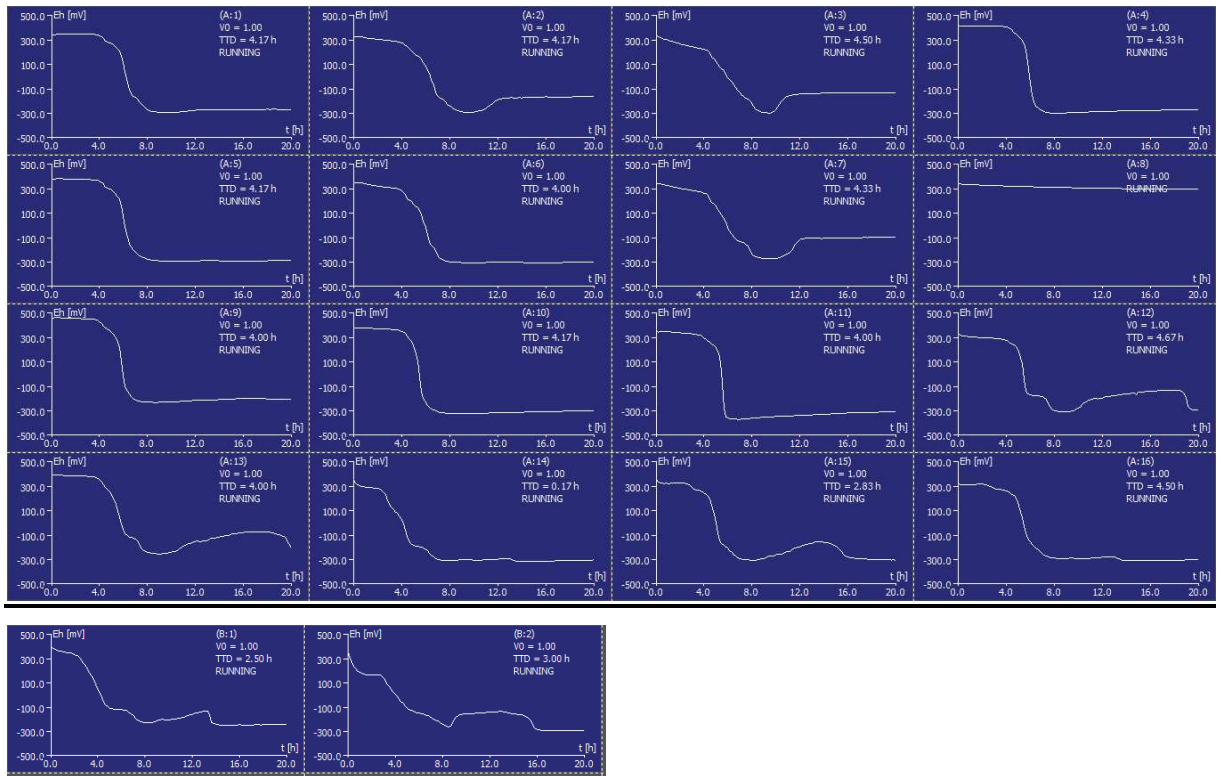
But all the samples of the dilution series of cephalexin in milk (milk with antibiotic residues) were detected with Delvotest SP-NT, the semiquantitative test gave positive (+++) result.

Consumption of milk within the withdrawal time is potentially dangerous for the consumers, despite of we found that samples taken from the second milking and analysed by the HPLC-MS/MS technique, were containing less cephalexin than the MRL in EU.

8. Mellékletek



1.Kép a B.adolescentis TTD görbéi



2.Kép az E. coli TTD görbéi



3.kép: CMT teszt az állatok kiválasztásánál



4.Kép a vizsgálatban szereplő tehenek tartós egyedi megjelöléséről



5.Kép a MicroTester -rel történő mérés előkészítése



5.Kép a MicroTester működés közben, a B.adolescentis-sel végzett kísérlet során

9. Irodalomjegyzék

1. Központi Statisztikai Hivatal honla, Gazdaság szerkezeti Összeírás 2013. (végleges adatok) <http://www.ksh.hu/>
2. KSH/ Eurostat dokumentumok, http://www.ksh.hu/docs/hun/eurostat_tablak/index.html
3. Green; Martin Dairy Heard Health, 1st Ed. Control of Mastitis and Enhancement of milk quality/ Introduction/ An international perspective on mastitis and milk production, CABI Publishing, 2012
4. Green; Martin Dairy Heard Health, 1st Ed. Control of Mastitis and Enhancement of milk quality/ Introduction/ Public health implications and perception of bovine milk, CABI Publishing, 2012
5. Rafai Pál, Brydl Endre, Nagy Gyula: A Serés- , a szarvasmarha-, és a háziyúktartás higiénája és állomány-egészségtana; Agroinform kiadó
6. Laczay Péter, Élelmiszer-higiénia, Élelmiszerlánc-biztonság, Mezőgazda kiadó, 2013.
7. 28/2009. (X.6.) FVM rendelet az Állatgyógyászati termékekről http://net.jogtar.hu/jr/gen/hjegy_doc.cgi?docid=A0900128.FVM
8. <http://eur-lex.europa.eu/homepage.html>
9. Dr. Ózsvári László, Állat-egészségügyi döntéselemzés a tejtermelő gazdaságokban, doktori értekezés
10. Tehéntej változatok <http://www.eufic.org/article/hu/elelmiszertechnologia/elelmiszerfeldolgozas/artid/Tehentejvaltozatok-feldolgozas-egeszseg/>
11. Huszka Péter: „A tejtermékfogyasztás szerkezetének változása, a vásárlási magatartás függvényében” doktori értekezéséből, 2005, p 3.20-21
12. Gálfi Péter (Szerk.), Csikó György, Jerzse Ákos: Állatorvosi gyógyszerteran III., Bíró Family Nyomda és Könyvkiadó, Bp., 2012
13. Wikipedia (cephalexine) <http://en.wikipedia.org/wiki/Cefalexin>
14. Applied Microbiology, Vol 15., No 4. July 1967, p. 765-769 (Cephalexin, a New orally absorbed cephalosporin antibiotic; Warren E. Wick)
15. Bartholow, Michael. "Top 200 Drugs of 2012". *Pharmacy Times*. 2012.
16. [Australia's Health 2012: The Thirteenth Biennial Health Report of the Australian Institute of Health and Welfare](#). Australian Institute of Health and Welfare. 2012. p. 408.

17. NÉBIH ÁTI, honlap.
https://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/allatgyogyaszati_igazgatosag/kozerdeku/torzskonyvezes/forgalmazhato/nemzeti
18. M.A. Zorraquino, M. Roca, N.Fernandez, M. P. Molina, R. Althaus: Heat inactivation of B-lactam Antibiotics in Milk, Journ. Of Food Protection, Vol. 71, No, 6, 2008, p 1193-1198.
19. M. Roca, L. Villegas, M.L. Kortabitare, R.L. Althaus, M.P. Molina: Effect of heat treatments on stability of B-lactams in milk. J. Dairy Sci. 9:1155-1164
20. Charles Patrick Davis, Clinical Microbiology, , Normal flora. 1996 Chapter 6
21. Sidney M. Finegold, Vera L. Sutter, Glenn E. Mathisen: Human intestinal Microflora in health and disease, Chapter 1, Normal Indigenous Flora
22. Diversity of the Human Intestinal Microbial Flora (Paul B. Eckburg et al., Science, 2005 June 10, 3008 (5728): p1635-1638
23. http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotic-associated_diarrhea
24. Sr. Cannon, P.H.P. Dyson, P.J, Sanderson: Pseudomembranous colitis associated with antibiotic prophylaxis in orthopedic surgery (the j.of bone and orthopedic surgery Vol. 70 B, No. 4., August 1988
25. K K. Sogaard, T Ejlertsen, H.C. Schonheyder: Clostridium difficile O27-associated pseudomembranous colitis after short-term treatment with cefuroxime and cephalexin in an elderly orthopedic patient: case report.
26. J.M. Dewney et al. Risk assessment of antibiotic residues of B-lactams and macrolides in food products with regard to their immuno-allergic potential.
27. <https://nebih.gov.hu/dbreader?id=902&blob=true&identifier=1703&column=9>
28. http://en.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli#Normal_microbiota
29. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Escherichia_coli
30. K. Szakmár, O. Reichart, O. Erdősi, Z. Fekete: Redoxpotenciál mérésen alapuló gyorsmódszer nyers tej mikróbaszámának meghatározására, Magy. Állatorvosok Lapja, 2009/6, 131. p 365-372
31. https://microbewiki.kenyon.edu/index.php/Bifidobacterium_adolescentis
32. http://www.dsm.com/content/dam/dsm/foodandbeverages/en_US/documents/delvotest-sp-nt-ampoules-instruction-for-use-en.pdf

10. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. László Noéminek, mert diplomamunkám minden lépésében támogatott és kész volt segítséget nyújtani számomra.

Köszönettel tartozom továbbá az Élelmiszer-higiéniai Tanszék Oktatóinak és dolgozóinak, kiemelve Dr, Szakmár Katalint, aki kiemelkedő szaktudásával szintén segítette munkámat.

Hálás vagyok továbbá családtagjaimnak, akik a körülöttem uralkodó békés légkör megteremtésével járultak hozzá ezen szakdolgozat elkészüléséhez.

HuVetA - SZIA

ELHELYEZÉSI MEGÁLLAPODÁS ÉS SZERZŐI JOGI NYILATKOZAT*

Név: . Dobos Attila Balázs

Elérhetőség (e-mail cím): dobosattilabalazs@gmail.com

A feltöltendő mű címe: Antibiotikum maradványanyag tartalmú tej gátló hatásának vizsgálata gyors módszerekkel

A mű megjelenési adatai: Szakdolgozat (2014)

Az átadott fájlok száma: 1 db.

Jelen megállapodás elfogadásával a szerző, illetve a szerzői jogok tulajdonosa nem kizárólagos jogot biztosít a HuVetA és a SZIA számára, hogy archiválja (a tartalom megváltoztatása nélkül, a megőrzés és a hozzáférhetőség biztosításának érdekében) és másolásvédtett PDF formára konvertálja és szolgáltatassa a fenti dokumentumot (beleértve annak kivonatát is).

Beleegyeznek, hogy a HuVetA és a SZIA egynél több (csak a HuVetA és a SZIA adminisztrátorai számára hozzáférhető) másolatot tároljon az Ön által átadott dokumentumból kizárólag biztonsági, visszaállítási és megőrzési célból.

Kijelenti, hogy a átadott dokumentum az Ön műve, és/vagy jogosult biztosítani a megállapodásban foglalt rendelkezéseket arra vonatkozóan. Kijelenti továbbá, hogy a mű eredeti és legjobb tudomása szerint nem sérti vele senki más szerzői jogát. Amennyiben a mű tartalmaz olyan anyagot, melyre nézve nem Ön birtokolja a szerzői jogokat, fel kell tüntetnie, hogy korlátlan engedélyt kapott a szerzői jog tulajdonosától arra, hogy engedélyezhesse a jelen megállapodásban szereplő jogokat, és a harmadik személy által birtokolt anyag rész mellett egyértelműen fel van tüntetve az eredeti szerző neve a művön belül.

A szerzői jogok tulajdonosa a hozzáférés körét az alábbiakban határozza meg **(egyetlen, a megfelelő négyzetben elhelyezett x jellel)**:

- engedélyezi, hogy a HuVetA-ban/SZIA-ban tárolt művek korlátlanul hozzáférhetővé váljanak a világhálón,
- a Szent István Egyetem belső hálózatára (IP címeire) korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- a SZIE Állatorvos-tudományi Könyvtárban található, dedikált elérést biztosító számítógépre korlátozza a feltöltött dokumentum(ok) elérését,
- csak a dokumentum bibliográfiai adatainak és tartalmi kivonatának feltöltéséhez járul hozzá (korlátlan hozzáféréssel),

* Jelen nyilatkozat az 5/2011. számú, *A Szent István Egyetemen folytatott tudományos publikációs tevékenységgel kapcsolatos adatbázis kialakításáról és alkalmazásáról* című rektori utasításhoz kapcsolódik, illetve annak alapján készült.

Kérjük, **nyilatkozzon a négyzetben elhelyezett jellel a helyben használatról is:**

Engedélyezem a dokumentum(ok) nyomtatott változatának helyben olvasását a könyvtárban.

Amennyiben a feltöltés alapját olyan mű képezi, melyet valamely cég vagy szervezet támogatott illetve szponzorált, kijelenti, hogy jogosult egyetérteni jelen megállapodással a műre vonatkozóan.

A HuVetA/SZIA üzemeltetői a szerző, illetve a jogokat gyakorló személyek és szervezetek irányában nem vállalnak semmilyen felelősséget annak jogi orvoslására, ha valamely felhasználó a HuVetA-ban/SZIA-ban engedéllyel elhelyezett anyaggal törvénysértő módon visszaélne.

Budapest, 201... évhónap

aláírás
szerző/a szerzői jog tulajdonosa

A HuVetA Magyar Állatorvos-tudományi Archívum – Hungarian Veterinary Archive a Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Könyvtár, Levéltár és Múzeum által működtetett szakterületi online adattár, melynek célja, hogy a magyar állatorvos-tudomány és -történet dokumentumait, tudásvagyonát elektronikus formában összegyűjtse, rendszerezze, megőrizze, kereshetővé és hozzáférhetővé tegye, szolgáltassa, a hatályos jogi szabályozások figyelembe vételével.

A HuVetA a korszerű informatikai lehetőségek felhasználásával biztosítja a könnyű, (internetes keresőgépekkel is működő) kereshetőséget és lehetőség szerint a teljes szöveg azonnali elérését. Célja ezek révén

- *a magyar állatorvos-tudomány hazai és nemzetközi ismertségének növelése;*
- *a magyar állatorvosok publikációira történő hivatkozások számának, és ezen keresztül a hazai állatorvosi folyóiratok impakt faktorának növelése;*
- *az Állatorvos-tudományi Kar és az együttműködő partnerek tudásvagyonának koncentrált megjelenítése révén az intézmények és a hazai állatorvos-tudomány tekintélyének és versenyképességének növelése;*
- *a szakmai kapcsolatok és együttműködés elősegítése,*
- *a nyílt hozzáférés támogatása.*

A SZIA Szent István Archívum a Szent István Egyetemen keletkezett tudományos dolgozatok tára.