

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

**A Campylobacterek előfordulása az élelmiszerláncban,  
valamint környezeti tényezők hatása túlélésükre és  
pusztulásukra**

**PhD értekezés tézisei**

**Dr. Józwiak Ákos**

2009

Témavezető és témabizottsági tagok:

Dr. Reichart Olivér  
Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Kar  
Élelmiszer-higiénia Tanszék  
témavezető

Tabajdiné dr. Pintér Vera  
Országos Élelmiszervizsgáló Intézet  
témabizottság tagja

Dr. Lombai György  
Budapest-Fővárosi Állategészségügyi  
és Élelmiszer-ellenőrző Állomás  
Központi Laboratórium  
témabizottság tagja

## Bevezetés, célkitűzések

Napjaink étel-eredetű human megbetegedéseinek leggyakoribb oka az élelmiszerek mikrobiális kontaminációja. Az elmúlt években a legtöbb étel-eredetű betegség olyan mikroorganizmusok okozták, melyek állatról emberre terjednek, a hagyományos kórokozókhoz képest enyhébb tünetekkel járnak, és széles körben okoznak fertőzéseket a humán populációban. Ezen mikroorganizmusok legfontosabb képviselői a *Salmonella* és *Campylobacter* fajok. Az elmúlt évekig a *Salmonella* enteritises esetek száma dominált, mára azonban a campylobacteriosis átvette a vezető szerepet. Ez a jelenség globálisan is megfigyelhető, így nem meglepő, hogy a WHO 2000-ben a *Campylobacter* fajokat – ezen belül is a *Campylobacter jejuni* – nevezte meg a fejlett országokban előforduló enterális zoonózisok legfőbb okozójának.

Míg a fejlődő országokban a nem megfelelően kezelt ivóvíz és a háziállatokkal való érintkezést tartják a legfontosabb kockázati tényezőnek, a fejlett országokban, így Magyarországon is a fertőzés módjai komplexebb képet mutatnak. Az iparosodott országokban az alábbi rizikófaktorok jelentik fontossági sorrendben a legjelentősebb fertőzési lehetőségeket:

1. baromfihús kezelése és fogyasztása
2. állati eredetű élelmiszerek, nyers tej
3. nem megfelelően kezelt ivóvíz
4. gazdasági haszonállatokkal és kedvtelésből tartott állatokkal történő érintkezés
5. külföldi utazások (utazási hasmenés).

A baromfihús eredetű fertőzés egyik oka a hús elégtelen hőkezelése, és a nyers élelmiszerek iránti egyre nagyobb fogyasztói kereslet. A baromfivágási technológia során a kopasztás és zsigerelés szakaszában jelentősen szennyeződik a hús felszíne. Elsősorban a nem megfelelően beállított zsigerelő berendezések, és a túlzott feldolgozási sebesség – melyek gyakori hibák a baromfifeldolgozás során – jelentik a legnagyobb veszélyt.

Annak ellenére, hogy hazánkban egyre nagyobb figyelmet fordítanak a mikrobiális eredetű ételmérgezések megelőzésére, az étel-eredetű gastroenteritises megbetegedések száma nem csökken szignifikáns mértékben. Magyarországon az étel-eredetű közvetített enterális fertőző megbetegedések vezető kórokozójának a *Campylobacter* és *Salmonella* fajok tekinthetők. Hazánkban a campylobacteriosisos esetek évente bejelentett száma mára

meghaladta a salmonellosisét. Az esetek elsöprő többségét a sporadikus megbetegedések teszik ki, *C. jejuni* okozta járványokról csak elvétve érkeznek bejelentések.

A *Campylobacter jejuni* a bélflóra normális összetevőjének tekinthető, természetes viszonyok között is nagy számban megtalálható a vadon élő és házi állatok bélcsatornájában, az állatok és az ember szájüregében is. A húsfeldolgozás során, a fekál kontamináció eredményeként megjelenhetnek az állatokból származó élelmiszerekben. A *C. jejuni* törzsek szórványosan okozhatnak vetélést kérődzőkben, borjakban ritkán hasmenést, fejőstehenekben pedig mastitist. Ez utóbbi során a kórokozó rendszerint tartósan ürül a tejjel, ami nyers tej fogyasztását követően emberekben *Campylobacter*-enteritis kialakulásához vezethet.

A baromfifajok és a vadon élő madarak bélcsatornájában a *C. jejuni* ubiquiter. Eltekintve a tyúkok *Campylobacter*-hepatitisétől, a fertőzés tünetmentes marad, így a fertőzött állatok megtalálása a vágóhídon a hagyományos húsvizsgálattal szinte lehetetlen. A *Campylobacter jejuni* a bélcsatornából nem jut be a tojásba, szemben a Salmonellákkal, így a kikelt naposcsibék fertőzéstől mentesek.

Szakirodalmi adatok szerint a mikroba szaporodásának hőmérséklet-optimuma 42°C-on van, de 30,5–45,0°C között még képes szaporodni. A baktérium viszonylag lassan növekedik, pH optimuma 6,5–7,5 tartományban van, de 4,9–9,0 között is túlél. Közöséges levegőn nem tenyésztethők, microaerophilek. Növekedésükhöz legmegfelelőbb, ha 3-15% oxigént és 3-5% széndioxidot tartalmazó gázkeverékben tenyésztjük őket. Vízáktívítási optimuma  $a_w = 0,997$  (0,5 % NaCl-dal beállítva), minimuma  $a_w = 0,987$  (2,0 % NaCl-dal beállítva).

Annak ellenére, hogy a *Campylobacter jejuni* csekély ellenálló képességet mutat a környezeti tényezők, számára szuboptimális irányú, viszonylag kismértékű változása iránt is, képes az élelmiszerekben tartósan életben maradni és fertőzőképességét megőrizni. A megfelelő felügyelethez meg kell értenünk a *Campylobacter jejuni* terjedési mechanizmusát, ehhez pedig epidemiológiai vizsgálatok és a mikroba tulajdonságait célzó vizsgálatok szükségesek. Nem tudjuk pontosan, hogy hogyan kerül az élelmiszerláncba, hogyan reagál a környezeti tényezők változásaira, és milyen lehetőségeink vannak eliminálására. Mindezek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy a campylobacteriosis leküzdésében a fertőzés megelőzésének van a legnagyobb szerepe. A HACCP-rendszer alkalmazásával és főképpen a Good Hygienic Practice (GHP) kritériumainak betartásával a kontamináció veszélye nagymértékben csökkenthető.

A *Campylobacter jejuni* okozta megbetegedések megelőzéséhez olyan élelmiszertartósítási eljárásokat kell kidolgozni, amelyek a baktérium szaporodását meggátolják, esetleg el is pusztítják a mikrobát, valamint nem befolyásolják kedvezőtlenül az élelmiszer organoleptikus tulajdonságait. A környezeti feltételek (hőmérséklet, vízaktivitás, pH) megváltoztatása felhasználható a baktérium szaporodásának visszaszorítására, így legfontosabb eszköze lehet az élelmiszer-közvetített humán campylobacteriosis leküzdésének. Ezen fontos kérdések megválaszolására a farmtól az asztalig tartó, a mikroba jellegzetességeinek, tulajdonságainak feltárását célzó vizsgálatokra és kísérletekre van szükség.

Az értekezésben bemutatásra kerül két baromfiállomány vizsgálata *Campylobacter* jelenlétére napos kortól a vágási tevékenység végéig, választ keresve az állományon belüli terjedés tulajdonságaival és a szezonalitással kapcsolatos kérdésekre.

Ezután vizsgáljuk, hogy a környezeti tényezők közül a hőmérséklet, a vízaktivitás és a pH, valamint ezek kombinációinak változása milyen hatással van a baktérium szaporodására, túlélésére és pusztulására. A vizsgálatok során egy új, a redox-potenciál mérésen alapuló élősejtszám-meghatározási gyors mikrobiológiai mérési eljárás pusztulási kísérletek kiértékelésére való alkalmasságát is vizsgáljuk.

## Anyag és módszer

Vizsgálatainkat a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék Akkreditált Mikrobiológiai Laboratóriumában végeztük. A kísérletekhez baromfivágóhídról izolált *Campylobacter jejuni* törzseket használtunk. A mikroba fenntartása szelektív Bolton-táplevesben (MERCK 1.00068) történt, hetenkénti átoltással.

A *Campylobacter* állományon belüli terjedését vizsgálandó telepi és vágóhídi mintavételezés történt. A mintavételekre a Hajdú-Bét Rt. broiler telepein és vágóhídján került sor. Két mintázási időszakot terveztünk – egyiket nyáron, másikat télen – annak érdekében, hogy képet kapjunk az esetleges szezonális különbségekről. A mintavételi ütemezés szerint a betelepítéskor, majd kéthetente vettünk mintát a baromfitartó telepen, egy állomány útját követve egészen a vágásig, ahol a technológiai sor különböző pontjairól is történt mintavétel.

A telepi és vágóhídi mintavételek során a cloacából, a szellőzőnyílásokról (10 cm<sup>2</sup>) és a dolgozók kezéről steril tamponnal vett mintát azonnal 10 ml transzport-dúsítóba tettük, a rovar-, takarmány-, és alommintákat steril Stomacher-zacskókban szállítottuk a laboratóriumba, és itt helyeztük a dúsítóba. A levegőmintákat Koch-féle szedimentációs módszerrel vettük, 15 perces expozíciós idővel. A vízmintákat steril üvegekbe, a mintavételi csapot kifolyatva vettük.

A *Campylobacter jejuni* telepi és vágóhídi azonosítását az MSZ-3640/24-1989 szabvány előírásai szerint végeztük. A vizsgálandó 25 g mintát 225 cm<sup>3</sup> mennyiségű Preston-féle levesben (Nutrient Broth No.2 – Oxoid CM0067; *Campylobacter* Growth Supplement – Oxoid SR0084; Preston *Campylobacter* Selective Supplement – Oxoid SR117E) homogéneztük, majd 42 °C hőmérsékleten 48 órán át inkubáltuk. Az inkubálás után a dúsítóból szelektív *Campylobacter* agarra – mCCDA agar (*Campylobacter* Blood Free Selective Agar Base – Oxoid CM0739 és CCDA Selective Supplement – Oxoid SR0155) végeztünk kiszélesztést. A szelektív táptalajokat 42°C-on, mikroaerofil körülmények között (Anaerocult<sup>®</sup>C – Merck 1.16275) tenyésztettük 48 óráig, majd a bírálat során a kiválasztott telepeket biokémiai próbáknak vetjük alá. A vízmintákat 0,30 µm pórusátmérőjű membránszűrőn szűrtük, majd a szűrőket szelektív mCCDA táptalajra helyeztük, és úgy inkubáltuk. A kiértékelés a szabvány előírásai szerint történt.

A környezeti tényezők (hőmérséklet, pH, vízaktivitás) hatásának vizsgálata során két élősejtszám meghatározási módszert alkalmaztunk: a tenyésztéses és a redox-potenciál mérésén alapuló gyorsmódszert.

A *Campylobacter jejuni* számának klasszikus, tenyésztéses meghatározása az ISO/TS 10272-2:2006 szabvány alapján történt. A mintából tízes léptékű hígítási sort készítettünk sós-peptonvízben (8,5 g/l NaCl, 1 g/l pepton). A hígítási sor valamennyi tagjából 0,1 ml-t szélesztettünk mCCDA agar táptalajra (MERCK 1.00070). A tenyésztést 42 °C hőmérsékleten, 48 órán át Anaerob Jar-ban (MERCK 1.16387) végeztük, a megfelelő gázkeverék (8-10 % CO<sub>2</sub> és 5-7 % O<sub>2</sub>) beállítását MERCK Anaerocult C (MERCK 1.16275) adalékkal biztosítottuk.

A *Campylobacter jejuni* számának redox-potenciál mérésén alapuló meghatározása a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékének és a Corvinus Egyetem Fizikai- és Automatizálási Tanszékének munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatás alatt álló eljárással és az ezen elvek alapján működő MicroTester nevű berendezéssel történt. A műszer a mikroorganizmusok szaporodását a tápközeg redox-potenciáljának mérése alapján detektálja. A mikroba-szaporodás energiaforrása a biológiai oxidáció, ami a környezet redukálódását eredményezi, így a közeg redox-potenciálja mindig csökken. Ez a csökkenés általában az oxigén-fogyasztás és a redukáló anyagcseretermékek felszaporodásának következménye. A redox-potenciál a mikroba-tenyészetek élettani állapotának egyik legkomplexebb indikátora, mérésével a mikrobiális kontamináció kvalitatív és kvantitatív meghatározása vált lehetővé.

A különböző kiindulási sejtkoncentrációk logaritmus (lgN) és a hozzájuk tartozó Time to Detection (TTD) értékek között szoros lineáris összefüggés áll fenn, ami kalibrációs görbe felvételét teszi lehetővé. A vizsgálni kívánt *Campylobacter jejuni* szintenyészetéből 10-es léptékű hígítási sort készítünk peptonvíz hígítóoldattal. A kiindulási szuszpenzió élősejtszámát klasszikus tenyésztéses módszerrel határoztuk meg. A hígítási sor minden tagjából a MicroTester 100 ml-es mérőcelláiban lévő steril Bolton-levesbe (Merck 1.00068 és Bolton Szelektív adalék – Merck – 1.00069) oltottunk 1-1 ml-t, és 42 °C-os vízfürdőben termosztálva meghatároztuk a TTD értékeket. A tenyésztéssel kapott lgN és a műszeresen meghatározott, különböző hígítási szintekhez tartozó TTD értékekből lineáris regresszióval kiszámítottuk a kalibrációs görbe egyenletét, melyet betápláltunk a műszer programjába. A kalibrációs görbe ismeretében lehetőségünk volt a későbbiek során a vizsgált minták élősejtszámának műszeres meghatározására.

A *Campylobacter jejuni* számának műszeres meghatározásához a mikrobiológiai gyakorlatnak megfelelő előkészítés (homogénezés, hígítás) után ismert mennyiséget viszünk a vízfürdős termosztátba helyezett mérőcellába, majd elvégezzük a műszeres mérést.

Negatív kontrollként steril táplevest, pozitív kontrollként a vizsgálandó mikroba nagy koncentrációjával oltott táplevest használunk. A mérőrendszer felveszi a redox-görbét, meghatározza a detektációs időt, és az előzetesen felvett kalibrációs görbe alapján kiszámítja a minta kezdeti élősejtszámát.

A hőpusztulási kísérletek során különböző hőmérsékleteken végzett izoterm hőpusztulási vizsgálatokban a klasszikus tenyésztési módszerrel nyert és a redox-potenciál mérésre alapozott műszeres eljárással meghatározott élősejtszámok alapján számított pusztulási paramétereket hasonlítottuk össze. A különböző hőmérsékleteken végzett izoterm hőpusztulási kísérletekben a tenyésztési módszerrel meghatározott, ismert kiindulási élősejtszámú ( $N_0$ ) szuszpenziót tartalmazó kémcsöveket (9 ml 0,5%-os glükózoldat, beoltva 1 ml *Campylobacter* szuszpenzióval) Medingen U10 ultratermosztát beállított hőmérsékletű vízfürdőjébe helyeztük. Az előre meghatározott mintavételi időpontokban 3-3 párhuzamos szuszpenziót kivettünk, hideg vízbe helyezve visszahűtöttünk, majd minden kémcsőből 1 ml-t szelektív Bolton-levesbe pipettáztunk. A dúsító oldatot tartalmazó kémcsöveket 42°C-on 48 óráig inkubáltuk. Az inkubálás után a kémcsövek tartalmát kioltottuk mCCDA táptalajra és 42 °C hőmérsékleten 24 órán át inkubáltuk mikroaerofil körülmények között, a hőkezelést túlélő sejtek felszaporítása céljából.

A klasszikus tenyésztési módszer esetén hőpusztulási időnek ( $\tau$ ) tekintettük azt a legkisebb hőkezelési időt, amelyenél a 3 párhuzamosan kivett minta egyikéből sem tudunk túlélést kimutatni. A hőpusztulási időből a tizedelődési idők kiszámíthatók. A redox-potenciál mérésre alapozott módszer esetén a különböző hőkezelési időkhöz tartozó túlélő mikroba-számot ( $IgN_t$ ) egy 16 csatornás MicroTester berendezéssel határoztuk meg, előzetesen felvett kalibrációs görbe alapján. A különböző hőmérsékletekhez tartozó tizedelődési időket ( $D_T$ ) a kiindulási élősejtszám ( $N_0$ ) és egy  $t$  idejű hőkezelést túlélő, műszeresen meghatározott  $N_t$  sejtszám felhasználásával számítottuk ki.

A vízáktivitás *Campylobacter jejuni* túlélésére kifejtett hatását a túlélő sejtszámok redox-potenciál mérésen alapuló meghatározásával vizsgáltuk. A vízáktivitást három különböző anyaggal – konyhasó, glükóz és glicerin – állítottuk be, a kísérleteket az élelmiszerekre jellemző normál vízáktivitás-tartományban végeztük. A Bolton-levesben feldúsított 24 órás *Campylobacter jejuni* szuszpenzióból 10 ml-t mértünk az előre elkészített, 42 °C hőmérsékletre beállított vízfürdőben termosztált, steril glicerin-, glükóz- és konyhasó-oldatokba. Az összekeverés után a 0, 15, 30 és 45. percben kivettünk 1 ml-t, és a szintén 42 °C-on termosztált mérőcellába készített steril Bolton-levesbe adagoltuk, majd a cellát rögtön összekapcsoltuk a redox-potenciál mérő berendezéssel. A mérőrendszer meghatározta a TTD értékeket és kalibrációs görbe alapján kiszámolta a túlélő *Campylobacter jejuni* számot.



Kísérleteink során a pH *Campylobacter jejuni* túlélésére kifejtett hatását vizsgáltuk, a túlélő sejtszámot MicroTesterrel meghatározva. A kísérleteket pH 4,5-10,0 tartományban végeztük. A Bolton-levesben feldúsított 24 órás *Campylobacter jejuni* szuszpenzióból 1 ml-t mértünk a beállított pH-jú és vízaktivitású steril Bolton-levesekbe. A vízaktivitás beállításához glicerint, a szaporodás szempontjából optimálisnak tekinthető 7,2 pH-n NaCl-ot is használtunk. A pH-t NaOH-dal, illetve steril borkősavval állítottuk be. Az így elkészített mérőcellákat beoltás után azonnal összekapcsoltuk a redox-potenciál mérő berendezéssel.

## Eredmények

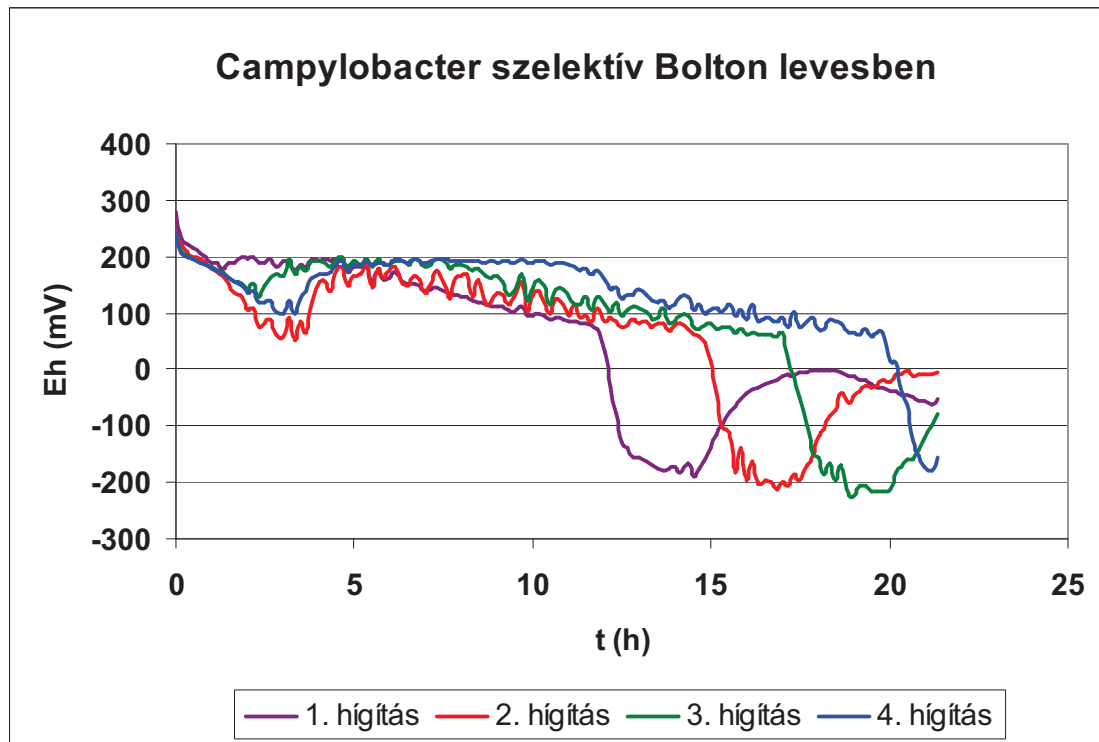
A telepi és vágóhídi mintavételek során, hogy képet kapjunk a *Campylobacter* fajok hazai körülmények közötti elterjedtségéről, mintákat vettünk egy baromfiállományból, napos kortól egészen a vágásig, nyáron és télen (összesen 195 mintát). Nyáron az első két mintavételi időpontban (0 és 12 napos korban) az összes (70) minta negatív volt. A 26 napos korban vett minták (összesen 35) közül egy kloáka minta, egy szellőzőnyílás melletti falfelület-minta és egy rovarminta volt pozitív. 42 napos korban, a vágóhídon vett mintavételi pontok (cloacatanpon, kopasztott testfelület, testfelület zsigerelés után, testfelület a testmosás után, lehűtött testfelület, személyi higiénia, környezeti higiénia, állatszállító ládák mosás után) mindegyikén (90 minta) találtunk *Campylobacter* fajokat. A téli mintázás során sem a 0, sem a 10 és a 31. napon vett mintákban nem sikerült *Campylobacter* izolálni, de 42 napos korban, a vágóhídon már igen. A vágóhídon az összes mintavételi ponton sikerült *Campylobacter* kimutatni, az élő állatok 93,3%-a volt fertőzött, a vágósor végére pedig már a minták 100%-a. A vágóhídi dolgozók kezéről és a vágóberendezésekről is sikerült *Campylobacter* kimutatni. A pozitív minták 95,5%-a (88-ból 84 minta) *Campylobacter jejuni*-nak bizonyult.

A *Campylobacter jejuni* hőpusztulásának vizsgálata során a hőkezelésekhez közös alapszuspenzióból indultunk ki, melynek élősejtszáma  $N_0=1,0 \cdot 10^5$  cfu/ml volt. A különböző hőmérsékletekhez tartozó, tenyésztéses vizsgálatok alapján meghatározott pusztulási időket és belőlük számított tizedelőési időket az 1. táblázat foglalja össze.

1. táblázat *Campylobacter jejuni* hőpusztulási jellemzői tenyésztéssel meghatározva

Hőmérséklet T (°C)	Induló sejtszám lg $N_0$	Pusztulási idő $\tau$ (min)	Tizedelőési idő D (min)	lg D
50	5,0	60	12,0	1,079
55	5,0	20	4,0	0,602
60	5,0	8	1,6	0,204
65	5,0	3	0,6	-0,222

A redoxpotenciál mérésen alapuló élősejtszám-meghatározáshoz először a kalibrációs görbét határoztuk meg. A kiindulási szuszpenzió 10-es léptékű hígításaiból meghatározott redox-görbéket az 1. ábra szemlélteti.

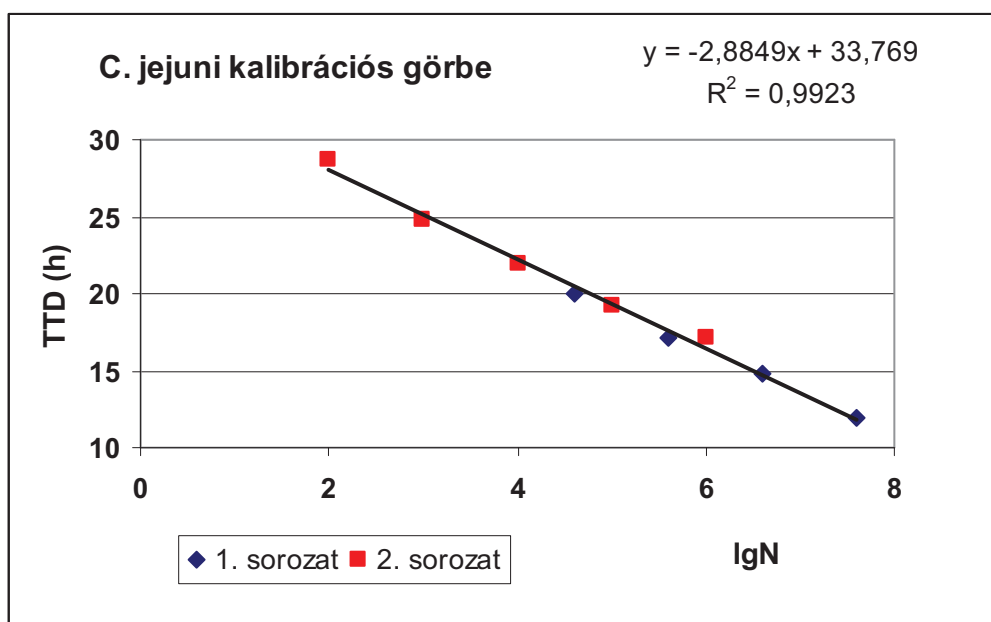


1. ábra A hígítás hatása *Campylobacter jejuni* redox-görbéire

A különböző hígításokhoz tartozó TTD értékeket (detektációs kritérium  $-0,5 \text{ mV/min}$ ) a felületi szélesztéses módszerrel, mCCDA agaron nyert *Campylobacter*-számmal összevetve, meghatározható a kalibrációs görbe és annak egyenlete. A hőpusztulási mérések kiértékeléséhez használt, két független mérési sorozat eredményeit a 2. táblázatban foglaltam össze, az egyesített adatokból meghatározott kalibrációs görbe a 2. ábrán látható.

2. táblázat *Campylobacter jejuni* TTD értékei a kiindulási sejtszám függvényében

IgN	TTD (h)
7,6	12,00
6,6	14,83
5,6	17,17
4,6	20,00
6,0	17,17
5,0	19,17
4,0	22,00
3,0	24,83
2,0	28,67



2. ábra A *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje

A hőkezelési kísérletek során műszeresen meghatározott túlélő sejtszámok felhasználásával számított tizedelési időket a 3. táblázat tartalmazza.

**3. táblázat** *Campylobacter jejuni* hőpusztulási jellemzői redoxpotenciál mérés alapján meghatározva

T (°C)	lg N <sub>0</sub>	Hőkezelés (min)	lg N <sub>t</sub>	D (min)	lg D
52	7,25	10	5,89	7,35	0,866
56	7,25	5	5,36	2,65	0,423
60	7,25	4	4,36	1,38	0,141
64	7,25	2	4,23	0,66	-0,179

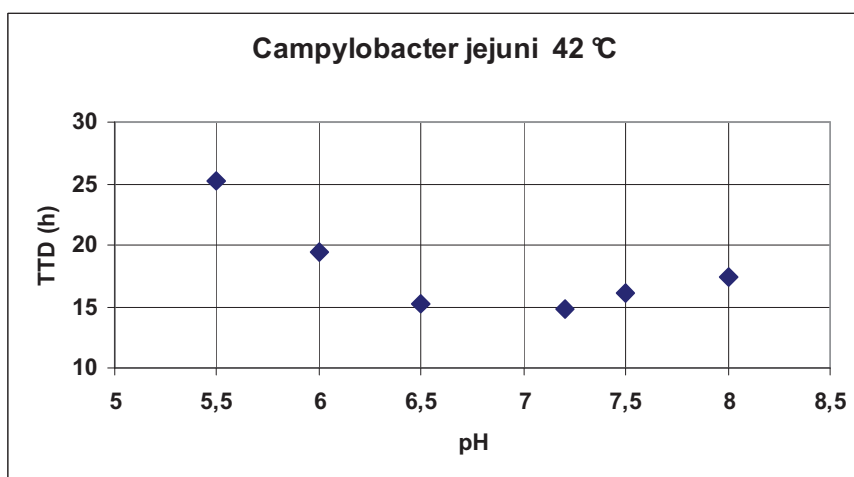
A további kísérletek során arra kerestük a választ, hogy a környezeti tényezők – ezen belül a vízaktivitás és a pH – változása milyen hatással van a baktérium szaporodására és túlélésére. Kísérletünkben hat (0,995, 0,985, 0,976, 0,946, 0,920, 0,874) vízaktivitási értéken vizsgáltuk a *C. jejuni* túlélését a szaporodási optimumnak megfelelő 42 °C hőmérsékleten. A vízaktivitási értékeket három vegyülettel (NaCl, glicerin, glükóz) állítottuk be, így lehetőségünk nyílt ugyanazon a vízaktivitási értéken a különböző anyagok *C. jejuni*-ra kifejtett hatását vizsgálni. A 0,995, 0,985, 0,976 vízaktivitásokon egyik oldatban sem változott a minta 45. percben mért mikrobaszáma a kiindulási értékhez képest. 0,946 vízaktivitási értéken már jelentős eltéréseket tapasztaltunk az egyes oldatok között. Ezen körülmények között a NaCl-os oldatban gyors és nagymértékű mikrobapusztulást figyeltünk meg, a 0. percben vett mintában gyakorlatilag már nem lehetett élő sejteket kimutatni. 0,920 vízaktivitáson már csak a glicerines és glükózos oldatokban vizsgáltunk élősejtszámot. 0,874 vízaktivitáson a glicerines oldatban azonnali és teljes baktériumpusztulást tapasztaltunk, így ezen az értéken több vizsgálatot nem végeztünk.

A pH hatásának vizsgálata során szelektív Bolton levesben pH = 4,5 – 10-ig terjedő tartományban, 0,5 pH értékenként vizsgáltuk a *Campylobacter jejuni* szaporodását. A mérést 42 °C (optimális) hőmérsékleten végeztük, redox-potenciál méréssel. A pH értékeket steril NaOH-dal, illetve borkősavval állítottuk be. A mérőcellákban 80-80 ml táptalaj volt, amelyet 1-1 ml, 24 órás *Campylobacter* szuszpenzióval oltottunk be. A cellákban a kezdeti mikroba-koncentráció  $2,3 \cdot 10^6$  cfu/ml volt. A mérést 48 óráig végeztük. Az eredményeket a 4. táblázat foglalja össze.

**4. táblázat** A pH hatása *Campylobacter jejuni* szaporodására és túlélésére (T=42 °C)

pH	TTD (h)	túlélés
4,5	-	-
5,0	-	+
5,5	25,33	+
6,0	19,17	+
6,5	12,83	+
7,2	13,5	+
7,5	14,33	+
8,0	17,33	+
8,5	-	+
9,0	-	-
9,5	-	-
10,0	-	-

A táblázatból megállapítható, hogy a *Campylobacter jejuni* az 5,5 és 8,0 közötti pH tartományban volt képes szaporodni. A szaporodást nem mutató csövekből kioltást végeztünk mCCDA táptalajra, annak megállapítására, hogy a nem szaporodó csövekben elpusztult-e a mikroba. A táblázatban az mCCDA táptalajon szaporodást mutató mintákat + jellel jelöltük. Az 5,5 – 8,0 pH tartományban mért TTD értékek a 3. ábrán láthatók.



**3. ábra** *Campylobacter jejuni* TTD értékeinek változása a pH függvényében (T=42 °C)

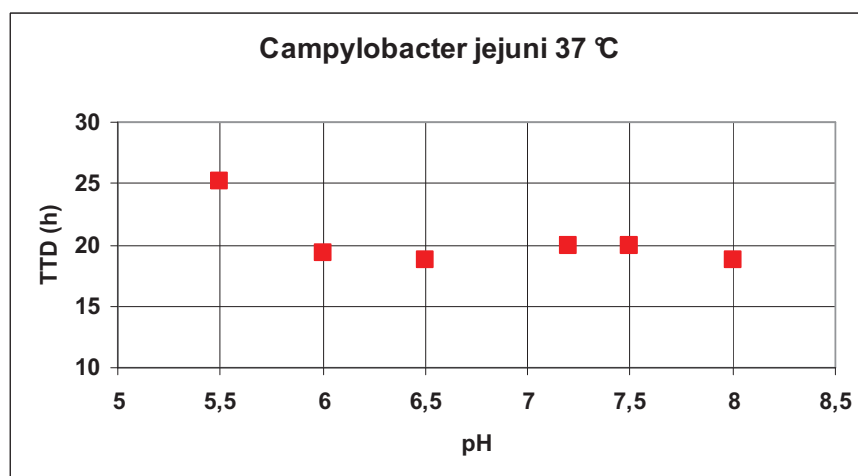
A pH és a hőmérséklet együttes hatását szelektív Bolton levesben pH = 5,5 – 8-ig terjedő tartományban, 0,5 pH értékenként, 27, 32, 37, 42, és 48 °C-on vizsgáltuk, redox-potenciál méréssel. Az eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

**5. táblázat** pH és hőmérséklet hatása *Campylobacter jejuni* szaporodására és túlélésére

T (°C)	pH	TTD (h)	túlélés	T (°C)	pH	TTD (h)	túlélés
27	5,5	-	+	42	5,5	25,17	+
	6	-	+		6	19,67	+
	6,5	-	+		6,5	17,67	+
	7,2	-	+		7,2	16,17	+
	7,5	-	+		7,5	17,83	+
	8	-	+		8	17,5	+
32	5,5	-	+	48	5,5	-	-
	6	-	+		6	-	-
	6,5	-	+		6,5	-	-
	7,2	-	+		7,2	-	-
	7,5	-	+		7,5	-	-
	8	-	+		8	-	-
37	5,5	25,17	+				
	6	19,33	+				
	6,5	18,83	+				
	7,2	20	+				
	7,5	20	+				
	8	18,83	+				

Az eredményekből megállapítható, hogy a *Campylobacter jejuni* csak 37 és 42 °C hőmérsékleten szaporodott. A szaporodást nem mutató csövekből kioltást végeztünk mCCDA táptalajra, annak megállapítására, hogy a nem szaporodó csövekben elpusztult-e a mikroba. A táblázatban az mCCDA táptalajon szaporodást mutató mintákat + jellel jelöltük.

A 37 °C-on mért TTD értékeket a 4. ábra mutatja be



**4. ábra** *Campylobacter jejuni* TTD értékeinek változása a pH függvényében (T=37 °C)

A vízaktivitás szaporodásra és túlélésre gyakorolt hatását szelektív Bolton levesben  $a_w=0,985$ ,  $a_w=0,975$ ,  $a_w=0,965$  értékeken vizsgáltuk. Az egyes vízaktivitás értékek szaporodásra gyakorolt hatását glicerinnel és NaCl-dal beállítva is megvizsgáltuk. A mérést  $42\text{ }^\circ\text{C}$  hőmérsékleten végeztük, redox-potenciál méréssel. A kísérleti eredmények szerint a mikroba egyetlen vízaktivitás értéken sem szaporodott. A szaporodást nem mutató csövekből kioltást végeztünk mCCDA táptalajra, annak megállapítására, hogy a nem szaporodó csövekben elpusztult-e a mikroba. A  $0,965$ , konyhasóval beállított vízaktivitási érték kivételével a többi helyen túlélést figyelhettünk meg.

Mivel a mikroba csökkentett vízaktivitás mellett optimális pH-n és hőmérsékleten sem szaporodott, a vízaktivitás, pH és hőmérséklet együttes hatását nem tudtuk vizsgálni.



## Következtetések

Az értekezésben tárgyalt felmérő vizsgálatok és a mikroba környezeti tényezőkkel szembeni ellenálló-képességét vizsgáló kísérletek eredményeiből az alábbi következtetések vonhatók le.

A *Campylobacter jejuni* broiler telepen és vágóhídon való előfordulásának vizsgálata során kapott eredmények egybevágtak a nemzetközi szakirodalmi adatokkal: a telepen nem sikerült *Campylobacter*t kimutatni egészen 26 napos korig, azonban 42 napos korban (vágáskor) az élő állatok 93,3%-a fertőzöttnek bizonyult, ahogy a technológiai higiéniai és a személyi higiéniai minták mindegyike is. A vágás előrehaladtával minden mintából sikerült *Campylobacter*t kimutatni. A pozitív minták 95,5%-a *Campylobacter jejuni*-nak bizonyult. Ezek az eredmények is megerősítik azokat az adatokat, melyek szerint egy állomány fertőződése után szinte minden egyed a baktérium hordozójává válik, amelyik nem, az a vágóhídon nagy valószínűséggel megfertőződik. Az eredmények alapján látszik, hogy a *Campylobacter* fajok szinte a teljes állományban jelen voltak, és aztán a vágási soron szét is kenődtek. Ebben szerepe lehetett mind az eszközök, mind a dolgozók személyi higiéniai hiányosságainak.

Ennek alapján kitűnik a megelőzés, az esetleges mentesítési programok fontossága. Ezek megtervezéséhez további vizsgálatokra van szükség, főleg a baromfiállományok fertőződési módját illetően. Bár a humán campylobacteriosisok prevalenciájáról rendelkezésre állnak hazai adatok, igen kevés publikált adat áll rendelkezésre a baromfiállományok hazai érintettségéről, illetve az állományokon belüli helyzetről, valamint a vágástechnológia hatásáról. Az értekezésemben ismertetett kísérletek a vizsgált állományon belül magas fertőzöttségi arányt (46,6-93,3%) mutatnak, összhangban a korábbi magyar adatokkal.

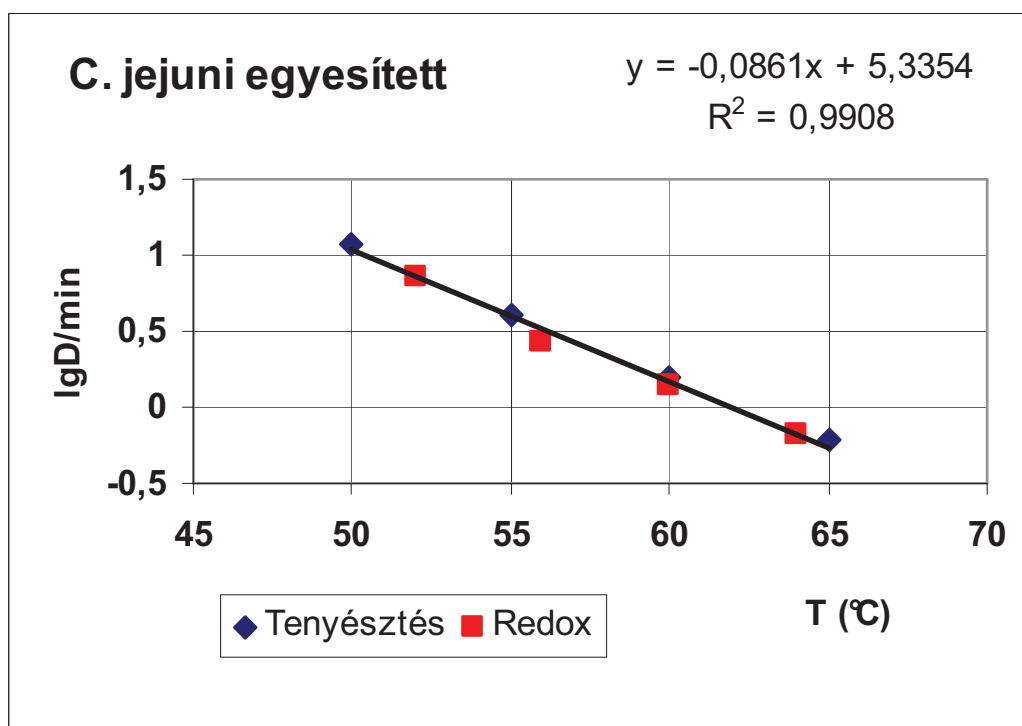
Tapasztalataink szerint 4 hetes kor körül fertőződnek az állományban az állatok. Amennyiben egy állomány *Campylobacter* fajokkal megfertőződik, szinte minden egyed is fertőzötté válik. A kísérletek során szezonális eltérést tapasztaltunk a broilerek nyári és a téli *Campylobacter*-fertőzöttségi szintje között, ami megerősítette a szakirodalmi eredményeket. Vizsgálatainkban a nyári szezonban vett mintákban a vágóhídi minták 85,8%-a, a téli minták 97,7%-a volt *Campylobacter*rel fertőzött. A hűtött testek mindegyike fertőzöttnek bizonyult *Campylobacter*rel mind nyáron mind télen. Saját vizsgálataim szerint a vágóhídról izolált *Campylobacter*ek 95,5 %-a *Campylobacter jejuni*-nak bizonyult, ez összhangban van a nemzetközi eredményekkel.

A jelen értekezésben ismertetett eredmények szerint a hazai broiler-állományok fertőzöttségi szintje hasonló a többi országéhoz, azonban az eredmények arra is rávilágítanak, hogy további kutatások szükségesek a fertőzés forrásainak illetve a fertőzési útvonalaknak a feltárására.

A hőmérséklet *Campylobacter jejuni* túlélésére gyakorolt hatásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy a mikroba szaporodási hőmérséklet tartománya nagyon szűk. Szaporodás csak 37 és 42 °C-on volt tapasztalható. 32 °C-on és 48 °C-on már nem tapasztaltunk szaporodást. A mikroba 32 °C-on túlélte 48 órát, 48 °C hőmérsékleten a kiindulási  $10^6$ /ml élősejtszámú szuszpenzió a vizsgálat ideje alatt (48 óra) elpusztult.

A hőpusztulási kísérleteinkben a *Campylobacter jejuni* izoterm hőpusztulását vizsgálatuk hagyományos tenyésztéses és redox-potenciál mérésen alapuló gyors módszerrel végzett élősejtszám meghatározással.

A tenyésztéssel meghatározott és a redoxpotenciál-mérés alapján számított IgD értékeket együttesen ábrázolva a hozzájuk tartozó hőmérsékletek függvényében, közös hőpusztulási görbét kapunk eredményül (5. ábra).



5. ábra *Campylobacter jejuni* egyesített hőpusztulási görbéje

Az igen szoros illeszkedésű hőpusztulási görbe egyértelműen igazolja, hogy a tenyésztéses alapon és műszeres mérés segítségével meghatározott hőpusztulási paraméterek között nincs szignifikáns különbség.

A hőpusztulási görbe egyenlete:	$\lg D = 5,34 - 0,0861 \cdot T$
A $\lg D$ értékek standard hibája:	standard error = 0,0487
A meredekségből számított z érték	$z = 1/0,0861 = 11,6 \text{ }^\circ\text{C}$
A meredekség 95%-os konfidencia-intervalluma:	$-0,0944 < -1/z < -0,0778$
A z érték 95%-os konfidencia-intervalluma:	$10,6 \text{ }^\circ\text{C} < z < 12,8 \text{ }^\circ\text{C}$

A vizsgálati eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a gyors módszerrel történő mikrobaszám meghatározás alkalmas hőpusztulási kísérletek kiértékelésére. A két módszer alapján meghatározott tizedelőési idők között nincs szignifikáns különbség, ezért az eredmények közös hőpusztulási görbében ábrázolhatók.

A meghatározás időigényét tekintve a műszeres mérés jelentősen gyorsabb, a hagyományos módszer 72 órás időigényével szemben csak 25-30 óra, lényegesen kevesebb munka és táptalaj-felhasználás mellett.

A hőpusztulási görbék alapján megállapítottuk, hogy a *Campylobacter jejuni* z értéke (az egy nagyságrendnyi tizedelőési idő csökkenéshez szükséges hőmérsékletnövekedés) nagyobb, mint a vegetatív mikrobák 5 °C körüli szokásos z értéke. *Campylobacter jejuni* esetében ez az érték 11,6 °C, ilyen nagy z érték a baktérium spórákra jellemző. Ugyanakkor a *Campylobacter jejuni* hőtűrése (adott hőmérsékleten mért tizedelőési ideje) nem tér el a vegetatív mikrobák esetében megszokott értékektől.

Mindezek alapján a *Campylobacter jejuni* a vizsgált 55-65 °C-os hőmérséklet tartományban a vegetatív baktériumoknál nem hőtűrőbb, de kevésbé érzékeny a hőmérséklet változására. E tény ismerete *Campylobacter jejuni*t tartalmazó élelmiszerek hőkezelésének méretezésénél fontos lehet.

A vízáktívitás *Campylobacter jejuni* túlélésére gyakorolt hatásának vizsgálata során megfigyeltük a különböző anyagokkal beállított vízáktívitási értékek mellett a *Campylobacter jejuni* élősejtszámának változását a kezdeti élősejtszámhoz képest, és a különbségből következtettünk a mikrobapusztulás mértékére. A műszeres méréssel meghatározott  $\lg N$  értékekből számított élősejt-koncentráció változásokat a 6. táblázatban foglaltuk össze. A  $\lg N_0$  a beállított vízáktívitású oldatba tett és elkeveredés után azonnal kivett minta

élősejtszámának logaritmusát jelenti,  $\Delta \lg N$  a kezdeti és a végső (45 perc után mért) értékek különbsége.

**6. táblázat** *Campylobacter jejuni* élősejt-koncentrációjának változása a vízáktivitás függvényében (45 perces kezelés 42°C-on)

$a_w$	glicerin		glükóz		konyhasó	
	$\lg N_0$	$\Delta \lg N$	$\lg N_0$	$\Delta \lg N$	$\lg N_0$	$\Delta \lg N$
0,995	7,5	0	7,5	0	7,5	0
0,985	7,5	0	7,5	0	7,5	0
0,976	7,5	0	7,5	0	7,5	-1,5
0,946	2,5	0	6	-3,8	0	-
0,920	1,5	-1,5	4,2	-3,4	-	-
0,874	0	-	-	-	-	-

0,995, 0,985, és 0,976 vízáktivításokon 45 perc elteltével nem változott szignifikáns mértékben az élősejtszám. Ennek alapján azt mondhatjuk, hogy 0,976 vízáktivítási értéken még képes életben maradni a baktérium.

Mindhárom beállító anyagnál 0,946 és 0,920 vízáktivítású közegben az élősejtszám már a beoltás pillanatában jelentősen csökkent. A csökkenés mértéke NaCl esetében a legnagyobb, gyakorlatilag a sejtek elpusztulnak.

Glicerinben a kezdeti gyors csökkenést lassabb változás követi. A jelenségre magyarázatul szolgálhat, hogy a glicerin a sejtmembránon keresztül akadálytalanul bejut a citoplazmába, ami gyors ozmotikus kiegyenlítődéshez vezet.

Glükóz hatására a beoltás pillanatában nem volt jelentős mértékű mikrobapusztulás, azonban az élősejtszám folyamatosan csökkent és a 45. percben megegyezett a glicerinben mért értékekkel.

Az  $a_w=0,876$  értéknél a mikroba glicerin és glükóz hatására is 15 percen belül elpusztult, a mikroba ozmosokra érzékeny.

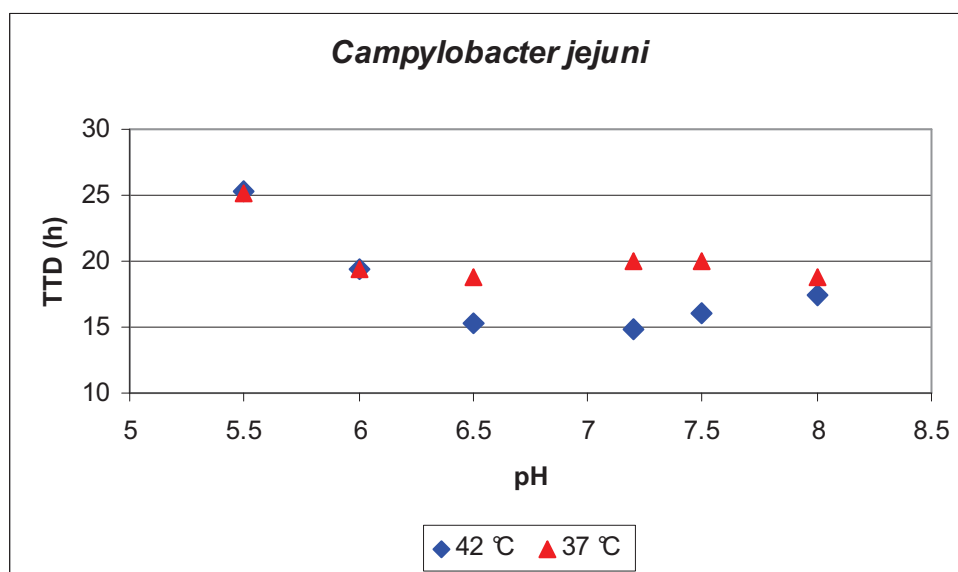
Mindezek alapján a *Campylobacter jejuni* a vízáktivításra érzékenynek tekinthető, a vízáktivitás csökkenését, a beszáradást, a sózást, cukrozást nem bírja. E tény ismerete a *Campylobacter jejuni*t tartalmazó élelmiszerek vízáktivitás-csökkentésen alapuló tartósítási eljárásaiban fontos lehet.

A pH hatását vizsgáló kísérleteink során megállapítottuk, hogy a *Campylobacter jejuni* 5,5 és 8,0 pH értékek között képes szaporodni. A mikroba pH optimuma 7,2 körüli érték. Az optimumnál nagyobb, illetve kisebb pH értékeknél az azonos kezdeti sejtszám kimutatásához szükséges TTD érték nő, vagyis a mikroba szaporodási sebessége csökken. Bár a mikroba pH=5,5 alatt és pH=8,0 felett nem szaporodott, de legalább 48 órán át képes volt túlélni az 5,0 és 8,5 pH közötti tartományt, majd optimális körülmények közé kerülve szaporodásnak indult. Az 5,0 pH érték alatti, illetve a 8,5 pH érték feletti tartományban a mikroba a vizsgálat ideje (48 óra) alatt elpusztult.

A *Campylobacter jejuni* az általunk vizsgált csökkentett vízaktivitás értékeken (0,985-0,965 között) nem mutatott szaporodást, azonban túlélte a csökkentett vízaktivitás hatását. Kivételt képez a NaCl-dal beállított  $a_w=0,965$  érték, amelynél a mikroba a vizsgálat ideje (48 óra) alatt elpusztult.

Mivel a baktérium csökkentett vízaktivitás mellett még optimális hőmérsékleten és pH-n sem szaporodott, ezért csak a hőmérséklet és a pH együttes hatását tudtuk vizsgálni, ezt is csak két hőmérsékleten (37 °C-on és 42 °C-on).

Megállapítottuk, hogy szuboptimális hőmérsékleten az optimális pH körüli értékhez közel (6,5-7,5) a mikroba gyakorlatilag érzéketlen a pH változására. Az optimumtól távolodva a pH érzékenység nő és a hőmérséklet hatása válik elhanyagolhatóvá. Az eredményeket a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra *Campylobacter jejuni* TTD értékének változása a hőmérséklet és a pH függvényében

## Új tudományos eredmények

1. A telepi és vágóhídi mintavételek eredményei megerősítik azokat az adatokat, melyek szerint egy állomány fertőződése után szinte minden egyed a baktérium hordozójává válik, amelyik nem, az a vágóhídon nagy valószínűséggel megfertőződik. A telepi mintavételek során sikerült *Campylobacter* izolálni a baromfitartás környezetéből is.
2. A kísérletek során szezonális eltérést tapasztaltunk a broilerek nyári és téli *Campylobacter*-fertőzöttségi szintje között, valamint megállapítást nyert, hogy az állatok 4 hetes kor körül fertőződnek. Az ilyen típusú kor-függés okait jelenleg még nem ismerjük, azonban fontos szerepe lehet a megelőzésben.

3. A *Campylobacter jejuni* környezeti tényezőkkel szembeni ellenálló-képességének vizsgálatai során egy új, eddig nem használt gyors mikrobiológiai módszert, a redox-potenciál mérésen alapuló sejtszám meghatározás pusztuláskinetikai vizsgálatokra való alkalmasságát vizsgáltuk. Az eredmények alapján megállapíthatjuk, hogy a gyors módszerrel történő mikrobaszám meghatározás alkalmas hőpusztulási kísérletek kiértékelésére. A két módszer alapján meghatározott tizedelődségi idők között nincs szignifikáns különbség, ezért az eredmények közös hőpusztulási görbében ábrázolhatók.

A meghatározás időigényét tekintve a műszeres mérés jelentősen gyorsabb, a hagyományos módszer 72 órás időigényével szemben csak 25-30 óra, lényegesen kevesebb munka és táptalaj-felhasználás mellett.

4. A hőpusztulási görbék alapján megállapítottuk, hogy a *Campylobacter jejuni* z értéke (az egy nagyságrendnyi tizedelődségi idő csökkenéshez szükséges hőmérsékletnövekedés) nagyobb, mint a vegetatív mikrobák szokásos z értéke, amely átlagosan 5 °C. *Campylobacter jejuni* esetében ez az érték 11,6 °C, ilyen nagy z érték a baktérium spórákra jellemző. Ugyanakkor a *Campylobacter jejuni* hőtűrése (a meghatározott hőmérsékleten mért tizedelődségi idők) nem tér el a vegetatív mikrobák esetében megszokott értékektől.

Mindezek alapján a *Campylobacter jejuni* a vizsgált 55-65 °C-os hőmérséklet tartományban az egyéb nem spórás baktériumoknál nem hőtűrőbb, de kevésbé érzékeny a hőmérséklet változására. E tény ismerete *Campylobacter jejuni*t tartalmazó élelmiszerek hőkezelésének méretezésénél fontos lehet.

5. A további kísérlet során vizsgáltuk a különböző anyagokkal beállított vízaktivitás hatását a *Campylobacter jejuni* szaporodására és túlélésére. A vízaktivitás beállításához használt különböző vegyületeket (glicerin, glükóz és konyhasó) használtunk. Glicerinnel a kis vízaktivitás hatását vizsgáltuk. Glükóz, illetve konyhasó alkalmazásával a cukrozással, illetve sózással tartósított élelmiszerekben uralkodó körülményeket modelleztük.

Megállapítottuk, hogy a mikroba 0,995-ös vízaktivitás érték alatt nem szaporodik, de 0,876  $a_w$  érték felett nem pusztul el és optimális körülmények közé kerülve szaporodásnak indulhat. Ha az  $a_w \leq 0,876$ , a mikroba elpusztul.

A *Campylobacter jejuni* túlélési esélyei jelentősen csökkennek cukrozás, illetve sózás alkalmazásakor. Előbbi esetben  $a_w \leq 0,946$ , utóbbi esetben  $a_w \leq 0,965$  értéknél a mikroba 48 órán belül elpusztul.

6. A pH *Campylobacter jejuni* túlélésére gyakorolt hatását vizsgáló kísérletek eredményei azt mutatják, hogy a mikroba viszonylag szűk pH tartományban (5,5-8) képes szaporodni, azonban az ennél kisebb, illetve nagyobb pH értékű élelmiszerekben (5,0-8,5) is túlélhet és optimális körülmények közé kerülve szaporodásnak indulhat. Kifejezetten savas (pH  $\leq 4,5$ ) és lúgos (pH  $\geq 9,0$ ) közegben a *Campylobacter jejuni* 48 órán belül elpusztul, így ezekben *Campylobacter* fertőzéstől nem kell tartani.

## A témában megjelent tudományos publikációk

Jozwiak Á., Reichart O., Laczay P.: **The occurrence of Campylobacter species in Hungarian broiler chickens from farm to slaughter.** J. Vet. Med. B 53, 291–294., 2006. (IF: 1,356)

Jozwiak Á., Reichart O., Szakmár K.: **Redoxpotenciál-méréseken alapuló gyorsmódszer Campylobacter jejuni hőpusztulásának vizsgálatára.** Magyar Állatorvosok Lapja 132, 47-53., 2010. (IF: 0,088)

Reichart O., Szakmár K., Jozwiak Á., Felföldi J., Baranyai L.: **Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination.** International Journal of Food Microbiology, volume 114, issue 2, 143-148., 2007. (IF: 2,581)

### *Szabadalom:*

Reichart O., Szakmár K., Felföldi J., Baranyai L., Jozwiak Á.: **Szabadalom: Eljárás mikroorganizmusok szilárd, folyékony, légnemű anyagokban való jelenlétének kimutatására és számszerű meghatározására.** Közzététel: 2006. december 28.

### *Egyéb közlemények:*

Jozwiak Á., Reichart O., Szakmár K.: **Redox potential measurement as a rapid method for heat destruction experiments of Campylobacter jejuni.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 52. Supp. 62-63., 2005.

Szakmár K., Reichart O., Jozwiak Á.: **Microbiological inspection of mineral water by redoxpotential measurement.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica. 52. Supp. 149-150., 2005.

Szakmár K., Reichart O., Jozwiak Á.: **Microbiological quality control of food industrial samples by redoxpotential measurement.** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica.. 52. Supp. 342., 2006.



*Előadások:*

Jozwiak Á, Reichart O: **A Campylobacter fajok növekvő jelentősége a humán enterális megbetegedések terén.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2003

Jozwiak Á, Reichart O: **Baromfihúsból izolált Campylobacter jejuni hőpusztulásának vizsgálata.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2005

Jozwiak Á, Reichart O, Szakmár K: **Ásványvíz mikrobiológiai vizsgálata redox-potenciál mérésen alapuló gyorsmódszer segítségével.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2006

Jozwiak Á, Reichart O, Szakmár K: **Redox-potenciál mérésen alapuló mikrobiológiai gyorsmódszer, mint hatékony eszköz a Campylobacter jejuni hőpusztulási kísérleteiben.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2006

Jozwiak Á, Süth M, Reichart O, Laczay P: **A Campylobacter és Salmonella fajok, valamint a Listeria monocytogenes előfordulása és terjedése broiler állományokban.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2004

Reichart O, Szakmár K, Jozwiak Á: **Redox-potenciál mérésen alapuló mikrobiológiai gyorsmódszer alkalmazása telepi nyerstejellenőrzés során.** Akadémiai Beszámolók SZIE ÁOTK, 2006

## **Köszönetnyilvánítás**

Értekezésemhez kapcsolódó munkám során nyújtott segítségért, konzultációkért szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Reichart Olivérnek, Dr. Szakmár Katalinnak a laboratóriumi kísérletekben és kiértékelésekben nyújtott hatékony segítségéért, továbbá Németh Gabriellának a laboratóriumi munka gondos előkészítéséért.

A telepi kísérletek az NKB-2003-KUT-7-028 pályázat keretében valósultak meg.