

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

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

PhD értekezés

Dr. Erdősi Orsolya

2014

Témavezető és témabizottsági tagok:

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

Dr. Szita Géza  
Szent István Egyetem  
Állatorvos-tudományi Kar  
Élelmiszer-higiéniai Tanszék  
témabizottság tagja

Juhászné Dr. Román Mariann  
Budapesti Corvinus Egyetem  
Élelmiszer-tudományi Kar  
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék  
témabizottság tagja

Készült 8 példányban. Ez a n. .... sz. példány.

.....  
dr. Erdősi Orsolya

## Tartalom

Rövidítések .....	6
1. Összefoglalás.....	7
2. Bevezetés (célkitűzés).....	9
3. Irodalmi áttekintés .....	11
3.1. Élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága .....	11
3.1.1. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	12
3.1.2. <i>Salmonella</i> .....	14
3.2. Technológiai higiéniai kritériumok.....	15
3.2.1. Enterobacteriaceae .....	15
3.2.2. A nyers tej mikrobiológiája .....	17
3.2.3. A nyers hússal szemben támasztott mikrobiológiai követelmények .....	17
3.3. Az élelmiszerekkel érintkező felületek mikrobiológiai szennyezettsége.....	18
3.4. Mikrobiológiai ellenőrző módszerek.....	19
3.4.1. Klasszikus, tenyésztéses mikrobiológiai módszerek .....	19
3.4.2. Gyors mikrobiológiai módszerek.....	19
3.4.2.1. Színreakción alapuló mérési módszerek.....	19
3.4.2.2. ATP biolumineszcencia mérés.....	20
3.4.2.3. Impedimetriás módszerek.....	21
3.4.2.4. Redoxpotenciál-mérés.....	22
3.4.2.5. PCR-módszerek .....	24
3.5 Jogsabályi vonatkozások .....	26
4. Anyagok és módszerek .....	28
4.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek .....	28
4.1.1. Szabványos módszerek.....	28
4.1.2. A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok .....	28
4.1.3. Felhasznált táptalajok .....	29
4.1.4. <i>Salmonella</i> -kimutatás .....	29
4.1.5. <i>Listeria monocytogenes</i> kimutatása.....	30
4.1.6. Összcsíraszám-meghatározás .....	30
4.1.7. Az Enterobacterium-szám meghatározása .....	30
4.1.8. Környezethigiéniai vizsgálatok, mikrobaszám-meghatározás lemezöntéssel.....	30
4.2. Redoxpotenciál-mérés.....	31
4.2.1. A mérési módszer elvi alapjai .....	31
4.2.1.1. Redoxgörbe.....	32

4.2.1.2. Mérési görbe .....	34
4.2.1.3. Külső kalibrációs görbe.....	34
4.2.1.4. Belső kalibrációs görbe.....	36
4.2.2. A mérőrendszer leírása .....	37
4.2.3. Redoxpotenciál-méréssel végzett mikrobiológiai vizsgálatok.....	41
4.2.3.1. Összcsíra- és Enterobacterium-szám meghatározás.....	41
4.2.3.2. Környezeti higiéniai vizsgálat.....	41
4.2.3.3. <i>Listeria monocytogenes</i> kimutatása.....	42
4.2.3.4. <i>Salmonella</i> -kimutatás .....	43
4.3. Real-time PCR .....	44
4.3.1. A <i>Listeria monocytogenes</i> azonosítása .....	44
4.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i> számának meghatározása Real-time PCR vizsgálattal.....	45
4.3.3. <i>Salmonella</i> -azonosítás .....	46
4.4. Matematikai statisztikai módszerek .....	46
5. Eredmények .....	47
5.1. Az összcsíra- és az Enterobacterium-szám meghatározás redoxpotenciál-méréssel .....	47
5.1.1. Nyers tej vizsgálata .....	47
5.1.1.1. A nyers tej szaporodásgátló hatásának kiküszöbölése .....	47
5.1.1.2. Az összcsíraszám meghatározása külső kalibrációs görbe alkalmazásával ...	48
5.1.1.3. Enterobacterium-szám meghatározása külső kalibrációs görbe alkalmazásával.....	48
5.1.1.4. Összcsíra- és Enterobacterium-szám meghatározása belső kalibrációs görbével .....	50
5.1.2. Vörösáruk gyártási fázisainak vizsgálata .....	53
5.1.2.1. Belső kalibrációs görbe meghatározása lemezöntéssel.....	53
5.1.2.2. Belső kalibrációs görbe meghatározása határhígítással .....	56
5.1.2.3. Közös kalibrációs görbe meghatározása .....	58
5.2. Környezet-higiéniai vizsgálatok redoxpotenciál-méréssel .....	60
5.2.1. Mikrobaszám meghatározása redoxpotenciál-méréssel .....	60
5.2.2. A műszeres és lemezöntéses eredmények összehasonlítása .....	62
5.3. Kvantitatív PCR teljesítmény jellemzőinek meghatározása.....	65
5.3.1. A kimutatási határ számítása.....	65
5.3.2. A méréshatár kísérleti meghatározása .....	65
5.3.3. Amplifikációs görbék vizsgálata .....	67
5.3.4. Standard görbék vizsgálata .....	70
5.3.5. A PCR-reakció hatékonyságának vizsgálata .....	72

5.3.6. Kalibrációs görbe meghatározása .....	73
5.3.7. A kvantitatív PCR-rel végzett sejtszám-meghatározás ismételhetősége.....	74
5.4. Élelmiszer-biztonsági kritériumok .....	75
5.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> kimutatás.....	75
5.4.1.1. <i>L. monocytogenes</i> szelektivitás .....	75
5.4.1.2. <i>Listeria</i> fajok és <i>L. monocytogenes</i> törzsek redox kalibrációs görbéinek meghatározása .....	77
5.4.1.3. <i>L. monocytogenes</i> redox elődúsítás utáni identifikálása PCR-módszerrel .....	81
5.4.2. <i>Salmonella</i> kimutatás .....	85
5.4.2.1. Szelektivitás vizsgálat.....	85
5.4.2.2. Élelmiszerminták előzetes vizsgálata.....	88
5.4.2.3. <i>Salmonella</i> kimutatás mesterségesen fertőzött tojásban .....	89
5.4.2.4. <i>Salmonella</i> kimutatás csirkehúsban.....	90
6. Megbeszélés .....	93
6.1. Összcsíraszám és Enterobacteriaceae-szám meghatározás.....	93
6.2. Környezethigiéniai vizsgálatok.....	95
6.3. Kvantitatív PCR teljesítmény-jellemzői .....	96
6.3.1. Méréshatár .....	96
6.3.2. Linearitás.....	97
6.3.3. Véletlen hiba.....	97
6.4. Élelmiszer-biztonsági kritériumok .....	98
6.4.1. <i>Listeria monocytogenes</i> kimutatás.....	98
6.4.2. <i>Salmonella</i> -kimutatás .....	99
7. Új tudományos eredmények.....	101
8. Irodalom .....	102
9. A doktori kutatás eredményeinek közlései.....	111
10. Köszönetnyilvánítás.....	113

## Rövidítések

ATCC	American Type Culture Collection.
CFU	Colony Forming Unit. (Telepképző egységek száma).
CT	Detektálási küszöb eléréséhez szükséges PCR ciklusok száma (Threshold Cycle).
d	Hígítási lépték (dilution rate).
DL	Hígítási szint (Dilution Level).
DC	Detektációs kritérium (mV/min). A redox-potenciál változás sebességének (dEh/dt) az a minimális értéke, amely már mikrobiológiai aktivitás következményének tekinthető.
E	A PCR reakció amplifikációs hatékonysága.
E <sub>h</sub>	A normál hidrogén elektródra vonatkoztatott redox-potenciál (mV)
MPN(0)	A hígítatlan minta legvalószínűbb mikrobaszáma (Most Probable Number).
MPN(c)	A redox méréshez előkészített minta MPN értéke.
NCAIM	National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms.
N <sub>0</sub>	A redox mérőcella kiindulási mikrobaszáma (CFU/cella)
N(c)	(=N <sub>0</sub> ). A redox cellában lévő mintamennyiség kiindulási mikrobaszáma (CFU/cella)
Nk	A detektációs kritérium eléréséhez szükséges sejtkoncentráció (CFU/ml) a redox mérőcellában.
R	Reporter signal. PCR reakciónál a fluoreszcensen jelölt specifikus próba jelintenzitása.
Rn	Normalizált reporter signal. A reporter emissziós jelének és a passzív referencia festék emissziós jelének hányadosa.
Rnk	Detektálási küszöbnek választott Rn érték.
So(IgN)	A IgN értékek meghatározásának véletlen hibája. Kalibrációs görbe esetén az egyenes körüli szórás.
TTD	Detektációs idő (Time To Detection). A redox mérés indulásától a Detektációs Kritérium eléréséig eltelt idő (h).

# 1. Összefoglalás

Az élelmiszerek mikrobiológiai ellenőrzésének két alapvető feladata az élelmiszer-biztonsági és a technológiai higiéniai kritériumoknak való megfelelés biztosítása. A probléma fontosságát jelzi, hogy a fejlett országokban évente a lakosság kb. 30 %-a szenved valamilyen élelmiszer eredetű megbetegedésben. Ahhoz, hogy ezt a számot csökkenteni tudjuk, alapvető fontosságú a patogén mikrobák jelenlétének gyors és megbízható kimutatása. A hagyományos mikrobiológiai módszerek munka és időigényesek, ezért nem felelnek meg a gyors kimutatás követelményeinek. Nagyon gyors és megbízható vizsgálatot tesz lehetővé a real-time PCR módszer alkalmazása, azonban alsó méréshatára kb.  $10^3$  cfu/g (ml), így önmagában nem felel meg a vizsgálattal szemben támasztott követelményeknek. További problémát jelent, hogy a módszerrel az élő és az elpusztult mikrobajelek nem különíthetők el egymástól. Ezeket a problémákat úgy küszöbölhetjük ki, hogy a PCR vizsgálat előtt valamilyen dúsítási lépést alkalmazunk. Munkám során a dúsítást redoxpotenciál-mérésen alapuló gyors vizsgálati módszerrel, MICROTESTER készülék alkalmazásával végeztem. Meghatároztam az egyetlen élő mikrobajelt kimutatásához szükséges mérési időt, amely *Listeria monocytogenes* esetében 35 óra, *Salmonella* esetében 24 óra. Azok a minták, amelyekben a meghatározott idő alatt nem mutatkozik mikrobaszaporodás (nem adnak detektációs időt), negatívak és további PCR vizsgálatuk nem szükséges. Így jelentős számú drága PCR-vizsgálat takarítható meg, és ezáltal a vizsgálati költségek csökkenthetők. Abban az esetben, ha a vizsgálat mikrobaszaporodást jelez (van TTD), a PCR-kimutatás elvégezhető, mivel – vizsgálateink szerint – a detektációs kritérium teljesülésekor a minta mikrobaszáma nagyságrendileg  $10^6$  cfu/ml.

A redoxpotenciál-változás mérésén alapuló és a real-time PCR módszerek összekapcsolásával gyors, hatékony és költségtakarékos vizsgálati protokolt fejlesztettünk ki, amely alkalmas a különböző élelmiszerekben patogén mikrobák jelenlétének vagy hiányának megállapítására.

Az ellenőrzés során nem csak a keletkezett végterméket vizsgáljuk, hanem egyre inkább a technológiai folyamatok és a feldolgozási lánc higiéniját is. Technológiai higiéniai kritériumként leggyakrabban a mezofil aerob mikrobaszámot és az Enterobacterium-számot alkalmazzuk. Munkám során vizsgálati módszert dolgoztam ki e két kritérium MICROTESTER készülékkel történő vizsgálatára hús és húskészítmények, valamint nyers tej és tejkészítmények ellenőrzésére. Az eljárás a mikrobaszaporodást kísérő redoxpotenciál-változás detektálásán alapul.

Tekintettel arra, hogy a detektációs idő annál rövidebb, minél nagyobb a minta szennyezettsége, a módszer alkalmazása lehetőséget teremt arra, hogy a vizsgált minták mikrobaszámát a jelenlegi szabványos módszereknél – különösen erősen szennyezett minták esetén - sokkal gyorsabban határozzuk meg. A nyers tejre technológiai szempontból határértéknek tekintett  $10^4$ - $10^5$  cfu/ 8-9 óra alatt (nagyobb sejtkoncentráció rövidebb idő alatt) meghatározható. A 2073/2005/EK rendeletben az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló 2.1. pontjában előírt aerob mikrobák számának meghatározása 6-10 órát vesz igénybe, szemben a klasszikus lemezöntéses eljárás által előírt 72 órás inkubációval.

A rövidebb mérési idő lehetővé teszi az eredményeknek a gyártási technológiába történő visszacsatolását, a HACCP rendszer hatékonyabb alkalmazását.

Nagyon fontos területe az élelmiszer-előállítás higiéniai ellenőrzésének a gyártás során az élelmiszerekkel érintkező felületek mikrobiológiai vizsgálata, a takarítás – fertőtlenítés hatékonyságának ellenőrzése. MICROTÉSTER készülék használatával olyan vizsgálati módszert dolgoztam ki, amely alkalmas a környezet-higiéniai minták mezofil aerob mikrobaszámának és Enterobacterium-számának gyors meghatározására. A módszer lehetővé teszi a higiéniai tamponok közvetlen (a tamponokról a mikrobák előzetes lemosása nélküli) vizsgálatát, lényegesen növelve a vizsgálat pontosságát. A módszerrel a vizsgálati idő a szabványos módszerekhez szükséges 1-3 napról néhány órára csökkenthető.



## 2. Bevezetés (célkitűzés)

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

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

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

A jelenleg alkalmazott mikrobiológiai gyorsmódszerek általában drága berendezéseket és jól képzett laboratóriumi személyzetet igényelnek. A kisvállalkozások, vagy kisüzemek általában nem engedhetik meg maguknak saját minőségellenőrző mikrobiológiai laboratórium működtetését. A Szent István Egyetem Állatorvos-tudományi Kar Élelmiszer-higiéniai Tanszékének és a Corvinus Egyetem Élelmiszer-tudományi Kar Fizika és Automatizálás Tanszékének munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatott MicroTester berendezés egy lehetséges megoldást jelent a mikrobiológiai vizsgálatok időigényének jelentős mértékű lerövidítésére, egyszerűsítésére és költségeinek csökkentésére. A redoxpotenciál-mérésre alapozott módszer előnye, hogy azonos teljesítmény (mintaszám) esetén beruházási költsége a hasonló célra alkalmazott impedimetriás eljárások költségének csupán harmada, és szabványos tápközegek felhasználását teszi lehetővé.

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

Munkám célja a redoxpotenciál változásának mérésén alapuló gyors vizsgálati módszer élelmiszeripari alkalmazhatóságának bizonyítása állati eredetű (tej és hús) termékek, illetve környezeti minták mikrobiológiai vizsgálatánál technológiai higiéniai és élelmiszer-biztonsági szempontból jelentős mikroorganizmusok kimutatásához, számszerű meghatározásához kapcsolódóan az alábbiak szerint.

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

### 3. Irodalmi áttekintés

#### 3.1. Élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága

A fogyasztó egészségét károsító ágensek mintegy 70 %-a az élelmiszerrel, a fennmaradó hányad pedig az ivóvízzel, illetve a levegőből jut az emberi szervezetbe (Laczay, 2013). Élelmiszer eredetű megbetegedések széles körben elterjedtek és okoznak növekvő közegészségügyi problémát mind a fejlett, mind a fejlődő országokban. Az élelmiszer eredetű egészségkárosodást előidéző fertőző vagy mérgező anyagok 5 fő csoportba sorolhatók:

- mikrobiológiai ágensek
- kémiai szennyezők
- fizikai szennyeződést okozó anyagok
- radioaktív szennyezők
- új technológiai, biotechnológiai eredetű kockázati tényezők.

Témakörömhöz illeszkedve, ezek közül az élelmiszerek mikrobiológiai biztonságát tekintem át.

A mikrobiológiai fertőzésekre visszavezethető hasmenéses megbetegedések a világon a megbetegedések számát tekintve a harmadik, a halálozások számát tekintve a hatodik helyen állnak (WHO, 2013).

A mikrobiológiai eredetű megbetegedésekben különféle baktériumok, vírusok, sarjadzó- és penészgombák, valamint prionfehérjék játszhatnak kóroktani szerepet. Az élelmiszerek és a víz mikrobiológiai szennyezettsége a legfőbb oka a hasmenéses megbetegedéseknek. A populáció kb. 30 %-a szenved évente valamilyen élelmiszer eredetű megbetegedésben, ez az arány a fejlődő országokban még magasabb lehet (Germini, 2009). 2011-ben 5 648 élelmiszer eredetű járvány volt az Európai Unióban, amely 69 553 humán esetet jelentett 7 125 hospitalizációval valamint 93 halálesetet (EFSA 2013). Az élelmiszer eredetű járványok 64,2 %-ában azonosították a kórokozót. A *Salmonella* volt a leggyakrabban detektált, a járványok 26,6 %-ában, ezt követte a baktériumtoxinok által okozott megbetegedések száma (12,9 %), *Campylobacter*-fertőzöttségek (10,6 %) és vírusok által okozott megbetegedések (9,3 %). A többi ágens kevesebb, mint 2 %-ban volt felelős az élelmiszer eredetű megbetegedésekért. A leggyakoribb hordozó élelmiszerek tojás és tojástermékek voltak.

### 3.1.1. *Listeria monocytogenes*

A listeriák rövid, pálcika alakú, csillós Gram-pozitív baktériumok. A nemzetségbe 10 faj tartozik, 2 patogén, a *Listeria monocytogenes* és *L. ivanovii*, valamint nyolc nem patogén faj: *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. fleischmannii*, és *L. weihenstephanensis* (Mraheil et al., 2013). A fajok közül a *Listeria monocytogenes*nek van kórtani szempontból jelentősége, mely emberben és állatokban is súlyos megbetegedést okoz (Pesavento et al. 2010).

A *L. monocytogenes* 1-2 µm hosszú, nem spóráképző, fakultatív anaerob kórokozó (Liu, 2006). Kataláz pozitív, az eszkulint hidrolizálja. Glükózból, maltózból savat képez, a mannitot és a xilózt nem bontja.

Széles körben előfordul a talajban, természetes vizekben, szennyvizekben, az egészséges emberek és állatok bélcsatornájában. Képes alkalmazkodni a különböző szélsőséges környezeti tényezőkhöz, mint a 10 %-os só koncentrációhoz vagy a széles pH intervallumhoz (4,5-9,6) és hőmérsékletekhez (1-45°C). Élelmiszerekben a fagyasztást, szárítást túléli (Chasseignaux et al., 2002).

Megtalálható feldolgozatlan állati eredetű élelmiszerekben, nyers tejben, húspan, halban, zöldségeken, gyümölcsökön, de kimutatható feldolgozott és fogyasztásra kész élelmiszerekben (RTE), csakúgy, mint sajtokban, jégkrémekben, húskészítményekben az utószennyeződés következményeként (Norrung et al., 1999, Guerra et al., 2001). Gyakran hűtőhőmérsékleten tárolt nyers és RTE élelmiszerek a fertőződés forrásai (Filiousis et al., 2009).

Fakultatív patogén, fogékony iránta az ember, az összes házi- és vadon élő emlősállat, valamint a madarak is. Kérődzőkben mastitist idézhet elő, tejjel kiválasztódhat. Gyakoribb azonban, hogy a bélcsatornában tünetmentesen fordul elő és különböző állati eredetű élelmiszerek bélsár eredetű másodlagos kontaminációját okozza a fejés, a vágás vagy a feldolgozás során.

Az infektív dózis nagysága  $10^3$  cfu/ml (Schmid-Hempel és Frank, 2007). Klinikai megbetegedés főként gyerekekben, idősekben, csökkent ellenállóképességű személyekben és terhes nőkben alakulhat ki. Terhes nők esetében 10-12-szer nagyobb a fertőzés kockázata az átlagosnál. A tünetek a fertőzött élelmiszer elfogyasztása után átlagosan 10-18 nap múlva alakulnak ki. A *L. monocytogenes* által előidézett megbetegedést extraintestinális tünetek kísérik, enyhébb esetben influenzaszerű állapot, súlyosabb esetben meningitis, meningoencephalitis, endocarditis. Terhes nőkben influenzaszerű tünetek jelennek meg, lázzal, fejfájással, hasi fájdalommal, amihez azonban a magzat transzplacentáris fertőződése társulhat vetélést, koraszülést vagy halvaszületést okozva. A fertőzött csecsemőkben a születést követő egy-két hétben is kialakulhat a megbetegedés

septicaemia, granulomatosis, tüdőgyulladás, meningitis formájában, nagy arányban elhalálozással (Zhou and Jiao, 2006). A *Listeria*-fertőzés okozhat még lázas gastroenteritist, amely nem invazív diarrhoeaban nyilvánul meg (Doganay, 2003). Ennek lappangási ideje 1-2 nap, a hasmenés pedig 1-3 napig tart. A láz, a hasmenés és a myalgia tüneti kezelésre megszűnnek.

A bakteriális endocarditis, septikaemia következménye lehet, immunszuppresszált betegekben fordul elő és mortalitása 33%. A septicus betegek kétharmadánál figyelhető meg a betegség.

A *Listeria monocytogenes* az előbbieket mellett okozhat még: a bőrön papulákat, pustulákat, peritonitist, hepatitist, hepaticus abscessust, psychosist, osteomyelitist (Fischetti, 2000).

Az Európai Unióban 2011-ben 1 476 megerősített eset fordult elő. Ez valamelyest csökkenést jelent az előző évhez képest, de szignifikáns változás nem tapasztalható az esetszámokat tekintve az utóbbi 5 évben. A kórházi kezelések aránya közel 100 % volt. Epidemiológiai adatok azt mutatják, hogy a listeriosis esetében a legmagasabb a hospitalizációs ráta és a legmagasabb a halálozási arány az élelmiszer eredetű megbetegedések között az Egyesült Államokban és az Európai Unióban is (Mead et al. 1999; Scallan et al. 2011). Összesen 134 halálesetet jelentettek, a legmagasabb esetszám Franciaországban fordult elő, Magyarországon 11 esetet erősítettek meg. Egy súlyos *Listeria*-járvány fordult elő Belgiumban 11 humán esetet okozva, mindannyian kórházi kezelésre szorultak és 4 személy meghalt. A listeriával fertőzött élelmiszer házi készítésű sajt volt. Finnországban és az Egyesült Királyságban pékáru és készétel volt a hordozó. Svájcban előforduló járvány esetén, amely 9 személyt érintett, a fogyasztott élelmiszer sertéshús és húskészítmény volt.

Számos *Listeria*-járvány tej vagy tejtermék fogyasztásához kapcsolható és okoz problémát a tejiparban, tekintve az esetszámokat és a 20-30 %-os halálozási rátát (Griffiths, 1989; Newell et al. 2010).

A 2011-es évben vizsgált minták közül a nem megfelelők aránya a halásznemű termékek esetén volt a legmagasabb, 6,7 %. Tej esetén, a gazdaságokban vett minták 3,7 %-a volt nem megfelelő, ez közvetlen fogyasztásra szánt nyers tej mintákat jelentett. Sajtok esetében kategóriától és mintavételi helytől függően a minták 0,1-5,4 %-a tartalmazott a megengedettnél több *L. monocytogenes*-t.

### 3.1.2. *Salmonella*

A salmonellosis a legjelentősebb élelmiszer eredetű megbetegedések közé tartozik, köszönhetően annak endémiás természete, magas morbiditása és az élelmiszerek széles köréhez köthető volta miatt (Aarestrup et al. 2007; de Freitas et al. 2010). A *Salmonella*-fertőzés jelentős egészségügyi és gazdasági terhet jelent az egész világon (Chen et al., 2010).

Az Enterobacteriaceae családba tartozó baktériumok rövid pálcika alakú, többnyire csillóval rendelkező, fakultatív anaerob mikrobák. A három fő antigén szerint a salmonelláknak több mint 2600 szerotípusát különböztetik meg, és a különböző szerotípusok előfordulása folyamatosan változik. A szerotípusok több mint 99 %-a a *Salmonella enterica* fajba tartozik, melyen belül 6 alfajt különböztetünk meg. Az élelmiszer-mikrobiológiai szempontból fontos szerotípusok az I. alfajba tartoznak (*S. enterica* subsp. *enterica*) (Laczay, 2013).

A salmonellák az emberi és állati bélcsatorna lakói. Egyes szerotípusok előfordulása általános (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), másoké csak meghatározott gazdaszervezetre korlátozódik. A salmonellák ürülékkel kerülnek a környezetbe, ahol hosszú ideig túlélhetnek, de nem szaporodnak. A húsok szennyeződése közvetlenül az állatok salmonellosisából származhat, vagy feldolgozás során kenődik a béltartalom a hús felületekre.

A salmonellák 6-47°C hőmérsékleti és 3,8-9,5 pH-tartományban képesek szaporodni. Hővel szembeni ellenállóképességük  $D_{60}=0,1-2$  min.

Darált húsban, tojásos, majonézes termékekben 4°C felett szaporodni képesek (Laczay, 2013).

A humán salmonellosisok többségét az élelmiszerrel felvett, állati eredetű zoonotikus szerotípusok okozzák. Az élelmiszer közvetítője is lehet az állatokat meg nem betegítő humán patogén szerotípusoknak is. Láz, hasi fájdalom, esetenként hányás és hasmenéssel járó kórkép jellemző a humán megbetegedésekre. Általában rövid, 12-36 órás lappangási idő után jelentkeznek a tünetek. A mortalitás alacsony, a megbetegedések kevesebb, mint 1 %-a jár halállal.

Az EU-ban az emberi megbetegedéseket leggyakrabban a *S. Typhimurium* és *S. Enteritidis* szerotípusok okozzák. A *S. Enteritidis* által előidézett megbetegedések kontaminált tojás és tojástermékek, valamint baromfihús fogyasztásához köthetők, míg a *S. Typhimurium* okozta megbetegedések fertőzött sertés-, marha- és baromfihús fogyasztása esetén fordulnak elő a leggyakrabban (EFSA 2013, Gantois et al. 2008).

A humán salmonellosis esetek száma a 2008-2011-es időszakban szignifikánsan csökkent, köszönhetően az EU-ban folyó *Salmonella*-gyérítési programoknak. 2011-ben összesen 97 897 salmonellózis esetet jelentett a 27 tagállam, melyből 95 548 esetet erősítettek meg. Ez

5,4 %-os csökkenést jelent az előző évhez képest. Magyarország 6 446 esetet jelentett, ebből 6 169 került megerősítésre.

2011-ben a nem megfelelő minták száma a hús eredetű élelmiszerek között volt a legmagasabb. Darált baromfi-hús és baromfi-hús-készítmények voltak a leginkább salmonellával fertőzöttek az EFSA jelentés szerint (az egyedi minták 6,8 %-a és a tételminták 2,4 %-a nem felelt meg a 2073/2005 EK rendelet által előírt kritériumoknak).

A járványok 50,5 %-ában tojás és tojástermékek voltak a fertőződési források, hasonlóan az elmúlt évek statisztikájához. *S. Enteritidis* volt a legnagyobb arányban felelős a humán megbetegedésekért. Járványok esetén a tojás és tojástermékek fogyasztásához köthető esetek aránya magasabbnak bizonyult az előző évekhez képest.

A második leggyakoribb élelmiszerkategóriát az összetett élelmiszerek alkották (7,4%-a a járványoknak ehhez a kategóriához köthető), amelyet az édességek és a csokoládé követett 6,7%-kal.

## **3.2. Technológiai higiéniai kritériumok**

A „technológiai higiéniai kritérium” olyan követelmény, amely a gyártástechnológia elfogadható működését jelzi, nem vonatkozik a forgalomba hozott termékekre. A kritérium egy indikatív szennyezettségi értéket határoz meg, amely felett helyesbítő intézkedések szükségesek ahhoz, hogy a technológiai higiénia megfeleljen az élelmiszerjogi előírásoknak (2073/2005/EK). A követelményeket a gyártási folyamat meghatározott szakaszában kell teljesíteni. Ha nem teljesül, az intézkedés, a gyártási folyamatba történő beavatkozás (a termék tehát forgalomba hozható). Már forgalomban lévő termékeket ez alapján kifogásolni nem lehet. A termelési folyamatok mikrobiológia ellenőrzésében kialakult az élelmiszer-technológiai higiénia fogalma, melynek keretében a feldolgozási folyamatok állandó ellenőrzésével megelőző tevékenységet folytatunk.

A 2073/2005/EK rendelet szerint a technológiai higiéniai kritériumok közül a leggyakrabban vizsgált paraméterek a *Salmonella* mellett az areob mikrobák száma és az Enterobacteriaceae szám.

### **3.2.1. Enterobacteriaceae**

Az Enterobacteriaceae család képviselői széles körben elterjedtek, jelen vannak a talajban, a vízben, a növényekben és az állati, illetve az emberi bélcsatornában. Ezért jelenlétük az ilyen jellegű szennyeződésekre, különösen a fekál kontamináció jelzését tekintve, indikátor

szereppel bír és számuk meghatározása az élelmiszer-mikrobiológiai laboratóriumok egyik leggyakoribb feladata (Blood és Curtis, 1995). Az Enterobacteriaceae családba tartozó baktériumokat, a felületek higiéniai állapotának megítélésére vonatkozó szabályozás külön is kiemeli, mert a családba tartozó fajok jelenléte, mennyisége a legfontosabb fokmérője az adott üzem higiéniai állapotának. Az élelmiszerekre meghatározott mikrobiológiai kritériumok egy része is erre a családra vonatkozik. Az Enterobacteriaceae szám meghatározása a korábbi, nehezebben definiálható, kóliform csoportba tartozó baktériumok számának meghatározását váltotta fel (Joosten et al. 2008).

Az 1-3 µm hosszú, pálcá alakú Gram-negatív baktériumok spórát nem képeznek. Általában csillókkal rendelkeznek, amelyek peritrich elhelyezkedésűek. Mind aerob és anaerob körülmények között képesek anyagcserét folytatni és szaporodni. Táplálkozási igényük egyszerű, aerob légzéssel a vegyületek széles sorát (szénhidrátokat, szerves savakat, aminosavakat) fel tudják használni, gyakran összetettebb vegyületek (keményítő, pektin, fehérjék) lebontására is képesek. Legfontosabb nemzetségeiket, főbb tulajdonságaikat az 1. táblázatban foglaltam össze.

#### 1. Táblázat Az Enterobacteriaceae család fontosabb tagjai

Nemzetség	Laktóz pozitivitás	Fekális eredet	Humán enteropatogenitás
<i>Citrobacter</i>	+/-	-/(+)	-
<i>Edwardsiella</i>	-	+	-/+
<i>Enterobacter</i>	+	-/(+)	-
<i>Erwinia</i>	-/(+)	-/(+)	-
<i>Escherichia</i>	+	+	-/+
<i>Hafnia</i>	-/(+)	-/(+)	-
<i>Klebsiella</i>	+	-/(+)	-/+
<i>Proteus</i>	-	-/(+)	-/+
<i>Salmonella</i>	-	+	+
<i>Serratia</i>	-	-	-
<i>Shigella</i>	-	+	+
<i>Yersinia</i>	-	+	-/+

Az *Escherichia* fajok többsége, a *Shigella* és a *Salmonella* fajok mindegyike az emberi és állati bélcatornában él. Az *E. coli* az ember vastagbelének normális lakója, fontos szimbiontának tekinthető, azonban bizonyos szerotípusok fertőző betegségeket okoznak



### 3.2.2. A nyers tej mikrobiológiája

Az egészséges tej előállítása a termelők, feldolgozók és fogyasztók közös érdeke, mert a tej által közvetített élelmiszereredetű megbetegedések kiemelkedő jelentőségűek. Annak ellenére, hogy a tej nagy része pasztörözött formában kerül fogyasztásra, több érv szól a termelői nyers tej mikrobiológiai minőség-ellenőrzésének fontossága mellett. Egyrészt a nyers tej különböző patogén mikroorganizmusokat tartalmazhat, amelyeket a pasztörözési eljárások nem pusztítanak el, másrészt nyers tejből pasztörözés nélkül készült tejtermékeket vagy akár közvetlenül nyers tejet is fogyasztunk. Élelmiszer-biztonsági és technológiai higiéniai szempontból a  $10^5$ /ml összcsíraszám jelenti tej esetében a kritikus határt, mert a normál pasztörözési eljárások ennél a mikrobaszámnál még kellő hatékonysággal alkalmazhatók.

A nem kellően hőkezelt tejek esetén, nyers tejből készült sajtok, alacsonyabb hőmérsékleten hőkezelt tejből készült termékek előállításakor fontos az Enterobacteriaceae családba tartozó mikrobák jelenlétének kizárása a feldolgozás előtt. Különösen lényeges a mikrobiológiai vizsgálat gyorsasága telepi begyűjtés esetén, mert egyetlen tejtermelő telep túlzott szennyezettségű tejének bekeverése a teljes mennyiséget tönkretelheti. Erre a problémára jelent megoldást az egyedi, gyors tejminősítés a termelés helyszínén vagy az üzemben, még az átvétel, ill. a feldolgozás előtt.

### 3.2.3. A nyers hússal szemben támasztott mikrobiológiai követelmények

Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól szóló 2073/2005/EK rendelet a 2.1. pontjában az aerob mikrobák számának meghatározását írja elő, amely jól tükrözi a valóságos összmikrobaszámot, mivel a teljes mikrobapopulációban ezekhez képest az obligát anaerob mikroorganizmusok aránya nagyságrendekkel kisebb.

Bár az egészséges vágóállatok húsa gyakorlatilag csíramentesnek tekinthető, mégis a vágás során elkerülhetetlenül szennyeződik bizonyos mikroorganizmusokkal. Feltételezzük, hogy egyes hústípusoknál (felsál, marhalábszár, marhanyak, darálthús) többé-kevésbé állandó a mikrobiota összetétele. A hús felületén aerob, belsejében anaerob körülmények uralkodnak. Következésképpen a nyers hús felületén aerob (*Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* nemzetségek), a belsejükben anaerob és fakultatív anaerob mikrobák (*Campylobacter*, *Salmonella*, enterobaktériumok) tudnak szaporodni (Deák, 2006).

### 3.3. Az élelmiszerrel érintkező felületek mikrobiológiai szennyezettsége

Az élelmiszerek szállítására, feldolgozására szolgáló edényzet, eszközök, gépek, berendezések, valamint az üzemi és tároló helyiségek fala, padozata állandó mikrobiológiai szennyezési forrás. Az eszközökön, berendezéseken, gyártó vonalakon kialakuló mikrobiota összetétele és nagyságrendje sok tényezőtől függ, és általában az üzemi higiénia fokmérője. A felületes, nem rendszeres, vagy nem megfelelő tisztítást, fertőtlenítést sok mikroorganizmus túléli. Vizes környezetben azonban, még körültekintően elvégzett fertőtlenítés esetén is, a felület (műanyag, beton vagy acél) és az alkalmazott fertőtlenítőszer minőségétől függően, a biofilmképződés védő szerepe miatt, kialakulhat ellenálló, akár patogén (*Salmonella*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Campylobacter*, enterohaemorrhagiás *E. coli*, *Listeria*) mikrobafajokból álló felületi mikroflóra, ami folyamatos kontaminációs forrást jelenthet az élelmiszer-feldolgozás folyamán (Joseph et al., 2001). A szokásos fertőtlenítésnek ellenálló mikroorganizmusokból alakul ki az üzemi mikroflóra, amely a gyártott termékeféleség szerint többnyire jellegzetes összetételű és a körülményekhez legjobban alkalmazkodott fajokból áll. Ez igen veszélyes specifikus szennyezési forrás (Deák, 2006).

Felületek, így az élelmiszer és a vele érintkező anyagok, érintkezésénél a mikroorganizmusok átvitele a donor felületekről, a recipiens felületekre történik. Az átvitel alapvetően a mikrobák számától és azoknak a különböző tulajdonságú felületekhez való kötődési képességétől függ. Ez utóbbit különböző külső (környezeti), illetve belső (mikrobiális) faktorok befolyásolják.

A külső faktorok közé tartoznak, a nyomásviszonyok, a nedvesség, a felületek fizikai minősége, húsiparban az élelmiszer zsír/hús aránya és az érintkezési idők. A legfontosabb belső faktorok a mikrobák extracelluláris struktúrái (fimbriák, csillók), a mikrobák felületét borító exopoliszacharid minősége, és az ezekből levezethető mikrobiális klaszter, illetve biofilmképződési erély.

A donor és recipiens felület között történő mikroorganizmus-átvitel jellemzésére az átviteli arány (transfer rate, TR) százalékban megadott értéke szolgál, ami a felületek érintkeztetése után a róluk kitenyészett mikrobák telepkepző egységeinek meghatározásából számolható, és jól jellemzi az adott gyártási környezetben lehetséges kontamináció mértékét (Pérez-Rodríguez et al., 2008).

Gyakorlati körülmények között az élelmiszerekkel érintkező felületek mikrobiológiai szennyezettségét vizsgálják, ami jó becslést ad az így lehetséges keresztszennyeződésre, az adott üzemi technológiai vonalra vonatkozó előírások betartásának pontosságára, a

higiéniai tisztaságára, a tisztítás, fertőtlenítés hatékonyságra. Ezzel az üzem vagy a technológiai vonal Jó Higiéniai Gyakorlatára (Good Hygienic Practice) és közvetve, a Jó Gyártási Gyakorlatának (Good Manufacturing Practice) meglétére, illetve hiányára is következtethetünk (Deák et al., 2006).

### **3.4. Mikrobiológiai ellenőrző módszerek**

#### **3.4.1. Klasszikus, tenyésztéses mikrobiológiai módszerek**

A hagyományos mikrobiológiai módszerek a *Listeria monocytogenes* és a *Salmonella* kimutatás esetén, beleértve a nem-szelektív elődúsítást, a szelektív dúsítást, a különböző szelektív és differenciáló táptalajokon történő tenyésztést, meglehetősen időigényes folyamatok. A gyanús telepeket biokémiai, szerológiai vizsgálatokkal meg kell erősíteni. Így a klasszikus szabvány szerinti módszerek időigénye több mint 7 nap is lehet (Patel et al., 2006).

Összcsíraszám meghatározás esetén 3 nap, Enterobacterium-szám meghatározás esetén 48 óra a standard módszer időigénye azonosítással együtt.

A meglehetősen hosszú vizsgálati idő miatt igény mutatkozott arra, hogy a mikrobák kimutatására szolgáló hagyományos élősejtszám-meghatározási módszereket jelentősen gyorsabb, és emellett automatizálható, új vizsgálati eljárásokkal váltsák fel.

#### **3.4.2. Gyors mikrobiológiai módszerek**

##### *3.4.2.1. Színreakción alapuló mérési módszerek*

A prokarióta sejtek anyagcseréjére jellemző hidrogén-transzport aktivitás redox indikátorokkal kimutatható. Az élő sejtek hidrogén-transzport rendszere a kék színű metilénkék indikátort reverzibilis reakcióban színtelen leuko-metilénkékké redukálja. A mikrobákat tartalmazó élelmiszert vagy szuszpenziót összekeverve megfelelő koncentrációjú metilénkék oldattal, az elszíntelenedési idő fordítottan arányos a mikroba-koncentrációval. Szoros korreláció az elszíntelenedési idő és a telepszám között azonban nem várható, mivel a különböző mikroorganizmusok eltérő redukációs aktivitással jellemezhetők, vagy néhány élelmiszer önmagában is képes a redukcióra, valamint az atmoszférikus oxigén abszorpciója csökkenti a redukció sebességét. A hátrányok ellenére

az egyszerű és gyors redukciós próbák tájékoztató jellegű telepszám becslésre alkalmasnak bizonyultak.

Az 1930-as évektől kezdődően metilénkék helyett egy másik redoxindikátor, a rezazurin terjedt el. Ennek előnye, hogy az oxidált forma kék színéből a redukált forma rózsaszín árnyalatába való átmenet sokkal gyorsabb, mint a metilénkék elszíntelenedése. Hátránya, hogy a módszer kevésbé standardizálható és a rezazurin fényérzékeny (Mossel et al., 1995). A redukciós próbáknál a tej és festék standard mennyiségeit (rendszerint 10 ml tejet és 1 ml festékoldatot) összekeverték és meghatározott hőmérsékleten inkubálták. A tejhez adott festékoldat (redox-indikátor) színváltozásának idejéből, vagy meghatározott idő alatt bekövetkező színváltozásából következtettek a tej csíraszámára. A metilénkék oxidált állapotban kék, redukált állapotban színtelen.

A redukciós próbákat elterjedten használták nyers tej, fermentált tejtermék (Garvie és Rowlands, 1952), jégkrém (Alexander és Rothwell, 1970; Anderson és Whitehead, 1974) és fagyasztott ételek (Kümmerlin, 1982) esetében.

#### 3.4.2.2. ATP biolumineszcencia mérés

Az ATP-luminometria egy olyan gyors biokémia módszer, mely a szentjánosbogár fénykibocsátásában is működő luciferin-luciferáz enzimrendszert alkalmazza (Deák et al., 2006). Az eljárás lényege, hogy a vizsgált mintához luciferáz enzimet adnak, az enzim reakcióba lép az élő szervezetek (mikroorganizmusok, állati sejtek) energiatároló komponensével (az ATP-vel) és világítani kezd.



A reakcióhoz szükség van ATP-re és a luciferin-luciferáz enzim szubsztrát rendszerre. A reakció során átmenetileg oxiluciferin-luciferáz-AMP komplex képződik, mely gyorsan bomlik, és az oxiluciferin a felszabaduló energiát foton formájában adja le. Összefoglalva: az enzimes reakció hatására a jelen lévő ATP fénykibocsátás mellett reagál. A folyamat során keletkező fényt egy készülék, az ún. luminométer, érzékeli és méri. Minél nagyobb a fényintenzitás, annál nagyobb az ATP-tartalom és annál nagyobb a szennyeződés mértéke (Stannard, 1989).

A módszert széles körben használják élelmiszer-ipari nyersanyagok (hal, hús, tej), késztermékek (italipar, tejipar), valamint víz vizsgálatára; leggyakrabban azonban a felületek higiéniai ellenőrzésére, ahol néhány perc alatt megoldható a tisztítás-fertőtlenítés

hatásfokának kontrollja. Felületek esetében, adott üzemi környezetben, a módszer gyorsan, jó becslést ad a szennyezettség mértékére, így a valós idejű monitorozás értékes eszköze.

A módszer alkalmazhatóságának egyik korlátja alacsony specifikussága, hiszen a növényi és állati sejtekben a mikroba eredetűnél lényegesen nagyobb koncentrációban van ATP (Deák, 2006). Másik korlátja, a kismértékű érzékenysége; így például felületek mikrobás szennyezettségét tekintve  $10^4$  cfu/100 cm<sup>2</sup> kimutatási határral számolhatunk (Davidson et al., 1999).

A készülék (a luminométer) a folyamat során keletkező fényt érzékeli és méri. Minél erősebb a fényintenzitás, annál magasabb az ATP-tartalom és annál nagyobb a szennyeződés. A mérés rendkívül érzékeny, hiszen  $10^{-13}$  g ATP már kimutatható.

Az ATP gyors higiéniai mérőkészülékkel megfelelő minta-előkészítés után rövid idő (mintegy 5 másodperc) alatt eredményt kapunk a mintázott felület higiéniai állapotáról. A mérés csak arról ad tájékoztatást, hogy a felület tiszta-e vagy sem, azt azonban nem képes kimutatni, hogy mennyire és milyen baktériummal szennyezett. Ha pontosan azonosítani akarják a kórokozót, a minta előkészítéséhez szükséges idő miatt az eljárás tovább tart (Deák, 2006).

Nyersanyagok (hal, hús, tej), késztermékek (italipar, tejipar) valamint víz vizsgálatára is alkalmas a gyors teszt. Élelmiszerek vizsgálatánál azonban a növényi és állati sejtekben a mikroba eredetűnél lényegesen nagyobb koncentrációban van ATP. Ilyenkor detergenssel való előkezelés után lehet csak elkülöníteni a mintában levő mikroba-, illetve növényi vagy állati eredetű ATP-t.

#### 3.4.2.3.. Impedimetriás módszerek

E vizsgálati módszerek alapja, hogy miközben a mikroorganizmusok a tápközegben szaporodnak, metabolizmusuk során a töltés nélküli, vagy gyenge töltéssel rendelkező szubsztrátot kis molekulatömegű, nagy töltésű molekulákká (pl. aminosavak, tejsav) alakítják, megváltoztatva ezzel a tápközeg impedanciáját (váltóáramú ellenállását), illetve vezetőképességét. E két jellemző változásának folyamatos mérésével (az oldatba merülő elektród segítségével), adott hőmérsékleten, következtetni lehet a mikrobák szaporodására. A mérés során a mérőkészülék meghatározza az ún. detekciós időt (TTD, time to detection), amely alatt a mikrobaszaporodás által okozott változás egy bizonyos küszöbértéket elér. A TTD fordítottan arányos a minta eredeti mikrobaszámával, és függ a kezdeti mikrobaszámtól, a vizsgált mikroorganizmus szaporodási kinetikájától, valamint a tápközeg tulajdonságaitól. Mivel a TTD és a kezdeti élősejtszám logaritmus (lgN) között  $10^3$ - $10^7$  sejt/ml koncentráció tartományban lineáris az összefüggés, a kalibrációs görbe meghatározása után, ennek

használatával, a detekciós időkből a kezdeti élősejtszámra következtethetünk. A kiindulási sejtszámtól függően akár néhány órán belül eredményeket kaphatunk

Az impedimetriás mérési technikát élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatokban az 1980-as évek második felétől már széleskörűen alkalmazták, tej összmikrobaszám vagy borélesztők kimutatására (Nieuwenhof and Hoolwerf, 1987).

A táptalaj kezdeti impedanciáját az oldat összetétele határozza meg. Nagy sókoncentrációjú oldatok esetén (pl. *Salmonella*-, *Listeria*-szelektív táptalajok) a mikroorganizmusok szaporodása kis impedancia változást eredményez. Ezekben az esetekben a tápközeg impedanciájának változása közvetlenül csak bizonytalanul mérhető, ehelyett indirekt mérés alkalmazható. Az indirekt mérés során a képződő CO<sub>2</sub>-t vezetik a tápoldattól elkülönített – lúgos oldattal töltött – mérőcellába, és a CO<sub>2</sub> hatására bekövetkező impedancia változást mérik (Bolton, 1990; Deak és Beuchat, 1993a,b; Timms et al., 1996).

Az impedimetriás módszer előnye a gyors eredmény, az automatikus kiértékelés és az alacsony működési költség. Nagy sókoncentrációjú tápoldat impedancia mérésre közvetlenül azonban nem használható, az indirekt módszernek pedig gátat szab, hogy nem minden mikroorganizmus termel a szaporodás során CO<sub>2</sub>-ot.

A jelentős előnyök mellett az impedimetriás módszer további korlátai közé tartozik, hogy kis élősejt koncentrációknál megbízhatatlan; 10<sup>2</sup> sejt/ml alatt a kiindulási sejtkoncentráció csak nagyon pontatlanul becsülhető, a kalibrációs görbéket nem lehet meghatározni. Mivel az impedancia függ a mérőcella alakjától, ezért a mérés csak a speciálisan kialakított mérőcellában végezhető el, így a minta mennyisége meghatározott. További hátrány, hogy az impedancia erősen hőmérsékletfüggő. A mért jel hőmérsékletérzékenysége igen nagy, ezért nagy pontosságú (±0,002 °C), költséges termosztát alkalmazását teszi szükségessé.

#### 3.4.2.4. Redoxpotenciál-mérés

A redoxpotenciál-mérésen alapuló módszer lényege, hogy a mikroorganizmusok szaporodását a tápközeg redoxpotenciál-változásának mérése alapján detektálja. A mért érték változásának kiértékelése lehetőséget teremt a vizsgált minták élősejtszámának az impedimetriás módszereknél nagyobb tartományú meghatározására (Reichart et al., 2007).

A mikrobák energiaforrása a biológiai rendszerekben általánosan elterjedt biológiai oxidáció, melynek során a környezetüket, részben az oxigén-felhasználás, részben a redukáló anyagok felszaporodása révén, redukálják.

A mikrobaszaporodás széles redoxpotenciál-tartományban lehetséges, az egyes mikroorganizmusok szaporodásuk redoxpotenciál-tartománya, illetve az azt befolyásoló oxigénhez való viszonyuk szerint négy alapvető csoportba sorolhatók:

1. Az *obligát aerob* mikroorganizmusok aerob légzést végeznek, energiájuk nagy részét az oxidatív foszforilációból nyerik, oxigént használva terminális elektron akceptorként. Szaporodásukhoz oxigént és nagy redoxpotenciálú (300 mV-ot elérő, vagy meghaladó) közeget igényelnek.
2. Az *obligát anaerob* mikroorganizmusok csak negatív redoxpotenciálú közegben képesek szaporodni, az oxigén teljes kizárásával. Szaporodásuk redoxpotenciál tartománya -300 mV alatti.
3. A *fakultatív anaerob* mikroorganizmusok mind aerob, mind anaerob környezetben szaporodnak. A környezet redoxpotenciálja függvényében energiájukat aerob légzés vagy erjesztés útján nyerik.
4. Az *aerotoleráns anaerob* mikroorganizmusok bár aerob légzésre képtelenek, ennek ellenére oxigén jelenlétében is szaporodnak.

A mikroorganizmusok előbb említett anyagcsere-tulajdonságaiból következik, hogy adott hőmérsékleten, adott kezdeti pH viszonyok mellett, zárt rendszerben, a redoxpotenciál-változás mérése jó jelzője lehet a mikrobiális anyagcsere intenzitásának és jellegének mérésére, és hogy az intenzitás függ a kiindulási élősejtszámtól, míg a jelleg az adott mikrobacsoportra, illetve fajra lehet jellemző.

Ezt használjuk ki a redoxpotenciál-változás mérésén alapuló módszerben. A fentiek értelmében, a mikroorganizmusok szaporodása következtében a környezet (táptalaj) redoxpotenciálja csökken, és a redoxpotenciál-változás görbéje jellemző az adott mikroorganizmusra (Reichart et al., 2007).

A mikrobaszaporodást kísérő redoxpotenciál-csökkenés mérése alkalmas lehet a mikrobiális aktivitás kimutatása mellett az élősejtszám becslésére is. Erre vonatkozóan a 20. század első harmadától kezdődően festék-redukciós próbák terjedtek el, döntően a tej mikrobiológiai állapotának relatíve gyors meghatározására.

A mikroorganizmusok redukciós aktivitásán alapuló meghatározási módszerek elméleti hátterének és történetének kitűnő összefoglalását adja Kroll (1989).

A redoxpotenciál mérhető egy inert fém elektród (általában platina) és egy vonatkoztatási elektród alkalmazásával. Elvileg a vonatkoztatási elektród a normál hidrogén elektród; a gyakorlatban azonban kalomel, vagy más referencia elektródot használunk, amelynek a normál hidrogén-elektrodra vonatkoztatott potenciálja ismert. Ma már gyakorlatilag kombinált

redox-elektrodákat használunk, melyeknél a mérő és a vonatkoztatási elektrodákat egyetlen elektrod- testbe építették be.

A SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék és a Budapesti Corvinus Egyetem Élelmiszer-tudományi Kar, Fizika-automatizálás Tanszék munkatársai által kifejlesztett és szabadalmaztatott eljárás (Reichart et al., 2005) és annak megvalósítását szolgáló MICROTESTER nevű berendezés a közeg redoxpotenciáljának mérése alapján teszi lehetővé a minta mikrobaszámának gyors meghatározását. A mérési eljárás elméleti alapjait, műszaki megvalósítását és kóliform mikrobák meghatározására történő validálását Reichart és munkatársai (2007) ismertették.

A redoxpotenciál változása független a mérőcella alakjától, méretétől és széles körben a táptalaj összetételétől, ezért a mérés tetszőleges mennyiségű mintával, bármely folyékony tápközegben elvégezhető. Ennek megfelelően a MICROTESTER az impedimetriás mérés technikában alkalmazott összes vizsgálaton túl lehetővé teszi szabványos mikrobiológiai eljárásokban alkalmazott táptalajok felhasználását és membránszűrőn koncentrált mikroorganizmusok számának meghatározását is.

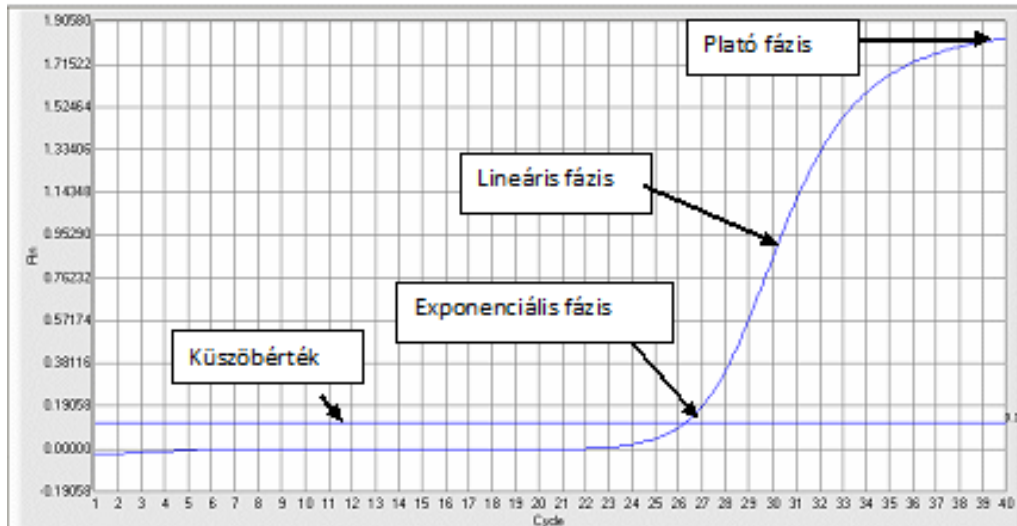
A tápleves redoxpotenciál értékét a hőmérséklet ingadozása csak kismértékben befolyásolja. 1°C hőmérséklet-emelkedés tápközegtől függően 0,5-1,5 mV csökkenést eredményez, ami termosztált közeg esetében messze elmarad a detektációs kritériumként előírt 5-10 mV/10 perc változástól. A módszer nem igényli az impedancia méréshez előírt nagy pontosságú termosztátok alkalmazását, elegendő a normál mikrobiológiai gyakorlatban alkalmazott  $\pm 0,5^\circ\text{C}$  pontosságú vízfürdők felhasználása a mérőcellák termosztálásához.

#### *3.4.2.5. PCR-módszerek*

A polimeráz-lánreakció (PCR) a DNS enzimatisz amplifikálására használt molekuláris biológiai technológia. Lehetővé teszi a DNS kis darabjainak megsokszorozását analízis céljából. Általánosan használt módszer élettani kutatásokban vagy egészségügyi laboratóriumokban pl. örökletes betegségek, fertőző betegségek kimutatására. Adott DNS szakaszról a másolatok DNS-polimeráz enzim segítségével készülnek, mely reakció három lépésből áll: A duplaszálú templát DNS szálainak elválasztása hődenaturációval, a hőmérséklet csökkentésével a primerek templát DNS-hez kapcsolása és végül az egyszálúvá denaturált templáthoz kapcsolódó primerek végeinek meghosszabbítása polimeráz enzim segítségével, miközben a templát elkészíti a DNS kiegészítő szálát. A második és harmadik lépés ismétlésével a polimeráz az újonnan elkészített szálakat templátként használja. Az így keletkezett DNS mennyisége exponenciálisan növekedik.



Optimális esetben, az exponenciális szakaszban a DNS mennyisége a reakcióelegyben minden egyes PCR ciklusban duplázódik, így 25-30 ciklus után  $10^7$ -szerese az eredeti elegy DNS tartalmának. A keletkezett végtermék ezután gélelektroforézissel vizsgálható. Az amplifikációs görbe szakaszait az 1. ábra szemlélteti.



**1. ábra** Az amplifikációs görbe szakaszai

- Exponenciális fázis: a felsokszorozni kívánt nukleotidszekvencia mennyisége minden egyes ciklusban elvileg megduplázódik. A folyamat a célszekvenciára nézve specifikus és pontos.
- Lineáris fázis: a reakció fokozatosan lassul, a képződött termék ugyanakkor elkezd degradálódni.
- Plató fázis (végpont: a hagyományos PCR detektálási pontja): a reakció leáll, több termék képződése már nem figyelhető meg. A képződött termék egy idő után degradálódik.

Minél nagyobb a cél-szekvencia (target) kiindulási kópiaszáma, a jelintézés annál korábban lépi át a detektációs küszöbértéket. Az ehhez szükséges ciklusszám: CT.

Real-Time PCR vizsgálat során a végtermék felsokszorozódása ciklusról ciklusra végigkövethető, így lehetőség nyílik amplifikációs és PCR-kinetikai görbék felvételére. A detektálás fluorimetriás úton történik, ennek valamely fluoreszcenciás jelzési technika használata az előfeltétele. A PCR-termék szekvenciaspecifikus kimutatása speciális fluoreszcens próbákkal megvalósítható. A hibridizációs próbapár két különböző fluoreszcens festékkel jelölt oligonukleotid, mely a PCR-termékre 1-3 nukleotid távolságban hibridizál. Az

akceptor festéket a gerjesztett donor festék fluoreszcens rezonancia energia transzfer révén gerjeszti, melynek fényemissziója detektálható. A real-time PCR készülékek különböző hullámhosszú fluoreszkáló jeleket képesek detektálni, különböző hullámhosszú gerjesztési forrást (LED, lézer) tartalmaznak. A kívánt PCR-termék megfelelő pozitív kontroll jelenlétében azonosítható, így nem szükséges gélelektroforézissel ellenőrizni (Mackay és Sakzewski, 2007).

Molekuláris módszerekkel, mint a PCR-reakcióval gyorsan kimutathatók és azonosíthatók a patogén mikrobák az élelmiszerben (Rijpens and Herman, 2002). A különböző PCR módszerek közül a real-time PCR érzékenysége megegyezik a tenyésztéses módszerekével, és lehetővé teszi a komplett kimutatást a dúsítás időtartamával együtt kevesebb, mint 48 óra alatt (Navas et al., 2006). Bár az új módszerek érzékenysége szignifikánsan nőtt, a dúsítás fázisa nem hagyható el az alacsony patogénszám és a holt sejtek detektálásának kockázata miatt. A dúsításnak nem csak a kimutatni kívánt mikrobák számának növelése, hanem a sérült és stresszelt sejtek reszuscitálása is célja (Lantz et al., 1994; Peng and Shelef, 2000; Norton, 2002; O'Grady et al., 2009). Szelektív dúsításra van szükség, hogy a természetes kísérő mikroflórát gátoljuk, valamint növeljük a kimutatási hatékonyságot és csökkentsük a fals negatív eredmény lehetőségét (Garrido et al. 2013). A PCR-technika által igényelt 1 ml mintamennyiség sem teszi lehetővé a direkt meghatározást a 2073/2005/EK rendeletben előírt élelmiszerbiztonsági kritériumoknak megfelelően, miszerint 25 g minta nem tartalmazhat *L. monocytogenes* vagy *Salmonellát*. PCR vizsgálat kezdete előtt így a minta mikrobaszámát növelni kell, hasonlóan a klasszikus tenyésztéses módszerhez, szelektív dúsítással. A dúsító lépés szükségessége függ a minta mikrobakoncentrációjától, de független a PCR kit fajtájától.

Dúsítás után a patogén mikrobák akár tenyésztéssel, akár PCR-vizsgálattal kimutathatók. A tenyésztéses módszer időigényes, míg a PCR-vizsgálat drága, használatának a költség és a mintamennyiség szabhat határt (Rodríguez-Lázaro et al., 2004).

### **3.5 Jogsabályi vonatkozások**

A 178/2002/EK rendelet meghatározza az általános élelmiszer-biztonsági követelményeket, amelyek szerint nem kerülhet élelmiszer-forgalmazásra az az élelmiszer, amely nem biztonságos.

Az Európai Parlament és a Tanács 853/2004/EK rendelete az állati eredetű élelmiszerek különleges higiéniai szabályainak megállapításáról, tartalmazza a nyers tejre vonatkozó követelményeket.

A 2073/2005/EK rendelet mikrobiológiai kritériumokat állít fel egyes mikroorganizmusokra és megállapítja azokat a végrehajtási szabályokat, amelyeket az élelmiszeripari vállalkozónak a 852/2004/EK rendelet alapján be kell tartani.

A 2073/2005/EK rendelet szerint: „az előállítási és a feldolgozási környezetből történő mintavétel hasznos eszköz lehet az élelmiszerekben lévő kórokozó mikroorganizmusok azonosítására és jelenlétük kiküszöbölésére”.

A 4/1998 EüM rendelet előírásai szerint kell a mikrobiológiai élelmiszer-biztonság szempontjából vizsgálni és elbírálni az élelmiszerrel kapcsolatos tevékenység során használt berendezést, felszerelést, gépet, munkaeszközt, élelmiszerrel közvetlenül érintkező munkafelületet és csomagolóanyagot, valamint az élelmiszerrel kapcsolatos tevékenységet végző személy tisztaságát. Mindezt a rendelet 3. számú melléklete szabályozza, melynek értelmében az élelmiszerrel közvetlenül érintkező felület 10x10 cm területét, ennél kisebb felületű eszközknél a teljes felületet vizsgálva tisztítás, fertőtlenítés után, a felületnek meg kell felelnie a következő követelményeknek: minősített kórokozót nem tartalmaz, és nem tartalmaz az 1. számú mellékletben felsorolt, Enterobacteriaceae családba tartozó mikroorganizmust, *Enterococcus faecalis*t, sarjadzó vagy fonalas gombát. Munkavégzés előtt vizsgálva a felület nem lehet szennyezett kórokozó mikroorganizmussal. A munkavégzés közben vett minta szennyezettségének értékelésénél figyelembe kell venni a végzett munka jellegét.

## 4. Anyagok és módszerek

### 4.1. Klasszikus mikrobiológiai módszerek

#### 4.1.1. Szabványos módszerek

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

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

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

Felületek vizsgálata tamponos mintavétellel: MSZ ISO 18593:2008.

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

#### 4.1.2. A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok

A vizsgálataimban a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszék Mikrobiológiai Laboratóriumának törzsgyűjteményéből származó következő mikrobákat használtam:

<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19111)	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC6380)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	<i>Klebsiella oxytoca</i> (ATCC700324)
<i>Listeria monocytogenes</i> (NCAIM B1935)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC10536)
<i>Listeria ivanovii</i> (ATCC 19119)	<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC8090)
<i>Listeria innocua</i> (ATCC 33090)	S. Enteritidis (NCAIM B.01908)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12600)	S. Typhimurium (ATCC13311)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 105369)	<i>Bacillus cereus</i> (NCAIM B1827)
<i>Bacillus subtilis</i> (NCAIM B1095)	

A NÉBIH ÉTbI Élelmiszer Mikrobiológiai Nemzeti Salmonella Referencia Laboratórium által különböző élelmiszerekből izolált *Salmonella* szerotípusok a következők voltak:

S. Bredeney	S. Newport
S. Cerro	S. Ohio
S. Cottbus	S. Saintpaul
S. Enteritidis	S. Senftenberg
S. Infantis	S. Stanley
S. Kentucky	S. Thompson

S. Livingstone  
S. Montevideo

S. Typhimurium  
S. Tennessee

#### 4.1.3. Felhasznált táptalajok

Kísérleteim során az alábbi táptalajokat használtam:

- PC (Plate Count) agar (Merck 105463)
- VRBG (Violet Red Bile Glucose) agar (Merck 110275)
- XLD (Xilóz-Lizin-Dezoxikolát) agar (Merck 105287)
- BPLS (Brillantzöld, Fenolvörös, Laktóz, Szaharóz) agar (Merck 107237)
- ALOA (Ottaviani-Agostini) agar (Merck 100427)
- Oxford agar (Merck 107004)
- Fraser broth (Merck 110398)
- RVS (Rappaport-Vasiliadis) broth (Merck 110236)
- TSYEA (Trypton, szója, élesztőkivonat) agar (Merck 100454)
- EE (Enterobacter enrichment) broth (Merck 105403)
- Peptonvíz (Merck 107228).

#### 4.1.4. *Salmonella*-kimutatás

A *Salmonella*-kimutatást az MSZ EN ISO 6579 szabvány szerint végeztem. A fontosabb lépések a 2. ábrán láthatók.



2. ábra A *Salmonella*-kimutatás egyszerűsített folyamatábrája

#### 4.1.5. *Listeria monocytogenes* kimutatása

MSZ EN ISO 11290-1 szabvány szerint végeztem.



3. ábra A *Listeria monocytogenes* kimutatás egyszerűsített folyamatábrája

#### 4.1.6. Összcsíraszám-meghatározás

Különböző helyekről származó (piac, tehenészeti telepek) tejminták vizsgálata és a Bercsényi Miklós Szakközépiskola húsüzemében vörösáru gyártás közben, több alkalommal vett minták vizsgálata az MSZ EN ISO 4833 szerint történt.

#### 4.1.7. Az Enterobacterium-szám meghatározása

Húsüzemből származó vörösáru minták, valamint nyerstejminták Enterobacterium-számának meghatározása az MSZ ISO 21528-2 alapján, VRBG táptalajon, 37°C –on, 24 órán át történő inkubációval végeztem.

#### 4.1.8. Környezethigiéniai vizsgálatok, mikrobaszám-meghatározás lemezöntéssel

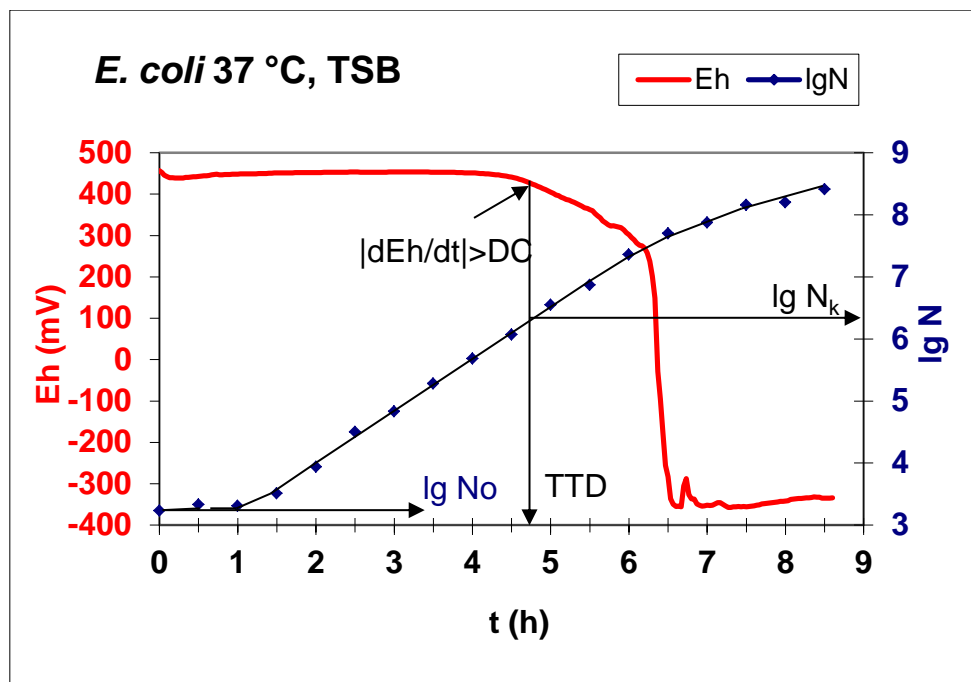
A sejszámok lemezöntéssel való meghatározásához, tamponmintákat hígító folyadékot (steril peptonvíz) tartalmazó kémcsövekbe helyeztem, majd a pálcá elvágása után aseptikusan lezártam. A csövek tartalmát ezután 30 másodpercig, VELP Scientifica Rx<sup>3</sup> típusú kémcsőrázóval kevertem, majd ezekből tízes alapú hígítási sort készítettem. Az összcsíraszám meghatározásához, PC agart, az Enterobacteriaceae-szám meghatározásához VRBG agart használtam a megfelelő szabványok szerint. Az inkubációs idő és hőmérséklet 72 óra, 30 °C az összcsíraszám, és 24 óra, 37 °C az Enterobacteriaceae-szám meghatározás esetén.

## 4.2. Redoxpotenciál-mérés

A leírást a Microtest Kft. által forgalmazott redoxpotenciál-mérő berendezés kézikönyve (MICROTESTER Kezelési Kézikönyv, 2013) alapján állítottam össze.

### 4.2.1. A mérési módszer elvi alapjai

A mérési eljárás elvi alapja az, hogy a baktériumok szaporodása folyamán az energia-termelő biológiai oxidációs reakciók eredményeként a környezet redoxpotenciálja egy meghatározott mikroba koncentráció felett jól detektálhatóan csökken. A mérés során végbemenő mikrobaszaporodást, redoxpotenciál-változást és a jellemző paramétereket a 4. ábra szemlélteti.



4. ábra *Escherichia coli* szaporodási és redoxgörbéje

Definíciók:

- Szaporodási görbe:  
Élő sejt koncentráció logaritmusa ( $\lg N$ ) az idő ( $t$ ) függvényében ábrázolva.
- Redoxgörbe:  
Normál hidrogén-elektrodra vonatkoztatott elektród-potenciál ( $E_h$ ) az idő ( $t$ ) függvényében ábrázolva.
- Detektációs idő (TTD) és detektációs kritérium (DC)

Detektációs időnek (TTD, Time to Detection) tekintjük azt az időpontot, amikor a redoxpotenciál-változás sebességének abszolút értéke egy, a véletlen hatásoktól szignifikánsan különböző, DC detektációs kritériumot (pl. DC =  $|dE/dt| = 0,5 \text{ mV/perc}$ ) meghalad.

A redoxpotenciál-csökkenés kritikus mértéke (detektációs kritérium) mikroba típusonként változik, *Escherichia coli* esetében  $\Delta E_r/\Delta t = -1 \text{ mV/min}$ .

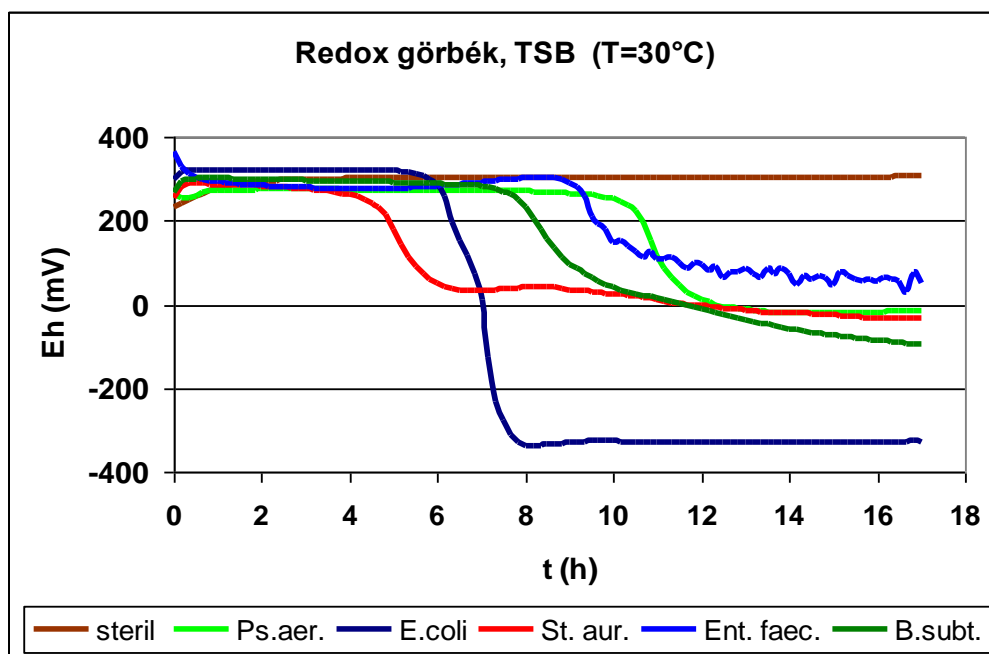
Az ábrán a kritikus redoxpotenciál csökkenéshez tartozó  $\lg N$  érték 4,7 óránál ( $\lg N = 6,2$ ;  $N = 1,6 \times 10^6 \text{ cfu/ml}$ )

- $\lg N_0$  és  $\lg N_k$

A kiindulási és a TTD-hez tartozó élő sejt koncentrációk logaritmusai.

#### 4.2.1.1. Redoxgörbe

A redoxpotenciál-mérésre alapozott vizsgálat lényeges előnye, hogy az eltérő mikrobacsoportok redoxgörbéi különböznek egymástól, ezáltal a módszer esetenként lehetőséget teremt a szaporodás detektálása mellett a szaporodó mikrobák tájékoztató jellegű azonosítására is. A redoxgörbék különbözőségét szemlélteti az 5. ábra.

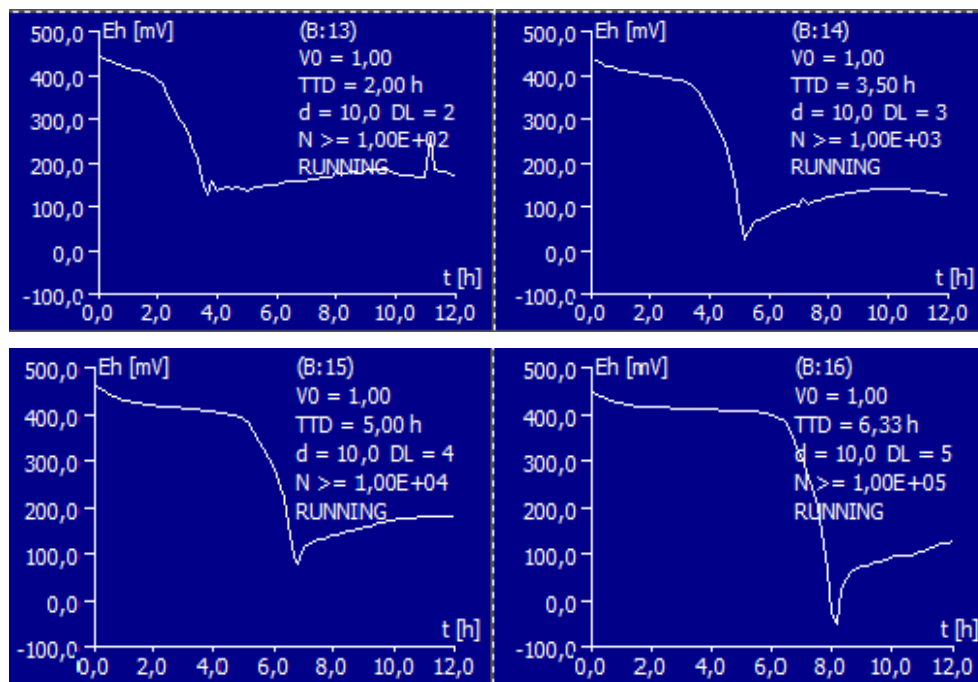


**5. ábra** Néhány baktérium redoxgörbéje Tripton-szója levesben

A mikrobákkal beoltott táptalajt tartalmazó mérőcellákban a redoxpotenciál változását mérve, a műszer automatikusan felveszi a redoxgörbéket, meghatározza a detektációs időket és a

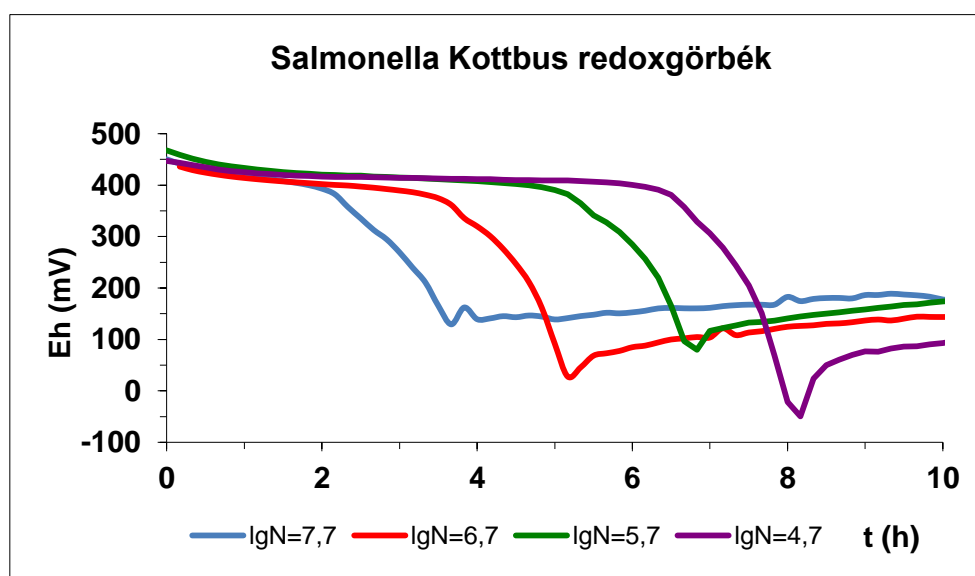


mérés egyéb paramétereivel együtt kiírja a képernyőre. A 6. ábrán *Salmonella* Kottbus hígítási sorával felvett redoxgörbék láthatóak.



6. ábra *Salmonella* Kottbus redoxgörbéi

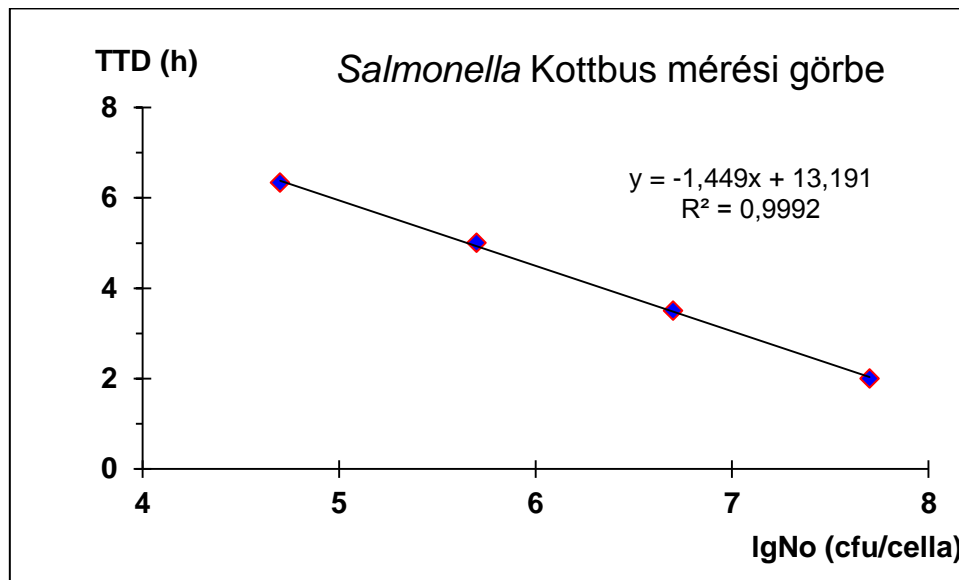
Gyakorlatban a műszer a TTD értékeket néhány óra alatt online meghatározza, míg a klasszikus tenyésztéses sejtszám eredményekre esetenként napokat is várni kell. A redoxgörbék kiindulási sejtszámtól való függését a 7. ábra szemlélteti.



7. ábra *Salmonella* Kottbus redoxgörbék a kiindulási sejtkoncentráció függvényében

#### 4.2.1.2. Mérési görbe

Meghatározva az egyes hígításokhoz tartozó induló mikrobaszámot, szoros lineáris korreláció állapítható meg a TTD értékek és a kezdeti sejtszámok logaritmus (lg N<sub>0</sub>) között. Az összetartozó TTD – lgN<sub>0</sub> értékpárokból lineáris regresszióval kiszámított összefüggés adja a mérési görbe egyenletét (8. ábra).



8. ábra *Salmonella Kottbus* mérési görbéje

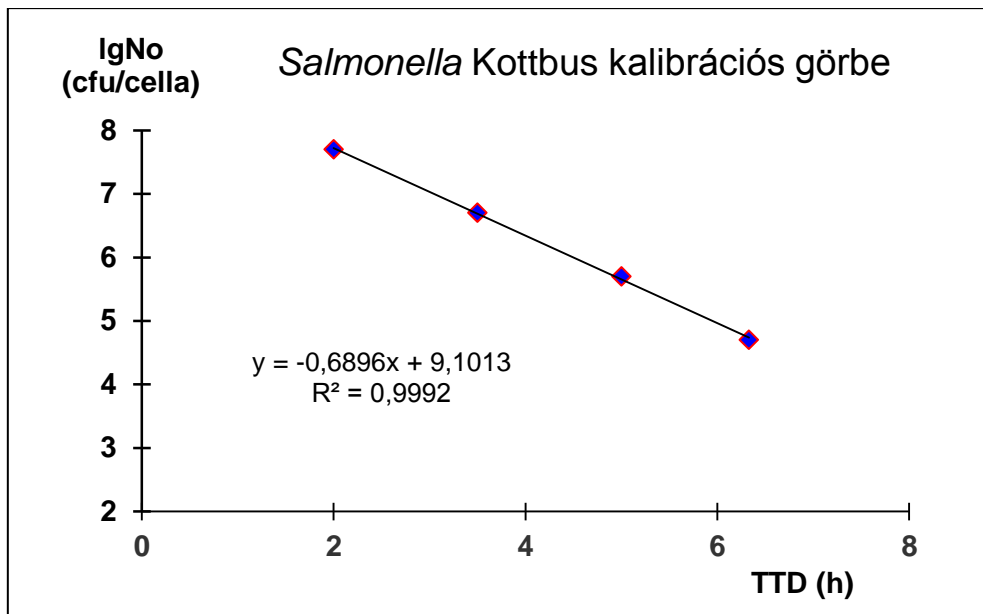
Mérési görbe:

$$TTD = a \cdot \lg N_0 + b$$

A mérési görbe jól szemlélteti a detektációs idő sejt-koncentrációtól való függését, lehetővé teszi a környezeti tényezők szaporodásra kifejtett hatásának értékelését, valamint a mérési módszer teljesítmény-jellemzőinek (mérési tartomány, linearitás, érzékenység, véletlen hiba, stb.) becslését. Az egyetlen sejt ( $\lg N_0=0$ ) kimutatásához szükséges idő a mérési görbe tengelymetszetéből számítható.

#### 4.2.1.3. Külső kalibrációs görbe

A detektációs idő és a kezdeti sejtkoncentráció logaritmus között fennálló szoros linearitás a továbbiakban felhasználható a kiindulási sejtkoncentráció TTD alapon történő meghatározásához. Az összefüggést a kalibrációs görbe reprezentálja (9. ábra)



9. ábra *Salmonella* Kottbus kalibrációs görbéje

Kalibrációs görbe:  $IgN_0 = A \cdot TTD + B,$

Elvileg felmerül a lehetősége, hogy a kalibrációs görbe paramétereit a mérési görbe paramétereiből határozzuk meg ( $A = 1/a$ ,  $B = -b/a$ ).

A regressziós egyenletek fenti átszámíthatósága azonban csak akkor alkalmazható, ha függvénykapcsolatról van szó, azaz  $R^2=1$ . Ekkor a két meredekség szorzata:  $a \cdot A=1$ .

Statisztikus kapcsolatnál az  $Y=a \cdot X+b$  és  $X=A \cdot Y+B$  regressziós egyenletekből meghatározott meredekségek szorzata:  $a \cdot A = R^2$ , s az átszámítás:  $A = R^2/a$ ,  $B = X_{\text{ÁTLAG}} - A \cdot Y_{\text{ÁTLAG}}$  (Sváb, 1981).

Tekintettel arra, hogy esetünkben mindig statisztikus kapcsolatról van szó, és a véletlen hiba értékére is szükségünk van, a mérési és a kalibrációs görbéket azonos adatpárok esetén is külön regresszióval határoztuk meg.

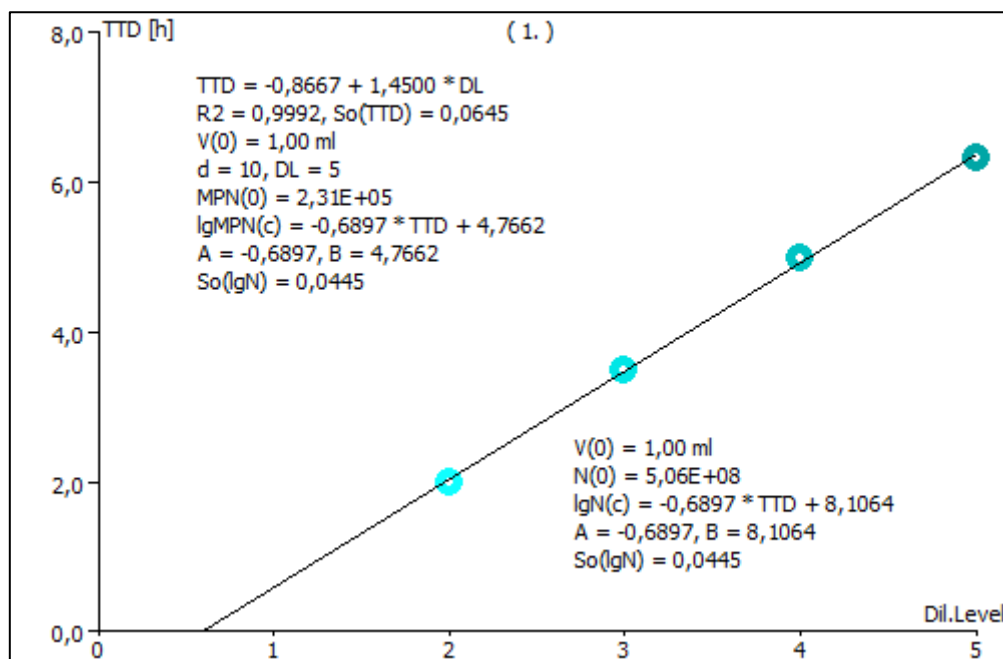
**A** értéke mindig negatív, mértékegysége attól függ, hogy a TTD értékeket percben vagy órában fejeztük ki. **A** és **B** értékét betáplálva a programba, lehetőségünk van a vizsgált minták elősejtszámának automatikus meghatározására. Az elősejtszám mértékegysége (cfu/ml, sejt/g, stb.) attól függ, hogy a kalibrációs görbe felvételekor az  $N_0$  értékeket hogyan adtuk meg.

A kalibrációs egyenlettel meghatározott lgN érték mindig a mérőcellára vonatkozik. A minta mikrobaszámát a bemérések és hígítások figyelembe vételével a szoftver automatikusan kiszámolja és kijelzi.

#### 4.2.1.4. Belső kalibrációs görbe

Ezt a módszert akkor alkalmazzuk, amikor nem tudunk előzetesen felvett kalibrációs görbét használni, mert a mikroflóra összetétele nem ismert. Ebben az esetben a mintából 10-es léptékű hígítási sort készítünk úgy, hogy az utolsó hígítás(ok)ban már ne legyen élősejt kimutatható (MPN módszer). A hígítási sor minden tagját mérőcellába oltjuk és műszeresen meghatározzuk a TTD értékeket. A szoftver automatikusan tárolja a különböző hígítási szintekhez tartozó TTD értékeket, és az utolsó még pozitív (TTD-t adó) hígítás függvényében kiszámítja a hígítatlan minta legvalószínűbb mikrobaszámát, MPN(0). Az ábrázolási formát MPN üzemmódra állítva a képernyőn megjelenik az MPN görbe, amely a TTD értékeket ábrázolja a hígítási szintek függvényében (10. ábra).

A belső kalibrációs görbe felvételével lehetőségünk van teljesen ismeretlen minták mikrobaszámának tájékoztató jellegű meghatározására. A módszer szelektivitását a választott tápközeg határozza meg.



10. ábra *Salmonella* Kottbus MPN görbéje

A szoftver a képernyő bal felső részére kiírja a TTD görbe egyenletét, a regresszió statisztikai paramétereit, a V(0) mintatérfogatot, a d hígítási léptéket, a DL hígítási szintet, a

hígíthatlan minta mikrobaszámát, MPN(0), a mérési cellára vonatkozó IgMPN(c) kalibrációs görbe egyenletét és annak parametereit, valamint az egyenes körüli szórás So(IgN) értékét.

Utólag betáplálva a gépbe a (referencia-módszerrel) meghatározott kiindulási mikrobaszámot, a szoftver automatikusan átszámítja az MPN kalibrációt IgN kalibrációra, az eredményt az ábra jobb alsó sarkában kijelzi. A továbbiakban a kalibrációs görbe külső kalibrációs görbéként egyedi minták mikrobaszámának meghatározására is használható.

Kimutatási határ és méréstartomány (Reichart et al., 2007):

A módszer elméleti kimutatási határa: 1 sejt/ mérőcella.

Lineáris méréstartománya: IgN(c) = 1 - 8

#### **4.2.2. A mérőrendszer leírása**

A méréseket a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékén lévő 2 modulós, 32 csatornás berendezéssel végeztük.

A rendszer működtetéséhez szükséges egy IBM-kompatibilis személyi számítógép szabványos RS232C interfésszel (COM port), vagy USB porttal, konverter kábelen keresztül.

A hardver irányítás szempontjából a PC konfigurációja nem kritikus, a vezérlő és adatfeldolgozó szoftver szempontjából ajánlott minimális konfiguráció:

P4 processzor (min. Celeron 300 MHz), RAM  $\geq$  256 Mb, HDD  $\geq$  10 Gb, CD-olvasó, WinXP vagy Windows7 operációs rendszer.

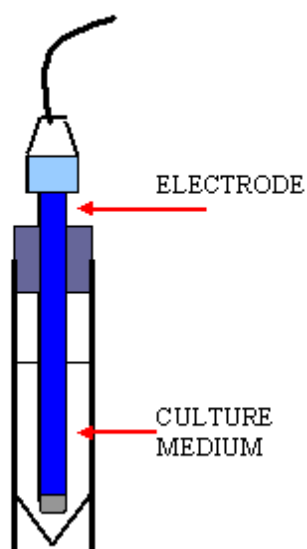
Egy 16 csatornás kiépítésű mérőrendszert mutat be a 11. ábra.



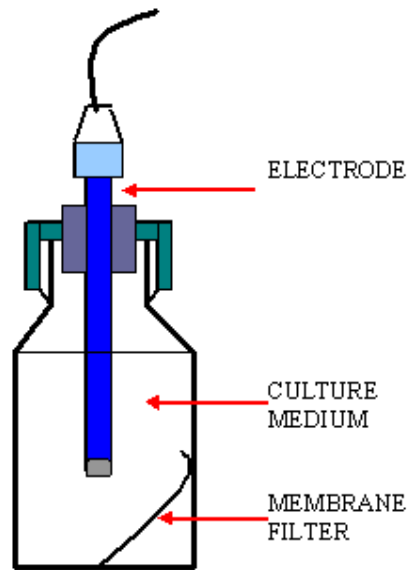
**11. ábra** 1 modulós, 16 csatornás MICROTASTER mérőrendszer

A mérésekhez különféle cellatípusok alkalmazhatók:

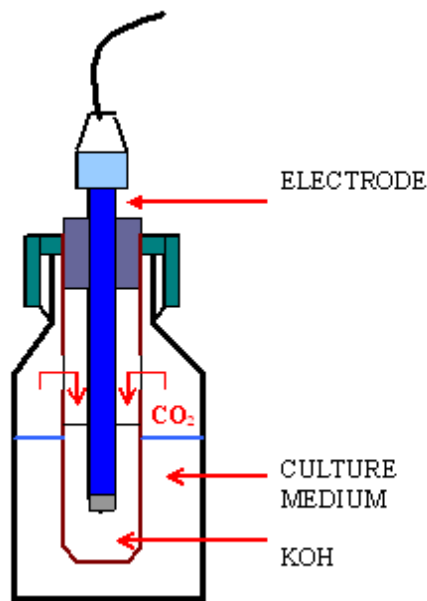
- Kémcsöves mérőcella (12. ábra). Kis térfogatú minták mérésére (egy membránszűrővel). (Műanyag kivitelben, 30 és 50 ml térfogattal is készül.)
- Membránszűrők mérésére alkalmas mérőcella (13. ábra).
- Indirekt mérőcella (14. ábra). A képződő széndioxid detektálásán alapuló mérésre szolgál.



**12. ábra** Kémcsöves mérőcella



13. ábra Mérőcella membránszűrőhöz



14. ábra Indirekt mérőcella

A MICROTASTER-hez a vezérlés és adatfeldolgozás céljára kifejlesztett speciális program folyamatos adatgyűjtést végez, minden mérőcsatornát leolvás. A beolvasott adatok rögzítése csak akkor történik meg, ha a csatorna beállításai szerint ez szükséges.

A program a zajos környezetben történő adatgyűjtés támogatására fejlett zajszűréssel rendelkezik.

A szoftver a begyűjtött adatokat táblázatban tárolja, ezek a telepített táblázatkezelő és statisztikai programokba konverzió nélkül könnyen beolvashatók.

A csatornák egyedileg paraméterezhetők, lehetővé téve több különböző jellegű, eltérő időben megkezdett vizsgálat monitorozását és kiértékelését.

A szoftverben beállítható a redoxgörbe kritikus differencia-hányadosának értéke, a kritikus értéket meghaladó mérési pontok minimálisan megkívánt száma, az értékelés kezdete és az a sejtszám határérték, amely felett a minta mikrobiológiai állapota kifogásolandó.

Az értékelés kezdetének beállításával az idősor eleje nem vesz részt a számításban, a mérés elejének bizonytalanságai így kiküszöbölhetőek. A detektációs idő számított értékét az előzetesen meghatározott kalibrációs görbe egyenletébe helyettesítve, kiszámítható a vizsgált minta mikrobaszáma.

A műszer által számított mikrobaszám és a felhasználó által megadott határérték összehasonlításából meghatározható a csatorna mérésének mikrobiológiai értékelése: megfelelő vagy kifogásolt. A számításokat a szoftver automatikusan végzi, és szükség szerint kijelzi, illetve tárolja.

A különböző grafikon típusok választhatók:

- *Összesített*: minden mérő csatorna megjelenik
- *Mozaik*: minden csatorna önálló grafikonnal jelenik meg. Ilyenkor minden egyedi grafikonon látható a detektációs idő értéke (ha van), és annak alapján számított sejtszám, valamint a sejtszám szerinti értékelés. Ennél az elrendezésnél a grafikonok színekkel is jelöltek az egyszerű áttekinthetőség érdekében: kézzel a futó, pirossal az elutasított eredményű, zölddel az elfogadott eredményű, szürkével pedig a befejezett mérést jelöli a program.
- *Csoportosított*: kijelölt adatsorok egy grafikonon jelennek meg (legfeljebb 4 db csoport hozható létre).
- *MPN*: a grafikon a különböző hígítási szintekhez tartozó TTD értékeket ábrázolja, amelyek alapján a műszer automatikusan kiszámítja a kalibrációs görbe egyenletét, illetve a minta kiindulási sejtszámát. Az eredményeket a képernyőre kiírja. Hasonlóan a csoportosított grafikonhoz, itt is legfeljebb 4 csoport hozható létre.



### 4.2.3. Redoxpotenciál-méréssel végzett mikrobiológiai vizsgálatok

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

##### Nyerstej-minták feldolgozása

Külső kalibrációs görbe felvételéhez nyers tejből izolált vegyes *Enterobacterium*-tenyészetet használtam. A műszeres mérést (TTD) Brillantzöld-Glükóz-Epe (Merck) tápoldatban (BBG táptalaj) végeztem 37 °C-on úgy, hogy a hígítási sor minden tagjából 1 ml-t 9 ml táplevest tartalmazó mérőcellába oltottam.

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

##### Vörösáru-minták előkészítése

A vörösáru gyártása közben vett mintákból 10 g-ot 90 ml pepton vízzel homogenizáltam, majd 1 ml-t 9 ml feles erősségű TSB táplevesbe oltottam. Kalibrációs görbe készítéséhez tízes alapú hígítási sort készítettem, és a hígítási sor minden tagjából 1 ml-t 9 ml táplevest tartalmazó mérőcellába oltottam. Inkubációs hőmérséklet 30 °C.

A TTD-értékekből és a lemezöntéssel, vagy MPN módszerrel meghatározott mikrobaszámokból elkészítettem a kalibrációs görbéket.

#### 4.2.3.2. Környezeti higiéniai vizsgálat

Redoxpotenciál-mérést alkalmazva a felületek mikrobaszámának meghatározása kétféleképpen történhet:

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

Az összcsíraszám meghatározásához feles erősségű TSB levest használtam.

A mintavétel a húsipari tanműhelyben kijelölt felületekről az ISO 18593:2004 szabvány szerint, 10x10 cm-es mintavételi felületről, vagy ennél kisebb felszínű eszköz (kés, fűrész), illetve a modell felületek esetében azok teljes felületéről történt. Ehhez a tampont ki kell húzni a tároló műanyag csőből, majd peptonvízbe mártani és a felesleges folyadék eltávolítása után a kijelölt mintavételi területet szabályszerűen le kell törölni. A szabályszerű

letörlés a tampon hüvelyk- és mutatóujj közötti forgatása közben, két, egymással merőleges irányban történik. Mintavételi eszközként „Eurotubo® collection swab” tampont használtam.

A húsipari tanműhely húsüzemének 10 pontjáról vettem higiéniai mintákat, melyeket hűtődobozban (1-4 °C) szállítottam, majd a laboratóriumba érve azonnal feldolgoztam.

#### 4.2.3.3. *Listeria monocytogenes* kimutatása

##### Szelektív táptalajok összehasonlítása

*Listeria monocytogenes* vegyes mikroflórából való kimutatásához a következő mikrobákat használtam: *Listeria monocytogenes* (ATCC 19111, ATCC 7644, NCAIM B1935), *Listeria ivanovii* (ATCC 19119), *Listeria innocua* (ATCC 33090), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12600), *Escherichia coli* (ATCC 105369), *Bacillus cereus* (NCAIM B1827), *Bacillus subtilis* (NCAIM B1095).

Három szelektív táplevest vizsgáltam:

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

A szelektivitás mértékét a baktérium szintenyészetek táptalajban mért redoxgörbéinek összehasonlítása alapján állapítottam meg az 5.4.1.1. fejezetben leírtak szerint.

##### Minta-előkészítés

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

A mintákat beoltottam a vizsgált mikrobákkal, három fertőzöttségi szinten (alacsony, közepes, magas). Az egyes mikrobák 24 órás ferde-agaros tenyészetét lemostam 9 ml peptonvízzel és tízes alapú hígítási sort készítettem. A mintákat (25 g-ot 225 ml táptalajban homogenizálva) beoltottam az egyes mikrobatenyészetek 1 ml-ével a 9., 6. és az 1. hígítási

fokokból, annak érdekében, hogy a kívánt alacsony, közepes és magas fertőzöttségi szinteket beállítsam. Az inkubációs hőmérséklet 37 °C volt.

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

Kísérleti elrendezés

2 termék (tej és lágysajt)

8 mikroba (természetes mikroflóra + 7 teszt mikroba)

3 fertőzöttségi szint (alacsony, közepes, magas)

3 párhuzamosban

Minta szám: n = 144

#### 4.2.3.4. Salmonella-kimutatás

##### RVS tápleves szelektivitás vizsgálat

Bizonyos élelmiszerek összetételüknek köszönhetően befolyásolhatják a táptalajok szelektivitását. Az RVS tápleves szelektivitásának esetleges változását tej hozzáadásával vizsgáltam. 25 ml tejet adtam 225 ml RVS tápleveshez, majd homogenizáltam. A szelektivitást *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Typhimurium mikrobák szintenyészetével mért redoxgörbék összehasonlításával értékeltem.

##### Minta-előkészítés

Tojás- és csirkehús-mintákat vizsgáltam. Az egész tojásokat homogenizáltam, majd *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Typhimurium baktériummal fertőztem, három különböző koncentrációban:

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

A 25 gramm élelmiszermintát (tojás, hús) 225 ml RVS táplevesben homogenizáltam. Az inkubációs hőmérséklet 42°C volt.

### 4.3. Real-time PCR

1 ml mintából kiindulva 400 µl DNS izolátumot állítottam elő, melyből a PCR mérést a SZIE ÁOTK Élelmiszer-higiéniai Tanszékén lévő SLAN® Real-Time PCR System (Hongshi) berendezés használatával végeztem el, *Mericon L. monocytogenes* Kit-et (Qiagen) alkalmazva. PCR reakció 20 µl mennyiségű reakcióelegyben ment végbe, amely 10,8 µl Multiplex PCR Master Mix-et és 9,2 µl DNS izolátumot tartalmazott.

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

A patogének detektálása real-time PCR-t alkalmazva az adott patogén genom specifikus régiójának amplifikálódásán alapul. Az amplifikált termék target specifikus fluoreszcens próbákkal detektálható. Ahogy a PCR termék akkumulálódik, a kötött próbákból a fluoreszcens jel erősödik. A fluoreszcens jel intenzitásának monitorozása a PCR futása közben lehetővé teszi az akkumulálódó PCR termék detektálását a reakció csövek újrainyitása nélkül.

#### 4.3.1. A *Listeria monocytogenes* azonosítása

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

A baktérium DNS izolálása a redoxpotenciál-mérést (dúsítást) követően a dúsító közeg 1 ml-éből történt "*Mericon DNA Bacteria Plus Kit*" (Qiagen) segítségével, a gyártó utasításai szerint.

A *Mericon L. monocytogenes* Kit élelmiszerekben és takarmányokban a *L. monocytogenes* dúsítás utáni kvalitatív kimutatására alkalmazható.

#### 4.3.2. *Listeria monocytogenes* számának meghatározása Real-time PCR vizsgálattal

A kvantitatív PCR mérés lépései:

- hígítási sor készítése, sejt-koncentrációk meghatározása
- DNS kinyerés
- PCR reakció
  - Amplifikációs görbék felvétele
  - Detektációs küszöbérték kijelölése
- a detektációs küszöb eléréséhez szükséges ciklus-szám Ct meghatározása
- standard görbe megszerkesztése (Ct vs lgN), PCR hatékonyság számítása
- kalibrációs görbe megszerkesztése (lgN vs Ct)

A PCR-reakció amplifikációs hatékonysága, (E) megadja, hogy egy ciklus során hányszorosára nő az ampliton mennyisége. Értéke meghatározható a standard görbéből:

$$E = 10^{-1/m},$$

ahol m a Standard görbe meredeksége.

Ideális esetben, 100%-os hatékonyságnál E=2.

A százalékban kifejezett hatékonyság, %E megadja, hogy a templát hány százaléka amplifikálódik minden egyes ciklusban:

$$\%E = (E-1) \cdot 100\%$$

Ideális reakcióra:

$$\%E = (2-1) \cdot 100\% = 100\%$$

Például, ha az amplifikációs hatékonyság 95,4%, akkor minden egyes ciklus végére az ampliton másolat-száma 1,954-szeresére nő (E=1,954), vagy másképpen kifejezve, a templát 95,4 %-a amplifikálódik (Real-Time PCR Applications Guide, 2006).

Alacsony amplifikációs hatékonyság eredhet gyenge primer használatából, szuboptimális reakció-körülményekből, vagy a pipetta-hibák halmozódásából a mikroba hígítási sorok készítésénél. A 6-8 nagyságrendnyi mérési tartományt átfogó görbék meredeksége nagyon érzékeny a hígítási hibára.

100% feletti reakció-hatékonyságot a hígítási sor készítésénél elkövetett pipetta-hiba halmozódása, vagy nem specifikus termékek, pl. primerdimerek koamplifikációja okozhat.

A kvantitatív PCR vizsgálatok elfogadhatóságának 3 kritériuma:

- Standard görbe linearitása  $R^2 > 0,980$
- Nagy amplifikációs hatékonyság (90 – 105%)
- Stabil ismételhetség (robustus módszer)

#### **4.3.3. *Salmonella*-azonosítás**

A redoxpotenciál-méréssel pozitívnak bizonyult minták klasszikus biokémiai megerősítése helyett real-time PCR berendezés alkalmazható. A baktérium DNS izolálása a redoxpotenciál-mérést követően a dúsított közeg 1 ml-éből történt “*Mericon DNA Bacteria Kit*”(Qiagen) használatával a gyártó utasításai szerint.

A *Mericon Salmonella Kit* élelmiszerekben és takarmányokban a *Salmonella* dúsítás utáni kvalitatív kimutatására alkalmazható.

#### **4.4. Matematikai statisztikai módszerek**

Az eredmények értékelése (regresszió analízis, varianciaanalízis, statisztikai vizsgálatok) Microsoft Excel 2013 programmal történt. .

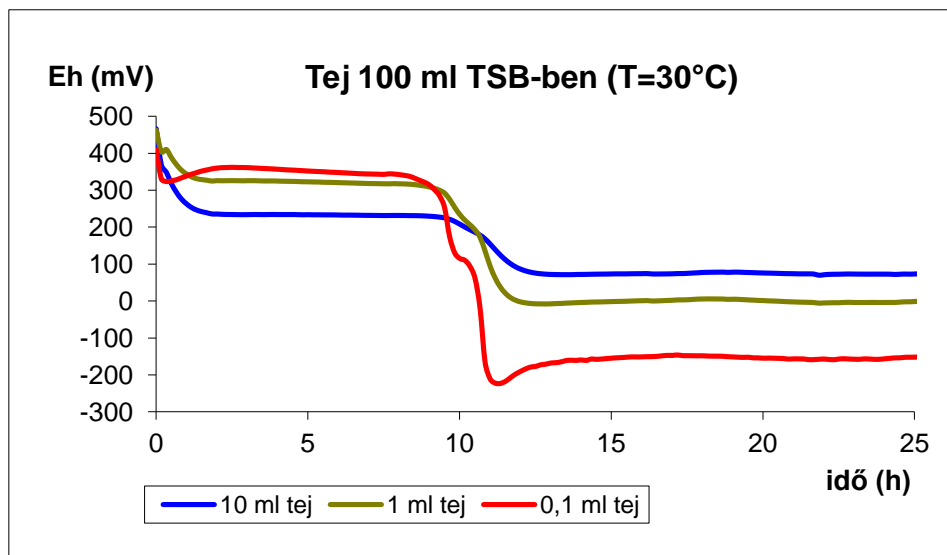
## 5. Eredmények

### 5.1. Az összcsíra- és az Enterobacterium-szám meghatározás redoxpotenciál-méréssel

#### 5.1.1. Nyers tej vizsgálata

##### 5.1.1.1. A nyers tej szaporodásgátló hatásának kiküszöbölése

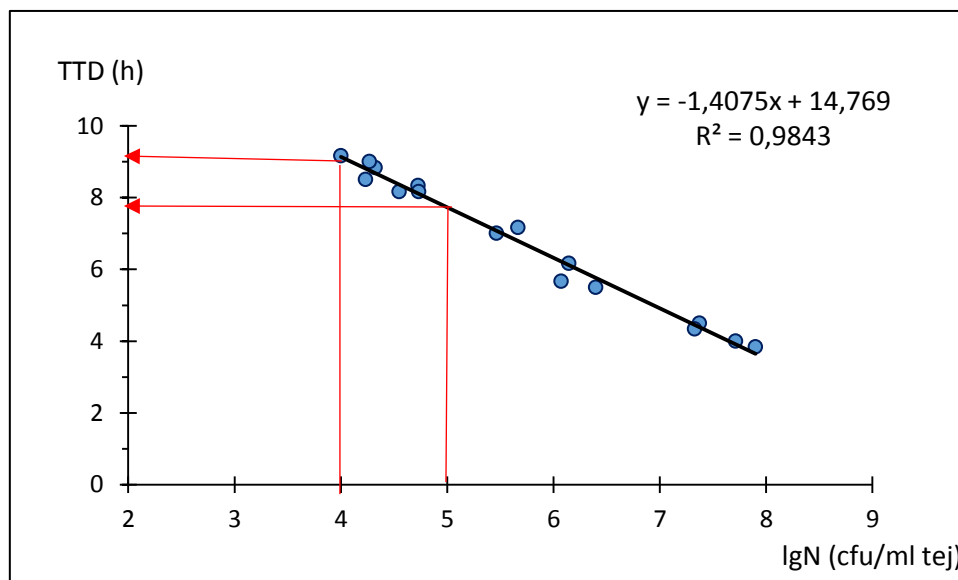
A mikrobaszám-meghatározás során problémát jelent a friss tej mikrobaszaporodást gátló hatása, vagy esetleges gátlóanyag tartalma. Ennek kiküszöbölésére a tejet különböző hígításokban vizsgáltam (15. ábra). Az ábrán látható, hogy a 0,1 ml tej/100 ml tápoldat alkalmazásakor kaptuk a leggyorsabb és legnagyobb mértékű redoxpotenciál-változást, vagyis a (0,1 ml tej /100 ml tápközeg esetében sikerült a friss tej szaporodásgátló hatását kiküszöbölni (Szakmár et al., 2009) . A továbbiakban ezzel a hígítási mértékkel dolgoztam.



15. ábra A friss tej gátló hatásának megszüntetése hígítással

### 5.1.1.2. Az összcsíraszám meghatározása külső kalibrációs görbe alkalmazásával

Tej összcsíraszámának tenyésztéses meghatározása 72 órás inkubációt igényel. Bár a különböző nyers tejek mikroba-összetétele elvileg különböző, a független mintákból készült mérési görbe alapján a kiindulási sejtszám logaritmus és a TTD értékek közötti lineáris korreláció igen szorosnak bizonyult. Különböző helyekről származó (piac, tehenészeti telepek) és különböző sejtszámú tejek esetében is felvehető tájékoztató jellegű mérési görbe (16. ábra). Az ábráról leolvasható, hogy a nyers tej, az ipar által leggyakrabban mikrobiológiai határértékként megállapított,  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml körüli összcsíraszámának műszeres meghatározása 8-9 órát vesz igénybe.



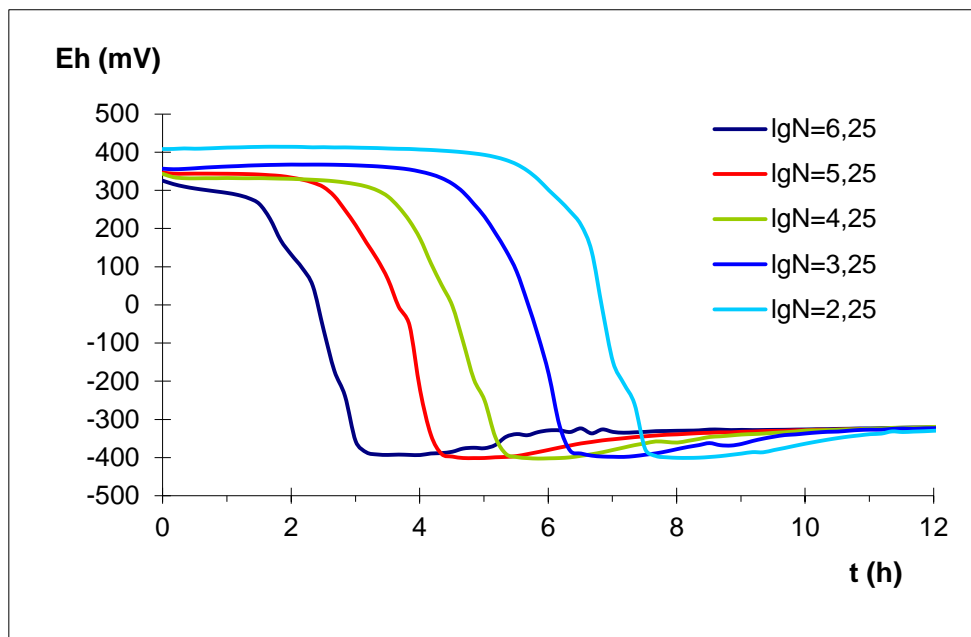
**16. ábra** Nyers tej összcsíraszámának külső mérési görbéje (1/2 TSB, T=30°C)

### 5.1.1.3. Enterobacterium-szám meghatározása külső kalibrációs görbe alkalmazásával

Nyers tej felhasználásával készülő vagy csak kismértékben hőkezelt termékek esetében, (pl. sajtgyártás során) különös jelentőségű az Enterobacteriumok esetleges jelenléte a tejben.

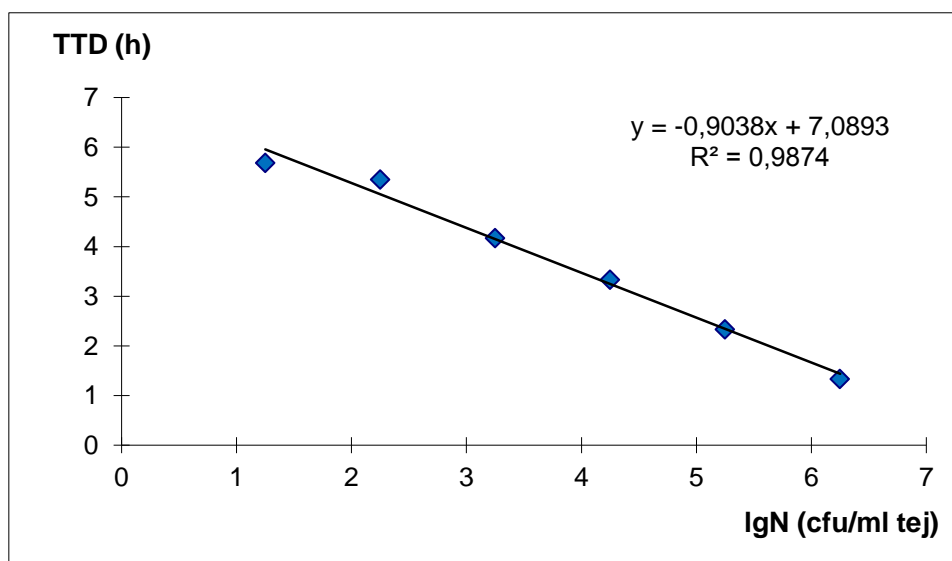
Külső kalibrációs görbe felvételéhez nyers tejből izolált vegyes Enterobacterium tenyészetet használtam. A műszeres mérést (TTD) EE (Merck) tápoldatban végeztem 37 °C-on. A mikrobaszám tenyésztéses meghatározása VRBG-agaron (Merck), lemezöntéssel történt. Inkubáció 37 °C-on 24 óra. A redoxgörbék a 17. ábrán láthatóak.





17. ábra Kiindulási sejtszám hatása Enterobacteriumok redoxgörbéire (nyers tej T=37 °C)

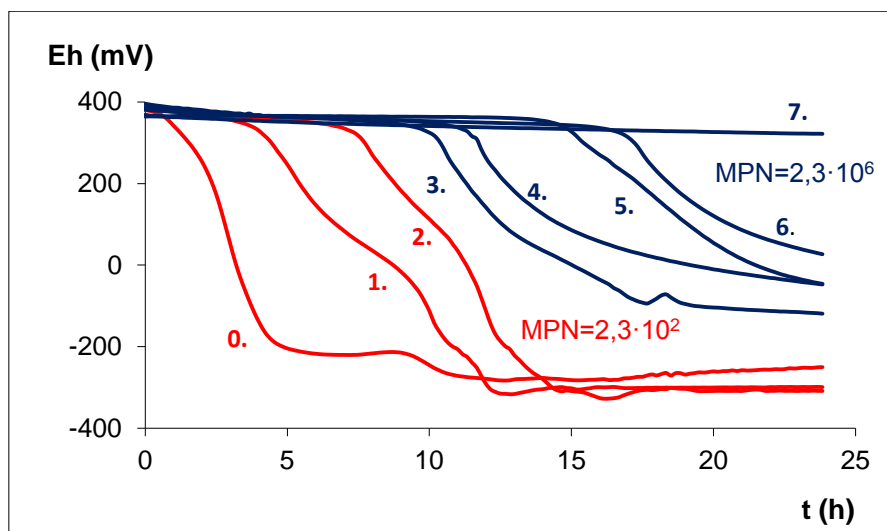
A mérési görbét a 18. ábra mutatja be. Az egyenes tengelymetszete alapján megállapítható, hogy az egyetlen Enterobacterium sejtől (lgN=0) kiinduló szaporodás kimutatásához szükséges idő 7,1 órának adódott, szemben a klasszikus módszer legalább 24 órás tenyésztési idejével.



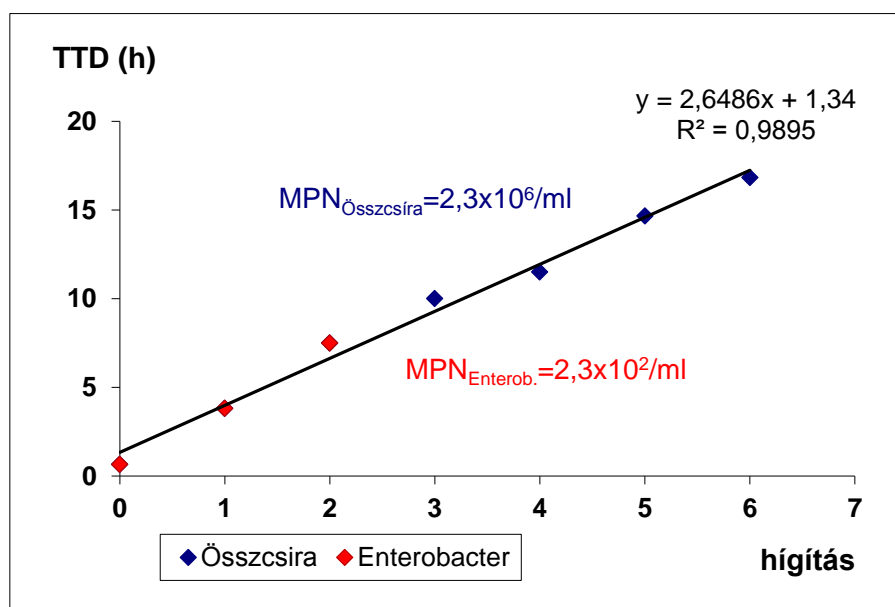
18. ábra Enterobacteriumok külső mérési görbéje (EE, T=37 °C)

#### 5.1.1.4. Összcscsira- és Enterobacterium-szám meghatározása belső kalibrációs görbével

Abban az esetben, ha nincs előzetesen felvett kalibrációs görbe, alkalmazható az MPN módszeren alapuló belső kalibrációs görbe felvétele (19., 20. ábra).



19. ábra Nyers tej redoxgörbéi a hígítás függvényében (1/2TSB, T=30°)



20. ábra Nyers tej belső MPN görbéje (1/2 TSB, T=30 °C)

A műszeres mérést (TTD) 1/2 hígítású Trypton-Soya Broth, (Merck) tápoldatban (TSB) végeztem 30 °C hőmérsékleten. A mikrobaszám tenyésztéses meghatározása Plate Count-agaron (Merck), lemezöntéssel történt, inkubáció 30 °C-on 3 nap.

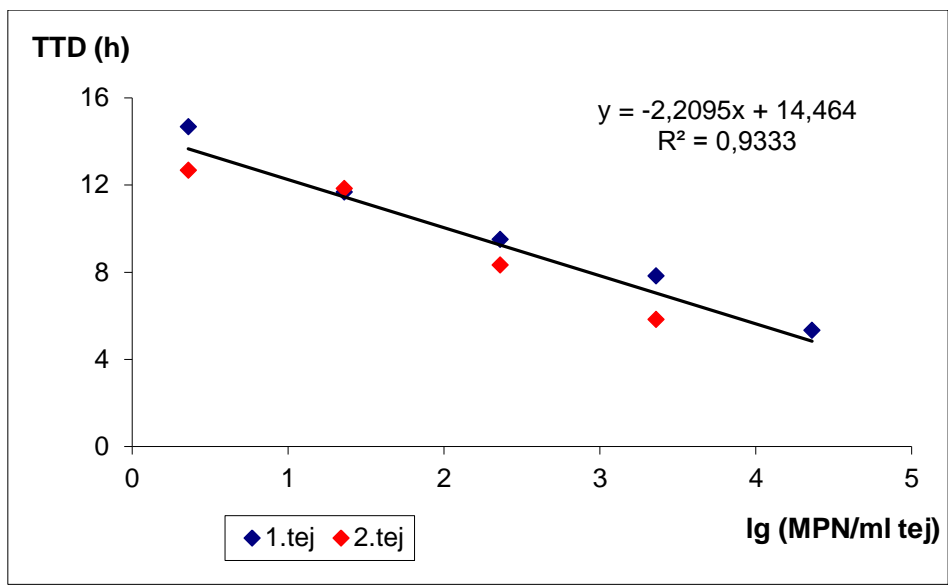
Amint a 19. ábrán megfigyelhető, a 7. hígításban már nem mérhető TTD érték, Ennek megfelelően a tej határhígítással meghatározott mikrobaszáma  $MPN=2,3 \times 10^6$  sejt/ml volt.

Kihasnálva azt a széleskörű előzetes vizsgálatokon alapuló tapasztalatot, hogy csak az Enterobacteriumok csökkentik a táptalaj redoxpotenciálját -300 mV alá, lehetőség van egyetlen hígítási sorból az összes mikroba- és az Enterobacteriumszám egyidejű meghatározására. A görbék lefutása alapján megállapítható, hogy az Enterobacteriumok a 2. hígításig vannak jelen (a 19. és 20. ábrán pirossal jelölve), a további hígítások görbéi nem jellemzőek az Enterobacteriumokra. Ennek megfelelően a vizsgált tejminta Enterobacterium száma  $10^2$  sejt/ml nagyságrendű volt.

A belső kalibrációs görbe alkalmazásának előnye, hogy segítségével egy időben az összcsíraszám részhalmozaként az Enterobacterium szám is meghatározható.

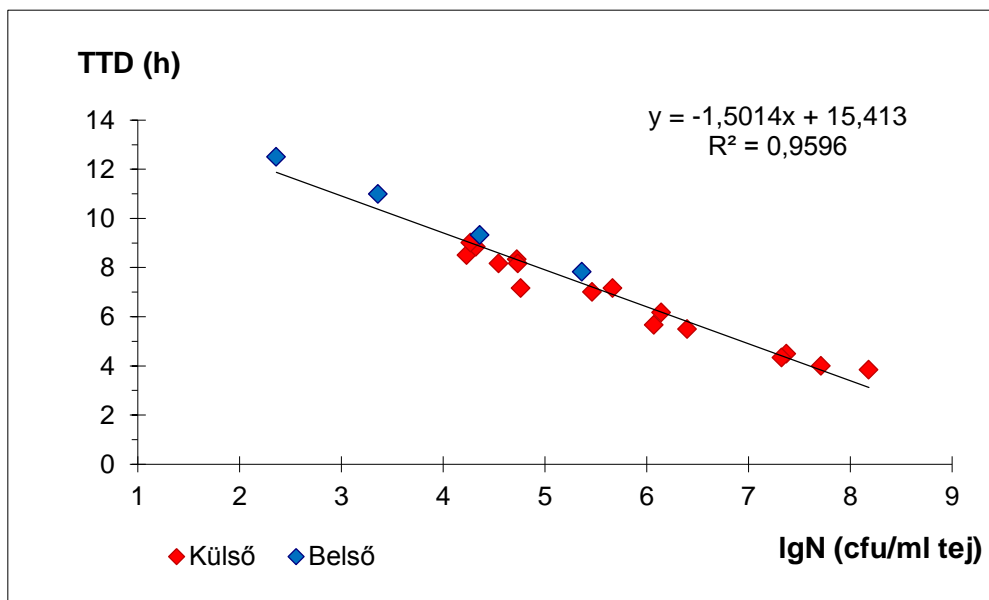
Belső kalibrációs görbe alkalmazásával a vizsgálati idő nagy sejtkoncentráció esetén lényegesen hosszabb, mint külső kalibrációs görbe esetén, (kb 20 óra), mert a hígítási szintek számát a teljes kihígulásig kell növelni, azonban – figyelembe véve, hogy egy tejtermelő telepen a nyers tej mikroflórájának összetétele nagyjából állandó – a belső kalibrációs görbét elegendő néhány alkalommal felvenni. Ha az így kapott kalibrációs görbék között nincs szignifikáns különbség, akkor az eredmények külső kalibrációs görbéként használhatók. További minták esetében így a vizsgálati idő lényegesen lerövidíthető.

Azonos tehenészetből, különböző időpontokban vett tejminták egyesített belső mérési görbéje látható a 21. ábrán.



**21. ábra** Azonos telepről, különböző időpontban vett minták belső mérési görbéje (T = 30 °C)

Mérési eredményeink szerint a különböző helyekről származó nyerstejminták lemezöntéses módszerrel felvett külső- és MPN-módszerrel meghatározott belső mérési görbéi – statisztikai hibahatáron belül – nem különböznek egymástól szignifikánsan, ezért közös egyenesben ábrázolhatók (22. ábra)



**22. ábra** Külső és belső mérési görbék egyesített illesztése

Különböző ideig hűtve tárolt (4 °C) nyerstejminták tenyésztéses és műszeres méréssel (belső kalibrációval) meghatározott összcsíraszámát és a mérés időigényét összehasonlítva (2. táblázat) megállapítható, hogy a két módszerrel mért érték között nincs szignifikáns különbség, azonban a műszeres mérés időigénye lényegesen kisebb.

**2. Táblázat** Nyerstejminták lemezöntéssel és műszeresen meghatározott mikrobaszámai

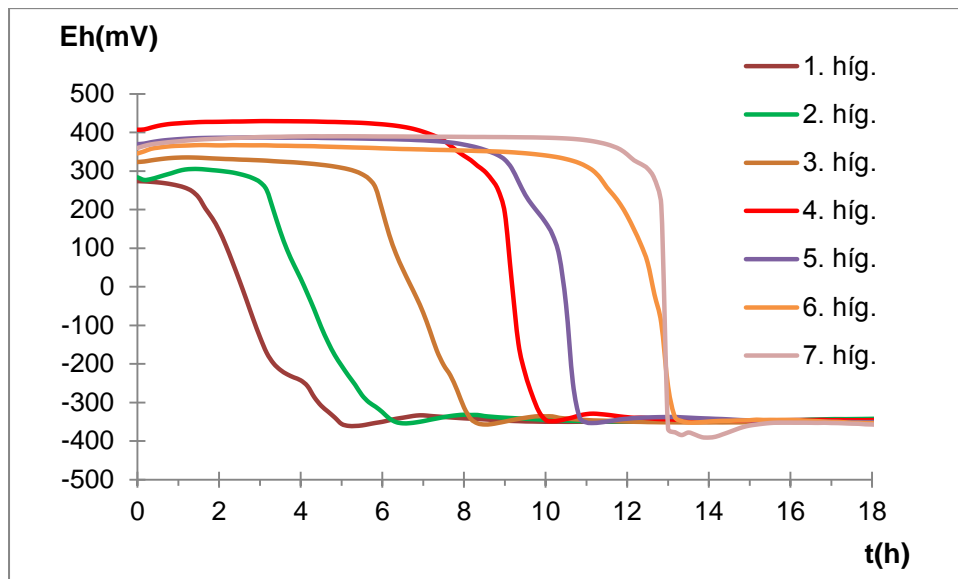
Minta	Tenyésztéses módszer		Műszeres mérés	
	IgN	Időigény (h)	IgMPN	Időigény (h)
1.	5,18	72	5,36	18
2.	5,06		5,36	
3.	4,93		4,36	
4.	6,35		6,36	
5.	6,79		6,36	

**5.1.2. Vörösáruk gyártási fázisainak vizsgálata**

A vörösáruk gyártási fázisainak vizsgálata során, mivel nem ismert a minták mikrobiota összetétele, belső kalibrációs görbe felvételére van szükség. A belső kalibrációs görbét két módszerrel, lemezöntéssel, illetve határhígítással (MPN), határoztam meg.

*5.1.2.1. Belső kalibrációs görbe meghatározása lemezöntéssel*

A kalibrációs görbe felvételéhez a virsli gyártásához használt húspépéből készítettem hígítási sort. A hígítási sor redoxgörbéit a 23. ábra mutatja be.



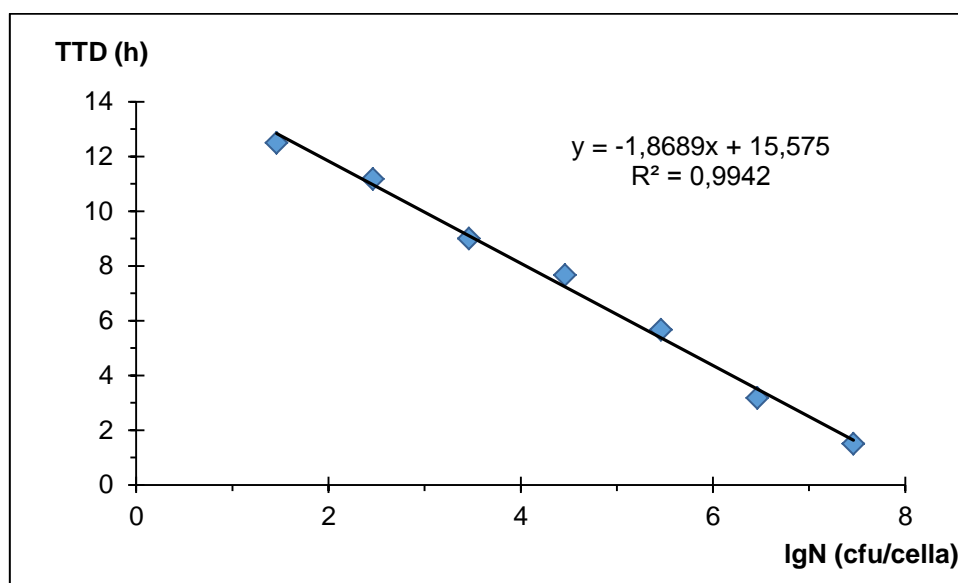
**23. ábra** Virsli péppel készített hígítási sor redoxgörbéi TSB levesben 30 °C-on

Az egyes görbék lemezöntéssel meghatározott mikrobaszámát és a mért TTD értékeket a 3. táblázat foglalja össze.

A készülék segítségével meghatározott TTD értékek, valamint a IgN értékek alapján felvettem a mérési görbét, amely a 24. ábrán látható.

**3. Táblázat** A hígítási sor tagjainak kezdeti mikrobaszáma és a redoxgörbék TTD értékei

Hígítás	IgN (N=cfu/cella)	TTD (h)
1.	7,46	1,50
2.	6,46	3,17
3.	5,46	5,67
4.	4,46	7,67
5.	3,46	9,00
6.	2,46	11,17
7.	1,46	12,50



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

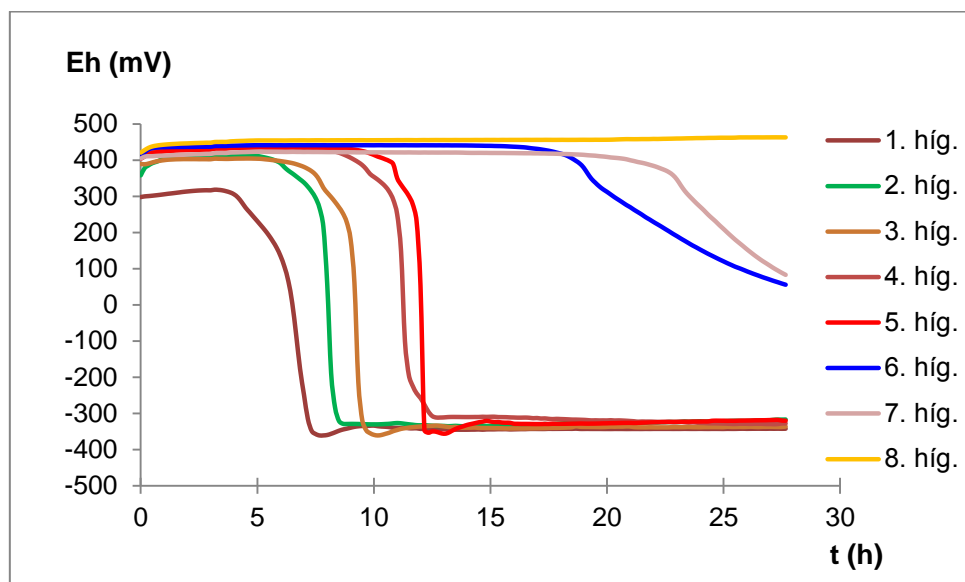
Kiszámítva a kalibrációs egyenletet:  $IgN = -0,532 \cdot TTD + 8,3114$ , az egyes fázispontokban vett minták redoxgörbéinek TTD értéke alapján a minták összcsíra száma meghatározható (4. táblázat).

#### 4. Táblázat Fázisminták összcsíraszama

Vizsgálati minta	TTD (h)	lg N(c) (számított)	N (cfu/cella)	N (cfu/g)
Darált sertéshús 1. hígítás	5,67	5,30	$1,98 \cdot 10^5$	$1,98 \cdot 10^6$
Darált marhahús 1. hígítás	6,50	4,86	$7,17 \cdot 10^4$	$7,17 \cdot 10^5$
Fűszerkeverék 1. hígítás	13,00	1,40	$2,50 \cdot 10^1$	$2,50 \cdot 10^2$
Marhahúspép a keverékből 1. hígítás	6,83	4,68	$4,79 \cdot 10^4$	$4,79 \cdot 10^5$
Juhbél 1. hígítás	6,00	5,12	$1,32 \cdot 10^5$	$1,32 \cdot 10^6$
Nyers virsli 1. hígítás	0,67	7,96	$9,06 \cdot 10^7$	$9,06 \cdot 10^8$

#### 5.1.2.2. Belső kalibrációs görbe meghatározása határhígítással

Hígítási sort készítettem a kész párizsi pépből 1-8. hígításig. A redoxgörbék a 25. ábrán láthatók.

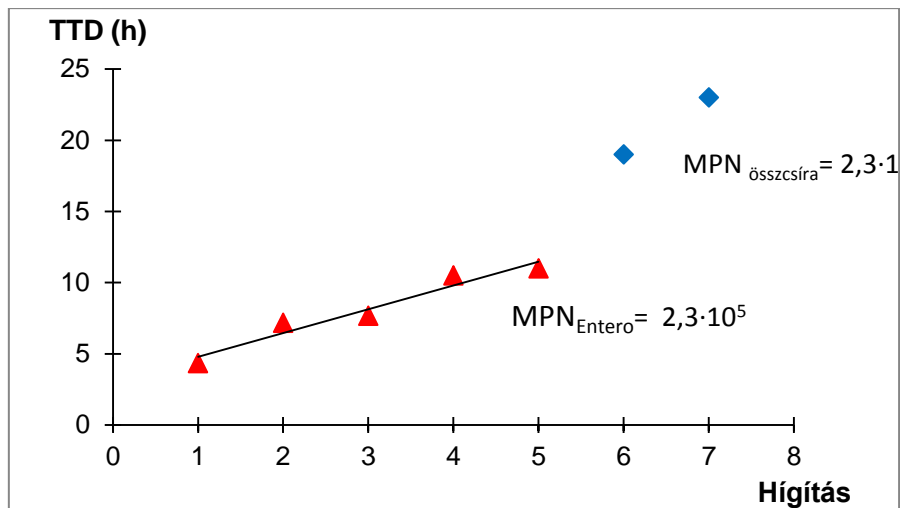


25. ábra Párizsi péppel készített hígítási sor redoxgörbéi TSB levesben 30 °C-on

A görbék lefutása alapján megállapítható, hogy az Enterobacteriumok az 5. hígításig vannak jelen, a további hígítások görbéi nem jellemzőek az Enterobacteriumokra.

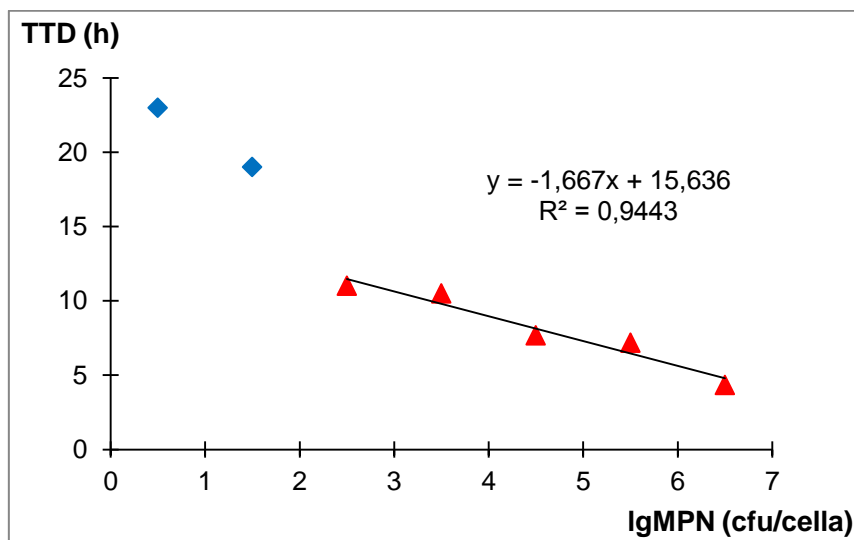
Az egyes hígításokhoz tartozó TTD értékek a 26. ábrán láthatók.





26. ábra Párizsi pép hígításokhoz tartozó TTD értékek

MPN módszer alkalmazása esetén a minta mikrobaszámát az utolsó pozitív hígítási tag alapján becsüljük. A 26. ábrán az enterobacteriumokra, illetve az összcsíra számra meghatározott MPN értékek láthatók. A minta legvalószínűbb élősejtszámának ismeretében az egyes hígítások mikrobaszáma meghatározható és a TTD - lg MPN mérési görbe felvehető, amely a 27. ábrán látható.



27. ábra Párizsi pép mérési görbéje

A 27. ábráról megállapítható, hogy a mérési görbe két szakaszos. Az Enterobacteriumok kihígulása után a lassúbb szaporodású (hosszabb TTD értékkel jellemezhető) mikrobák maradnak.

A kalibrációs görbe:  $\lg N = -0,5665 \cdot \text{TTD (h)} + 8,9678$

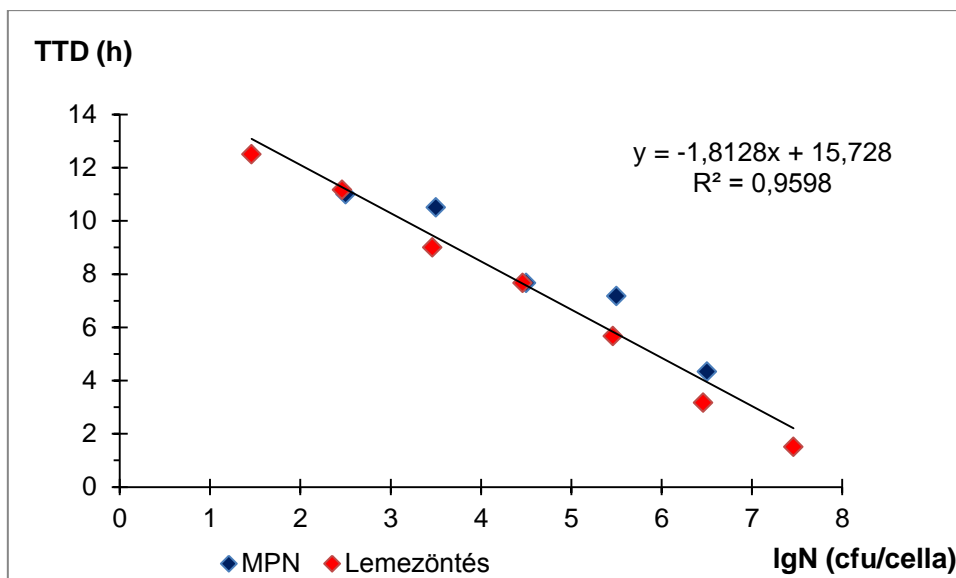
Az egyenlet segítségével kiszámolható a többi minta összcsíraszama. A mérési eredményeket az 5. táblázat tartalmazza.

#### 5. Táblázat Fázisminták összcsíra száma

Vizsgálati minta	TTD (h)	Ig MPN (számított)	MPN (cella)	MPN/g
Darált sertés hús 1.	5,17	6,04	$1,09 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^7$
Marhahús pép ládából	5,17	6,04	$1,09 \cdot 10^6$	$1,09 \cdot 10^7$
Hús pép kutterből	5,33	5,95	$8,88 \cdot 10^5$	$8,88 \cdot 10^6$
Húspép első keverés után	3,33	7,08	$1,21 \cdot 10^7$	$1,21 \cdot 10^8$
Darált hús 2, (virslinél használt)	3,17	7,17	$1,49 \cdot 10^7$	$1,49 \cdot 10^8$
Virslipép kutterből, sózás után	2,33	7,65	$4,44 \cdot 10^7$	$4,44 \cdot 10^8$
Virslimassza első keverés után	2,33	7,65	$4,44 \cdot 10^7$	$4,44 \cdot 10^8$
Juhbél	11,67	2,36	$2,27 \cdot 10^2$	$2,27 \cdot 10^3$
Finom aprítás után kész virslipép	2,67	7,46	$2,85 \cdot 10^7$	$2,85 \cdot 10^8$
Juhbélbe töltött virsli	2,83	7,36	$2,32 \cdot 10^7$	$2,32 \cdot 10^8$

#### 5.1.2.3. Közös kalibrációs görbe meghatározása

Feltételezve, hogy a különböző időpontokban történt gyártás során az egyes fázispontok mikrobiotájának összetétele nem változik lényegesen, a különböző időpontokban felvett mérési görbék egyesíthetők. Az egyesített mérési görbe a 28. ábrán látható.



28. ábra Fázisvizsgálatok egyesített mérési görbéje

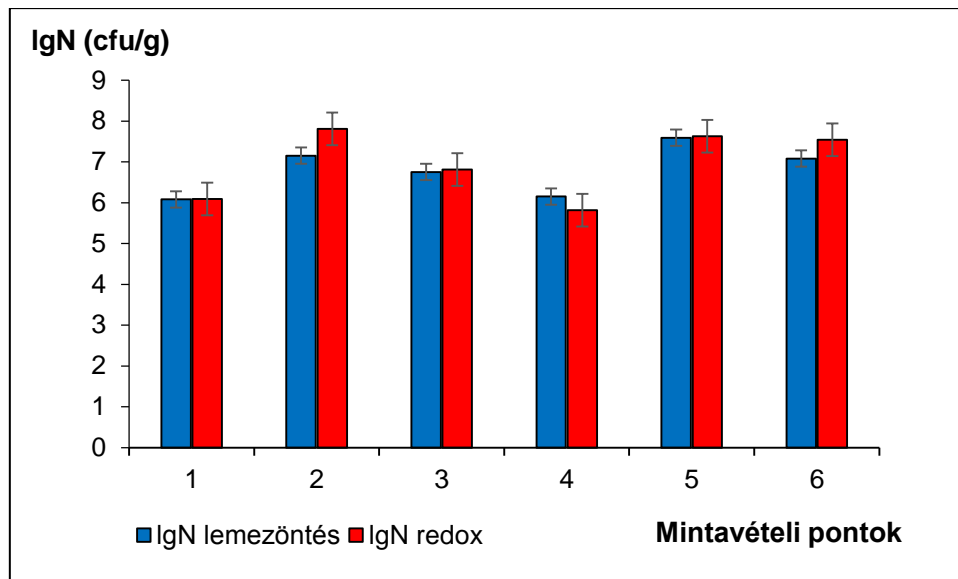
A kalibrációs görbe:  $\lg N(\text{cfu/cella}) = -0,5294 \cdot \text{TTD}(\text{h}) + 8,507$

Az egyesített kalibrációs görbe ellenőrzésére mintákat vettem egy gyártás fázispontjaiból. Az összcsíra számot redoxpotenciál-méréssel és lemezöntéssel is meghatároztam. Az eredményeket a 6. táblázatban foglaltam össze.

#### 6. Táblázat Műszeresen és lemezöntéssel meghatározott mikrobaszámok

Mintavételi pont	Minta	TTD (h)	$\lg N_{\text{műszeres}}$ (cfu/g)	$\lg N_{\text{lemezöntés}}$ (cfu/g)
1.	Darált hús	6,33	6,09	6,08
2.	Húspép 1.	3,17	7,81	7,15
3.	Húspép 2.	5,00	6,81	6,75
4.	Húspép 3.	6,83	5,82	6,15
5.	Virslis pép kutterből	3,50	7,63	7,59
6.	Juhbélbe töltött virsli	3,67	7,54	7,08

A fázisminták lemezöntéssel és műszeres méréssel meghatározott  $\lg N$  értékeit a hozzájuk tartozó SD értékekkel a 29. ábrán mutatom be.

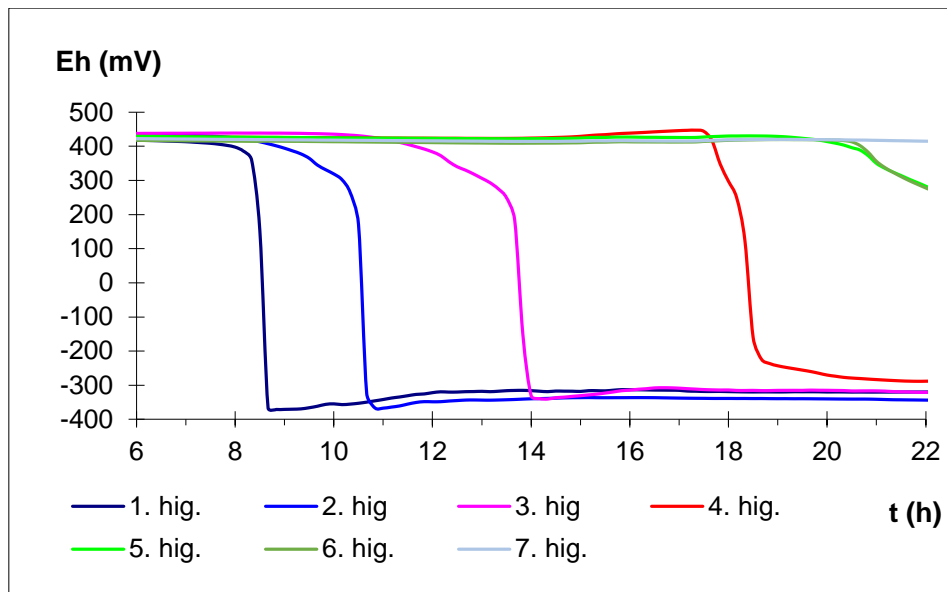


**29. ábra** A fázispontok lemezöntéssel (lemezöntés) és műszeres (redox) méréssel meghatározott logaritmus-összcóra szám értékei (lg N ± SD)

## 5.2. Környezet-higiéniai vizsgálatok redoxpotenciál-méréssel

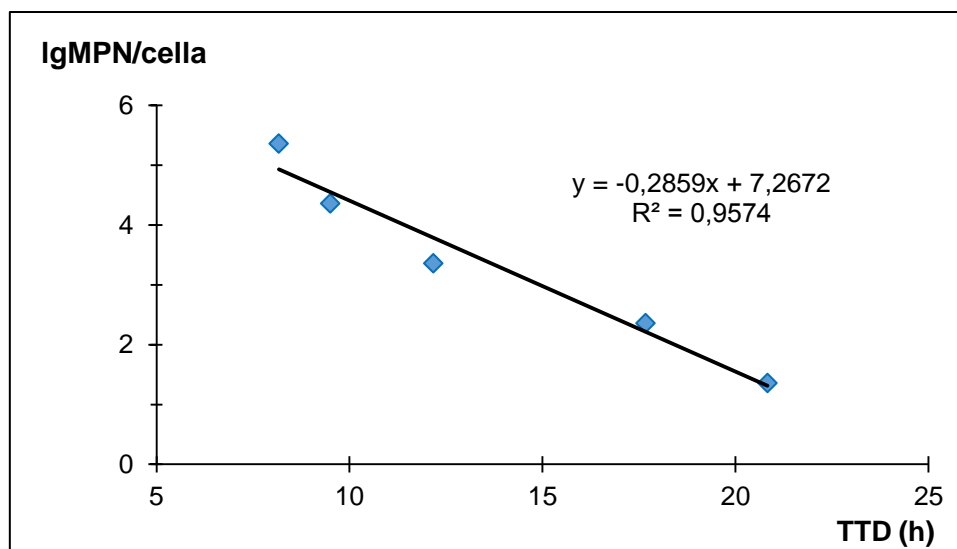
### 5.2.1. Mikrobaszám meghatározása redoxpotenciál-méréssel

A méréseket a belső kalibrációs görbe meghatározásával kezdtem. Ez a módszer használható, amikor a mikroflóra összetétele nem ismert, illetve nincs előzetesen készített kalibrációs görbe. Ehhez, a minták megfelelő előkészítése után, az 1-es mérési pont (kutter) mintáját  $10^{-7}$  értékig hígítottam majd a sor minden tagjából 1ml-t a 9ml TSB táplevest tartalmazó mérőcellába mértem. Ezt követően a mérőcellákat 30 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Az így kapott redoxgörbék a 30. ábrán láthatók. A görbéken megfigyelhető nagy redoxpotenciál esések az Enterobacteriumoknak köszönhetők, mert csak azok csökkentik a redoxpotenciált -300 mV alá.



**30. ábra** Kutter felületi minta redoxgörbéi a hígítás függvényében (1/2 TSB, T = 30 °C)

A hígítási sor azon utolsó tagjaiból, melyek még mikrobaszaporodást mutattak, meghatároztam a minta legvalószínűbb mikrobaszámát:  $MPN=2,3 \cdot 10^5/100 \text{ cm}^2$ . Az így kapott egyes hígításokhoz tartozó TTD, illetve  $\lg MPN$  értékekből lineáris regresszióval kiszámítottam a kalibrációs görbe egyenletét, amelyet betápláltam a programba. A 31. ábrán látható belső kalibrációs görbe ismeretében, a továbbiakban lehetőség volt a többi vizsgált minta élősejtszámának meghatározására.

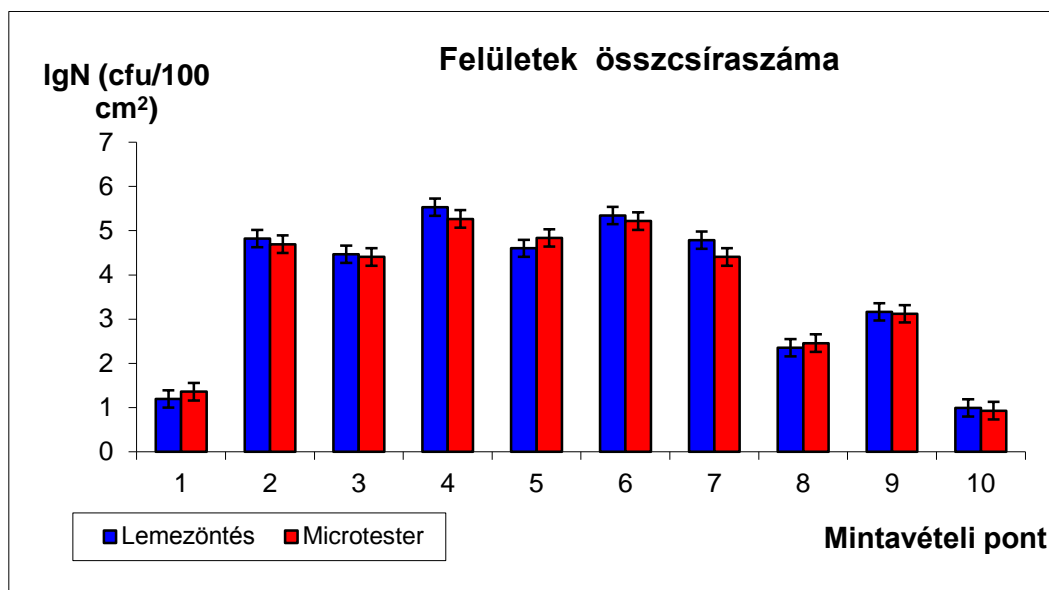


**31. ábra** Belső kalibrációs görbe felületi mikrobaszámhoz

### 5.2.2. A műszeres és lemezöntéses eredmények összehasonlítása

Az összes mintavételi ponthoz tartozó mintából szabványos lemezöntéses módszerrel is meghatároztam a mikrobaszámokat.

A két módszerrel kapott mérési eredmények a 95 %-os konfidencia-intervallumok feltüntetésével, a 32. ábrán láthatók.



**32. ábra** Felületi mikrobaszámok összehasonlítása (lgN ± konf. intervallum)

Konfidencia-intervallum számításakor lemezöntéses eljárásnál a felületi mikrobaszám meghatározás ismételhetőségének több körvizsgálat eredményeiből kapott 2011. évi átlagos szórást ( $S_r = 0,195$ ) vettem figyelembe (Szakmár és Reichart, 2013)

A redoxpotenciál-méréssel, belső kalibrációs görbe alapján meghatározott MPN értékek konfidencia-intervallumát a regresszió-analízisből meghatározott reziduális szórás ( $S_r = 0,198$ ) felhasználásával számítottam ki.

Az eredmények párosított t-próbáját a 7. táblázat tartalmazza.

## 7. Táblázat Kétmintás párosított t-próba a várható értékre

	<i>Lemezöntés Microtester</i>	
Átlag	3,725	3,669
Szórás	2,8436	2,5643
Vizsgálatok	10	10
Pearson Korreláció	0,9949	
Feltételezett átlagos eltérés	0	
df	9	
t Stat	<b>0,946</b>	
P(T<=t) egyszélű	0,184	
t Kritikus egyszélű	1,833	
P(T<=t) kétszélű	0,369	
t Kritikus kétszélű	<b>2,262</b>	

Kétszélű eloszlást feltételezve, az átlagértékek között nincs szignifikáns különbség.

A 7. táblázat alapján megállapítható, hogy a műszeres MPN módszerrel meghatározott mikrobaszámok átlagértéke (3,669) kisebb a lemezöntéssel kapott átlagértéknél (3,725), a páronkénti különbségek átlaga azonban nem különbözik szignifikánsan 0-tól.

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

Feltételezve, hogy adott üzemben, adott felületen, a szokásos munkarend megtartásával a mikrobiota összetétele alapvetően változatlan, a későbbi méréseknél külső kalibrációs görbe használata is elegendő. Ez jelentősen tovább rövidíti a vizsgálatokhoz szükséges időt. A húsipari tanműhely esetében a kimutatási idők a mikrobiológiai kontamináció mértékétől függően a 8. táblázatban összefoglaltak szerint változtak.

**8. Táblázat** Szabványos és redoxpotenciál-méréseken alapuló módszerek időigénye

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

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



### 5.3. Kvantitatív PCR teljesítmény jellemzőinek meghatározása

#### 5.3.1. A kimutatási határ számítása

A gyártó adatai szerint a Mericon próbák érzékenysége 10 DNS a reakció-elegyben (Mericon Pathogen Detection Handbook, 2011). A 4.3. szakaszban leírt eljárás szerint a DNS mennyisége a reakció-elegyben a következőképpen határozható meg:

$$\text{DNS(PCR)} / \text{DNS(minta)} = 9,2 \mu\text{l} / 400 \mu\text{l} = 0,023$$

Feltételezve, hogy egy mikrobából egy DNS templát képződik, a mintában lévő mikrobák elméleti kimutatási határa:

$$N(\text{minta}) = 10/0,023 = 435 \text{ mikroba/ml}$$

$$\lg N(\text{minta}) = 2,64.$$

#### 5.3.2. A méréshatár kísérleti meghatározása

A kísérleti meghatározás során először tízes alapú hígítási sort készítettem a *L. monocytogenes* ATCC 19111 törzssel fiziológiás sóoldatban az 1-7. hígítási szintig. A *L. monocytogenes* szuszpenziók mikrobaszáma lemezöntéssel került meghatározásra a 6. hígítási fokból Brain-Heart agaron, három párhuzamosban. A hígítások  $\lg N$  értékeit a három párhuzamos átlagából számítottam ki. A hígítások minden tagjában a *L. monocytogenes* jelenlétét 2 módszerrel vizsgáltam:

1. 1 ml szuszpenzió 9 ml Brain-Heart levesbe oltva és 37°C-on 48 óráig inkubálva három párhuzamosban (*Listeria* jelenlét).
2. 1 ml szuszpenzió PCR vizsgálata, három párhuzamosban (CT).

Az eredmények a 9. táblázatban láthatók, melyben CT a detektációs küszöb eléréséhez szükséges ciklusok számát jelöli.

**9. Táblázat** *Listeria monocytogenes* L1. kimutatása direkt PCR-módszerrel fiziológias sóoldatból

mikroba	hígítás	<i>Listeria</i> jelenlét	lgN	CT	eredmény
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 19111 (L1)	1	+++	7,00	19,20	Pozitív
				19,01*	Pozitív
				20,15	Pozitív
	2	+++	6,00	22,73	Pozitív
				23,26*	Pozitív
				22,43	Pozitív
	3	+++	5,00	27,51*	Pozitív
				27,79	Pozitív
				28,44	Pozitív
	4	+++	4,00	31,56*	Pozitív
				31,13	Pozitív
				30,77	Pozitív
5	+++	3,00	34,15	Pozitív	
			34,07*	Pozitív	
			34,12	Pozitív	
6	+++	2,00	38,09	Negatív	
			38,12	Negatív	
			No CT	Negatív	
7	+++	1,00	38,10	Negatív	
			No CT	Negatív	
			No CT	Negatív	

A \*-gal jelzett CT értékekhez tartozó amplifikációs görbéket tartalmazza a 33. ábra.

**10. Táblázat** *Listeria monocytogenes* L2. vizsgálati eredményei

<i>mikroba</i>	hígítás	<i>Listeria</i> jelenlét	IgN	CT	eredmény
<i>Listeria</i> <i>monocytogenes</i> ATCC 7644 (L2)	3	+++	5,17	25,91	Pozitív
				26,28	Pozitív
				26,26	Pozitív
	4	+++	4,17	30,19	Pozitív
				30,20	Pozitív
				30,10	Pozitív
	5	+++	3,17	33,66	Pozitív
				32,77	Pozitív
				32,59	Pozitív
	6	+++	2,17	36,87	Pozitív
				No CT	Negatív
				No CT	Negatív
7	+++	1,17	38,51	Negatív	
			No CT	Negatív	
			No CT	Negatív	

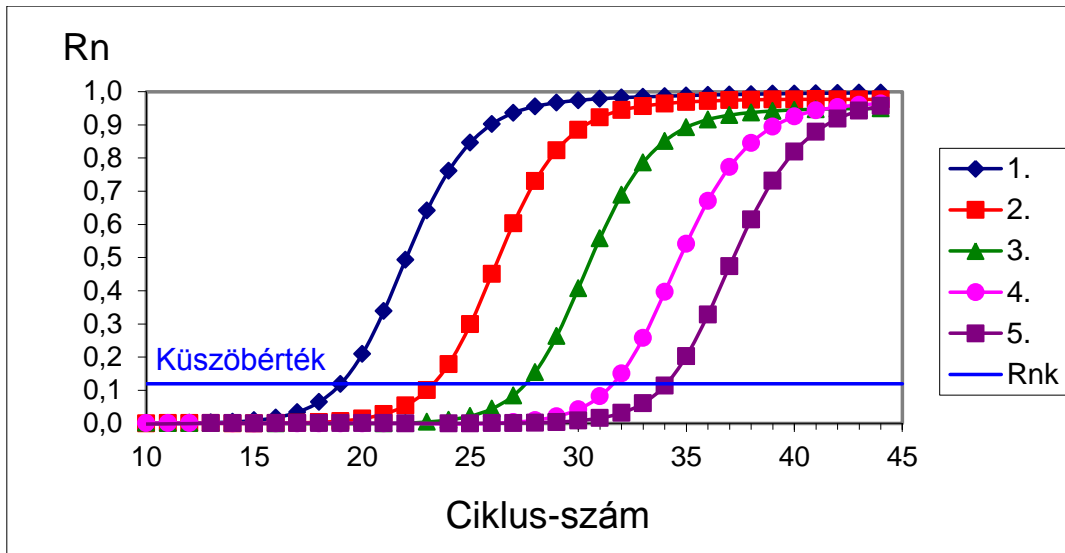
Az eredmények alapján megállapítható, hogy az utolsó, egyértelműen (mindhárom párhuzamosban) pozitív eredményt mindkét törzs esetében az 5. hígításból kapjuk, amelynek mikrobaszáma  $10^3$  cfu/ml. Ennek megfelelően a PCR meghatározás alsó határa a mintában:

$$N(\text{minta}) = 10^3 \text{ cfu/ml.}$$

**5.3.3. Amplifikációs görbék vizsgálata**

A standard görbe megszerkesztésének feltétele, hogy az amplifikációs görbék exponenciális szakaszának meredeksége között ne legyen szignifikáns különbség. Ezt az amplifikációs görbék logaritálásával ellenőrizhetjük.

Az 1-5. hígításokhoz tartozóan egy-egy amplifikációs görbét (a 9. táblázatban \*-gal jelölve) a 33. ábrán mutatok be. Az ábrán R<sub>nk</sub> jelöli a kimutatási küszöbértéket.



**33. ábra** *Listeria monocytogenes* (L1.) amplifikációs görbéi

Az amplifikációs görbék exponenciális szakaszát leíró egyenlet:

$$Rn(C) = C_0 \cdot E^C,$$

ahol  $Rn(C)$  az ampliton értéke a  $C$ -edik ciklus után,  $C_0$  a kiindulási templát szekvencia mennyisége.

A logaritmált exponenciális szakasz egyenlete:

$$\lg Rn = a + \lg(E) \cdot C$$

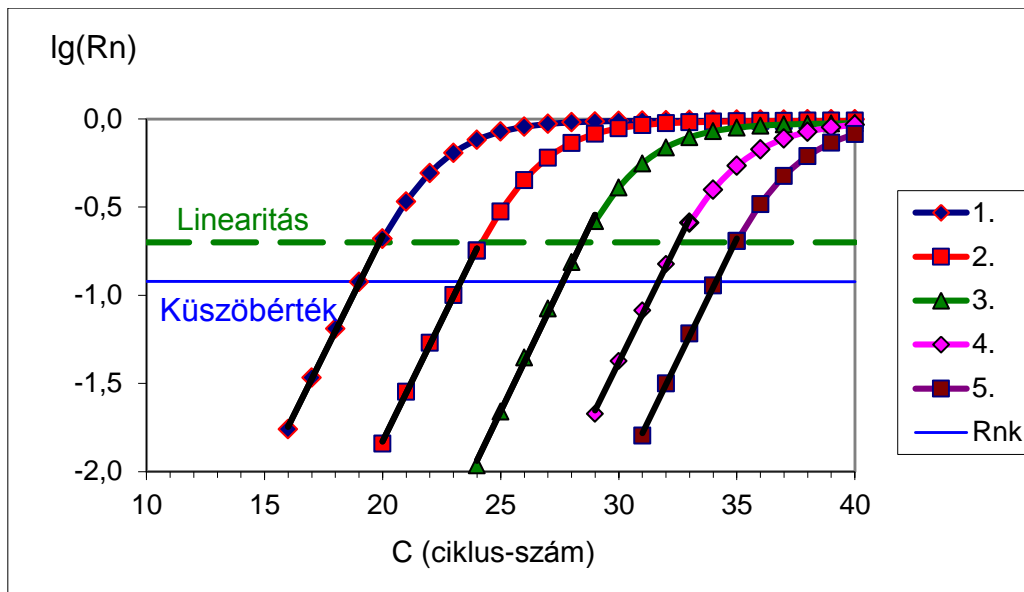
Egyszerűsített formában:  $\lg(Rn) = a + m \cdot C,$

ahol az egyenes meredeksége:  $m = \lg E$

Az egyenes meredekségéből a PCR reakció hatékonysága számítható:  $E = 10^m$

A logaritmált amplifikációs görbék a 34. ábrán láthatóak, melyeknek lineáris része reprezentálja az amplifikációs görbék exponenciális szakaszát.

Az ábrán a linearitás felső végét szaggatott vonal jelöli. Jól látható, hogy a detektációs küszöbérték a logaritmált amplifikációs görbék lineáris szakaszához tartozik.



34. ábra *Listeria monocytogenes* (L1.) logaritmált amplifikációs görbéi.

Az exponenciális szakaszoknak megfelelő egyenesek egyenleteit és a belőlük számított paramétereket a 11. táblázat foglalja össze.

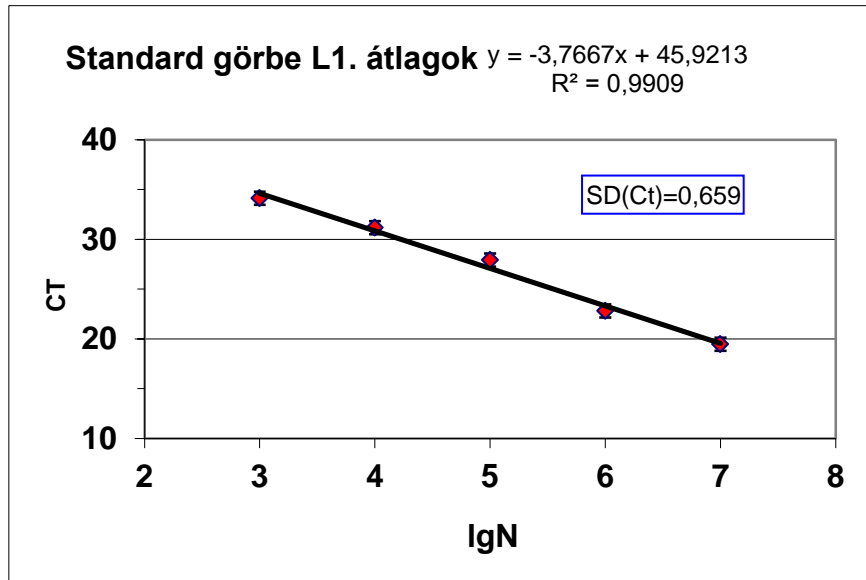
11. Táblázat A logaritmált amplifikációs görbék lineáris szakaszának paraméterei

Görbe	lgN mért	Ct	Linearitás	adattár	a	m	R <sup>2</sup>	E
1	7	19,01	C=16-20	5	-6,0724	0,2704	0,9989	1,864
2	6	23,26	C=20-24	5	-7,2985	0,2735	0,9992	1,877
3	5	27,51	C=24-29	6	-8,6251	0,2787	0,9973	1,900
4	4	31,56	C=29-33	5	-9,5735	0,2719	0,9976	1,870
5	3	34,12	C=31-35	5	-10,347	0,2763	0,9990	1,889
ÁTLAG						0,2742		1,880
SZÓRÁS						0,0033		0,0145

Az eredményekből megállapítható, hogy az exponenciális szakaszok meredeksége között nincs szignifikáns különbség, a standard görbe megszerkeszthető.

### 5.3.4. Standard görbék vizsgálata

A 9. táblázat adatainak átlagértékeiből megszerkesztett standard görbe a 35. ábrán látható.



**35 ábra** *L. monocytogenes* L1. Standard görbe linearitás (Átlagérték ± SD)

A *Listeria monocytogenes*-re vonatkozó standard görbe robusztusságának vizsgálata érdekében a másik, (L2.) törzset is bevontam az értékelésbe. Az egyesített adatokat a 12. táblázatban foglaltam össze.

**12. Táblázat** *Listeria monocytogenes* L1. és L2. egyesített adatai

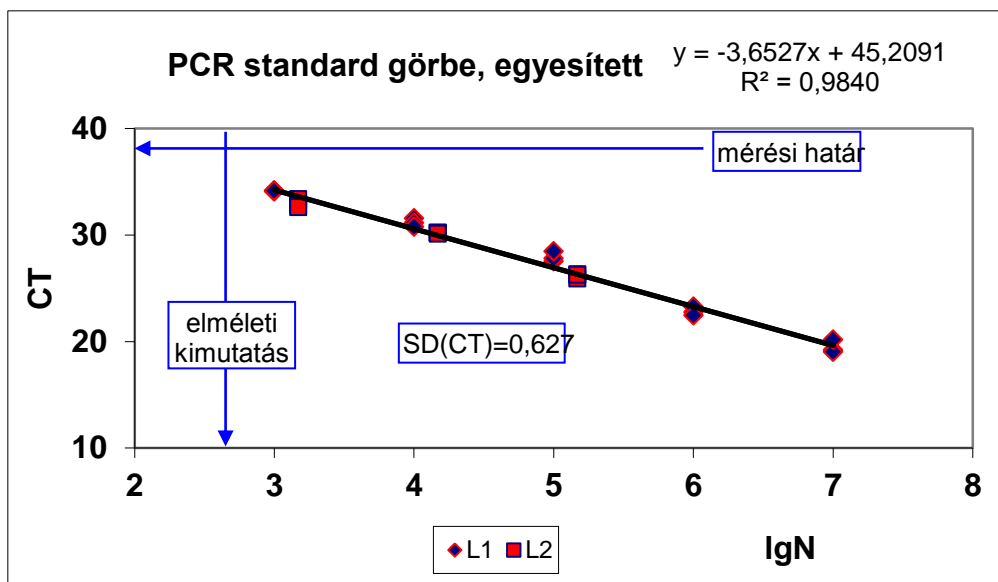
	lg N	CT			Átlag	S <sup>2</sup>	S
Listeria L1.	7,00	19,2	19,01	20,15	19,45	0,3730	0,6108
	6,00	22,73	23,26	22,43	22,81	0,1766	0,4203
	5,00	27,51	27,79	28,44	27,91	0,2276	0,4771
	4,00	31,56	31,13	30,77	31,15	0,1564	0,3955
	3,00	34,15	34,07	34,12	34,11	0,0016	0,0404
Listeria L2.	5,17	25,91	26,28	26,26	26,15	0,0433	0,2081
	4,17	30,19	30,2	30,1	30,16	0,0030	0,0551
	3,17	33,66	32,77	32,59	33,01	0,3282	0,5729
Max S <sup>2</sup>						0,3730	
Sum S <sup>2</sup>						1,3099	
Átlag S <sup>2</sup>						0,1637	
C						0,2848	

Cochran próba a szórásnégyzetek vizsgálatára:  $C = S^2(\max)/\Sigma S^2 = 0,2848$

Táblázatos érték 3 párhuzamos, 8 szórásnégyzet:  $C(95\%) = 0,516$

A számított C érték kisebb a kritikusról, tehát a szórásnégyzetek között nincs kiugróan nagy érték, a regressziós vizsgálat elvégezhető.

A 9. és 10. táblázatban összefoglalt adatokból közös regresszióval megszerkesztett standard görbét a 36. ábra mutatja be. A regresszió-analízist a 13. táblázat tartalmazza.



36. ábra *L. monocytogenes* egyesített standard görbéje

13. Táblázat Egyesített standard görbe regresszió-analízise

<i>Regressziós statisztika</i>	
r értéke	0,9920
r-négyzet	0,9840
Korrigált r-négyzet	0,9833
Standard hiba	0,6273
Megfigyelések	24

VARIANCIANALÍZIS

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Sign.</i>
Regresszió	1	532,020	532,09	1351,9	3,0E-21
Maradék	22	8,657	0,3935		
Összesen	23	540,678			

	<i>Koefficiens</i>	<i>St. Hiba</i>	<i>t érték</i>	<i>p-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Felső 95%</i>
Tengelymetszet	45,2091	0,4831	93,5	4,1E-30	44,21	46,21
Meredekség	-3,6527	0,0993	-36,7	3,0E-21	-3,859	-3,447

A 36. ábrán bemutatott egyesített standard görbéről leolvasható, hogy a mérési módszer a teljes vizsgált tartományban szoros lineáris összefüggést ad a detektációhoz szükséges ciklus-szám (CT) és a sejtszám logaritmus között:

Egyesített standard görbe:  $CT = 45,209 - 3,6527 \cdot \lg N$   
 $n=24, R^2=0,9840, SD(CT)=0,627$

CT értékek érzékenysége a minta sejtszám-változására számítva:

$$\frac{\partial CT}{\partial \lg N} = -3,653$$

A minta sejtszámának egy nagyságrendnyi növelése a kimutatáshoz szükséges ciklusok számát 3,65-tel csökkenti.

### 5.3.5. A PCR-reakció hatékonyságának vizsgálata

Standard görbe:  $CT = 45,209 - 3,6527 \cdot \lg N$

$$Ct = a - \frac{1}{\lg(E)} \cdot \lg N$$

Standard görbe meredeksége:

$$m = - \frac{1}{\lg(E)} = -3,653$$

Hatékonyság:

$$E = 10^{-1/m} = 1,878$$

Százalékos hatékonyság  $\%E = 87,8\%$

Figyelembe véve a meredekség 13. táblázatban feltüntetett konfidencia-határait:

Alsó határ  $m \text{ (alsó)} = -3,859 \rightarrow E = 1,816 \rightarrow \text{Százalékos hatékonyság} = 81,6\%$

Felső határ  $m \text{ (felső)} = -3,447 \rightarrow E = 1,950 \rightarrow \text{Százalékos hatékonyság} = 95,0\%$

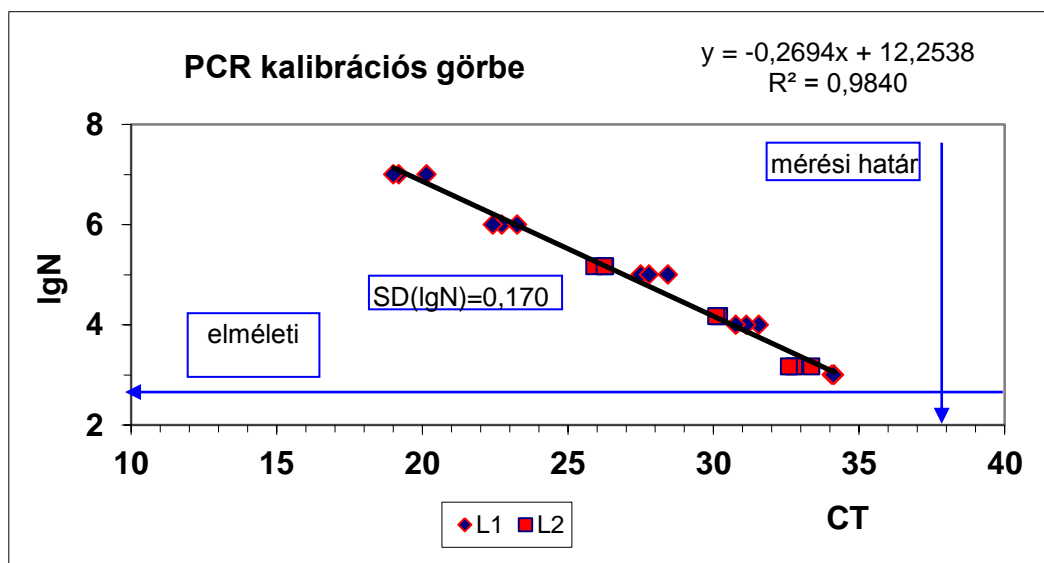
A konfidenciaintervallum figyelembevételével megállapíthatjuk, hogy az (L1. és L2.) egyesített Standard görbe alapján számított PCR hatékonyság ( $E=1,878$ ) nem különbözik



szignifikánsan az L1. törzs egyedi amplifikációs görbéiből számított, 11. Táblázatban összefoglalt (átlagosan E=1,880) egyedi hatékonyságoktól.

### 5.3.6. Kalibrációs görbe meghatározása

A kvantitatív PCR vizsgálatok során a mért CT értékekből határozzuk meg a minta mikrobaszámát a  $\lg N = f(CT)$  összefüggés (*kalibrációs görbe*) alapján. Az egyesített kalibrációs görbét a 37. ábra mutatja be. A Regresszió-analízist a 14. Táblázat tartalmazza.



37. ábra *L. monocytogenes* egyesített kalibrációs görbéje

### 14. Táblázat Egyesített *Listeria*-adatok regresszió-analízise

#### ÖSSZESÍTŐ TÁBLA

<i>Regressziós statisztika</i>	
r értéke	0,9920
r-négyzet	0,9840
Korrigált r-négyzet	0,9833
Standard hiba	0,1704
Megfigyelések	24

## VARIANCIANALÍZIS

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>Sign.</i>
Regresszió	1	39,2366	39,2366	1351,9	3,0E-21
Maradék	22	0,6385	0,0290		
Összesen	23	39,8751			

	<i>Koefficiens</i>	<i>St. Hiba</i>	<i>t érték</i>	<i>p-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Felső 95%</i>
Tengelymetszet	12,2538	0,2087	58,7	1,1E-25	11,82	12,69
Meredekség	-0,26939	0,00733	-36,7687	3,0E-21	-0,2846	-0,2542

Egyesített kalibrációs görbe:  $\lg N = 12,356 - 0,2694 \cdot CT$   
 $R^2 = 0,9840$   
 $SD(\lg N) = 0,170$   
 $n = 24$

Az egyesített kalibrációs görbéből meghatározható a mérési módszer érzékenysége és a PCR reakció hatékonysága:

Kalibrációs görbe:

$$\lg N = 12,356 - 0,2726 \cdot CT$$

Elméleti érzékenység:

$$\frac{\partial \lg N}{\partial CT} = -\lg(2) = -0,3010$$

Mért érzékenység:

$$\frac{\partial \lg N}{\partial CT} = -\lg(E) = m = -0,2694$$

### 5.3.7. A kvantitatív PCR-rel végzett sejtszám-meghatározás ismételhetsége

A PCR-módszer ismételhetségét (a  $\lg N$  értékek véletlen hibáját) a 12. Táblázatban lévő regressziós összefüggés variancia analízisének maradék szórásnégyzetéből határoztuk meg.

Maradék szórásnégyzet:  $S_0^2(\lg N) = 0,0290$   
Véletlen hiba:  $S_0(\lg N) = 0,170$   
N értékek Variációs koefficiense:  $CV = 10^{0,17} - 1 = 1,480 - 1 = 0,480$   
Mikrobaszámok relatív szórása:  $\pm 48\%$

## 5.4. Élelmiszer-biztonsági kritériumok

### 5.4.1. *Listeria monocytogenes* kimutatás

#### 5.4.1.1. *L. monocytogenes* szelektivitás

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

Három különböző (a, b és c jelű) táplevesben vizsgáltam a 4.2.3.3. pontban leírt baktériumok szaporodását 37°C-on. A 250 ml-nyi tápleveseket 1 ml (kb. 10<sup>6</sup> cfu) tenyésztettel oltottam be (ferde agaron lévő tiszta tenyészetet 9 ml peptonvízzel lemosva, majd tízes alapú hígítási sort készítve a 3. hígítási fokból származóan). A szaporodást a redoxgörbék felvételével mértem.

a.) Fraser Listeria Selective Enrichment Broth (Merck110398) + Fraser Listeria Supplement (Merck100093). 37. ábra.

Baktériumszaporodás: mindhárom *L. monocytogenes* törzs, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus*.

b.) Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck 111951) + Listeria Selective Enrichment Supplement acc. to FDA-BAM 1995/IDF-FIL (Merck 110549). 38. ábra.

Szaporodik: mindhárom *L. monocytogenes* törzs, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *Staphylococcus aureus*.

Nem szaporodik: *E. coli*

c.) Listeria Enrichment Broth (LEB) Base acc. to FDA/IDF-FIL (Merck) + Oxford Listeria Selective Supplement (Merck107006). 39. ábra.

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

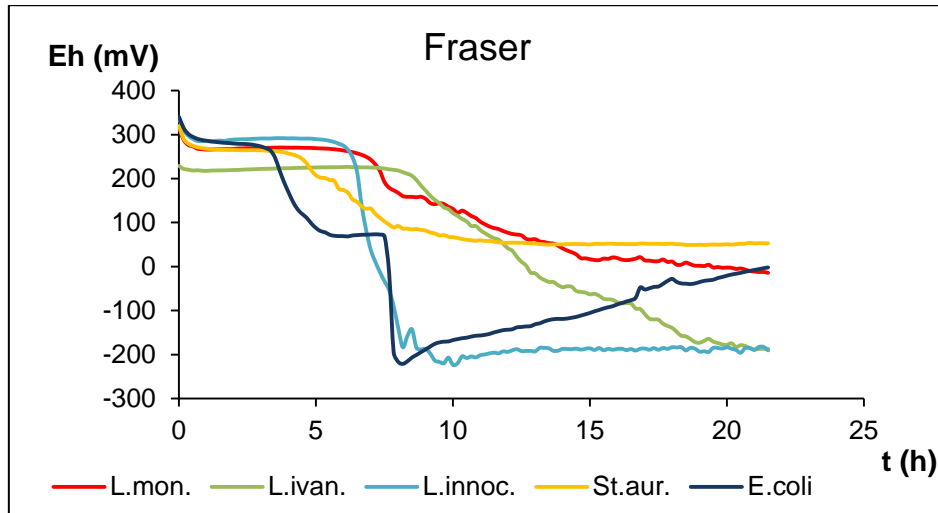
Nem szaporodik: *L. ivanovii*, *E. coli*. Gátolt: *Staphylococcus aureus*.

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

Kiegészítve a vizsgálandó mikrobákat a *Bacillus cereus*-szal (nem szaporodik) és *Bacillus subtilis*-szel (szaporodik), a c.) táptalaj szelektivitása a 39. ábrán látható. Mivel az *E. coli* szaporodás teljes mértékben gátlódik, a részlegesen gátolt *Staphylococcus aureus* pedig nem csökkenti a táptalaj redoxpotenciálját a *Listeria*

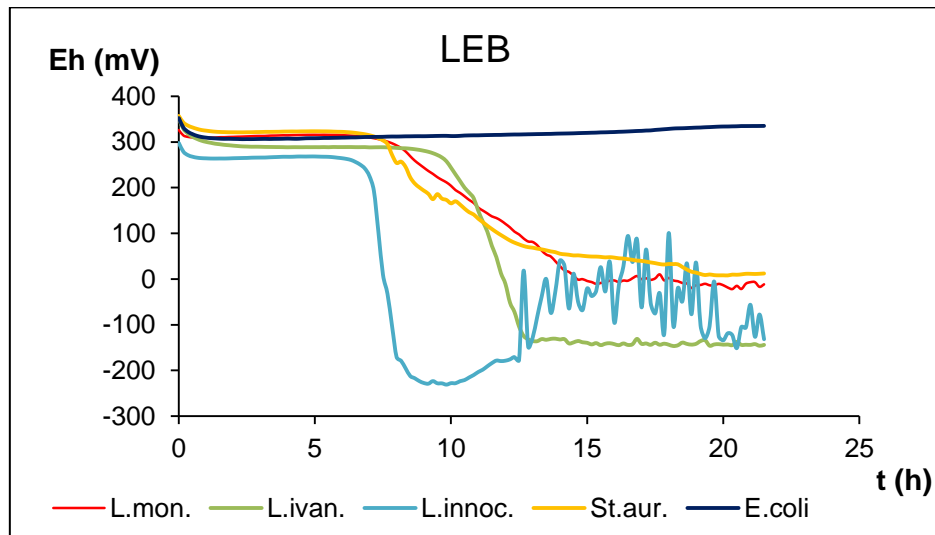
fajokhoz hasonló mértékben, a jellemző redox görbe alapján azonosítható a *L. monocytogenes* és a *L. innocua*.

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



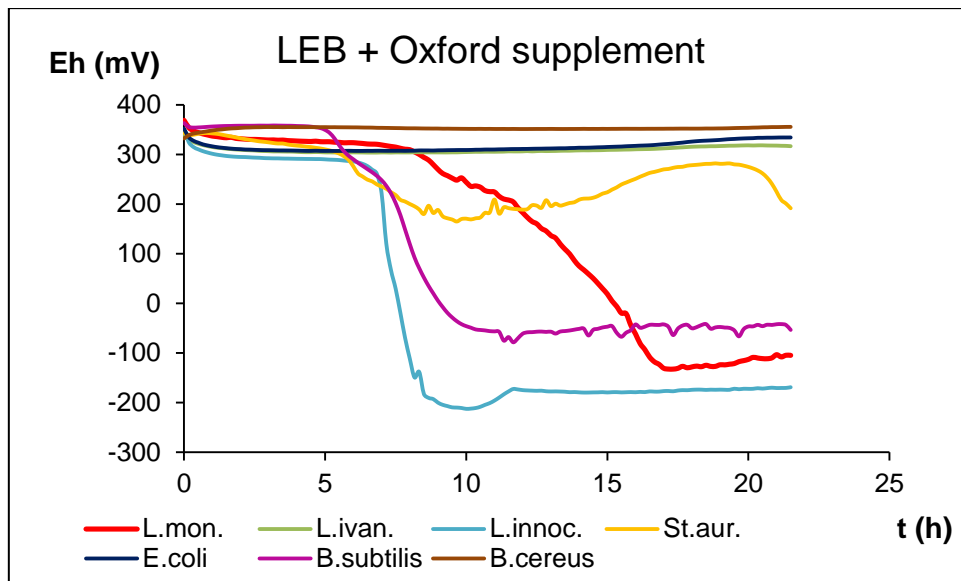
**37. ábra** Fraser tápleves szelektivitása

Fraser táplevesben az összes vizsgált mikroba szaporodott.



**38. ábra** LEB *Listeria* selective enrichment supplementtel

A LEB tápközeg csak az *E. coli* szaporodását gátolta.



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

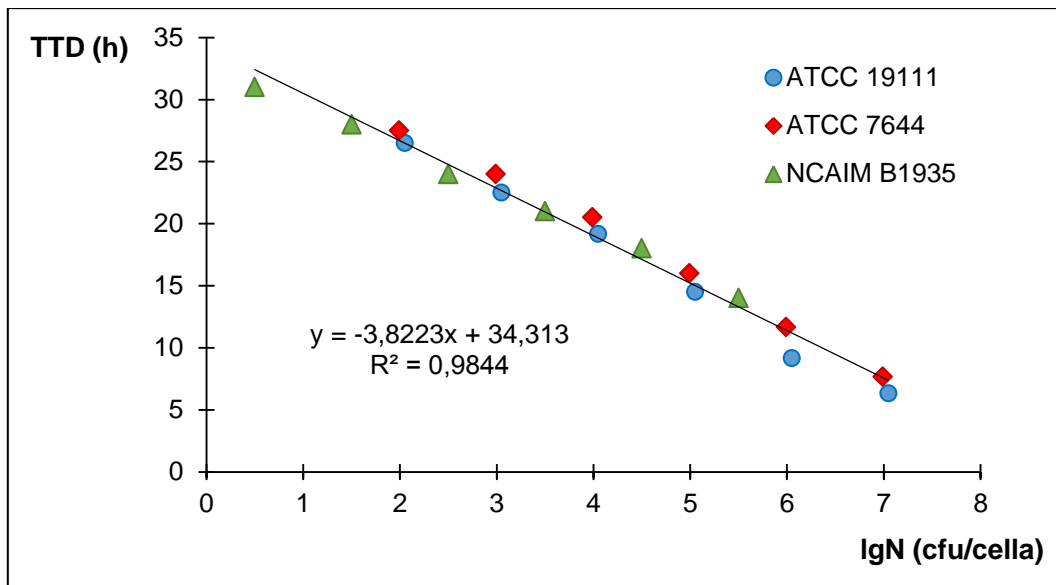
A LEB + Oxford supplementben csak a *L. monocytogenes*, *B. subtilis* és *L. innocua* szaporodott.

A redoxpotenciál-mérés alapján a LEB + Oxford supplement volt a legszelektívebb táptalaj *Listeria monocytogenes*re, de a *Listeria* fajok és a *Bacillus subtilis* redoxgörbéi egymástól nem különíthetők el. A differenciálás nehézsége miatt, abban az esetben, ha a *L. monocytogenes* jelenléte nem zárható ki, az azonosítást el kell végezni. A *L. monocytogenes* jelenlétének megerősítésére real-time PCR-t alkalmaztam

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

A redoxpotenciál-mérés Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben történt. A kalibrációs görbe meghatározásához *Listeria* törzsek ferde agar tenyészetét lemostam, és pepton vízzel tízes alapú hígítási sort készítettem a 6.-ik hígítási fokig. Minden hígítási fokból 1 ml-t pipettáztam a 250 ml LEB + Oxford supplementet tartalmazó redox-mérőcellába. A mérést elindítva a készülék automatikusan meghatározza a kimutatási időket az egyes hígítási fokokhoz tartozóan.

Ábrázolva az egyes hígítási fokokhoz tartozó IgN értékek függvényében a mért TTD értékeket, az ún. mérési görbét kapjuk, amely a 40. ábrán látható.



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

Az ábrán mindhárom *Listeria monocytogenes* törzs eredményeit feltüntettem. A három különböző *Listeria* törzsszel történt mérés (1: ATCC 19111, 2: ATCC 7644, 3: NCAIM B1935) eredménye egyetlen közös egyenessel ábrázolható.

Az egyenes egyenlete:

$$TTD = 34,31 - 3,8223 \cdot \lg N$$

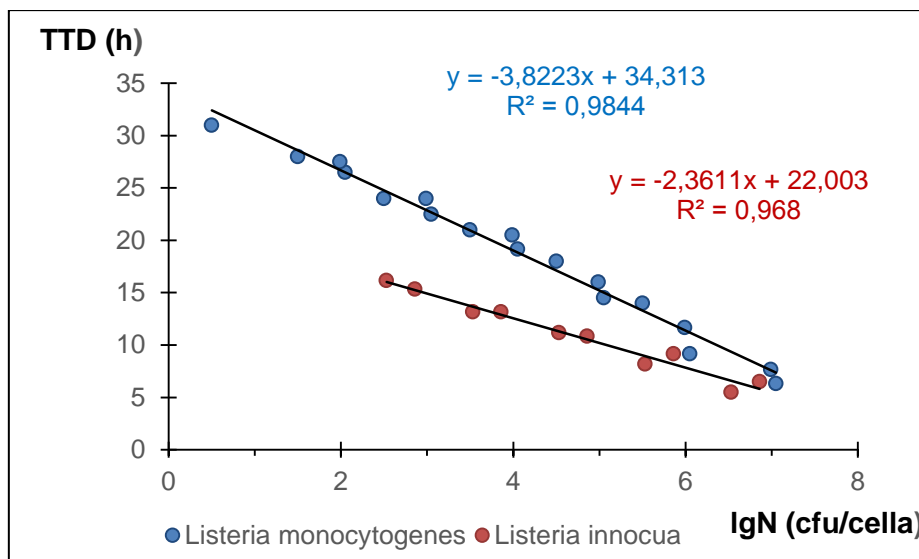
Az egy sejt kimutatásához szükséges időigény ( $\lg N=0$ ) a mérési görbe tengelymetszetéből számítható ki:  $TTD = 34,31$  h.

A regresszió variancia táblázatából (13. táblázat) meghatározható a tengelymetszet 99 %-os konfidencia intervalluma, amelynek felső értéke az egyetlen élő *L. monocytogenes* sejt kimutatásához szükséges idő maximuma, 36 óra.

**13. Táblázat** Egy sejt kimutatásához szükséges mérési idő meghatározása

	Koefficiensek	Standard hiba	t Stat	P-érték	Alsó 99%	Felső 99%
Tengelymetszet	34,3131	0,5318	64,52	9,09E-21	32,76	35,87
Meredekség	-3,8223	0,1203	-31,77	6,96E-16	-4,17	-3,47

Közös ábrán ábrázolva a *Listeria monocytogenes* és a *Listeria innocua* mérési eredményeit, megállapíthatjuk, hogy a két görbe szignifikánsan különbözik egymástól (41. ábra).

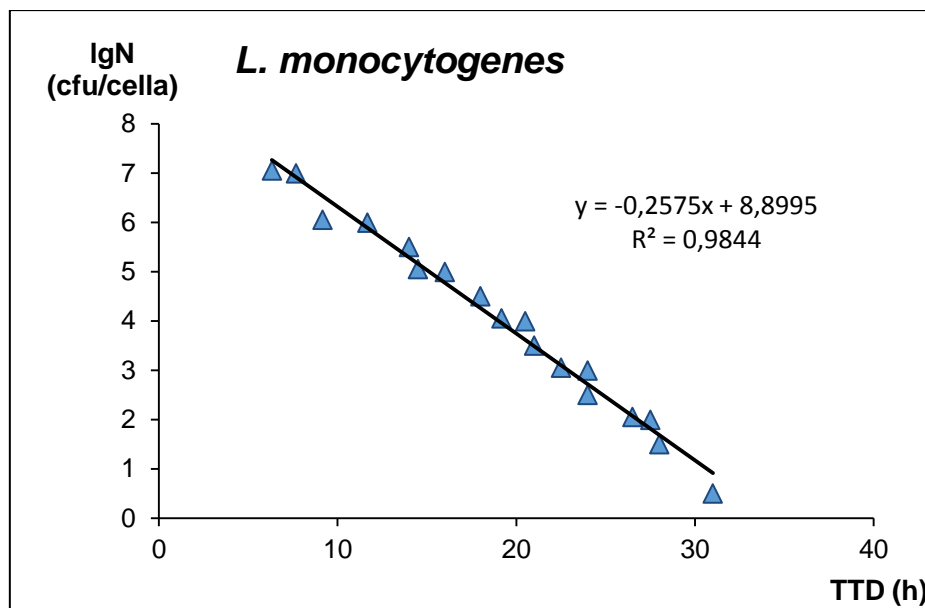


**41. ábra** *Listeria monocytogenes* és *Listeria innocua* mérési görbéi Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben

Ahogy az ábrán is látható a *L. monocytogenes* szaporodási rátája kisebb, mint a *L. innocua*-é. (azonos sejtszámhoz tartozó TTD-je magasabb). Az időigény, amely a mérőcellában található egyetlen sejt kimutatásához szükséges (lgN=0) a mérési görbe tengelymetszetéből TTD(0) határozható meg. Ha ezen időtartam alatt TTD nem detektálható, a mérőcella nem tartalmaz élő baktériumot.

Tekintve, hogy a *L. monocytogenes* szaporodik lassabban és figyelembe véve a konfidencia intervallum felső határát, kijelenthetjük, hogy ha nincs TTD 36 órán belül, akkor a minta *L. monocytogenes* mentes. A *L. monocytogenes*-negatív minták kiszűrésének időigénye 36 óra. Kontamináció esetén ez az idő lényegesen rövidül. A TTD a lehetséges pozitív mintát jelenti. A hígítatlan minta lemezöntéssel vizsgált sejtszámának betáplálása után, a szoftver meghatározza a kalibrációs görbe egyenletét, amely a TTD függvényében számítja ki a sejtszám logaritmusát.

A kalibrációs görbét a 42. ábrán mutatom be. A regresszió-analízis eredményeit a 14. táblázat foglalja össze.



42. ábra *L. monocytogenes* kalibrációs görbe

#### 14. Táblázat Regresszió analízis

##### ÖSSZEFOGLALÓ TÁBLÁZAT

<i>Regressziós statisztika</i>	
R értéke	0,9922
R <sup>2</sup>	0,9844
Korrigált R <sup>2</sup>	0,9834
Standard hiba	0,2454
Megfigyelések	18

##### ANOVA

	<i>df</i>	<i>SS</i>	<i>MS</i>	<i>F</i>	<i>F szignifikancia</i>
				1,01E+0	
Regresszió	1	60,7887	60,7887	3	6,96E-16
Maradék	16	0,9637	0,0602		
Összes	17	61,7524			

	<i>Koefficiense k</i>	<i>Standard hiba</i>	<i>t Stat</i>	<i>P-érték</i>	<i>Alsó 95%</i>	<i>Felső 95%</i>
Tengelymetszet	8,8995	0,1643	54,16	1,48E-19	8,55	9,25
Meredekség	-0,2575	0,0081	-31,77	6,96E-16	-0,27	-0,24



Műszeres mikrobaszám-meghatározási módszernél, mivel az eljárás kalibrációs görbéken alapul, az ismételhetőséget a  $\lg N = f(\text{TTD})$  értékek regresszió analízisének standard hibája adja meg.

Validálási jellemzők a regressziós egyenesből számítva:

<i>Linearitás:</i>	Kimutatási tartomány egészében
<i>Érzékenység:</i>	( $\Delta \lg N / \Delta \text{TTD}$ , a kalibrációs görbe meredeksége): 0,26/óra
Kimutatási határ	1 élő sejt a mérőcellában
Mérési tartomány:	$10^0 - 10^7$ cfu/ml
Ismételhetőség:	$\text{SD}(\lg N) = 0,2454$

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

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

A 4.2.3.3. szakaszban (*Listeria monocytogenes* kimutatás) leírt módszer szerint előkészített minták redox-vizsgálata után a *L. monocytogenes* jelenlétre gyanús dúsított szuszpenzióból történő azonosítás PCR-rel további három órát vesz igénybe.

A vizsgálatok során a Mericon *L. monocytogenes* Kit specificitásának köszönhetően csak azok a minták bizonyultak pozitívnak, amelyeket *L. monocytogenes*-sel oltottam be. Azok a minták, amelyek redoxpotenciál-méréssel gyanúsak voltak, de *L. innocua*-t vagy *B. subtilis*-t tartalmaztak, minden esetben negatív eredményt adtak real-time PCR vizsgálattal. A beoltott minták eredményei (pozitív vagy negatív), a redoxpotenciál-mérés és a real-time PCR, valamint kombinációjuk időigénye összehasonlítva a konvencionális ISO 11290-1 standard módszerrel a 15-17. táblázatokban látható.

**15. Táblázat** *L. monocytogenes* kimutatás és azonosítás alacsony szennyezettségi szint esetén

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

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

Összesen: identifikálás teljes időigénye, Redox + PCR

Standard: MSZ EN ISO 11290-1

TTD: Time to Detection,

SD(TTD) = 0,25 h

**16. Táblázat.** *L. monocytogenes* kimutatás és azonosítás közepes szennyezettségi szint esetén

Módszer	N	Szabványos	Redoxpotenciál	Real-time PCR	Összesen		
	(cfu/ml)	szaporodás	TTD(h)	idő (h)	idő(h)		
Tej		---	---	36<	-	36	
<i>L. monocytogenes</i>	2,2·10 <sup>3</sup>	+++	+++	22	+++	3	25
<i>L. ivanovii</i>	3,5·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>L. innocua</i>	9,8·10 <sup>3</sup>	---	+++	15	---	3	18
<i>Staph. aureus</i>	5,6·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>E. coli</i>	2,4·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>Bacillus cereus</i>	2,4·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>Bacillus subtilis</i>	3,6·10 <sup>3</sup>	---	+++	17	---	3	20
Lágy sajt		---	---	36<	-	-	36
<i>L. monocytogenes</i>	5,4·10 <sup>3</sup>	+++	+++	21	+++	3	24
<i>L. ivanovii</i>	3,1·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>L. innocua</i>	2,5·10 <sup>3</sup>	---	+++	14	---	3	17
<i>Staph. aureus</i>	4,1·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>E. coli</i>	3,4·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>Bacillus cereus</i>	5,3·10 <sup>3</sup>	---	---	36<	-	-	36
<i>Bacillus subtilis</i>	4,2·10 <sup>3</sup>	---	+++	16	---	3	19

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

Összesen: identifikálás teljes időigénye, Redox + PCR

Standard: MSZ EN ISO 11290-1

TTD: Time to Detection,

SD(TTD) = 0,25 h

**17. Táblázat** *L. monocytogenes* kimutatás és azonosítás magas szennyezettségi szint esetén

Módszer	N (cfu/ml)	Szabványos	Redoxpotenciál		Real-time PCR		Összesen
		szaporodás		TTD(h)		idő(h)	idő(h)
Tej		---	---	36<		-	36
<i>L. monocytogenes</i>	$8,9 \cdot 10^7$	+++	+++	4,4	+++	3	7,4
<i>L. ivanovii</i>	$8,5 \cdot 10^8$	---	---	36<		-	36
<i>L. innocua</i>	$5,1 \cdot 10^8$	---	+++	2,3	---	3	5,3
<i>Staph. aureus</i>	$3,2 \cdot 10^8$	---	---	36<		-	36
<i>E. coli</i>	$4,1 \cdot 10^8$	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus cereus</i>	$1,6 \cdot 10^8$	---	---	36<			36
<i>Bacillus subtilis</i>	$6,3 \cdot 10^8$	---	+++	5	---	3	8
Lágy sajt		---	---	36<		-	36
<i>L. monocytogenes</i>	$3,5 \cdot 10^7$	+++	+++	4,6	+++	3	7,6
<i>L. ivanovii</i>	$8,3 \cdot 10^7$	---	---	36<		-	36
<i>L. innocua</i>	$6,4 \cdot 10^7$	---	+++	4,1	---	3	7,1
<i>Staph. aureus</i>	$5,6 \cdot 10^8$	---	---	36<		-	36
<i>E. coli</i>	$2,4 \cdot 10^8$	---	---	36<		-	36
<i>Bacillus cereus</i>	$1,9 \cdot 10^8$	---	---	36<			36
<i>Bacillus subtilis</i>	$5,9 \cdot 10^8$	---	+++	4,5	---	3	7,5

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

Összesen: identifikálás teljes időigénye, Redox + PCR

Standard: MSZ EN ISO 11290-1

TTD: Time to Detection,

SD(TTD) = 0,25 h

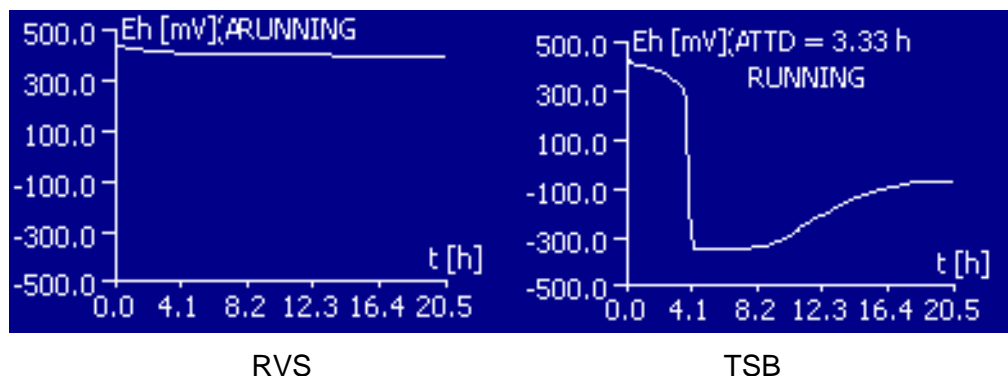
## 5.4.2. *Salmonella* kimutatás

### 5.4.2.1. Szelektivitás vizsgálat

A *Salmonella* meghatározását klasszikus mérés esetén jelentősen zavarja az *Escherichia coli* jelenléte. Megvizsgáltam, hogy képes-e az *E. coli* szaporodni (TTD-t adni) az RVS táplevesben, 42°C hőmérsékleten. Megállapítottam, hogy az *E. coli* az RVS-ben nem szaporodik, így a *Salmonella* Microtesterrel történő kimutatása esetén nem ad fals pozitív eredményt. Pozitív kontrollként az *E. coli* azonos koncentrációját a nem szelektív TSB táplevesben vizsgáltam.

Feltételezve, hogy az igen komplex táptalajt jelentő tej jelenlétében csökken az RVS szelektivitása, így esetleg az *E. coli* szaporodása is lehetővé válhat. A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a tej nem csökkenti az RVS szelektivitását, vagyis az *E. coli* tej jelenlétében sem ad az RVS-ben TTD-t.

A 43. ábrán az *E. coli* RVS-ben, mellette az *E. coli* TSB-ben végzett vizsgálatának eredménye látható, a tej mennyisége mindkét esetben 10 % volt. (T=42 °C)



**43. ábra** *Escherichia coli* redoxgörbéi RVS-ben és TSB-ben (T = 42 °C)

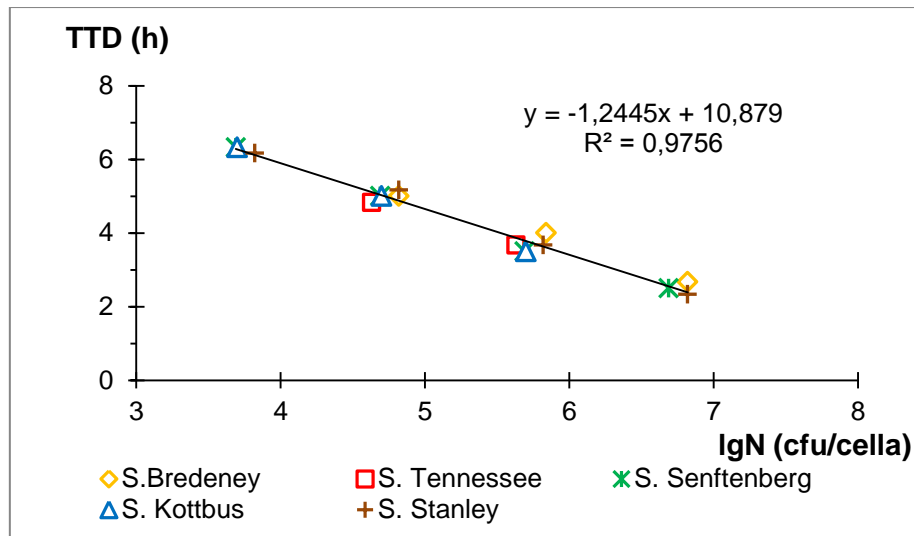
További zavaró mikrobákat vizsgáltam: *Proteus vulgaris*, *Klebsiella oxytoca*, *Citrobacter freundii* esetén is azt tapasztaltam, hogy azok sem tej nélkül, sem tejjel nem szaporodnak RVS-ben.

Megvizsgáltam, hogy a különböző *Salmonella* szerotípusok TSB táplevesben mért kalibrációs görbéi ábrázolhatók-e egy közös görbével. Az eredmények alapján megállapítható, hogy valamennyi *Salmonella* közös görbe nem alkalmazható. A *Salmonella* kalibrációs görbéik alapján 4 csoportba oszthatók, az egyes csoportokon belül közös mérési görbe alkalmazható.

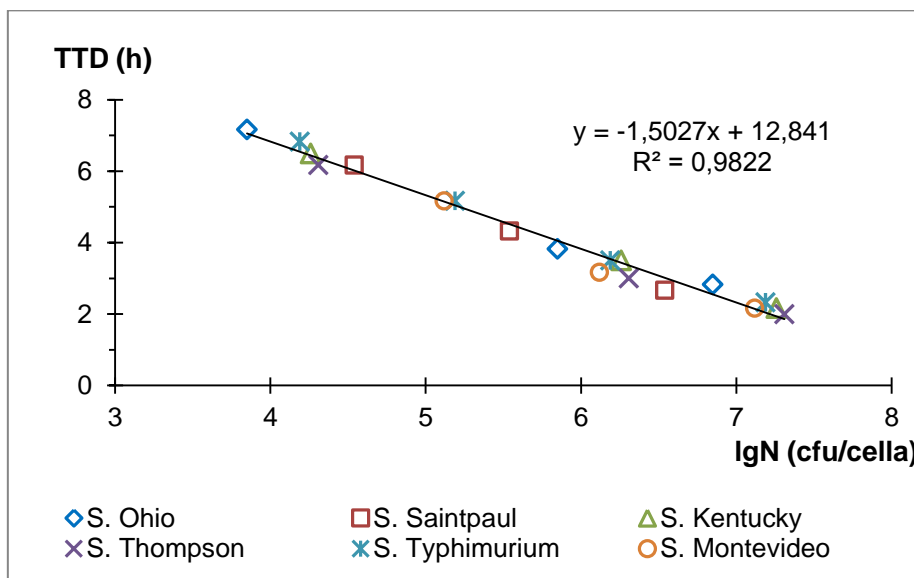
Közös kalibrációval jellemezhető *Salmonella* csoportok (44-47. ábra)

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

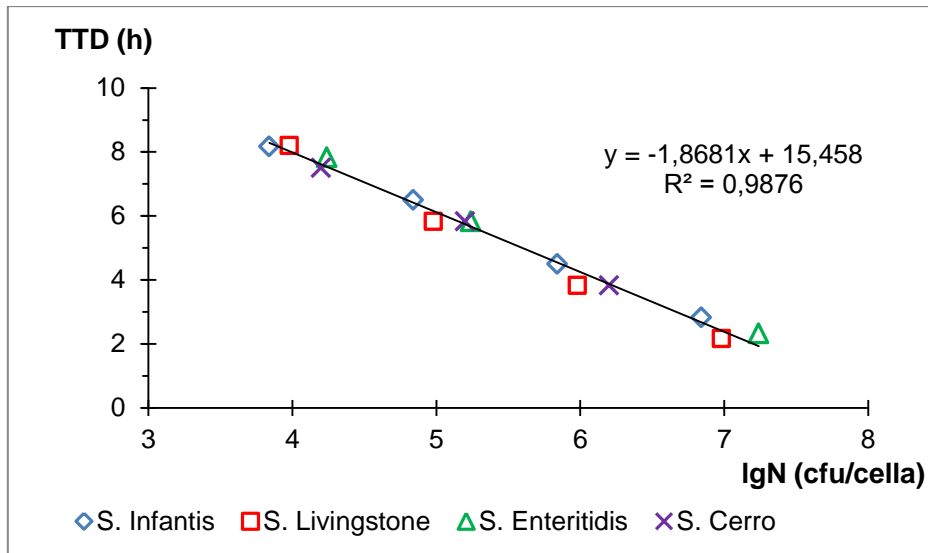
A \*-gal jelölt szerotípusok mérési görbéit RVS táplevesben is meghatároztam (48. ábra)



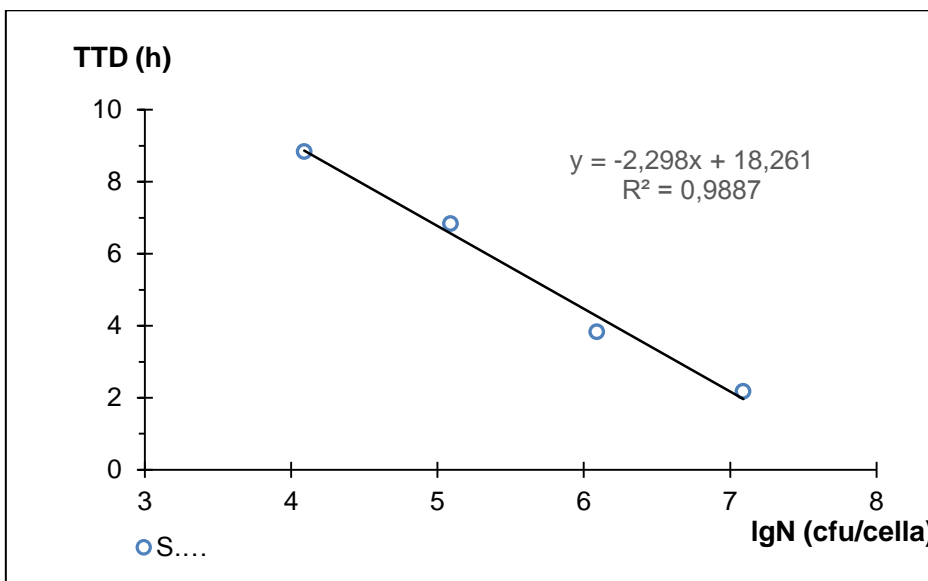
44. ábra *Salmonella* I. csoport mérési görbéje TSB táplevesben



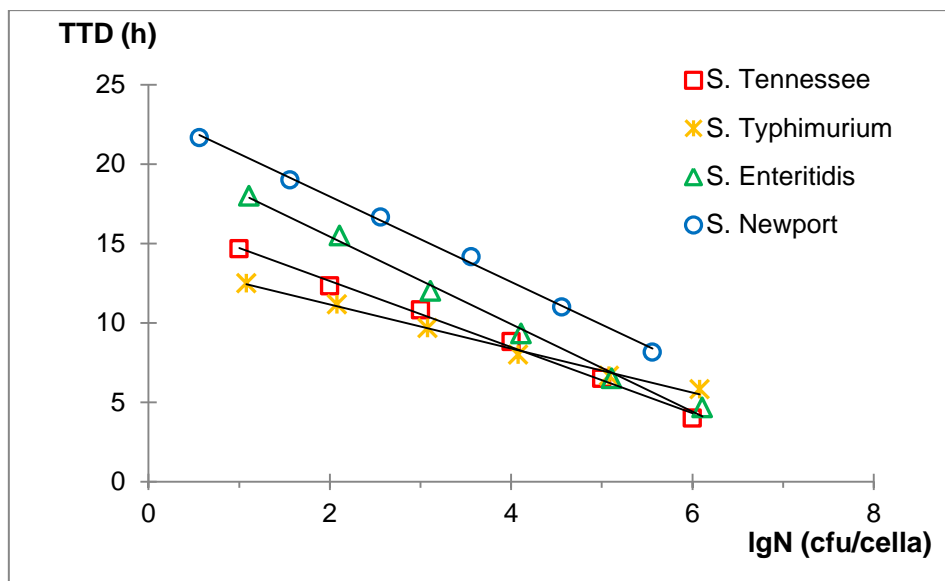
45. ábra *Salmonella* II. csoport mérési görbéje TSB táplevesben



46. ábra *Salmonella* III. csoport mérési görbéje TSB táplevesben



47. ábra *Salmonella* IV. csoport mérési görbéje TSB táplevesben



48. ábra *Salmonella* szerotípusok mérési görbéi RVS táplevesben

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

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

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

#### 5.4.2.2. Élelmiszerminták előzetes vizsgálata

Tej, tojás és csirkehús *Salmonella* szennyezettségét ellenőriztem (jelenlét/hiány próba). 5-5 mintát vizsgáltam az egyes élelmiszer-típusokból 2 párhuzamosban, klasszikus tenyésztési módszerrel, redoxpotenciál-méréssel és redoxpotenciál-mérést követően real-time PCR



vizsgálattal (30 meghatározás módszerenként). A három különböző módszerrel kapott eredmények azonosak voltak.

A tej és tojásminták nem tartalmaztak *Salmonellát*. Az 5 húsmintából 1 bizonyult negatívnak, 4 minta tartalmazott *Salmonellát*. Ezen eredmények alapján a különböző módszerek összehasonlító vizsgálata során tojástermékek esetén mesterségesen fertőzött mintákat használtam, míg a brojler hús minták esetén az eredeti mikroflórát vizsgáltam.

#### 5.4.2.3. *Salmonella kimutatás mesterségesen fertőzött tojásban*

25 g mintát homogenizáltam 225 ml RVS táplevesben és oltottam be 1 ml *Salmonella* Enteritidis és *Salmonella* Typhimurium hígított szuszpenziójával. (24 órás ferde agar tenyészet pepton vízzel lemosva és hígítási sor készítve). Három sejtkoncentrációval történt a beoltás (alacsony, közepes, magas). Az aktuális szennyezettségi szintek a 19. táblázatban láthatók.

#### 19. Táblázat Tojásminták mesterséges kontaminációs szintjei (CFU/25g)

Kontamináció	alacsony	közepes	magas
<i>S. Typhimurium</i>	$1,6 \cdot 10^0$	$2,4 \cdot 10^2$	$3,6 \cdot 10^4$
<i>S. Enteritidis</i>	$1,4 \cdot 10^0$	$3,2 \cdot 10^2$	$2,4 \cdot 10^4$

A *Salmonella*-kontamináció meghatározása három párhuzamos vizsgálattal történt, összesen 21 vizsgálat módszerenként. (Natúr termék + 2 törzs x 3 mikroba-szint) x 3 párhuzamos = 21.

Az egyetlen sejt kimutatásához szükséges idő redoxpotenciál-méréssel 23,5 óra, de az erősen szennyezett minták esetén a kimutatási idő lényegesen rövidül. Az azonosítás a dúsított szuszpenziókból real-time PCR-rel további 3 órát igényel. Az eredmények (pozitív vagy negatív), a redoxpotenciál-mérés és real-time PCR módszerek, valamint kombinációjuk időigénye összehasonlítva az ISO 6579 standard módszerrel a 20. táblázatban látható.

**20. Táblázat** *Salmonella* kimutatás tojásban (3 párhuzamos átlaga)

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

\*: nincs redox görbe

\*\* : nincs jel

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

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

**5.4.2.4. *Salmonella* kimutatás csirkehúsban**

Kereskedelmi forgalomban kapható, helyi piacról származó csirkemellhús *Salmonella* fertőzöttségét vizsgáltam (20 minta, 3 párhuzamos vizsgálat). Minden mintát az ISO (2002) klasszikus tenyésztéses módszerrel is megvizsgáltam, párhuzamosan a redoxpotenciál-mérés és real-time PCR kombinált módszerrel. Az eredmények a 21. táblázatban láthatók. A 3 módszer minden esetben azonos eredményt adott (60 meghatározás módszerenként).

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

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

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

\* : nincs redoxgörbe

\*\* : nincs jel

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

*Salmonella*-pozitív redoxpotenciál-mérési eredmény esetén a redox mérőcella dúsított szuszpenziójából történt a real-time PCR-módszerrel történő azonosítás 3 óra alatt, a klasszikus biokémiai azonosítás helyett. Összehasonlítva a kombinált módszert az ISO 6579 standard módszerrel, a teljes *Salmonella* jelenlét-hiány kimutatási idő kevesebb, mint 24 óra, szemben a 114 órás klasszikus módszer időigényével. A redoxpotenciál-mérés és PCR módszerek kombinációjával jelentős mennyiségű munkát, időt és pénzt takaríthatunk meg a *Salmonella* kimutatás során.

## 6. Megbeszélés

### 6.1. Összcsíraszám és Enterobacteriaceae-szám meghatározás

Több tejfeldolgozó üzem nyers tejjel vonatkozó követelményei szigorúbbak, mint a hivatalos határértékek, mivel a szomatikus sejtszám és összcsíraszám befolyásolja a tejtermékek minőségét, eltarthatóságát és biztonságát (Barbano et al., 2006). A szabványos klasszikus tenyésztési módszer a „gold standard” az élelmiszerek mikrobiológiai állapotának meghatározása esetén, de meglehetősen idő- és munkaigényes. Számos gyorsmódszert fejlesztettek az elmúlt évtizedekben az idő- és költségcsökkentés céljából. Ready-to-use táptalajok, részben vagy teljesen automatizált alternatív módszerek, amelyek megkönnyítik a laboratóriumi munkát, gyorsabban adnak eredményt, de az inkubációs idő megegyező a szabványos módszerével (Beloti et al., 2002). Erre példa a TEMPO system, amely egy módosított tenyésztési módszer, MPN technikával kombinálva (Torlak et al., 2008). Petrifilm AC lemezek szintén alternatív megoldást biztosítanak az aerob mikrobaszám meghatározására a tejiparban (Beloti et al., 2002).

Tejben, darált húsban, halban vagy bármely más hűtött élelmiszerben, több Enterobacteriaceae nemzetségbe tartozó mikroba tud szaporodni, és számos törzs hordozhat toxin gént, amely az enteropatogén *E. coli*-hoz hasonló.

Bár a molekuláris-, immunológiai- és mikroszkópos-módszerek automatizáltak, gyorsabban adnak eredményt, kevesebb munkaerőt igényelnek, de magas beruházási- és anyagigény-költséggel járnak (Jasson et al. 2010).

Laktózt fermentáló Enterobacteriaceae kimutatására szolgáló PCR-assay a tejiparban már elérhető, de az élő és holt sejtek elkülönítése nem megoldott. A PCR-módszerek, élelmiszerminták esetén, mindig előzetes dúsítást igényelnek, módszertől függően 4-16 óra időtartamban (Soejima et al., 2012). RT-qPCR-módszer fejlesztése esetén is fontos a megfelelő dúsítási idő meghatározása, minimálisan 8 óra szükséges szelektív táplevest alkalmazva (Martín et al., 2010).

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

A meghatározás időigényét tekintve a műszeres módszer jelentősen gyorsabb, különösen akkor, ha külső kalibrációs görbével dolgozhatunk. Ebben az esetben a nyers tejjel

technológiai szempontból határértéknek tekintett  $10^4$ - $10^5$  cfu/ml (Adams and Moss, 1995) 8-9 óra alatt (nagyobb sejtkoncentráció rövidebb idő alatt) meghatározható.

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

A tenyésztéses és műszeres meghatározási módszer időigényének különbsége a detektálási kritériumok közötti eltérésre vezethető vissza. Lemezöntéses és szélesztéses módszernél különálló telep megjelenéséhez  $10^0$ -ról  $10^7$ -re történő szaporodás, határhígítási módszernél 1-10 sejtől  $10^7$ - $10^8$  sejt/ml koncentráció elérése szükséges. Műszeres mérésnél a kiindulási sejtkoncentrációról kell elérni a detektációhoz szükséges  $10^6$  sejt/ml koncentrációt. Ez utóbbi időigény a tenyésztéses módszerekhez (MSZ EN ISO 7218) viszonyítva lényegesen rövidebb.

További előny, hogy a műszeres mérés költségigénye lényegesen kisebb, mint a tenyésztéses módszeré, különösen külső kalibrációs görbe alkalmazása esetén. Ennek oka, hogy kalibrációs görbe alkalmazásakor a mikrobaszám  $10^0$  –  $10^6$  cfu/ml tartományában nincs szükség a minta hígítására, míg lemezöntéses módszer esetén az MSZ EN ISO 7218 előírásai szerint hígítási sor alkalmazása szükséges, ami anyag-, eszköz- és időfelhasználási többletet okoz.

Az elmúlt 50 évben a globális húsfogyasztás megnégyszereződött, az 1961-ben megállapított 70 millió tonnáról 2011-ben 283 millió tonnára nőtt. A megnövekedett termelés, a vásárlók igénye a magas minőségű termékek iránt és nem utolsósorban a húsipari termékek biztonsága, szükségessé teszi a minőségügyi és mikrobiológiai vizsgálati módszerek minél gyorsabbá tételét (Tao és Peng, 2014).

Nyers hús összes élő aerob mikrobaszám meghatározására szolgáló oxigénfogyasztás-mérés detektálásán alapuló rendszert írtak le. A módszerrel  $10^3$  cfu/g sejtszám esetén 12 óra alatt kapunk eredményt (O'Mahony et al., 2009). Közeli infravörös spektroszkópia (NIR) is sikeresen alkalmazható összmikrobaszám meghatározására különböző állatfajok húsainak vizsgálata esetén, de a kis mintamennyiségek gátat szabhatnak a széleskörű használatának (Barbin et al. 2013; Feng és Sun, 2013).

A húsok összcsíraszámának meghatározására PCR-módszereket is alkalmaztak, qRT-PCR segítségével 8-12 óra alatt határozható meg az összcsíraszám, de  $10^3$  cfu/g sejtszám alatt nem alkalmazható (Dolan et al., 2009.)

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

## 6.2. Környezethigiéniai vizsgálatok

Általában az egészséges állatok húsa sterilnek tekinthető a vágás pillanatában, ugyanakkor erősen szennyezett a kültakaró és a gyomor-bél csatorna. Leginkább ezek felelősek a testfelek kontaminációjáért, valamint nem csak a testfél, hanem a feldolgozó környezet is ki van téve a szennyeződés lehetőségének (Koutsoumanis et al., 2006). A feldolgozó környezetből származó élelmiszer-eredetű megbetegedést okozó baktériumok szennyezhetik a húsipari termékeket az előállítás során (Jessen és Lammert, 2003).

A higiéniai ellenőrzések egy húsfeldolgozó üzemben különböző módszerekkel történhetnek: megtekintés, tamponos mintavételi módszerrel végzett felületi vizsgálatok, ATP biolumineszcencia. A megtekintés nem pontos, a tamponos mintavételi módszer képzett személyzetet és 1-3 nap vizsgálati időt igényel. A felületen található ATP viszont nem csak baktérium-eredetű lehet, hanem élelmiszer-kontaminációból is származhat. Az ATP-kimutatás lehetőségét továbbvizsgálva, tanulmányok jelentek meg a fluoreszcens spektroszkópiás módszer alkalmazásáról (Oto et al., 2013). Más közleményekben bakteriális eredetű ATP mennyiségének becslésére UV-Vis spektrofotometriai analízis alkalmazásának lehetőségét javasolják a szerzők (Oshita et al., 2011).

A legtöbb vágóhídon és húsipari üzemben azonban a hagyományos módszerek közül a tamponos mintavételi módszerrel végzett felületi mikrobiológia vizsgálatokat alkalmazzák. Ennek a módszernek az időigénye (MSZ ISO 18593) jelentősen redukálható a redoxpotenciál-mérésen alapuló új módszer segítségével.

Ismert minta esetén előnye a módszernek, hogy kalibrációs görbét alkalmazva nincs szükség a felületi szennyezést hordozó tampon alapos lemosására, hígítási sor készítésére. A hordozó közvetlenül behelyezhető a mérőcellában lévő táptalajba és a mérés elvégezhető.

A belső kalibrációs görbe segítségével az összcsíraszám ismeretlen összetételű mikroflóra esetén is biztonsággal meghatározható. A belső kalibrációs görbe felvételének időigénye a felületek mikrobiológiai szennyezettségétől függően 15-20 óra, mely ugyan nagyobb, mint a külső kalibrációs görbével végzett vizsgálatok időigénye, de még így is jelentősen kisebb, mint a hagyományos lemezöntéses mikrobaszám meghatározáshoz szükséges idő (72 óra inkubálás összcsíraszám az MSZ EN ISO 4833 szerint, 24 óra *Enterobacteriaceae*-szám meghatározásához az MSZ ISO 21528-2 szerint). Nem szelektív táptalaj használata esetén a hígítási sorból az *Enterobacteriaceae*-szám és összcsíraszám esetenként egyidejűleg meghatározható.

### 6.3. Kvantitatív PCR teljesítmény-jellemzői

A kvantitatív PCR-vizsgálatok elfogadhatóságának 3 kritériuma (Real-Time PCR Applications Guide, 2006):

- Standard görbe linearitása  $R^2 > 0,980$
- Nagy amplifikációs hatékonyság (90 – 105%)
- Stabil ismételhetség (robosztus módszer)

A teljesítmény-jellemzőket *Listeria monocytogenes* számszerű meghatározására vonatkozóan vizsgáltam. A mikrobaszámok minden esetben standard lemezöntéssel meghatározott CFU/ml vagy CFU/g értéket jelentenek.

#### 6.3.1. Mérés határ

A kvantitatív PCR-módszer kimutatási határa, közvetlenül a PCR-reakcióba bevitt mennyiségre vonatkoztatva  $N=10$  mikrobának megfelelő DNS (Rantsiou et al., 2008; Martin et al., 2012), amit a DNS feltárás és a preparációs térfogatváltozások figyelembe vételével átszámítva az eredeti mintára 435 mikroba/ml értéket kapunk.

Kísérletileg meghatározva az alsó mérés határt kb  $10^3$  cfu/ml sejt koncentrációt határoztam meg, ami jól egyezik más szerzők vizsgálati eredményeivel (Rantsiou et al. 2008, Martin et al. 2012).

Szilárd élelmiszer minták esetén szükség van egy alaphígításra és homogenizálásra a mikrobiológiai vizsgálat előtt, ezért a minimálisan kimutatható sejtszám egy nagyságrenddel növekszik:  $N(\min) = 4,4 \cdot 10^3$  cfu/g,  $\log N(\min) = 3,64$ . Ennek megfelelően a mintára vonatkoztatott alsó mérés határ  $10^4$  cfu/g.



### 6.3.2. Linearitás

A linearitást jellemző standard görbék megszerkesztésének feltétele, hogy a detektálási küszöbhez tartozó CT-értékeket az amplifikációs görbék exponenciális szakaszában határozzuk meg, és az exponenciális szakaszok linearizált formája azonos meredekségű legyen. Kísérleteim során ezek a feltételek fennálltak.

A standard görbét két *Listeria monocytogenes* törzs egyesített adataiból megszerkesztve, annak közös egyenlete (36. ábra):

$$CT = -3,6527 \cdot \lg N + 45,209, R^2 = 0,9840$$

A vizsgált mérési tartományban ( $\lg N = 3 - 7$ ) a módszer lineáris.

A determinációs együttható alapján a standard görbe linearitása megfelel az elvárásnak:

$$R^2 = 0,9840 > 0,980$$

A standard görbe meredekségéből számított amplifikációs hatékonyság:  $E = 1,878$ .

A hatékonyság 95 %-os konfidencia-intervalluma: 1,816 – 1,950.

Százalékban kifejezett hatékonyság: %E = 87,8 %, konfidencia-intervalluma 81,6% – 95,0%.

Az alkalmazott módszer amplifikációs hatékonysága 87,8% számszerűleg kisebb az elvárt 90%-nál, bár a különbség nem szignifikáns.

A gyengébb hatékonyság feltehető oka az, hogy az alkalmazott Mericon *L. monocytogenes* Kit dúsítás utáni kvalitatív kimutatásra ajánlott termék.

### 6.3.3. Véletlen hiba

A módszer robusztus voltára utal, hogy az eltérő időben (több hét elteltével) vizsgált két *Listeria* törzs egyesített adatai szoros illeszkedésű,  $S_0(CT) = 0,62$  véletlen hibával jellemezhető közös standard görbét eredményeztek.

A mikrobaszám meghatározás véletlen hibája az egyesített kalibrációs görbe regressziós vizsgálatából meghatározva:

$$S_0(\lg N) = 0,170$$

Mikrobaszámok relatív szórása,  $CV = 48\%$

## 6.4. Élelmiszer-biztonsági kritériumok

Figyelembe véve a minimálisan kimutatható mikroba számot, nyilvánvaló, hogy a “nincs patogén mikroba 25 g élelmiszerben” kritérium direkt PCR-rel történő meghatározása elméletileg sem lehetséges.

Élelmiszer-biztonsági vizsgálatokra (jelenlét/hiány próba, illetve alacsony,  $10^3$ /ml alatti mikrobaszám meghatározása) a módszer közvetlenül nem, csak előzetes mikrobádúsítás után alkalmazható. Abban az esetben, ha alacsony sejtszámú a mintánk és jelenlét/hiány próbát szeretnénk végezni, a dúsítás fázisa, mely a sérült sejtek resuscitálása szempontjából is lényeges, különösen fontos lépés a kimutatás során.

### 6.4.1. *Listeria monocytogenes* kimutatás

*L. monocytogenes* széles körben előforduló környezeti és élelmiszer-eredetű patogén mikroba, amely akár halálos megbetegedést is okozhat az emberben. A *L. monocytogenes* jelenléte számos élelmiszerben és az egész világon növekvő számú *Listeria*-járványok előfordulása igényli a *Listeria monocytogenes* gyorsabb kimutatását. Molekuláris módszerekkel, mint a PCR, gyorsan kimutathatók és azonosíthatók a patogén mikrobák (Rijpens and Herman, 2002). A PCR-módszer használatának a költsége vagy a mintamennyiség szabhat gátat (Rodríguez et al., 2004). Kis sejtszámú minták vagy akár egyetlen sejt kimutatása esetén és a fizikailag sérült sejtek resuscitálásának érdekében a dúsítás elkerülhetetlen lépés (Cocolin et al., 2002).

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

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

A szelektív táptalajként alkalmazott, Oxford supplementet tartalmazó LEB táplevesben a *L. ivanovii* nem volt detektálható, így a *L. monocytogenes*től elkülöníthető. Konvencionális módszerrel, közvetlenül a különböző táptalajokkal a *L. monocytogenes* a többi *Listeria* fajtól nem lehet elkülöníteni a jelenlegi ismereteink szerint (Jamali et al., 2013).

A redoxpotenciál-mérési görbéjének alapján megállapítható, hogy *L. monocytogenes* jelenlétének esetén max. 36 órán belül eredményt kapunk.

Abban az esetben, ha nincs TTD 36 órán belül, a mintánk nagy valószínűséggel nem tartalmaz élő *L. monocytogenes*-t.

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

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

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

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

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

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

#### **6.4.2. Salmonella-kimutatás**

A *Salmonella*-gyérítő programok és folyamatos mikrobiológiai monitoring ellenére, az élelmiszer eredetű megbetegedések között a *Salmonella* fajok által előidézettek továbbra is a leggyakoribbak közé tartoznak (Scallan et al., 2011).

Számos élelmiszer lehet a fertőzési forrás, beleértve a különféle friss zöldségeket, gyümölcsöket és az állati eredetű élelmiszereket, mint a különböző állatfajokból származó húsok, tojás és tej (Pui et al., 2011).

A *Salmonella* fajok élelmiszermintákból történő kimutatására használt jelenlegi standard módszer az ISO 6579 számú szabványban található. Mint minden tenyésztési módszer, ez is idő- és munkaigényes, 4-7 nap szükséges a komplett kimutatáshoz (Jasson et al., 2011). Különösen lényeges a kimutatási idő csökkentése a gyorsan romló élelmiszerek esetén.

Ennek érdekében különböző PCR-módszereket és immunoassay rendszereket fejlesztettek ki az elmúlt években.

In situ hibridizációs próbát használó immunoassay alkalmazásának lehetőségéről jelent meg tanulmány, mellyel megfelelő dúsítás után, 24 óra alatt kimutható élelmiszermintákból a *Salmonella* (Almeida et al., 2010). Számos, élelmiszerekhez adaptált immunoassay kit kereskedelmi forgalomban is kapható, amelyek esetén a kimutatási határ akár 1 cfu/ 25 g vagy ml minta, de ezek a módszerek csak dúsítás után alkalmazhatók (Almeida et al., 2013). *Salmonella* fajok élelmiszermintákban történő kimutatására fejlesztettek real-time PCR-módszert, amely egy 18 órás pufferolt peptonvízben, majd 6 órás szelektív RVS táplevesben történő dúsítást foglal magába (McGuinness et al., 2012).

Másik közlemény szerint minimum 12 órás dúsítás szükséges a *Salmonella* PCR-módszerrel történő kimutatásához 100 cfu/ml mikrobaszám esetén. A kísérletek során csirkehús mintákat vizsgáltak (Myint et al., 2006).

Bár az új módszerek érzékenysége szignifikánsan nőtt, a dúsítás fázisa nem hagyható el a patogén csírák kis száma és a holt sejtek detektálásának kockázata miatt. A dúsításnak nem csak a kimutatni kívánt mikrobák számának növelése, hanem a sérült és stresszelt sejtek resuscitálása is célja (Lantz et al., 1994; Peng and Shelef, 2000; Norton, 2002; O'Grady et al., 2009). Szelektív dúsításra van szükség, hogy a természetes kísérő mikroflórát gátoljuk, valamint növeljük a kimutatási hatékonyságot és csökkentjük a fals negatív eredmény lehetőségét (Garrido et al., 2013).

Munkám során redoxpotenciál-méréseken alapuló és a real-time PCR-módszer kombinációját alkalmaztam. A redoxpotenciál-mérés, mint dúsító eljárás kiszűri a pozitív *Salmonella*-mintákat. A biokémiai megerősítés helyett a további azonosítás real-time PCR-rel történt. Negatív minták esetén redoxpotenciál-méréssel 23,5 órán belül eredményt kapunk. Összehasonlítva a standard módszer (MSZ EN ISO 6579) 114 órás időigényét a kombinált módszer 26,5 órás időigényével látható, hogy negatív *Salmonella*-minták esetén, a 2073/2005/EK rendeletben szereplő kritérium, miszerint a forgalomba hozott termék 25 grammjában az eltarthatósági ideje alatt nincs jelen *Salmonella*, lényegesen gyorsabban bizonyítható a kombinált módszerrel ily módon. A redoxpotenciál-méréseken alapuló és real-time PCR módszer kombinációja egy költség-, munka- és időtakarékos megoldást jelent a *Salmonella* kimutatására élelmiszerekben.

## 7. Új tudományos eredmények

- A redoxpotenciál-mérésre alapozott vizsgálati módszer továbbfejlesztését végeztem el, amely a módszert alkalmassá teszi a hús és tejipar területén technológiai higiéniai, környezet mikrobiológiai és élelmiszer-biztonsági vizsgálatokra. Bizonyítottam, hogy a módszer a vizsgált esetekben a szabványos tenyésztéses eljárásoktól szignifikánsan nem különböző eredményeket szolgáltat, jelentősen rövidebb (általában 1 napon belüli) idő alatt.
- Adaptáltam a redoxpotenciál-mérésen alapuló mikrobiológiai módszert a legfontosabb technológiai higiéniai kritériumok, összes mikroba és Enterobacterium-szám gyors, (esetenként 6-8 óra alatti), egyszerű és költséghatékony meghatározására. Vizsgálatokkal bizonyítottam annak alkalmazhatóságát nyers tej, hús és húskészítmények, valamint környezeti higiéniai minták mikrobiológiai ellenőrzésében. A módszer lehetővé teszi a felhasználásával nyert mikrobiológiai eredmények HACCP rendszerbe való gyors visszacsatolását (Erdősi et al., 2012; Erdősi et al., 2013; Szakmár et al., 2009).
- A redoxpotenciál-mérés és Real-time PCR módszerek kombinációjával módszert dolgoztam ki *L. monocytogenes* élelmiszer mintákból történő költség- és időtakarékos, gyors kimutatására. A kombinált módszer előnye, hogy a dúsítási lépésként alkalmazott redox-módszer kiszűri a negatív mintákat így a felesleges PCR azonosítás költsége megtakarítható. (Erdősi et al., 2014 közlésre elfogadva)
- Kifejlesztettem a redoxpotenciál-mérésen alapuló és a Real-time PCR módszer kombinációját költség-, munka- és időtakarékos megoldásként *Salmonella* kimutatására élelmiszerekben. A redoxpotenciál-mérés, mint dúsító eljárás kiszűri a pozitív *Salmonella* mintákat, a biokémiai megerősítés helyett a további azonosítás real-time PCR-rel történik. A pozitív minták azonosítása 5 napról 1 napra csökkenthető. (Erdősi et al., 2013, közlésre elfogadva).

## 8. Irodalom

**A Bizottság 2073/2005/EK rendelete az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól, 2005.**

**Az Európai Parlament és a Tanács 178/2002/EK rendelete az élelmiszerjog általános elveiről és követelményeiről, az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság létrehozásáról és az élelmiszerbiztonságra vonatkozó eljárások megállapításáról, 2002.**

**Az Európai Parlament és a Tanács 853/2004/EK rendelete az állati eredetű élelmiszerek különleges higiéniai szabályainak megállapításáról, 2004.**

Adams, M.R., Moss, M. O.: **Food Microbiology**, The Royal Society of Chemistry, 108, 1995.

Aarestrup, F. M., Hendriksen, R. S., Lockett, J., Gay, K., Teates, K., McDermott, P. F., White, D. G., Hasman, H., Sørensen, G., Bangtrakulnonth, A., Pornreongwong, S., Pulsrikarn, C., Angulo, F. J., Gerner-Smidt, P.: **International spread of multidrug-resistant Salmonella Schwarzengrund in food products**, Emerg. Infect. Dis., 13. 726-31, 2007.

Alexander, J., Rothwell, J.: **A study of some factors affecting methylene blue test and the effect of freezing on bacterial content of ice-cream**, J. Food Technol., 5. 387-402, 1970.

Almeida C., Azevedo, N. F., Fernandes, R. M., Keevil, C. W., Vieira, M. J.: **Fluorescence in situ hybridization method using a peptide nucleic acid probe for identification of Salmonella spp. in a broad spectrum of samples**, Appl. Environ. Microbiol., 76. 4476–4485, 2010.

Almeida, C. Cerqueira L., Azevedo, N. F., Vieira, M. J.: **Detection of Salmonella enterica serovar Enteritidis using real time PCR, immunocapture assay, PNA FISH and standard culture methods in different types of food samples**, Int. J. Food Microbiol., 161. 16–22, 2013.

Anderson, G. E., Whitehead, J. A.: **The validity of the methylene blue reduction test in the grading of ice-cream**, J. Appl. Bacteriol., 37. 487-492, 1974.

Barbano, D. M., Na, Y., Santos, M.V.: **Influence of Raw Milk Quality on Fluid Milk Shelf Life**, J. Dairy Sci., 89. 15–19, 2006.

Barbin, D. F., El Masry, G., Sun, D., Allen, P., Morsy, N.: **Non-destructive assessment of microbial contamination in porcine meat using NIR hyperspectral imaging**, *Innov. Food Sci. Emerg.*, 17. 180–191, 2013.

Beloti, V., Barros, M. A. F., Nero, L. A., de Souza Pachemshy, J. A., de Santana, E.H. W., Franco, B.D.G.M.: **Quality of pasteurized milk influences the performance of ready-to-use systems for enumeration of aerobic microorganisms**, *Int. J. Dairy J.*, 12. 413–418, 2002.

Blood, R. M., Curtis, G. D. W.: **Media for 'total' Enterobacteriaceae, coliforms and Escherichia coli**, *Int. J. Food Microbiol.*, 26. 93-115, 1995.

Bolton, F. J.: **An investigation of indirect conductimetry for detection of some food-borne bacteria**, *J. Appl. Bacteriol.*, 69. 655-661, 1990.

Chasseignaux, E., Pascale, G., Marie-Therese, T., Gilles, S., Pierre, C., Gwennola, E.: **Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants**, *FEMS Microbiol. Lett.*, 210. 271-275, 2002.

Chen J., Zhang L., Paoli G.C., Shi C., Tu S. and Shi X.: **A real-time PCR method for the detection of *Salmonella enterica* from food using a target sequence identified by comparative genomic analysis**, *Int. J. Food Microbiol.*, 137. 168–174, 2010.

Cocolin, L., Rantsiou, K., Lacumin, L., Cantoni, C., Comi, G.: **Direct Identification in Food Samples of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* by molecular methods**, *App. Environ. Microbiol.*, 6273–6282, 2002.

Cousins, D., L., Marlatt, F.: **An evaluation of conductance method for the enumeration of Enterobacteriaceae in milk**, *J. Food Protect.*, 53. 568-570, 1990.

Davidson, C. A., Griffith, C. J., Peters, A. C., Fielding, L. M.,: **Evaluation of two methods for monitoring surface cleanliness-ATP bioluminescence and traditional hygiene swabbing**, *Luminescence*, 14. 33-38, 1999.

Deak, T., Beuchat, L. R.: **Evaluation of the indirect conductance method for the detection of yeasts in laboratory media and apple juice**, *Food Microbiol.*, 10. 255-262, 1993 (a).

Deak, T., Beuchat, L. R.: **Comparison of conductometric and traditional plating techniques for detecting yeasts in fruit juices**, *J. Appl. Bacteriol.*, 75. 546-550, 1993 (b).

Deák T.: **Élelmiszer-mikrobiológia**, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 250-263, 320-326, 2006.

de Freitas, C. G., Santana, A. P., da Silva, P. H. C., Gonçalves, V. S. P., Barros, M. de A. F., Torres F. A. G., Murata L., S., Perecmanis, S.: **PCR multiplex for detection of Salmonella Enteritidis, Typhi and Typhimurium and occurrence in poultry meat**, Int. J. Food Microbiol., 139. 15–22, 2010.

Doganay M.: **Listeriosis: clinical presentation**, FEMS Immunol. Med. Microbiol., 35. 173-5, 2003.

Dolan, A., Burgess, C. M., Barry, T. B., Fanning, S., Duffy, G.: **A novel quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) for the enumeration of total bacteria, using meat micro-flora as a model**, J. Microbiol. Meth., 77. 1–7, 2009.

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

**EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food borne outbreaks 2011.**; EFSA Journal, 10. 2597, 2013.

Feng, Y., Sun, D.: **Determination of total viable count (TVC) in chicken breast fillets by near-infrared hyperspectral imaging and spectroscopic transforms**, Talanta, 105. 244–249, 2013.

Filioussis, G., Anders, J., Joachim, F., Vincent, P.: **Prevalence, genetic diversity and antimicrobial susceptibility of Listeria monocytogenes isolated from open-air food markets in Greece**, Food Control, 20. 314-317, 2009.

Fischetti, V. A.: **Gram-positive pathogens**, ASM Press, 474-478, 2000.

Gantois, I., Eeckhaut, V., Pasmans, F., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F.: **A comparative study on the pathogenesis of egg contamination by different serotypes of Salmonella**, Avian Pathol., 37. 399-406, 2008.

Garrido, A., Chapela, M., Román, B., Fajardo, P., Lago, J., Vieites, J. M.: **A new multiplex real-time PCR developed method for Salmonella spp. and Listeria monocytogenes detection in food and environment samples**, Food Control, 31. 76-85, 2013.



Garvie, E.I. & Rowlands, A.,: **The role of micro-organisms in dye reduction and keeping quality tests. II. The effect of microorganisms when added to milk in pure and mixed culture**, J. Dairy Res., 19. 263-274, 1952.

Griffiths, M. W.: ***Listeria monocytogenes*: its importance in the dairy industry**, J. Sci. Food Agr., 47. 133-158, 1989.

Guerra, M., McLauchin, J., Bernardo, F. A.: ***Listeria* in ready-to-eat and unprocessed foods produced in Portugal**, Food Microbiol., 18. 423-429, 2001.

Jamali, H., Chai, L. C. and Thong, K. L.: **Detection and isolation of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods with various selective culture media**, Food Control, 32. 19-24, 2013.

Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., Uyttendaele, M.: **Alternative microbial methods: An overview and selection criteria**, Food Microbiol., 27. 710-730, 2010.

Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele, M.: **Detection of low numbers of healthy and sub-lethally injured *Salmonella enterica* in chocolate**, Int. J. Food Microbiol., 145. 488–491, 2011.

Jessen, B, Lammert, L.: **Biofilm and disinfection in meat processing plants**, Int. Biodeter. Biodegr., 51. 265–269, 2003.

Joosten, H., Marugg, J., Stephan, R., Klijn, A., Jackson, T., Iversen, C.: **A rapid and reliable alternative to ISO 21528-1:2004 for detection of Enterobacteriaceae**, Int. J. Food Microbiol., 125. 344–346, 2008.

Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, Indrani, Karunasagar, I.: **Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers**, Int. J. Food Microbiol., 64. 367–372, 2001.

Koutsoumanis, K. P., Geornaras, I., Sofos, J. N.: **Microbiology of land muscle foods**, Y.H. Hui (Ed.), Handbook of food science, technology, and engineering, Taylor & Francis, London, 52/1–52/42, 2006.

Kroll, R.G.: **Dye reduction and other colorimetric methods for the assessment of microbial contamination**. In: Adams, M.R., Hope, C.F.A. (Eds.), Rapid Methods in Food Microbiology. Progress in Industrial Microbiology, Elsevier, Amsterdam, 26. 191-233, 1989.

Kümmerlin, R.: **Resazurin test for microbiological control of deep-frozen shrimps**, J. Food Technol., 17. 513-515, 1982.

Laczay P.: **Élelmiszer-higiéniá, Élelmiszerlánc-biztonság**, Mezőgazda Kiadó, Budapest, 15-53, 2013.

Lantz, P. G., Hahnhagerdal, B., Radstrom P.: **Sample preparation methods in PCR-based detection of food pathogens**, Trends Food Sci. Technol., 5. 384-389, 1994.

Liu, D.: **Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen**, J. Med. Microbiol., 55. 645-659, 2006.

Mackay, I. M. Sakzewski A.: **Real-Time PCR in Microbiology: From Diagnosis to Characterization**, Publisher: Caister Academic Press, Virus Research Centre, Queensland, Australia. 2007.

Martín, M. C., Martínez, N., del Río, B., Ladero, V., Fernández, M., Alvarez, M. A.: **A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries**, J. Dairy Sci., 93. 860–867, 2010.

Martin, B., Garriga, M., Aymerich, T.: **Pre-PCR treatments as a key factor on the probability of detection of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in ready-to-eat meat products by real-time PCR**, Food Control, 27. 163-169, 2012.

McGuinness, S., Barry, T. O'Grady, J.: **Development and preliminary validation of a real-time RT-PCR based method targeting tmRNA for the rapid and specific detection of *Salmonella***, Food Res. Int., 45. 989-992, 2012.

Mead, P. S., Slutsker, L., Dietz, V., McCaig, L. F., Bresee, J. S., Shapiro C., Griffin, P. M., Tauxe, R. V.: **Food-related illness and death in the United States**, Emerg. Infect. Dis., 5. 607-625, 1999.

**Mericon Pathogen Detection Handbook**. 13, 2011.

**MICROTESTER Kezelési Kézikönyv**, 2013.

Mossel, D. A. A., Corry, J. E. L., Struijk, C. B., Baird, R. M.: **Essentials of the Microbiology of foods**, John Wiley & Sons, Chichester, 306-308, 1995.

Mraheil, M. A., Barbuddhe, S., Hain, T., Chakraborty, T.: **The Prokaryotes: Listeria**, 3. 219-235, 2013.

MSZ EN ISO 4833 **Horizontális módszer a mikroorganizmusok számlálására, telepszámlálási technika 30°C-on**, 2003.

MSZ EN ISO 11290-1 (módosítás: MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005. **Horizontális módszer a Listeria monocytogenes kimutatására és számlálására. 1. rész kimutatási módszer**, 1998.

MSZ EN ISO 6579 **Horizontális módszer a Salmonella fajok kimutatására**, 2002.

MSZ ISO 18593 **Horizontális módszer a felületek kontaktlemez és tamponos mintavételi eljárásaira**, 2008.

MSZ ISO 21528-2 **Horizontális módszer az Enterobakteriumok kimutatására és számlálására. 2. rész telepszámlálós módszer**, 2007.

Myint, M. S., Johnson, Y. J., Tablante, N. L., Heckert, R. A: **The effect of pre-enrichment protocol on the sensitivity and specificity of PCR for detection of naturally contaminated Salmonella in raw poultry compared to conventional culture**, Food Microbiol., 23. 599-604, 2006.

Navas, J., Ortiz, S., Lopez, P., Jantzen, M., Lopez, M., Martinez-Ruarez, J. V.: **Evaluation of effects of primary and secondary enrichment for the detection of Listeria monocytogenes by real-time PCR in retail ground chicken meat**, Foodborne Pathog. Dis., 3. 347-354, 2006.

Newell, D. G., Koopmans, M., Verhoef, L., Duizer, E., Aidara-Kane, A., Sprong, H., Opsteegh, M., Langelaar, M., Threlfall, J., Scheutz, F., van der Giessen, J., Kruse, H.: **Food-borne diseases — The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge**, Int. J. Food Microbiol., 139. S3–S15, 2010.

Nieuwenhof, F. F. J., Hoolwerf, J.D.: **Impedance measurement as an alternative to the plate count method for estimating the total count of bacteria in raw milk**, J. Food Protect., 50. 665-668, 1987.

Norrung, B., Anderson, J. K., Schlundt, J.: **Incidence and control of Listeria monocytogenes in foods in Denmark**, Int. J. Food Microbiol., 53. 195-203, 1999.

Norton, D.: **Polymerase chain reaction-based methods for detection of *Listeria monocytogenes*: toward real-time screening for food and environmental samples**, J. AOAC Int., 85. 505-515, 2002.

O'Grady, J., Ruttledge, M., Sedano-Balbás, S., Smith, T. J., Barry, T., Maher, M.: **Rapid detection of *Listeria monocytogenes* in food using culture enrichment combined with real-time PCR**, Food Microbiol., 26. 4-7, 2009.

O'Mahony, F., Green, R. A., Baylis, C., Fernandes, R., Papkovsky, D. B.: **Analysis of total aerobic viable counts in samples of raw meat using fluorescence-based probe and oxygen consumption assay**, Food Control, 20. 129-135, 2009.

Oshita, M., Al-Haq, M. I., Kawagishi, S., Makino, Y., Kawagoe, Y., Ye, X., Shinozaki, S., Hiruma, N.: **Monitoring of ATP and viable cells on meat surface by UV-Vis reflectance spectrum analysis**, J. Food Eng., 107. 262-267, 2011.

Oto, N., Oshita, Y., Makino, Y., Kawagoe, Y., Sugiyama, J, Yoshimura, M.: **Non-destructive evaluation of ATP content and plate count on pork meat surface by fluorescence spectroscopy**, Meat Sci., 93. 579-585, 2013.

Patel, J. R., Bhagwat, A. A., Sanglay, G. C., Solomon, M. B.: **Rapid detection of *Salmonella* from hydrodynamic pressure-treated poultry using molecular beacon real-time PCR**, Food Microbiol., 23. 39-46, 2006.

Peng, H., Shelef, L. A.: **Rapid detection of low levels of *Listeria* in foods and next day confirmation of *L. monocytogenes***, J. Microbiol. Methods, 41. 113-120, 2000.

Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Carrasco, E., García, R.M., Zurera, G.: **Understanding and modelling bacterial transfer to foods: a review**, Trends Food Sci. Technol., 19. 131-144, 2008.

Pesavento, G., Ducci, B., Nieri, D., Comodo, N., Lo Nostro, A.: **Prevalence and antibiotic susceptibility of *Listeria* spp. isolated from raw meat and retail foods**, Food Control 21. 708-713, 2010.

Pui, C.F. Wong, W.C. Chai, L.C Tunung, R.. Jeyaletchumi, P. Noor Hidayah, M.S Ubong, A. Farinazleen, M.G. Cheah Y.K., Son, R.: ***Salmonella*: A foodborne pathogen**, Int. Food Res. J. 18. 465–473, 2011.

Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P. and Cocolin, L.: **Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR**, Int. J. Food Microbiol. 121. 99–105, 2008.

**Real-Time PCR Applications Guide**, 2006 Bio-Rad Laboratories Inc 2006.

[http://www.bio-rad.com/pdf/Bulletin\\_5279B.pdf](http://www.bio-rad.com/pdf/Bulletin_5279B.pdf)

Reichart, O., Szakmár, K., Felföldi, L., Baranyai, L., Jozwiák, Á.: **Eljárás mikroorganizmusok szilárd, folyékony és légnemű anyagokban való jelenlétének kimutatására és számszerű meghatározására**, Szabadalom. Közzététel: 2006. december 28. 2005.

Reichart, O., Szakmár, K., Jozwiák, Á., Felföldi, J., Baranyai, L.: **Redox potential measurement as a rapid method for microbiological testing and its validation for coliform determination**, Int. J. Food Microbiol., 114. 143-148, 2007.

Rijpens N.P., Herman, L. M.: (2002): **Molecular methods for identifications and detection of bacterial food pathogens**, J. AOAC Int., 85. 984-995, 2002.

Rodríguez-Lázaro, D., Hernández, M., Pla, M.: **Simultaneous quantitative detection of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes* using a duplex real-time PCR-based assay**, FEMS Microbiol. Lett., 233. 257-267, 2004.

Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones J. L., Griffin, P. M.: **Foodborne illness acquired in the United States—major pathogens**, Emerg. Infect. Dis., 17. 7-12, 2011

Schmid-Hempel, P., Frank, S. A.: **Pathogenesis, Virulence, and Infective Dose**, PLoS Pathog., 3. 147, 2007.

Soejima, T., Minami, J., Iwatsuki, K.: **Rapid propidium monoazide PCR assay for the exclusive detection of viable Enterobacteriaceae cells in pasteurized milk**, J. Dairy Sci., 95. 3634–3642, 2012.

Stannard C. J.: **ATP Estimation**. In: Adams, M. R. and Hope ed. **Rapid Methods in Food Microbiology**, Elsevier, 1-17, 1989.

Sváb J: **Biometriai módszerek a kutatásban**, Mezőgazdasági Kiadó , 263-417, 1981.

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

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

Tao, F., Peng, Y.: **A method for nondestructive prediction of pork meat quality and safety attributes by hyperspectral imaging technique**, J. Food Engin., 126. 98–106, 2014.

Timms, S., Colquhoun, K.O., Fricker, C.R.: **Detection of Escherichia coli in potable water using indirect impedance technology**, J. Microbiol. Methods, 26 p. 125-132. 1996

Torlak E., Akan, IM., Gökmen, M.: **Comparison of TEMPO EC and TBX medium for the enumeration of Escherichia coli in cheese**, Lett. Appl. Microbiol., 47. 566-570, 2008.

[http://www.who.int/gho/publications/world\\_health\\_statistics/EN\\_WHS2013\\_Full.pdf](http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/EN_WHS2013_Full.pdf)

WHO World Health Statistic, 2013.

Zhou, X. and Jiao, X.: **Prevalence and lineages of Listeria monocytogenes in Chinese food products**, Lett. Appl. Microbiol., 43. 554–559, 2006.

**4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről**, 1998.

## 9. A doktori kutatás eredményeinek közlései

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

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

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

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

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

### Konferencia prezentációk:

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

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

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

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

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

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

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

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



## **10. Köszönetnyilvánítás**

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