

Tabajdiné dr. Pintér Veronika

**ÉLELMISZEREK SALMONELLA VIZSGÁLATAINAK ÚJABB
MÓDSZEREI I.****1. A SZALMONELLA VIZSGÁLAT JELENTŐSÉGE**

A kórokozó szalmonellák kimutatása az élelmiszerekből az élelmiszermikrobiológiai legjelentősebb feladata. A vizsgálatok jelentőségét, fontosságát mi sem bizonyítja jobban, mint hogy nemzetközi és hazai viszonylatban is az elmúlt évtizedekben évről évre növekszik a szalmonellózisban megbetegedettek száma. Tömeges élelmiszer előállítás esetén különösen nagy gondot kell fordítani a fogyasztó érdekében arra, hogy szalmonella ne forduljon elő a termékben.

A WHO becslése szerint fejlett ipari országokban is a lakosság 5-10 %-a, más becslések szerint 15%-a szenved évente élelmiszer-fogyasztással összefüggésbe hozható megbetegedés tüneteiben.

A mikrobiológiai eredetű események kórokozó szerinti megoszlását vizsgálva megállapítható, hogy kóroki tényezőként a szalmonellák állnak az első helyen, ezen belül is a *S. enteritidis* abszolút túlsúlya jellemző. Magyarországon is.

2. ÉDESIPARI VONATKOZÁSOK

Az édesipari termékek többsége alacsony vízaktivitása és magas zsírtartalma következtében nem kedvez a benne lévő mikroorganizmusok többsége szaporodásának, így a szalmonelláknak sem. A hetvenes évekig nem is igen foglalkoztak az édesipari mikrobiológusok csak a termékek minőségét befolyásoló (élesztő- és penészgombák), valamint a gyártáshigiéniát jelző (aerob mikroba és koliform) mikroorganizmusokkal.

Csokoládé okozta szalmonellózist 1970-ig nem is regisztráltak. Ezután több eset is előfordult. Édesipari termékek gyártására felhasznált, *S. durham*-mal szennyezett kakaópor volt a forrása 110 ember megbetegedésének Svédországban 1972-ben. Kanadában és USA-ban 200, három év körüli gyermek betegedett meg *S. eastbourne*-val fertőzött csokoládétól. A fertőzés a tiszta és piszkos övezet nem megfelelő szeparálásából adódó keresztszennyezésnek volt köszönhető.

Angliában 1982-83-ban 245, főleg gyermek betegedett meg *S. napoli*-t tartalmazó olasz csokoládétól. A fertőzés forrása a fertőzött hűtővíz volt.

1986-ban két csokoládé okozta fertőzés volt, ami az aktualitást igazolja. Kanadában előforduló néhány eset Belgiumból származó, S.nima-t tartalmazó csokoládé érmékre volt visszavezethető.

S.typhimurium-mal fertőzött csokoládétól több mint 300 gyerek betegedett meg. Epidemiológiai vizsgálatok igazolták ezen törzsek madaraktól való eredetét.

A fenti jelenségek magyarázata az, hogy

- a csokoládében lévő szalmonellák nagyon hosszú ideig életképesek maradnak, akár néhány évig is, továbbá nagyon nagy hőrezisztenciát mutatnak, amely az alacsony vízaktivitás és a zsír védőhatásának köszönhető. A csokoládéból izolált S.anatum-ot találták a leghőrezisztensebbnek. Bár a hőmérséklet eléri a 70-80°C-ot a finomítás, konszolás alatt, de nem sérül a szalmonella sejt.

- az infektív dózis igen alacsony, a S.napoli esetében 1,6 sejt/g , S. eastbourne esetében 0,2-1,0 sejt/g , míg S.nima esetében 0,005-0,025 sejt/g volt. Az igen alacsony infektív dózis a gyomorban való rövid tartózkodásnak (gyors felszívódás), továbbá a zsír gyomorsavval szembeni védő hatásának a következménye.

- a csokoládé gyártás során mikrobaölő technológiai műveletek nincsenek, így az alapanyagok és a környezet higiéniai állapota határozza meg a késztermék biztonságát.

A kakaó-, csokoládé- és édesipari feldolgozásra vonatkozó HACCP rendszert mind az ICMSF (1988), mind az IOCCC (1991) tárgyalja. Mindkét anyag leszögezi, hogy élelmiszerbiztonsági szempontból a Salmonella jelentős az édesipari termékekben

A különböző élelmiszer előállítók élelmezésegészségügyi előírásaikban tételenként 10, 15, 30, sőt 60 elemi mintából írják elő a szalmonella mentességet. 60 elemi minta (1500 g) negatív eredménye esetén 95 %-os biztonsággal állíthatjuk, hogy a tételből kivett 500 g minta eredménye negatív lesz, 30 elemi minta esetén 250 g-ról, 15 elemi minta esetén 125g-ról és 10 elemi minta esetén 80 g-ról állíthatjuk ugyanezt.

Más szóval, ha 95 %-os biztonsággal akarjuk a termékünket gyártani 10 mintaelemes előírás esetén, akkor 30 mintaelemes belső ellenőrzést kell végezni. E szigorú határértékek metodikai szempontból is új kihívást jelentenek a mikrobiológusok számára.

3. A KLASSZIKUS SZALMONELLA VIZSGÁLAT ESZKÖZ ÉS IDŐIGÉNYE

Az élelmiszerekből való szalmonella vizsgálatok jelenleg több lépcsőben történnek, amelynek első részében az általában kis számban előforduló szalmonellát a kísérő baktériumflóra visszaszorítása mellett dúsítják, második részben a dúsítóból való kimutatása és azonosítása történik biokémiai és

szserológiai vizsgálatokkal. Az élelmiszer fajtájától, a kísérőflóra várható nagyságától függően a szalmonella vizsgálat 3-5 napig tart. Az MSZ EN ISO 12824:1999 "Horizontális módszer szalmonellák kimutatására" szabvány szerinti munkafázisokat az 1. ábra szemlélteti.

A vizsgálat hosszadalmassága gyorsan romló élelmiszereknél, szűkös raktározási körülmények esetén és szoros szállítási határidőknél problémát okoz: a sokféle tenyésztési művelet és táptalaj használata a vizsgáló laboratórium számára jelent nehézséget. A vizsgálatokhoz tízféle táptalajra, mintánként 8-10 Petri csészére, 10-20 biokémiai sorra (30-60 csőbe fejtett táptalaj), 10-15 agglutinációra van szükség. Ennyi edény mosogatása, sterilizése, táptalajkészítés és adagolás, leoltás, tenyésztés, értékelés és utósterilizálás már felsorolva is sok időt jelent.

Végeredményben a Salmonella negatív minta esetében is jelentős számú megerősítő vizsgálat elvégzésére van szükség, mivel a tenyésztés sokszor nem eredményez könnyen azonosítható telepeket, mert ez függ pl. a Gram negatív kísérő flóra behatásától is pl. Proteus. Az alkalmazott gátlóanyagok jelenléte is akadályozza a vizsgálandó mikroorganizmusok ideális fejlődését.

A bírálat nagy gyakorlatot igényel. Ennek következtében előfordulhat téves negatív eredmény is, vagy túlzottan megnő az azonosító vizsgálatok száma.

4. TENDENCIÁK A SZALMONELLA VIZSGÁLATOK TERÜLETÉN

Az előző fejezetben ismertetett adatok alapján nem véletlen, hogy a szalmonella vizsgálatok területén az elmúlt időkben igen sokféle eljárást próbáltak e hosszú és költséges munkafolyamat csökkentésére.

A módszerfejlesztés fő irányai:

- A klasszikus vizsgálatok gyorsítása vagy egyszerűsítése új szelektív és differenciáló kromogén táptalajok kifejlesztése, elődúsítási és dúsítási eljárások módosítása.
- A dúsítók szelektivitásának növelése és műszeres méréssel való kombinálása pl. konduktancia mérés.
- DNS vizsgálati módszerek bevezetése
- Immunológiai vizsgálatok (FIA, RIA, ELISA, ELFA) alkalmazása
- Mindezen módszerek további gyorsítása a kimutatáshoz szükséges sejtszám koncentrációval való elérésével, akár közvetlenül az élelmiszerből is.

Ebben a cikkben a klasszikus vizsgálati módszerekkel elérhető eredményekről számolunk be, a következő cikkekben pedig az immunológiai, molekuláris biológiai, és konduktometria mérésen alapuló műszeres vizsgálatokkal elért eredményeinkről.

5. DÚSÍTÁSI ÉS ELŐDÚSÍTÁSI MÓDSZEREK MEGVÁLASZTÁSÁNAK JELENTŐSÉGE

Az utóbbi évtizedben számtalan új szalmonella diagnosztikai eljárás jelent meg az élelmiszer-mikrobiológiában. A vizsgáló céljának megfelelő módszer megválasztásával, a módszerek összehasonlításával számtalan tanulmány foglalkozik. Ugyanakkor jóval kisebb hangsúlyt fektetnek a szinte valamennyi kimutatási módszer alapját képező, a kimutatási határ elérését szolgáló elődúsítási és dúsítási eljárásokra. Pedig az új műszeres módszerek egyike sem nélkülözheti a megelőző dúsítási eljárásokat.

A Salmonella vizsgálati módszerek kimutatási határa elérésének optimalizálása számos tényező - például az élelmiszer összetevői, a várható kísérőflóra, a károsodott sejtek jelenléte, valamint a dúsítást követő lépések szelektivitása - miatt egyaránt fontos. Mindezek az igények a klasszikus módszerek újragondolását is megkövetelik, egyrészt a túlzott egységesítés ISO 6579 hibáinak kiküszöbölésére, de ugyanakkor a bennük rejlő új lehetőségek feltárására is.

Vizsgálataink első fázisában az elődúsítások és dúsítások módszereinek elemzését végeztük el a kimutatási módszerek függvényében.

5.1 Az élelmiszer-mátrix, a mikroökológiai környezet és a tartósítóiipari technológia hatása a Salmonella kimutatásra

A túlzott egységesítési törekvés az elődúsítási és dúsítási eljárásokat is leegyszerűsítette, elrejtve ezzel az élelmiszer-mátrix és a mikroökológiai környezet meghatározó szerepét a Salmonella kimutatásban. E felismerések és a vizsgálati eredmények rövid összefoglalóját mutatja a 2. ábra az AOAC és az MSZ EN ISO 12824 szabvány alapján. Az elődúsítás és a dúsítás vezetése alapvetően meghatározza a módszer érzékenységét mind az elődúsító, mind az elődúsítási időtartam megválasztásával. Az elődúsítás célja a sérült sejtek reszusztitációja, ami döntően függ az elődúsító összetételétől és a vizsgálandó élelmiszertől.

Néhány példával szemléltetném az ábrán vázolt összefüggéseket.

Kakaó és csokoládé termékek gátló hatást fejtenek ki a Salmonella szaporodására, amit sovány tejben történő elődúsítással lehet kompenzálni, a

várható nagyobb számban előforduló kísérő mikroflórát pedig brillantzöld oldat hozzáadásával lehet visszaszorítani.

Hagymát, fokhagymát tartalmazó termékek esetén, azok fitoncid hatásának neutralizálására 5g/l K_2SO_3 -ot javasolnak.

Tojásfehérje inhibitor hatása annak köszönhető, hogy ovotranszferin protein tartalma leköti a Salmonella növekedéséhez szükséges vasat. Vas vegyületek adagolása az elődúsítóhoz az inhibitor hatást csökkenti.

Nyers darált hús, továbbá más nagy vízaktivitású nyers vagy fermentált termékek esetén 6-8 óránál hosszabb elődúsítást nem javasolnak a nagyszámú kísérőflóra gátló hatása miatt.

Sok terméknel az alkalmazott tartósítási technológia (pl. hőkezelés) után szubletálisan sérült sejtek maradnak vissza. Ez azt jelenti, hogy ezek a sejtek közvetlenül szelektív agaron nem tenyészthetők, csak megfelelő elődúsítás után.

Ugyanakkor egyre erőteljesebb az igény a minél rövidebb idő alatti kimutatásra a biztonságos ételkészítés előállítás megvalósításához.

Az elmúlt években kutatások folytak, hogy találjanak olyan vegyületeket, amelyek a Salmonella sejtek repair kapacitását növelik, ezzel az elődúsítás idejét lerövidítik. Pless és Reissbrodt (1995) tej és tojás termékek esetében a 20 $\mu\text{g/ml}$ vas-ammónium-citrát és vas-klorid adagolásával elérték, hogy az elődúsítás 6-8 órára csökkenthető.

Saját vizsgálataink során különböző típusú vas vegyületeket választottunk e cél elérése érdekében. Az irodalomból ismert vas-ammónium-citrát, a HUMET-R makro- és mikroelemek pótlására szolgáló roborálószer és élesztősejtek által metabolizált szerves vas vegyület felhasználásával vezetett elődúsítások eredményeit a 3-5. ábrák szemléltetik nyerstej, hőkezelt tej és tojásfehérje esetében.

Az eredményekből látható, hogyan növekedett a Salmonella sejtek szaporodási képessége és repair kapacitása a vas vegyületeket tartalmazó elődúsítás után.

Újabb irodalmi adatok szerint a Ferrioxamine E egy további szerves vas vegyület, amely amellet, hogy elősegíti a Salmonella növekedését, nem segíti az E.coli, Proteus, Providencia baktériumok fejlődését, így szelektíve előnyhöz juttatja már az elődúsítás fázisában a szalmonellákat. A Ferrioxamine E a vasat Fe(III) komplex formájában tartalmazza, így egyes baktériumok számára könnyebben hozzáférhető, mint a szervesetlen vasvegyületek.

5.2. A szelektív dúsítási eljárás megválasztásának jelentősége

A leggyakrabban alkalmazott szelektív dúsítási eljárások, valamint a dúsítást követő kimutatások módszereit a 6. ábra szemlélteti.

Az előző részben leírt elődúsítási eljárást követően a szelektív dúsítást a klasszikus módon Rappaport Vassiliadis (RV) dúsítóban való dúsítás mellett félfolyékony szelektív MSRV és Diassalm táptalajokon is elvégeztük.

Az **MSRV** (félfolyékony RV) (LAB 150) táptalajban lévő malachitzöld oxalát, a magnéziumklorid és novobiocin (20 mg/l) enterobaktériumokra gátló hatást gyakorol, a motilis szalmonellák migrációja hatására pedig a táptalaj közepétől a Petri csésze széli része felé a migrációs zónában a táptalaj eredeti színe elhalványodik. A zóna széli részéről történő szélesztés esetén a szalmonella gyakorlatilag szintenyészetben izolálható. Migrációs zóna hiánya esetén a negatív eredmény kiadható annak ellenére, hogy ezzel csak a motilis szalmonellák mutathatók ki megbízhatóan, mivel a nem mozgó *Salmonella gallinarum* élelmiszerekben való előfordulási valószínűsége igen kicsi.

A **Diassalm** (LAB 537) szelektív és differenciáló dúsító táptalaj. Szelektivitását malachitzöld oxalát, a magnéziumklorid és a novobiocin biztosítja, míg differenciáló képességét két indikátor rendszer a szacharóz-brómkrezolöld és a vasammóniumsulfát - nátriumtiosulfát adja. A motilis szalmonellák migrációja hatására a táptalaj közepétől a Petri csésze szélei felé a migrációs zónában a táptalaj eredeti zöld színe lilára változik.

A táptalajon lehetőség van megerősítő vizsgálatok elvégzésére is. A táptalajon elhelyezett, polivalens H savóval átitatott papírkorong mentén szalmonellák jelenléte esetén jellegzetes gátlás alakul ki. A gátlási zóna szélén a biokémiai reakciók intenzívebben jelentkeznek, a kénhidrogén termelés itt jól látható.

Amennyiben a vizsgálat *Salmonella enteritidis*-re irányul, a táptalaj erre a mikrobára 0,015 g nitrofrantoinnal tehető szelektívvé.

A vizsgálatok eredménye

A vasvegyületekkel végzett elődúsítás után a félfolyékony táptalajokra való cseppentés, majd 16-18 órás inkubálás után a következő eredményeket kaptuk:

- A vasvegyületek alkalmazása az elődúsítóban megnöveli a szalmonellák motilitását is a félfolyékony tápközegekben, a zóna átmérője több, mint kétszeresére növekszik mind a 37 °C, mind a 42 °C hőmérsékleten történő inkubálás esetén.
- A Diassalm táptalajon vizuálisan jól értékelhető a lila szín és mozgás alapján a feltételezeten *Salmonella* jelenlétét.

- Lehetőség van a Diassalm táptalaj esetében MUCAP reagenssel (4-methylumbelliferyl caprylate) (Biolife) történő megerősítő vizsgálat elvégzésére, amely a C8 észteráz reakción alapul.

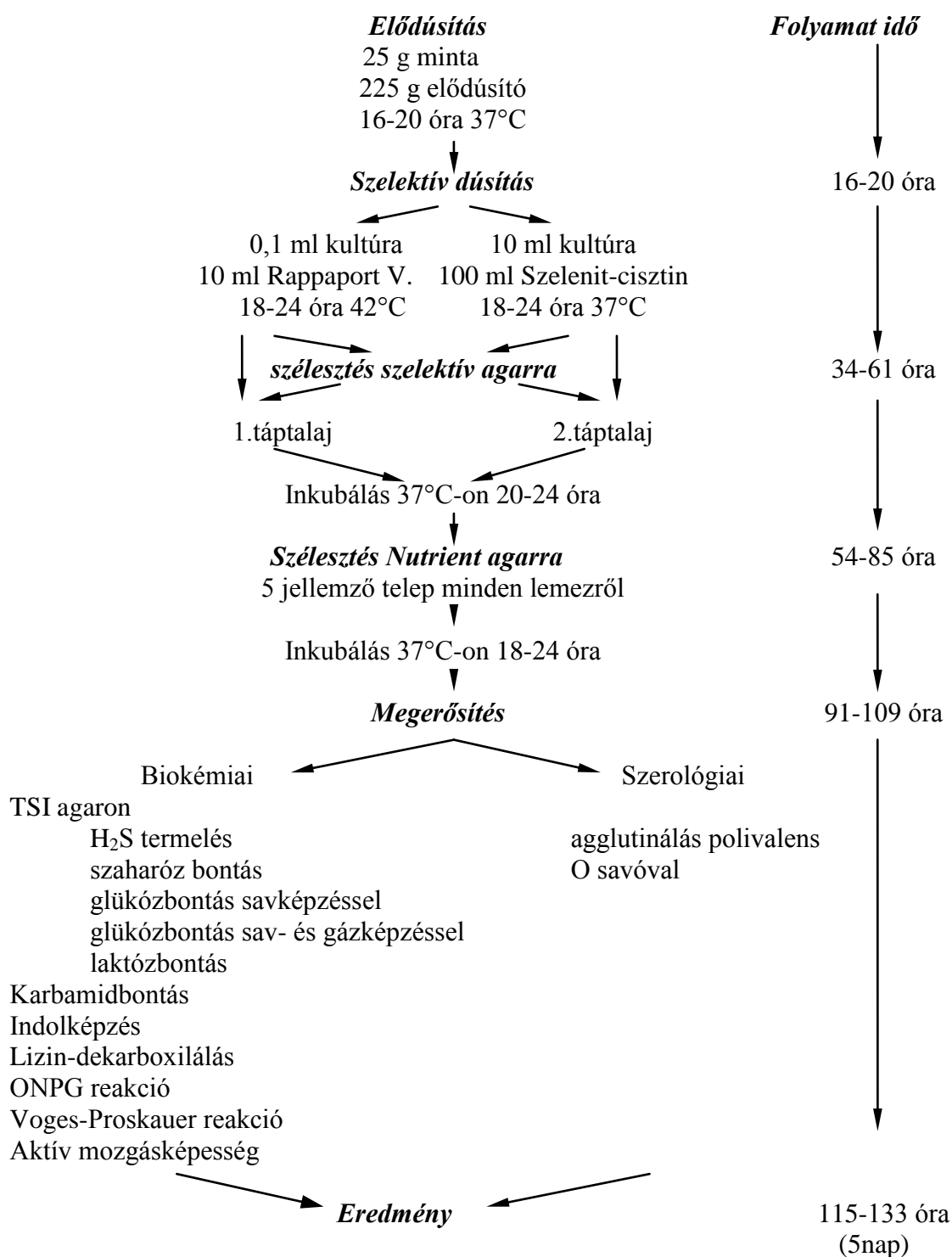
A reagensből 10 µl-t csöppentve a motilitási zónára, 365 nm hullámhosszú UV fényben a csöppentés helyén fluoreszkál Salmonella jelenléte esetén.

Összefoglalva megállapítható, hogy a klasszikus vizsgálati metodikával is elérhető, hogy 24 órán belül Salmonella vizsgálati eredményt kapjunk még szubletálisan sérült Salmonella sejtek esetében is, ha kihasználjuk a mikroökológiában, a termék és technológiai ismeretekben rejlő lehetőségeket.

Ennek módja: elődúsítás, lehetőleg Ferrioxamine E-vel dúsított pufferolt peptonvízben, rázatott termosztátban 37°C-on 6-8 órán át, majd szelektív és differenciáló dúsítás Diassalm táptalajon, valamint gyors megerősítő vizsgálat MUCUP reagenssel.

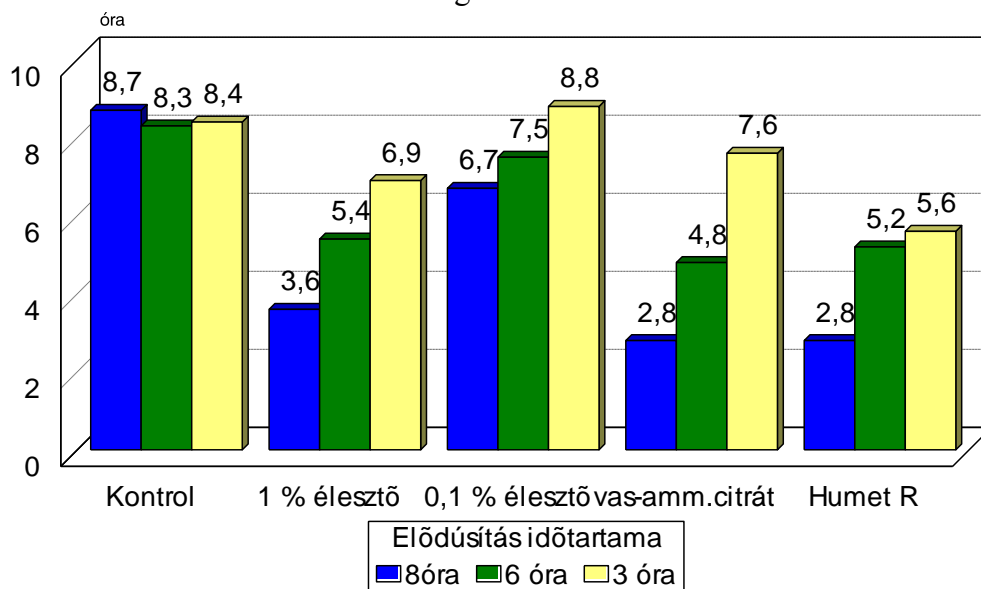
1.ábra

Tenyésztési eljárás (MSZ EN ISO 12824:1999)



Salmonella kimutatás tojás fehérjéből

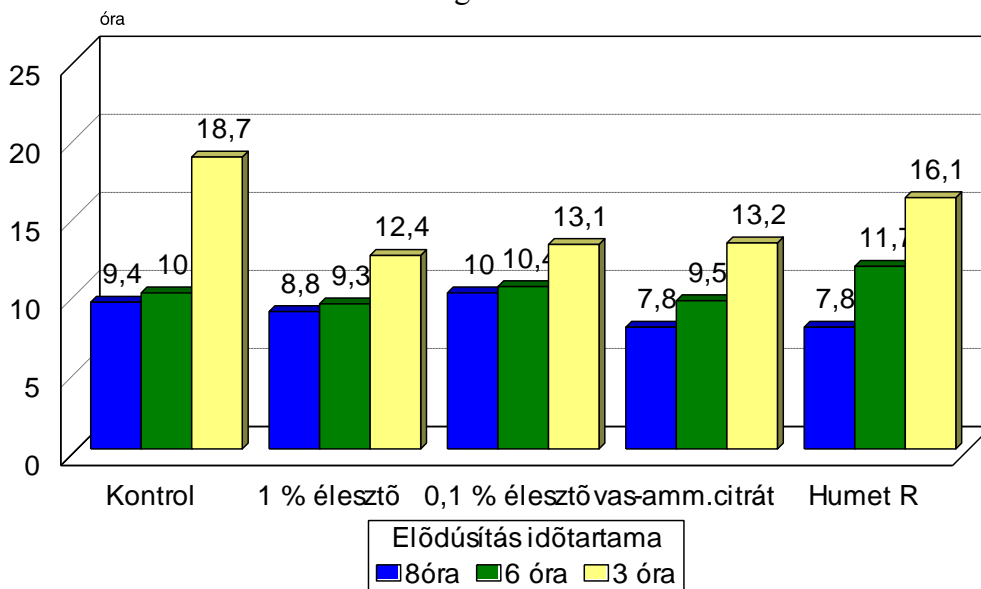
Kimutatási határ eléréséhez szükséges idő



Induló sejtszám 60/ml

Salmonella kimutatás hőkezelt tejből

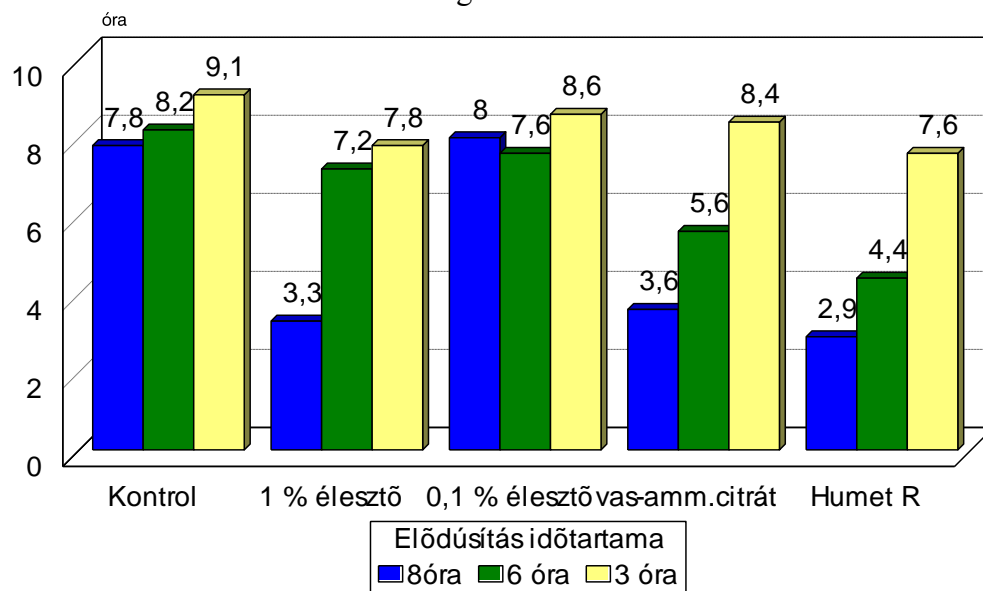
Kimutatási határ eléréséhez szükséges idő



Induló sérült sejt 90/ml

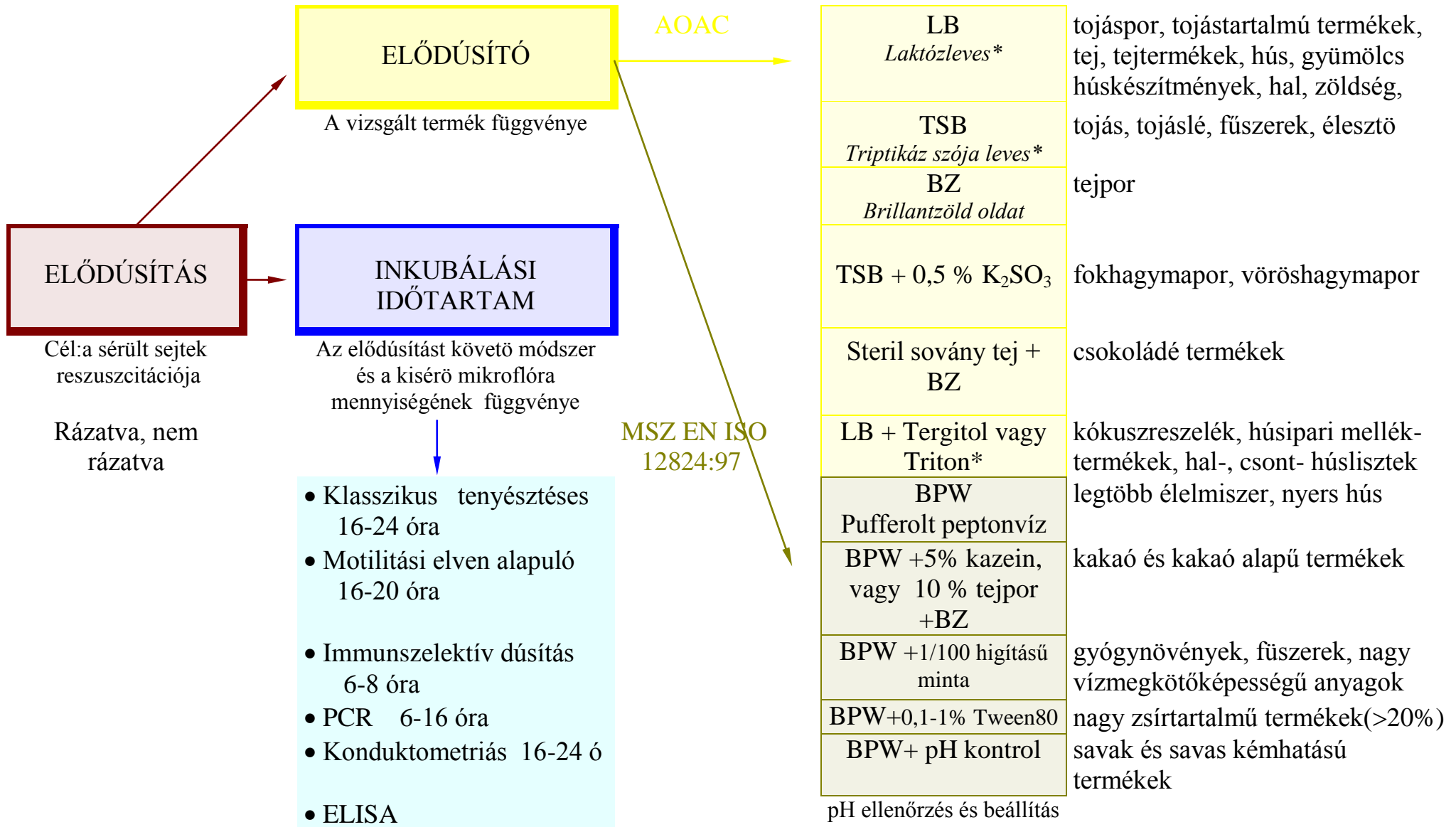
Salmonella kimutatás tejből

Kimutatási határ eléréséhez szükséges idő



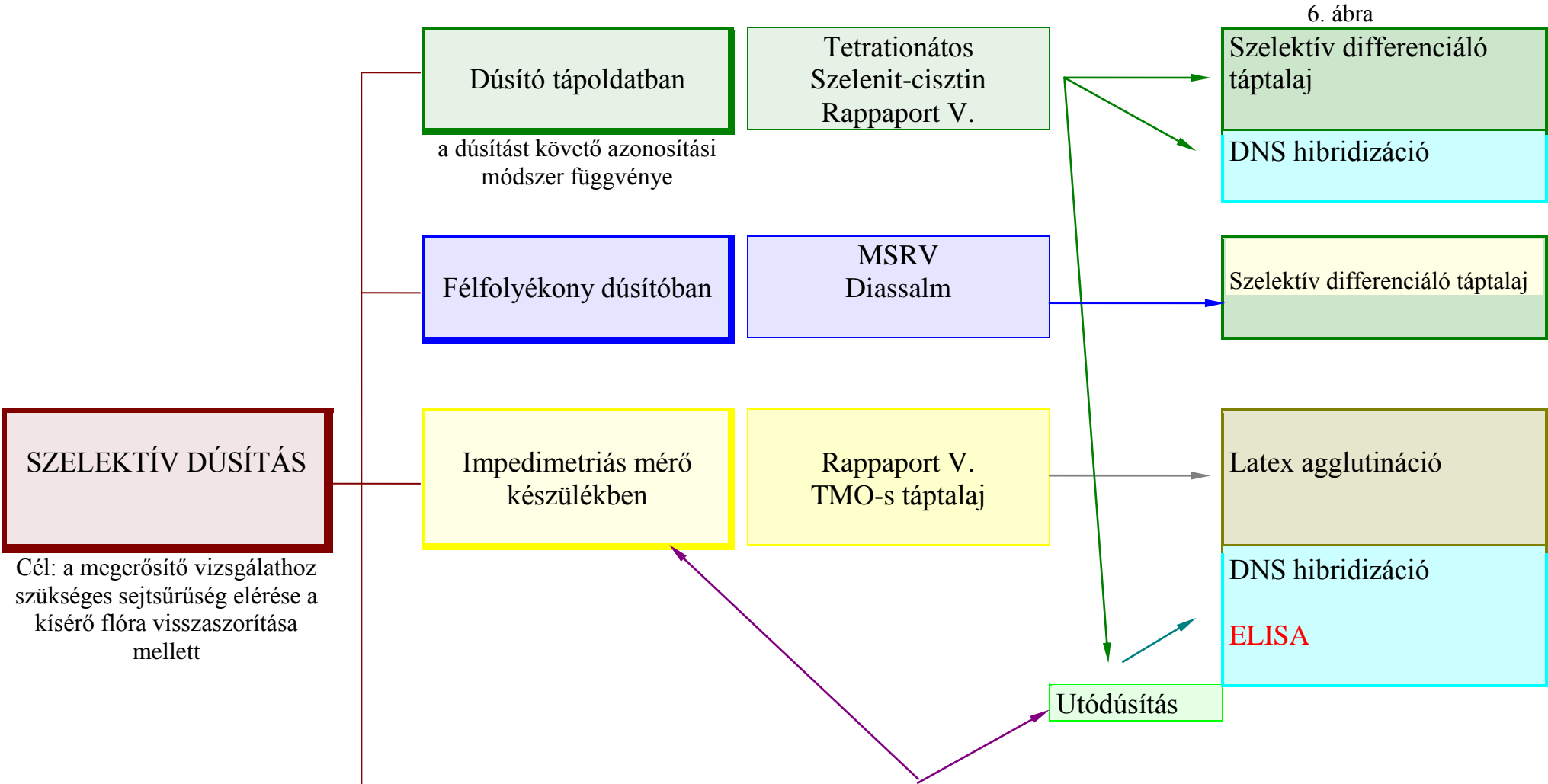
Induló sejtszám 80/ml

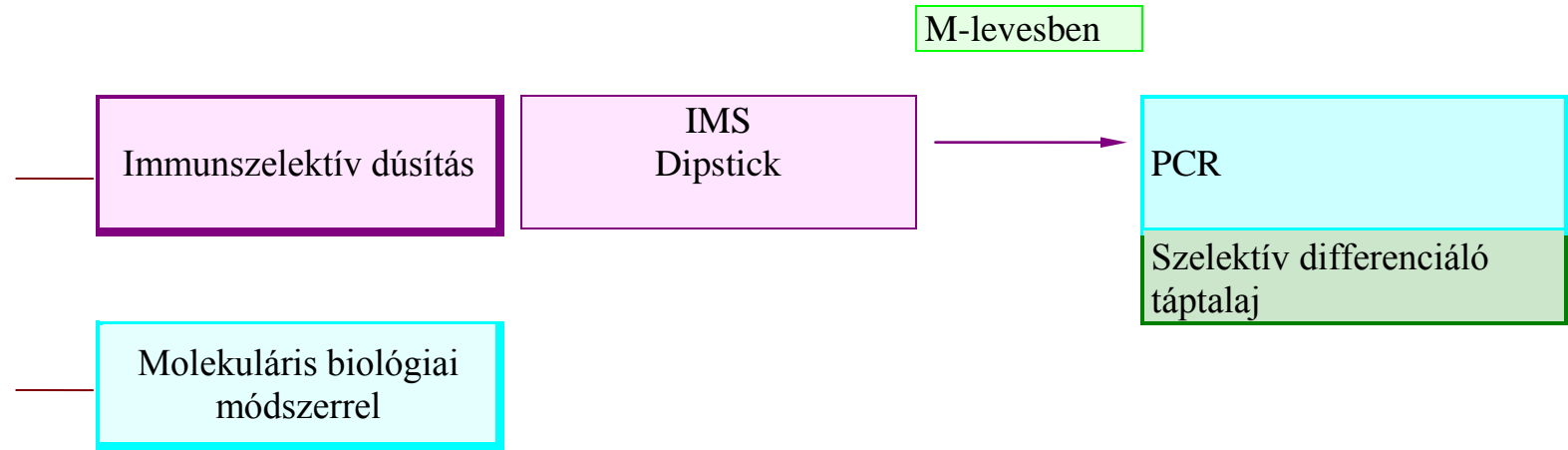
2. ábra



- kevés kísérő mikroflóra
16-24 óra
- sok kísérő mikroflóra
6-8 óra

1 óráal az előd.
megkezdése után
BPW+Fe hők.tej, tojás
Előmelegített dúsító





Irodalomjegyzék:

De Smedt J.M., Bolderdijk R.F.: (1987) Dynamics of Salmonella isolation with MSR/V Medium. *J.Food Protection* **50** 658-661

Van der Zee H. (1992.) Detection of Salmonella spp. With the use of a standard method, diagnostic semi-solid agars and immunocapture kit. Third World Congress foodborne infections and intoxications, Berlin

Bánhegyi I., Földes T., Szigeti J.: (1999) Egy gyors és megbízható eljárás szubletálisan sérült Salmonella spp. kimutatására élelmiszerekből 296. KÉKI Kollokvium

MSZ EN ISO 12824:1999 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a szalmonellák kimutatására

MSZ ISO 6785:1994 Tej és tejtermékek. A szalmonella kimutatása

Tabajdiné P.V., Sréterné L.Zs.: (2000) A Salmonella dúsítási és elődúsítási módszerek megválasztásának jelentősége. Akadémiai Beszámolók ÁOTE Élelmiszerhigiéniai szekció január 26.

Pless P., Reissbrodt R.: (1995) Improvement of Salmonella detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture. *Int. Journal of Food Microbiology* **27** 147-159

Medici D., Pezotti G.: (1998) Comparison between ICS-Vidas, MSR/V and standard cultural method for Salmonella recovery in poultry meat. *Int. Journal of Food Microbiology* **45** 205-210.

Összefoglalás

A szerző elemzi a szalmonellák élelmiszerekből való kimutatásának jelentőségét, a legújabb vizsgálati módszerek széles választékát, valamint az édesipari vonatkozásokat. A cikk első részében összegzi a klasszikus vizsgálati eljárások területén elért legfontosabb eredményeket irodalmi és saját vizsgálati tapasztalatok alapján. Megállapításra kerül, hogy a klasszikus vizsgálati metodikával is elérhető, hogy 24 órán belül Salmonella vizsgálati eredményt kapjunk még szubletálisan sérült Salmonella sejtek esetében is, ha kihasználjuk a mikroökológiában, a termék és technológiai ismeretekben rejlő lehetőségeket.