



Gyors mikrobiológiai vizsgálatok jelentősége az ivóvíz vizsgálatok területén

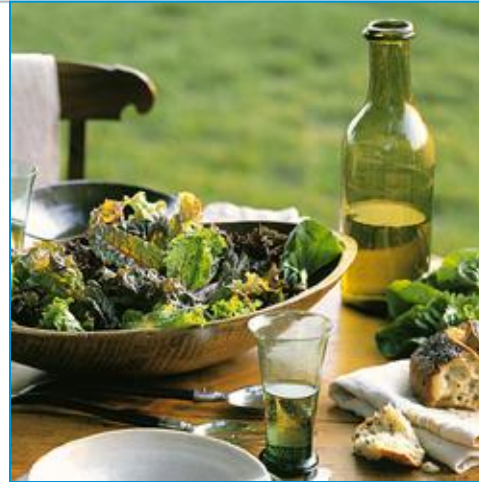
Tabajdiné dr. Pintér Vera, Rohonczy Kata

Dr. E. Wessling Kft.-FoodMicro Kft.



Környezetanalitika

- Vízgazdálkodás
- Talaj/Iszap
- Hulladékgazdálkodás
- Emisszió/Immisszió
- Azbeszt
- Anyag és termékbevizsgálás



Termékvizsgálatok

- Élelmiszer
- Gyógyszerek
- Takarmány
- Kozmetikumok
- Termékmegfelelőség
- Tanácsadás



Tervezés és tanácsadás

- Környezetvédelmi üzemeltetés
- Műszaki ellenőrzés
- Ingatlanok
- Talaj és talajvízkezelés
- Projektvezetés



Vízgazdálkodás

- Talajvíz, vezetékes víz, felszíni víz
- Ivóvíz
- Fürdővíz
- Szennyvíz
- Vízvizsgálatok tisztító telepeken
- Idő és mennyiség arányos szennyvíz mintavétel
- Csatornarendszer
- Szennyvíziszap

- élelmiszer-nyersanyagok, -adalékanyagok,- technológiai segédanyagok és késztermékek mikrobiológiai mintavétele és vizsgálata,
- kozmetikai alapanyagok, -adalékanyagok, technológiai segédanyagok és késztermékek mikrobiológiai mintavétele és vizsgálata,
- élelmiszergyártás melléktermékeinek és hulladékainak mikrobiológiai mintavétele és vizsgálata
- élelmiszer – és kozmetikum-gyártással kapcsolatos környezeti higiéniai minták mikrobiológiai mintavétele és vizsgálata
- ivóvíz, ásványvíz és palackozott víz mikrobiológiai mintavétele és vizsgálata
- fürdővíz mintavétele és mikrobiológiai vizsgálata
- takarmányok mintavétele és mikrobiológiai vizsgálata
- állati eredetű élelmiszerek antibakteriális gátlóanyag vizsgálata
- élelmiszerek vízaktivitásának vizsgálata
- szakvélemény adása megfelelőségről vagy nem-megfelelőségről

- Az akkreditálás műszaki területéhez tartozó minták (élelmiszer, takarmány, higiéniai és környezeti minták, levegő, víz, fürdővíz, kozmetikai készítmények) mintavétele és vizsgálata **klasszikus és gyors** módszerekkel
- ***Élelmiszerbiztonsági paraméterek***
- Bacillus cereus, Clostridium perfringens, Salmonella sp., Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Campylobacter, E.coli O157
- ***Higiéniai paraméterek***
- Pseudomonas aeruginosa, Szulfitredukáló Clostridium, Koliform, Escherichia coli, Enterobacteriaceae, Enterococcus, Enterococcus faecalis, Endoszámla, Kokkusz-számla, Fekálkoliform,
- Fertőtlenítőszer hatékonyság vizsgálatok
- ***Minőségi paraméterek***
- Alicyclobacillus acidoterrestris, Aerob és anaerob spóra, Laktobacillus sp.,
- Mezofil aerob mikroba, Mezofil aerob spóra, Penész- és élesztőgomba, Ozmofil élesztőgomba, Bifidobaktérium, Psychrofil mikrobák
- ***Környezeti ártalom vizsgálata***
- Levegő mikrobiológiai szennyezettségének mérése
- Legionella vizsgálat

2005. évi CLIX. Törvénnyel módosított 2003. évi LXXXII. Törvény és az abban hivatkozott 178/2002 EK rendelet értelmében

Élelmiszer: minden olyan feldolgozott, részben feldolgozott vagy feldolgozatlan anyagot vagy terméket jelent, amelyet emberi fogyasztásra szánnak. Az élelmiszer fogalmába beletartozik a víz is.

A víz a legnagyobb mennyiségben előállított élelmiszer.

A Magyar Víziközmű Szövetség adatai alapján a vezetékes ivóvíz hálózatok üzemeltetői naponta 2 millió m³ vizet juttatnak el a fogyasztókhoz.

- „A levegő tisztasága, nedvességtartalma és hőmérséklete, a zaj, és az izgalom, a fizikai munka mennyisége stb. mind igen fontosak de környezetünkkel való kapcsolatunkban az egyik legalapvetőbb tényező az étel, mivel környezetünk az ételek formájában hatol be szervezetünkbe a legközvetlenebbül.”

Szent-Györgyi Albert

- Egészségre ártalmatlan
 - Jó minőség (érezkszervi tulajdonság, beltartalom)
 - Gazdaságosan előállítható
 - Késztermék vizsgálat már túl késő
Preventív, technológiába beépülő szabályozási rendszer
Élelmiszeripar (2002)
Vízi közművek (ivóvíz, egyedi vízellátás, vízkezelés, vizes technológiák)
 - Tömeges termelés, iparszerű állattenyésztés és növénytermesztés, központi vízellátás
 - Nemzetközi kereskedelem, túrizmus (mikrobaforgalom)
 - Új táplálkozási szokások (új tartósítási technológiák)
 - Új kereskedelmi formák (mmi)
 - Feldolgozottsági fok növelése
 - Immunrendszer gyengülése
 - Kórokozók virulenciájának, patogénitásának növekedése
 - Az első vízadó réteg irreverzibilis elszennyeződése
- HACCP, kockázat elemzés (becslés WHO, kezelés, kommunikáció) a teljes folyamatban ↓
- Módszerekkel szemben új követelmények

Mikrobiológiai vizsgálatokkal szembeni új követelmények

- Gyors vagy gyorsított
- Egyszerű
- Munka és anyagtakarékos
- Reprodukálható
- Károsodott sejtek kimutatása
- Nagyszámú kísérő flóra mellett kórokozó és romlást okozó mikroorganizmusok megkeresése
- Biofilmet alkotó és VNC mikrobákat kimutatása
- Analitikai kémiai
- Enzimológiai
- Fizikai kémiai
- Immunbiokémiai
- Műszeres elektronikai
- Molekuláris biológiai

Hagyományos módszerek gyorsítása, automatizálása

- Kész táptalajok
- Gravimetriás adagolás, hígítás
- Spirál lemez módszer
- Telepszámlálás automatizálása
- Petri-film
- TEMPO
- Hidrofób hálózatos HGMF(Grid)
- Új szelektív táptalajok
- Egyszer használatos eszközök

Direkt sejtszámlálás újabb módszerei

- Részecskeszámlálás
- Flow citometria
- DEFT technika (COBRA, BACTO SCAN)
- Lézeres értékelés (ChemScan)
- Immunfluoreszcencia

Sejtalkotók szelektív elemzése

- ATP meghatározás
- DNS hibridizációs módszer
- PCR
- Zsírsav analízis
- Fehérje, aminosav analízis
- LAL teszt (sejtfal lipopoloszacharid)
- Patogenitási faktor (p60)

Mikroba metabolitok mérése

- Gázösszetétel
- Toxinok
- Diacetil
- Titrálható savtartalom
- Alkoholok, szerves savak
- Nitrát/nitrit
- CO₂, H₂, H₂S, NH₄

Mikrobaszaporodás detektálása

- Impedancia, konduktancia mérés (Malthus, Rabbit, BacTrac)
- Turbidimetria (Bioscreen)
- Mikrokalorimetria (DSC)
- Radiometriás módszerek
- Redoxpotenciál mérés

Immunológiai módszerek

- ELISA, ELFA(VIDAS)
- RIA
- Immunfluoreszcencia
- Latex agglutináció

Sejtkoncentráció

- Szűrés
- IMS
- Immuncapture system
- PCR

Korszerű diagnosztikai eljárások

- Immunológiai módszerek (Path stick, Single path, Reveal)
- Molekuláris diagnosztika
- Biokémiai módszerek (Identifikáló kitek:API, Crystal)

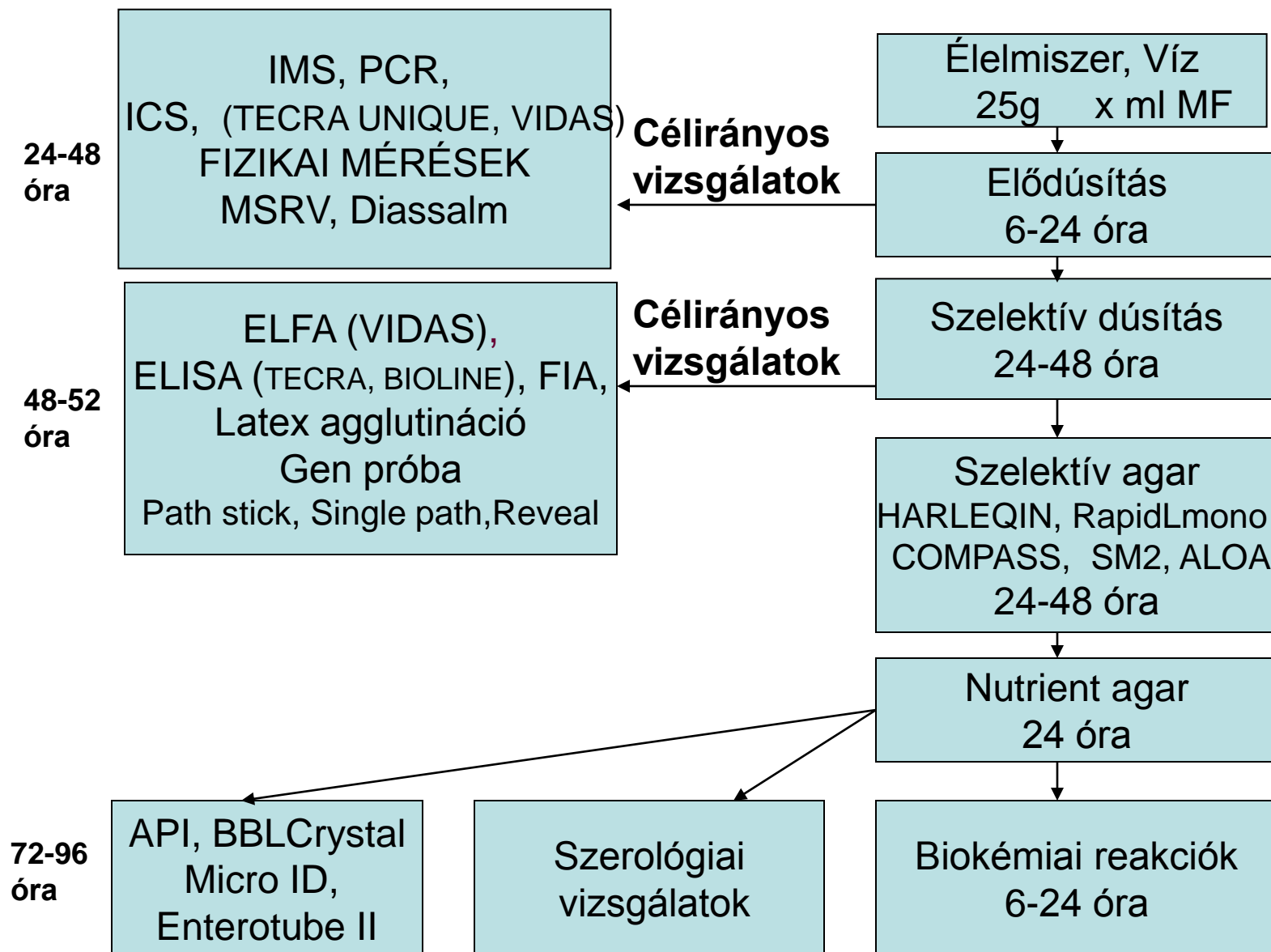
- Jelenlét/hiány
- Szám meghatározás
- Azonosítás

Szám meghatározás

- E.coli
- Koliform
- Mikrobaszám
- E.faecalis
- C.perfringens
- P.aeruginosa
- S.aureus
- Legionella

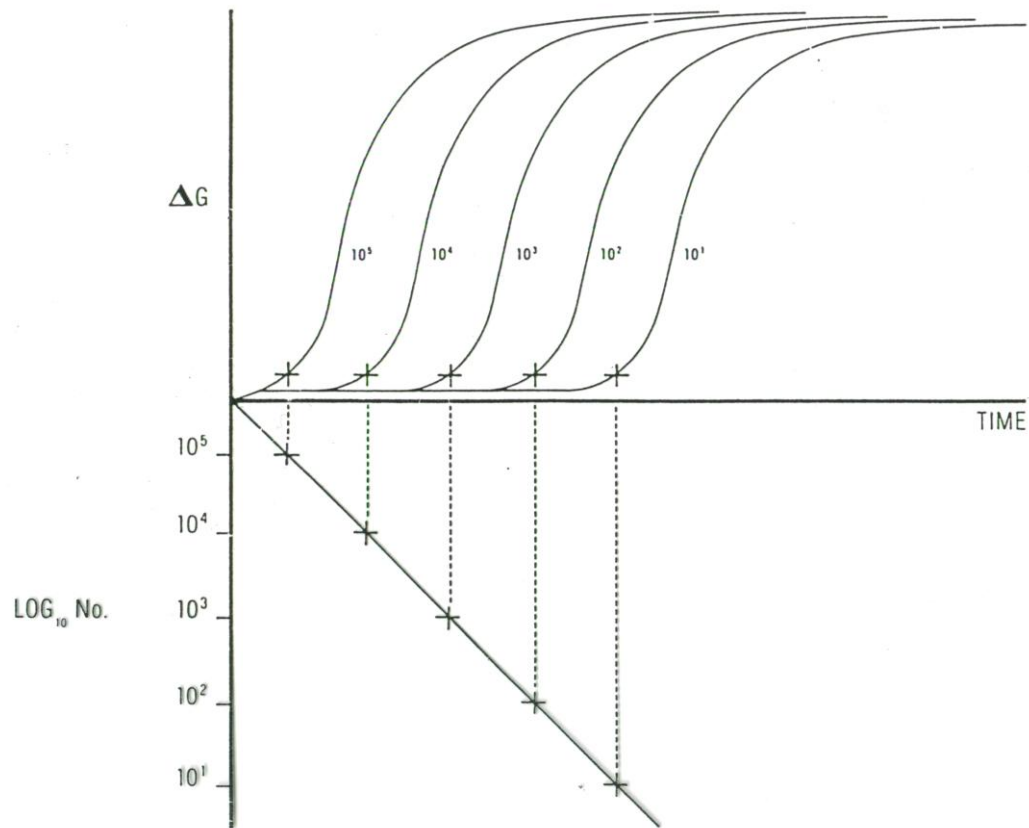
Jelenlét/hiány próba

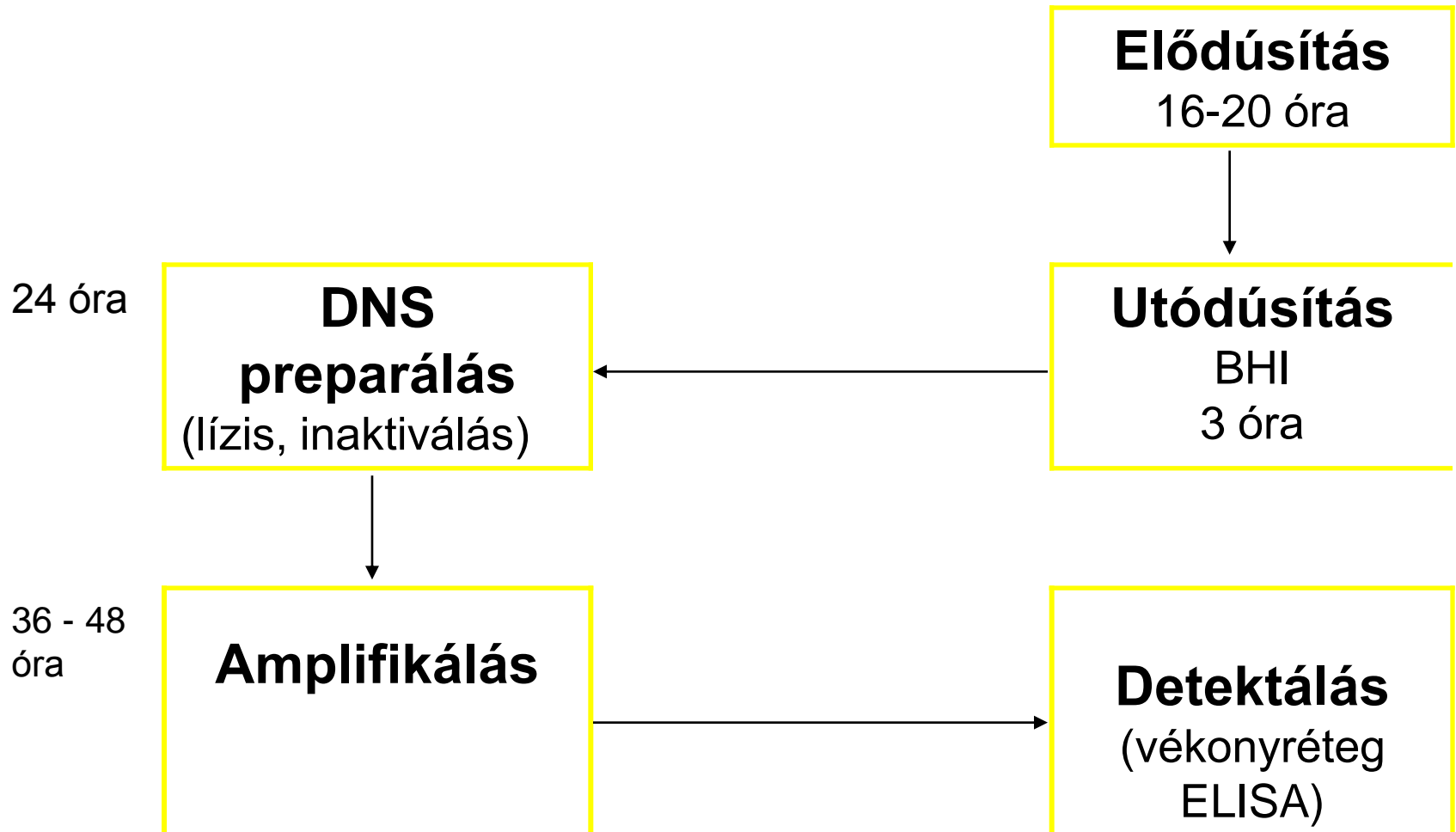
Salmonella
Campylobacter
E.Coli O157:H7
L.monocytogenes
Shigella
Y.enterocolitica

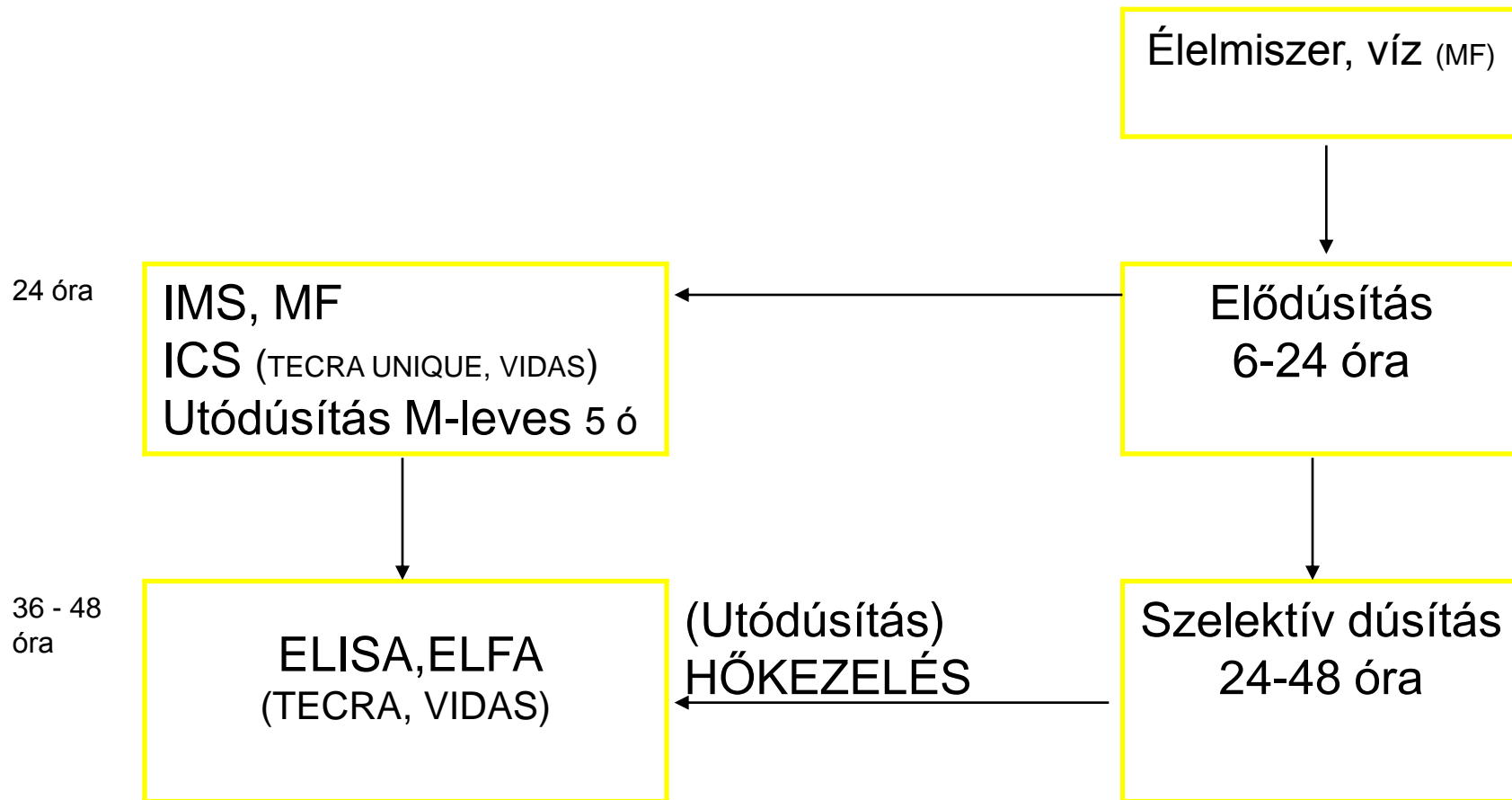


Mikrobaszaporodás detektálása

(hő, turbiditás, szín, konduktancia, beütésszám, redoxpotenciál)







Immunkromatográfia

Path stick, Single path,Reveal

Reagens zóna

anti S.antitest
Nitrocellulóz
membrán

Negatív
kontrol zóna

Minta

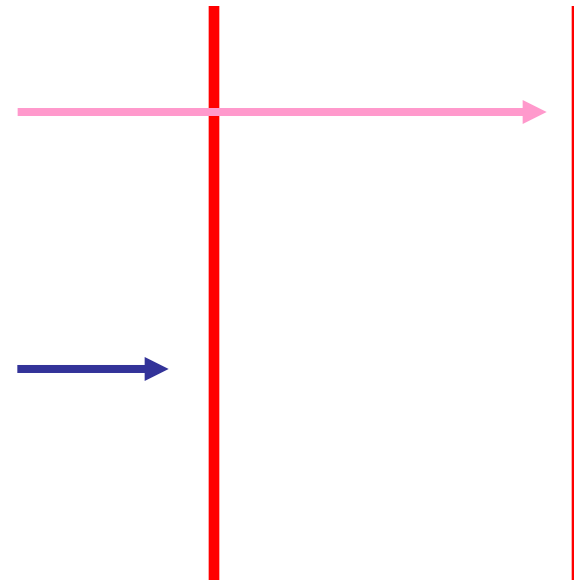


Arannyal konjugált
antigén

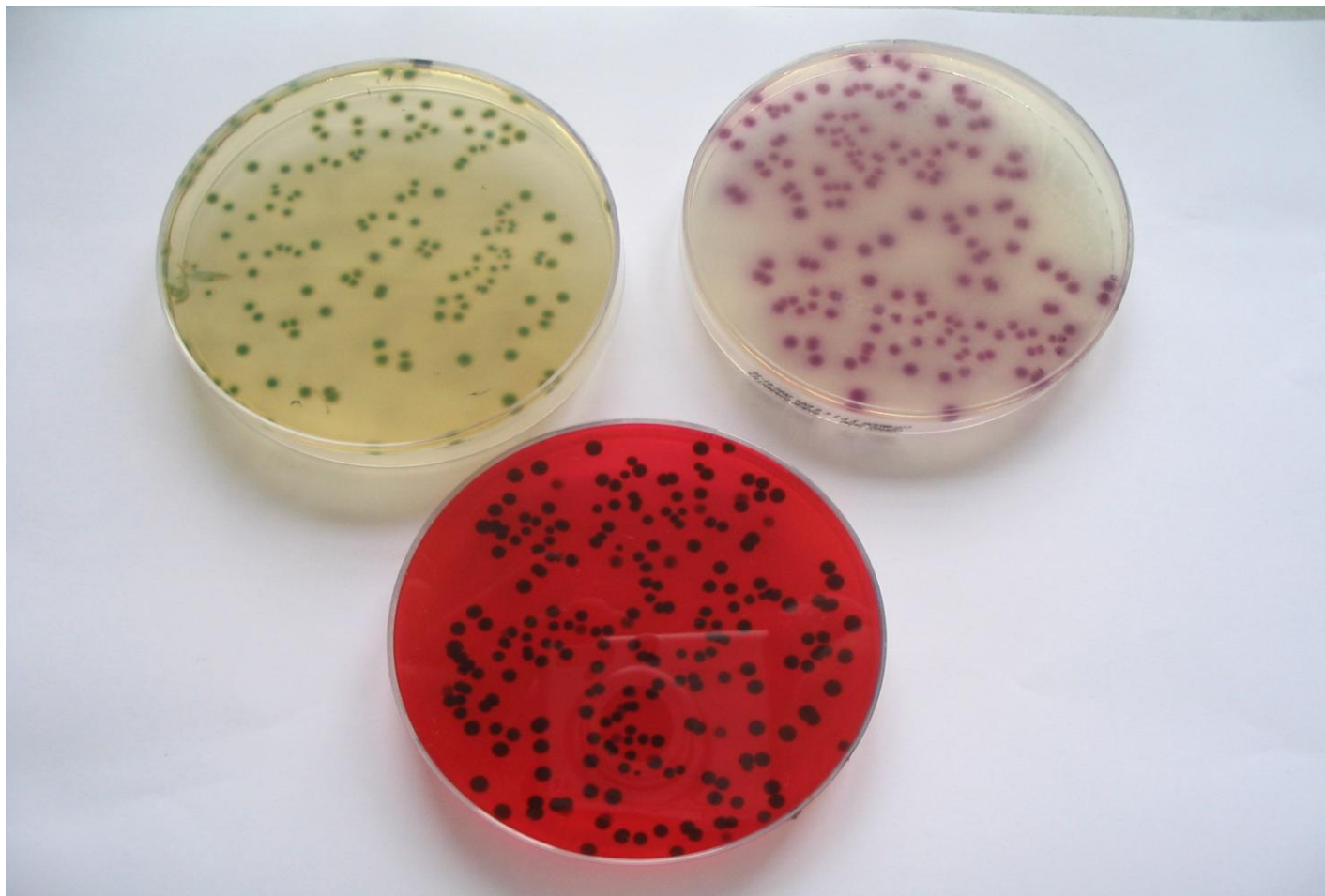
SZÍNINDIKÁTOR

Arannyal konjugált
Salmonella antitest

KONJUGÁTUM



Kromogén táptalajok



Compass

5 bromo 6 chloro 3 indolyl caprylate esterase 5 bromo 6 chloro 3 indolyl

	Salmonella		Kísérő flóra	
Észteráz	+	-	+	-
β-D-glükózidáz	-	+	+	-
	piros	kék	lila	színtelen

Harlequin

alfa-galaktozidáz
béta-galaktozidáz

	Salmonella	Kísérő flóra
alfa-galaktozidáz	-	
béta-galaktozidáz	+	
	zöld	fekete

Kromogén táptalajok



COMPASS

5 bromo 6 chloro 3 indolyi D glukosidase

ALOA

5 bromo 4 chloro 3 indolyi glukopyranozide

L.monocytogenes: kék opálos udvarral
körülvevő telepek

RapidL.mono

Foszfolipáz-C és xylóz fermentáció

Jellemző paraméterek

MSZ EN ISO 16140

Relatív pontosság: $100 \cdot (p+n) / N \%$

Relatív specitikusság: $100 \cdot n / (n+fp) \%$

Relatív érzékenység: $100 \cdot p / (p+fn) \%$

	Referencia +	Referencia -
Alternatív +	p	f _p
Alternatív -	f _n	n

A módszerek jellemző paramétereit

n=85 (MSZ EN ISO 16140)

	Relatív pontosság (%)	Relatív specifitás (%)	Relatív érzékenység (%)
COMPASS	100	100	100
HARLEQUIN	100	100	100
SM2	100	100	100
VIDAS SLM	100	100	100
VIDAS ICS+SLM	99	100	98
TECRA ICS	99	100	95

A módszerek jellemző paramétereit

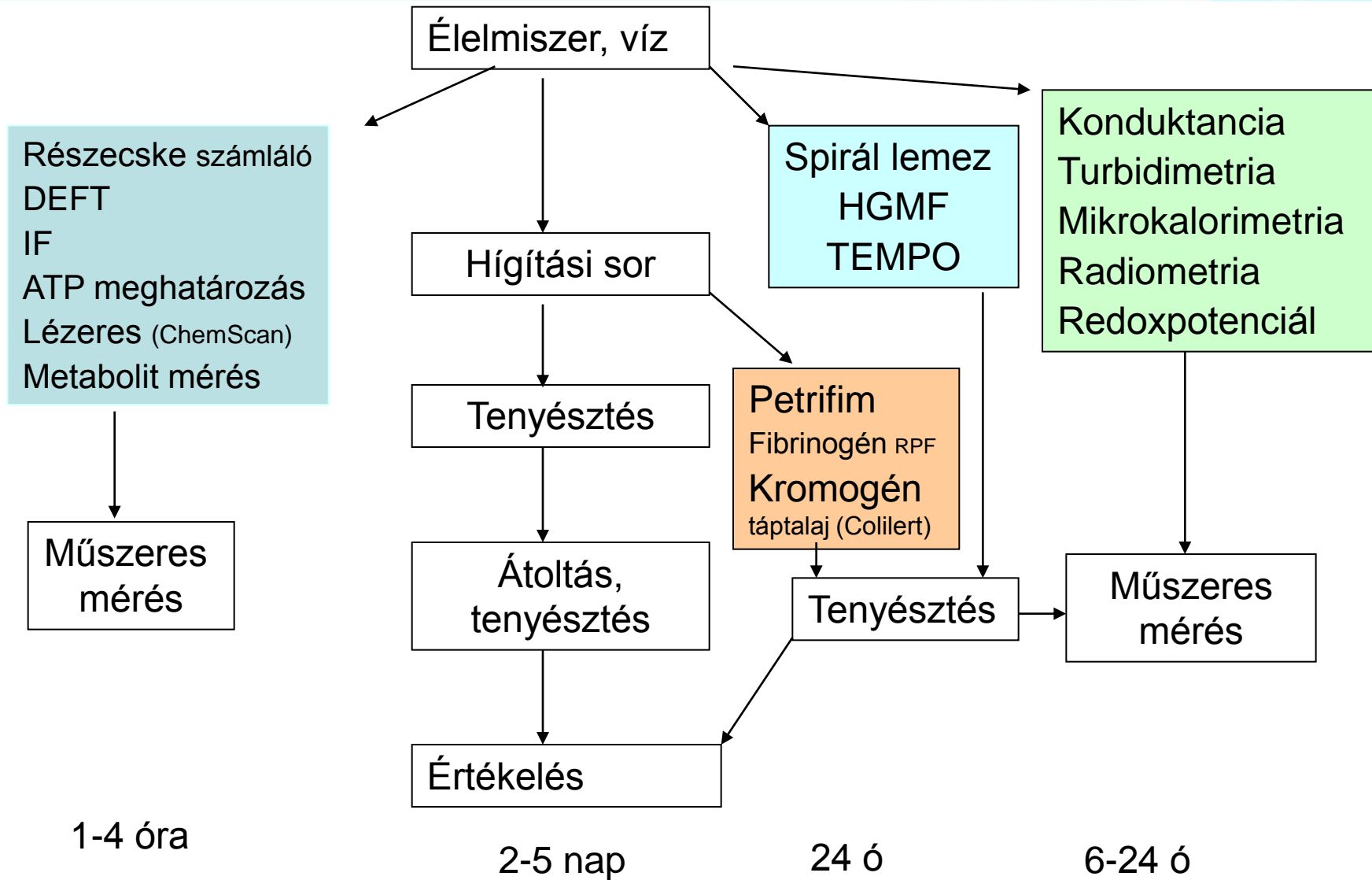
n= 63 (MSZ EN ISO 16140)

	Relatív pontosság (%)	Relatív specifitás (%)	Relatív érzékenység (%)
ALOA	100	100	100
COMPASS	100	100	100
VIDAS LMO2	100	100	100

- Az új alternatív vizsgálati módszerek segítik a vizsgáló laboratórium munkáját.
- A kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajok szelektívebbek, és jól elkülöníthető telepeket képeznek.
- A műszeres vizsgálatokkal pedig idő takarítható meg.

- **Olyan módszerek összehasonlítására került sor, melyek segítségével a patogén mikroorganizmusok kimutatása egyszerűbb, gyorsabb a hagyományos eljárásoknál.**
- **Az általunk tesztelt vizsgálati módszereknek:**
 - **alacsony a kimutatási határa**
 - **nagyobb szelektivitás a kimutatandó kórokozóra**
 - **mind a fals pozitív eredmények aránya minimális**
 - **validáltak**

A klasszikus vizsgálatok gyors diagnosztikai módszerekkel való helyettesítésével a jelenleg használatos minőségbiztosítási rendszereket maximálisan ki tudjunk szolgálni.



E.coli szabványok és definíciók

Élelmiszerek

MSZ 3640/12-79, MSZ 3640/19-79

E.coli olyan koliform baktérium, amely epét, vagy epesót tartalmazó folyékony táptalajban a laktózt gázképződés mellett 30° és 44,5°C-on bontja, és amely az IMViC próbákban az *E.coli*ra jellemző reakciókat mutatja

Víz

MSZ EN ISO 9308-1:2001

E.coli: epeellenálló baktériumok, amelyek indolt képeznek triptofánból 44°C-on 21±3 órán belül

Tej és tejtermékek

MSZ EN ISO 3743/4-87

E.coli olyan koliform baktérium, amely epét, vagy epesót tartalmazó folyékony táptalajban a laktózt gázképződés mellett 30° és 44,5°C-on bontja, és amely az IMViC próbákban az *E.coli*ra jellemző reakciókat mutatja

Horizontális módszerek

MSZ ISO 7251:2005

feltételezeten *E.coli*, mely 44°C-on a laktózt gázképződés mellett bontja, illetve a triptofánból indolt képez ...

MSZ ISO 16649-2:2004

β-D-glükoronidáz pozitív *E. coli* olyan baktérium, amely jellegzetesen kék telepeket képez 44°C-on a tripton-epe-glükuronid (TBX) táptalajon...

MSZ ISO 16649-3:2004

feltételezeten *E.coli* , mely 4-metilumbelliferyl-β-D-glükuronid (MUG) felhasználásával fluoreszcenciás reakciót ad, miközben a triptofánból indolt képez ...

Klasszikus módszerrel : MPN módszer,
lemezöntés, felületi szélesztés

-Chromogén táptalajok

-fluorocult táploldatok felhasználása

E.coli *Coliform*

β -D-galaktozidáz + +

β -D-glükoronidáz + -

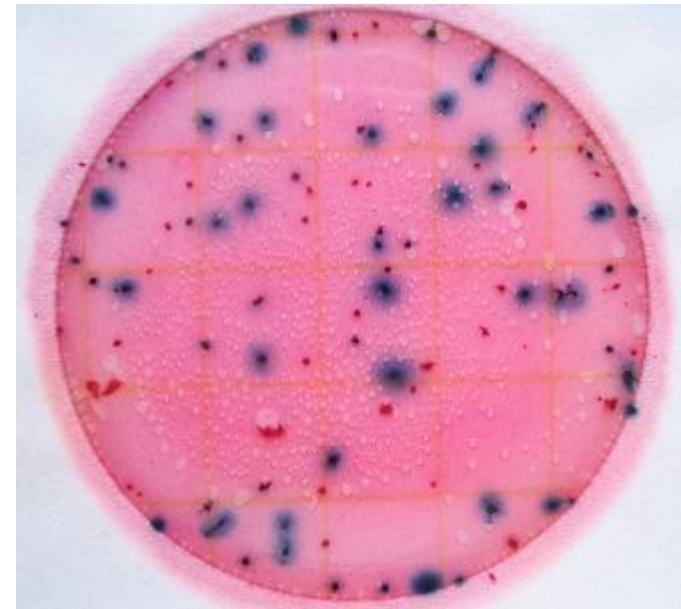
Petri-film módszerek

Automatizált módszerek:

-konduktometriás elven alapuló

készülékek (Bac-track, RABIT, Malthus),

-MPN elven alapuló módszer (TEMPO)



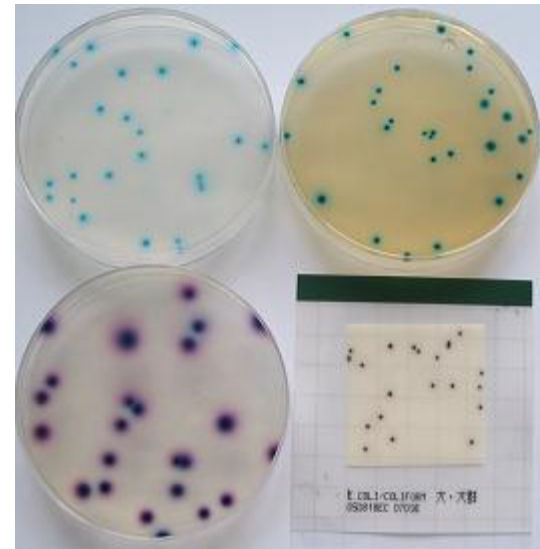
Felhasznált tápközegek

- Lemez

- Chromocult (*E.coli*/Koliform)
- Chromocult ES (*E.coli*/Koliform)
- Petri-film (*E.coli*/Koliform)
- Coli ID (*E.coli*/Koliform)
- TBX 1 (*E.coli*)
- TBX 2 (*E.coli*)
- Petri-film (TBX) (*E.coli*)
- Rida Count (TBX) (*E.coli*)

- MPN

- Fluorocult (*E.coli*/Koliform)
- Brila-fluorocult (*E.coli*/Koliform)
- Lauryl-szulfát + EC (*E.coli*/Koliform)
- TEMPO (*E.coli*)



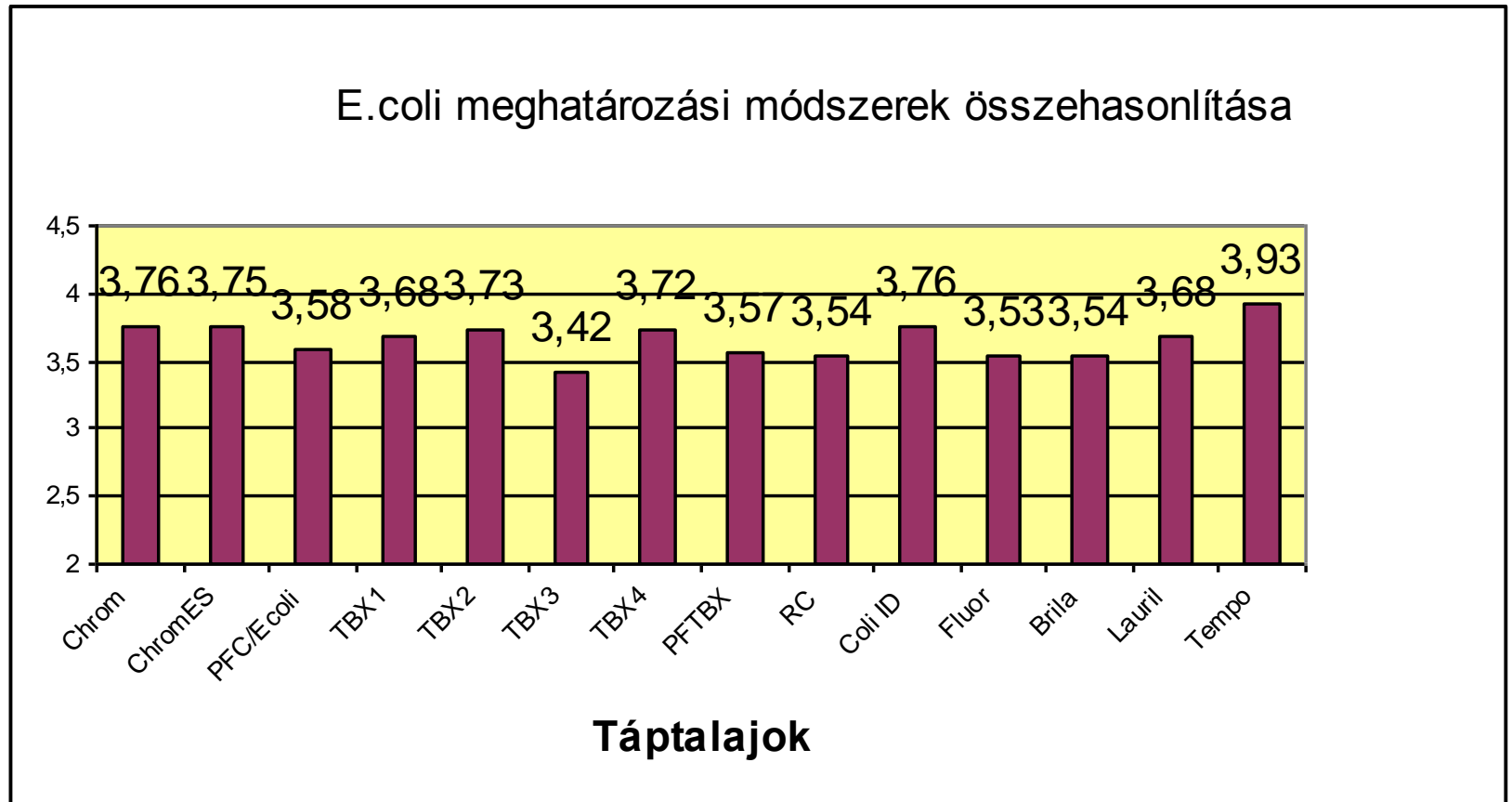
TEMPO KÉSZÜLÉK



Húsok, húskészítmények, tej,
tejtermékek, ivóvíz

$$y=0,49+0,91x$$

$$r=0,98$$



30 órán belül kiadható

Salmonella,

L. monocytogenes,

E.coli 0157,

Campylobacter,

Staph. enterotoxin,

E.coli,

Mikrobaszám,

Koag. pozitív Staphylococcus,

Enterobacteriaceae eredmény ,

eleget téve az új EU direktíva előírásainak.

**CALITAX, FEPAS, OKI, OÉVI és általun szervezett
körvizsgálatokban tesztelt módszerek**

Mi határozza meg, hogy melyik módszert válasszuk?



- **a vizsgálat célja**
- **biztonsági szint**
- **mintavételi terv**
- **validálás**
 - **érzékenység**
 - **specifikusság**
 - **pontosság**
- **a vizsgált mátrix**
- **vizsgálati idő**
- **automatizálás lehetősége, adattárolás, adatelemzés**
- **szerviz és céginformációk**
- **vizsgálati költség**

Akkreditált gyors vizsgálati módszerek



Salmonella REVEAL módszerrel	KSZ 28 AOAC 998.09
Salmonella ELISA módszerrel	KSZ 14 AOAC 998.09
Salmonella MINIVIDAS-30 órás ICS+SLM	KSZ 31 BIO-12/06-03/99
Salmonella MINIVIDAS 48 órás SLM	KSZ 32 AOAC 996.08, BIO-12/1-04/94
Listeria spp gyors MINIVIDAS készülékkel 30 óra LSX	KSZ 33 BIO-12/12-07/04
Listeria monocytogenes MINIVIDAS 48 óra LMO2	KSZ 34 BIO-12/09-07/02
Campylobacter MINIVIDAS	KSZ 35
E.coli O157 MINIVIDAS ECO	KSZ 36 BIO-12/8-07/00
Staph enterotoxin MINIVIDAS SET2	KSZ 37 AOAC 070404
Mikrobaszám meghatározás Petri film típusú módszer	KSZ16 AFNOR 01/1-09/89 AOAC 990.12, AOAC-RI 01 1001
Koliform és E.coli szám meghatározás Petri film típusú módszer	KSZ17 AFNOR 01/4-09/92 AOAC 991.14, AOAC-RI 01 1001
Enterobaktérium szám meghatározás Petri film típusú módszer	KSZ18 AFNOR 01/6-09/97
Penész és Élesztőszám meghatározás Petri film típusú módszer	KSZ19 AOAC 997.02 AOAC-RI 01 1001
Mikrobaszám meghatározás TEMPO készülékkel	KSZ 42
E.coli szám meghatározás TEMPO készülékkel	KSZ 43

FOLYAMAT ELLENŐRZÉS

- Fizikai indikátorok ($^{\circ}\text{C}$, t, a_w , pH..)
- Kémiai indikátorok (tart.szer konc., fert.szer konc., savak..)
- Direkt sejtszámlálás

KOCKÁZATBECSLÉS

alap-, adalék-, segédanyag vizsgálat

eloszlásvizsgálat, mintavételi terv

matematikai modellezés

technológiai műveletek méretezése

környezet vizsgálatok

challenge test

HACCP verifikálás (késztermék vizsgálat)

Megfelelő biztonságú becslés \longrightarrow nagyszámú vizsgálat

KÖSZÖNÖM

A MEGTISZTELŐ FIGYELMÜKET !

Staphylococcus enterotoxin vizsgálatok

European Screening Method (ESM)

- 25 g minta
- 25-40 ml extraháló (deszt.víz, triklórecetsav)
- Homogenizálás
- Szobahőmérséklet 0,5-1 óra
- Savanyítás pH 3,5
- Centrifugálás 3000-5000g
- Neutralizálás pH 7,3
- Centrifugálás
- Dializálás (koncentrálás) v. szűrés
- **TECRA SET VIA (TransiaPlate), TECRA SET UIQUE VIDAS SET2**

Reveal Salmonella Test

