

## **Korszerű Salmonella kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben**

Tabajdiné dr. Pintér Vera

### ***I. BEVEZETÉS***

Előadásommal annak a felkérésnek próbálom eleget tenni, hogy gyakorló mikrobiológusként összefoglaljam a Salmonella vizsgálati módszerekkel szerzett tapasztalatokat.

Jelenlegi munkahelyemen, a FoodMicro Kft. mikrobiológiai laboratóriumában évente sok ezer élelmiszer minta Salmonella vizsgálatát végezzük el, így a módszereket aszerint is tudjuk értékelni, hogy milyen a felhasználói igény.

A kórokozó Salmonellák kimutatása élelmiszerekből ma is az egyik legfontosabb mikrobiológiai feladat, még akkor is, ha az élelmiszerbiztonsági rendszereknek köszönhetően 1996-tól a Salmonella okozta megbetegedések száma Európaszerte csökken. Továbbra is első helyen áll azonban az élelmiszerek okozta kóroki tényezők között, ezen belül a *S. enteritidis* abszolút túlsúlya jellemző. Magyarországon is.

A közvetítő élelmiszerek többsége még ma is a tojás és tej eredetű termékek (krémek, sodók), ezt követik a hús félék, de a többi élelmiszerek, zöldségek, sőt a csokoládé is. Az édesipari termékek többsége alacsony vízaktivitása és magas zsírtartalma következtében nem kedvez a benne lévő mikroorganizmusok többsége szaporodásának, így a Salmonelláknak sem. Csokoládé okozta Salmonellózist 1970-ig nem is regisztráltak. Ezután több eset is előfordult, amikor több száz ember betegedett meg. Ennek oka az, hogy a csokoládéban lévő Salmonellák nagyon hosszú ideig életképesek maradnak, akár néhány évig is, továbbá nagyon nagy hőrezisztenciát mutatnak, amely az alacsony vízaktivitás és a zsír védőhatásának köszönhető. Az infektív dózis is igen alacsony (1-2 sejt/g), a gyomorban való rövid tartózkodásnak (gyors felszívódás), továbbá a zsír gyomorsavval szembeni védő hatása miatt.

Az elmúlt években számos törvény, rendelet, előírás, szabvány jelent meg, amely a Salmonella vizsgálatok gyakoriságát, módszertanát befolyásolta. Ezek közül a legfontosabbak: az 1993. évi X. törvény a termék felelősségről, a CAH HACCP rendszer alkalmazása, 4/1998 EüM, 1/2003 FVM, 77/2002 FVM, MSZ EN ISO 17025:2001 szabvány.

A különböző élelmiszer előállítók élelmezésegészségügyi előírásaikban tételenként 10, 15, 30, sőt 60 elemi mintából írják elő a Salmonella mentességet. Erre az előírásoknak való megfelelő miatt van szükség, mert pl. 30 elemi minta (750 g) negatív eredménye esetén 95 %-os biztonsággal azt állíthatjuk, hogy a tételből kivett 250 g minta eredménye negatív lesz. 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.

A HACCP rendszerek működtetése, validálása és verifikálása, a különböző határértékeknek való megfelelés, továbbá a vizsgáló laboratóriumok akkreditálásának követelményei egyre szigorúbb követelményeket állítanak a módszerek, így a Salmonella vizsgálati módszerek elé is.

A szabványos módszerek mellett egyre több alternatív módszer kerül bevezetésre a mikrobiológiai laboratóriumokban.

Hol tartunk ma, milyen követelmények fogalmazódnak meg a Salmonella vizsgálati módszerekkel szemben, milyen előnyei és korlátai vannak az alternatív módszereknek?

## **2. A MÓDSZERFEJLESZTÉS FŐ IRÁNYAI**

Az élelmiszer-mikrobiológiai vizsgálatok területén a legfontosabb feladat az élelmiszerbiztonságot és a termék minőségét veszélyeztető mikrobák kimutatási módszereinek gyorsítása, korszerűsítése, automatizálása, hogy a laboratórium megbízhatóan szolgálja ki a kereskedelmi, vállalati, hatósági managementet a megfelelő biztonságú döntések meghozatalához. Ehhez kellően gyors módszerekre van szükség, hiszen a laborkapacitás nem szabhat határt a biztonságos mintavételnek. A társtudományok minden eredménye robbanásszerűen vonult be a mikrobiológiába. Ezt a nagy lendületet azonban józan üteműre mérsékeltek a mikrobiológiai vizsgálatokra is egyre szigorúbban bevezetésre kerülő matematikai statisztikai megfontolások, a jó értelemben vett egységesítési törekvések.

Az alternatív módszerek megjelenése jót tett a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatoknak is, azok újragondolása szép új megoldásokat eredményezett. Különösen igaz ez a Salmonella vizsgálatokra, ahol a túlzott egységesítési törekvés megváltozott, és újra a mikroökológiai szemlélet kezd uralkodóvá válni a területen.

A Salmonella vizsgálatok területén az elmúlt időkben igen sokféle eljárást próbáltak a szabványos, hosszú és költséges munkafolyamat csökkentésére. Az AOAC által összesen nyilvántartott és validált Salmonella vizsgálati módszereket az 1.sz. ábra szemlélteti

A módszerfejlesztés fő irányai:

- A klasszikus vizsgálatok gyorsítása vagy egyszerűsítése új szelektív és differenciáló kromogén táptalajok kifejlesztése.
- A dúsítók szelektivitásának növelése és műszeres méréssel való kombinálása pl. konduktancia mérés (Malthus, BacTrac, Rabbit).
- Molekuláris biológiai (PCR, DNS hibridizációs ) 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.

A Salmonella vizsgálatok idődiagramját a 2. ábra szemlélteti.

A különböző alternatív vizsgálati módszereknek egyrészt jelentősen eltér a kimutatási határa, másrészt még jobban eltér a kimutatási határ leggyorsabb eléréséhez vezető módszer. Ezért nagy hangsúlyt kell fektetni a kimutatási határ elérésének optimalizálására, mert ez számos tényező, pl. az élelmiszer összetevői, a várható kísérőflóra, a károsodott sejtek jelenléte, valamint a dúsítást követő lépések szelektivitása miatt nagyon fontos. Valamennyi módszernél jelentős szerepe van az elődúsításnak.

## **3. AZ ÉLELMISZERMÁTRIX ÉS A MIKROÖKOLÓGIAI KÖRNYEZET HATÁSA A SALMONELLA KIMUTATÁSRA**

A túlzott egységesítési törekvés az elődúsítási és dúsítási eljárásokat is leegyszerűsítette, elrejtve ezzel az élelmiszermátrix és a mikroökológiai környezet meghatározó szerepét a Salmonella kimutatásban. 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 alátámasztani a fentieket.

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 élelmiszer 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.

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 szerves vasvegyületek.

#### **4. A SZELEKTÍV DÚSÍTÁSI ELJÁRÁS MEGVÁLASZTÁSÁNAK JELENTŐSÉGE**

##### *4.1 Szabványos módszerek*

Az előző részben leírt elődúsítási eljárást követően a szelektív dúsítás klasszikus módon Rappaport Vassiliadis (RVS) és Müller Kauffman dúsítókból (MSZ EN ISO 6579), Müller Kauffman és Szelenites dúsítókból (MSZ EN ISO 6785) történik.

##### *4.2 Félfolyékony szelektív dúsítók*

Ma már sok laboratóriumban alkalmazzák a félfolyékony szelektív MSR/V és Diassalm táptalajokat, melyek a dúsítást követően diagnosztikus értékkel is rendelkeznek.

Az **MSRV** (félfolyékony RV) táptalajban lévő malachitzöld oxalát, a magnéziumklorid és novobiocin (20 mg/l) enterobaktériumokra gátló hatást gyakorol, a motilis Salmonellák 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 Salmonella gyakorlatilag szintenyészetben izolálható. Migrációs zóna hiánya esetén a negatív eredmény kiadható annak ellenére, hogy ezzel csak a motilis Salmonellák 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-brómkrezolzöld és a vasammóniumsulfát - nátriumtiosulfát adja. A motilis Salmonellák 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 Salmonellák 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 enteritidisre irányul, a táptalaj erre a mikrobára 0,015 g nitrofrantoinnal tehető szelektív.

Érdemes figyelembe venni, hogy a vasvegyületek alkalmazása az elődúsítóban megnöveli a Salmonellák motilitását is a félfolyéony 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 feltételezetten Salmonella jelenlét.

Lehetőség van a Diassalm táptalaj esetében MUCAP reagenssel (4-methyl-umbelliferyl caprylate) 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.

Összevont dúsítást is alkalmaznak nyers hús és darált hús esetén. A mikroökológiai elemzések egy hasznos megoldást kínálnak nyers hús és darált hús gyors Salmonella vizsgálatára. A nyers húsok közvetlenül félfolyékony táptalajra helyezve egyrészt biztosítják a rövid elődúsítási lépést a húsban (mint legjobb táptalajban), másrészt a novobiocin gátolja a nagyszámú kísérőflóra felszaporodását. Rutin vizsgálatokra jól bevált egy német húsvizsgáló laboratóriumban.

#### 4.3. *Reveal teszt*

A Ferrioxamin-E kiegészítővel való 2-4 órás elődúsítás, majd a teljes elődúsított mennyiség szelektív dúsítását követheti egy ELISA elven működő gyors teszt, amely lehetővé teszi a Salmonella sejtek kimutatását 24 órán belül nagy biztonsággal. A Reveal teszt olyan elődúsítást alkalmaz tehát, amely mind a Salmonella növekedést, mind pedig a sérült sejtek helyreállítását szolgálja. A teljes anyagmennyiség szelektív dúsítása pedig biztosítja, hogy a salmonella sejtek száma elérje a gyors teszthez szükséges detektálási szintet (amely saját vizsgálataink alapján  $10^7$  sejt/ml). E vizsgálat folyamatát a 3. ábra szemlélteti.

#### 4.4. *Salmonella vizsgálatok konduktometriás módszerekkel*

Ezekkel a fizikai mérési módszerekkel a mikrobaszaporodást szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával, folytonos konduktancia méréssel követik nyomon. Az állandó hőmérsékleten mért µS értékekből egy szaporodási görbe jellegű változást kapunk, amelynek jellemző paramétere, a detektálási idő szolgál a termékek mikrobiológiai állapotának meghatározására (a mikrobaszám fordítottan arányos a detektálási idővel.), jelenlét hiány próbák esetén pedig a görbe meredeksége és a µS érték változásának mértéke szolgál az adott baktérium jelenlétére.

A kimutatási határ 1 élő sejt/mérőcella.

Mivel a konduktancia mérést a minta turbiditása nem zavarja, felhasználási területe széleskörű.

A Salmonella vizsgálatok menetét a 4. sz. ábra szemlélteti.

A készülék mérő cellájába az elődúsítást követően kerül a minta, ahol a szelektív dúsítás során 6 percenként méri a műszer a vezetőképességet. A küvettában lévő szelektív táptalaj a szokásos dúsítóktól annyiban tér el, hogy egy ún. szelektív supplementet (novobiocint) és egy a mérést segítő adalékot is tartalmaz. Ez az adalék a TMO (trimetilamin-N-oxid-dihidrát), amely vegyületet a Salmonellák metabolizálják, és a keletkező anyagcseretermék hatására jelentősen megnövekszik a vezetőképesség. Így a műszerben való dúsítás és mérés lehetővé teszi egyrészt a kísérő mikroflóra visszaszorítását, másrészt Salmonella jelenlét esetén a gyors és jelentős mértékű konduktancia változást. Ez a változás (pozitív válasz) az elődúsítóban lévő Salmonellák számától függően 8 - 20 óra inkubálási idő után jelentkezik. Negatív esetben 24 órás inkubálás után nincs változás, a Salmonella negatív eredmény kiadható.

Pozitív válasz esetében az a célra kifejlesztett latex agglutináció segít a valóban pozitív minták kiszűrésére.

A vizsgálati idő, mint a leírtakból kitűnik, attól függ, hogy a Salmonella sejtek kezdeti száma mennyi a mérő küvettában. Ezt befolyásolni tudjuk az elődúsítás vezetésének a mikroökológiai körülményekhez való igazításával, valamint sejtkoncentrálnálási (immunszelektív oszlop ICS, immunmágneses szeparálás IMS) műveletekkel. E műveletek közbeiktatásával akár 24 órára is csökkenthető a Salmonella kimutatás ideje.

A módszer fő előnye tehát a gyorsaság. A mikroorganizmusok kimutatása gyorsabb a hagyományosnál, így csökken a tárolási, raktározási idő, valamint a várakozási idő a higiéniai vizsgálatok eredményére. A gyártásközi ellenőrzésbe építve a rendszert, lehetővé válik a gyorsabb hibafeltárás, így a korai beavatkozással a veszteség csökkenthető, így hatékony mikrobiológiai minőségellenőrzést tesz lehetővé. A számítógéppel vezérelt műszer folyamatos mérésre alkalmas, készüléktípustól függően 60 - 240 mintát képes egyszerre mérni.

## 5. IMMUNOLÓGIAI MÓDSZEREK

E témakörbe tartozó vizsgálati módszerek közül az ELISA, ELFA, latex agglutinációs és immunszelektív dúsítási eljárások (dip stick, IMS) kerülnek bemutatásra.

### 5.1. Salmonella vizsgálatok ELISA módszerrel

1. Nagy érzékenységgű, Salmonellákra specifikus befogó antitesteket adszorbeálódnak a mikroküvetták felületére, amelyekbe a Salmonella dúsítás utáni mintát pipettázunk.
2. Ha jelen vannak a Salmonella antigének a mintában, specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel. A mintában lévő többi anyagot mosással eltávolítjuk.
3. Salmonellákra specifikus, enzimmel jelzett antitestet (konjugátum) adagolunk a mikroküvettákba, mely hatására kialakul a "szendvics".
4. A Salmonellák jelenlétét láthatóvá egy enzim-szubsztrát színreakcióval tesszük. Ha a mintában nem volt Salmonella, akkor nem lesz az oldat színes.

A standard ELISA vizsgálat menetét az 5.sz. ábra szemlélteti.

Az ELISA kitek érzékenysége  $10^6$ - $10^7$  sejt /  $cm^3$ . Az érzékenységet a dúsító összetétele nem befolyásolja, ha a Salmonella e szükséges sejtszámot elérte benne.

A **szelektivitást** illetően megállapítható, hogy a tenyésztéses módszernél zavaró baktériumok (Proteus, Citrobacter, Pseudomonas, Enterobacter, E.coli) közül esetenként a C.freundii és az E.aerogenes esetén adhatnak a kitek fals pozitív eredményt.

A módszerösszehasonlító vizsgálatok azt mutatják, hogy az ELISA módszerek érzékenysége  $100 \cdot p / (p + f_n) = 98-100 \%$ , specifikitása  $100 \cdot n / (n + f_p) = 97-99 \%$ , ahol:

p: valós pozitív minták száma, n: valós negatív minták száma

fn: fals negatív minták száma, fp: fals pozitív minták száma

Az ELISA vizsgálat mellett, hogy megbízható, idő, munka, anyag és eszköz takarékos eljárás. nagyszámú szelektív, Petri csészébe kiöntött táptalajt, rövid biokémiai sort és sok élőkultúrát lehet vele megspórolni.

A mai napon külön ismertetem a BIOLINE ELISA rendszert, amely egyszerű, gyors eljárás az élelmiszerekben és takarmányokban előforduló Salmonellák kimutatására. A módszer az AOAC által validált, Franciaországban, Dániában és Finnországban szabványos módszer. Az BIOLINE ELISA módszer idődiagramját, és lépéseit a 6. ábra szemlélteti.

E módszer előnyei:

Széleskörű felhasználási terület (élelmiszerek, takarmányok, környezeti minták)

Egyszerű, felhasználóbarát (akár napi 600 minta )

Nem igényel utódúsítást

Flexibilis (igény szerint csíkokra szétszedhető kit)

Stabil, felhasználásra kész reagensek (12 hónap)

Detektálási limit ( $10^6$ - $6 \cdot 10^6$  cfu/ml RV)

Analóg a referencia módszerrel

Érzékenység: 99%

Specifikusság: 97%

Élelmiszerelőállítóknál biztonságos a vizsgálat, mivel az ELISA eljárás már a hőkezelt mintával történik

Mind hazai, mind nemzetközi körvizsgálatban kiváló eredményt tudunk elérni a BIOLINE ELISA alkalmazásával.

Az érzékenységet tekintve az Enterobacteriaceae – be tartozó törzsek döntő többsége nem ad pozitív eredményt a kittel (így a Proteus, E.coli, E.cloaceae, Klebsiella..). Néhány E.aerogenes és C.freundii adhat néha keresztreakciót (fals pozitív).

Megállapítható, hogy a BIOLINE ELISA vizsgálattal átlagosan 48 órán belül biztosan kiadhatók a negatív eredmények, mivel fals negatív eredményt nem kaptunk az ELISA vizsgálatok során. Nagyszámú kísérő flóra esetén a klasszikus vizsgálati módszerrel viszont kaphatunk fals negatív eredményt.

### 5.2. Az ELISA módszer kombinálása szelektív sejtkoncentrációval

A korszerű minőségbiztosítási rendszereket működtető vállalatoknál 48 órán belül van szükség, hogy az élelmiszerbiztonságot szavatoló HACCP rendszerek működtetéséhez megfelelő információval tudjanak szolgálni a mikrobiológusok.

Ehhez az elődúsítás és dúsítás műveletének gyorsítását kell elérni.

Lehetőségek:

-membránszűrés (legrégibb sejtkoncentrációra alkalmas módszer, de csak tükrös levek esetében jó)

-immunszelektív felületek alkalmazása

Salmonella Immuncapture system (ICS)

Immunmágneses szeparálás (IMS)

Ezek közül a gyakorlati szempontból igen jelentős immunológiai módszereket vizsgáltuk.

Mind az IMS, mind az ICS élelmiszerekben lévő Salmonellák gyors kimutatására szolgál.

ELISA technikával való kombinációval 24 órán belül valószínűsíthető a pozitív eredmény, illetve adható meg a negatív eredmény.

A módszer eleve: a hagyományos eljárást helyettesítő teszt a szelektív dúsítás helyett egy immunszelektív felületet, a szelektív és differenciáló agartáptalajok helyett ELISA módszert alkalmaz 5. ábra.

A teszt lépései:

- a./ Elődúsítás egy éjszakán át.
- b./ Salmonella sejtek "befogása" az elődúsítóból. az immunszelektív felület segítségével.
- c./ Mosás után az immunszelektív felületeket M-levesben inkubáljuk néhány órán át, hogy az ELISA vizsgálatokhoz szükséges sejtszámot elérjük.
- d./ Hőkezeljük a Salmonella sejteket, ezzel leválasztjuk az antigéneket az immunszelektív felületről.
- e./ Enzimmel jelzett Salmonella antitesteket (konjugátum) kötünk az antigénekhez, amelyek hatására egy szintelen szubsztrát színesre változik.

Az immunszelektív dúsítási módszer tehát idő és anyagtakarékos, szelektív, felhasználóbarát.

### 5.3. Salmonella vizsgálat ELFA módszerrel

Szelektív dúsítás utáni Salmonella jelenlét meghatározására alkalmas ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) vizsgálatok egy teljesen automatizált VIDAS készülékben végezhetők.

A Salmonella dúsítás utáni hőkezelt mintát egy reagenseket is tartalmazó műanyag strip megfelelő küvettájába pipettázzuk, majd a készülékbe helyezük. A vizsgálat valamennyi lépését a készülék automatikusan elvégzi.

A készülékben lezajló folyamatok:

A nagy érzékenységű, Salmonellákra specifikus befogó monoklonális antitestek egy a készülékben lévő pipettázó (SPR= Solid Phase Receptacle) felületére vannak adszorbeálva. A mintatartó küvettából a minta a pipettázóba cirkulál a szükséges reakció ideig. Amennyiben jelen vannak a Salmonella antigének a mintában, specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel. A minta visszakerül a küvettába, majd a SPR mosása történik. A következő munkafázisban Salmonellákra specifikus, alkálikus foszfáttal jelzett antitest (konjugátum) cirkulál a SPR-ben. Hatására egy komplex ("szendvics") keletkezik. A következő lépésben mosással eltávolításra kerül a nem kötött konjugátum, majd szubsztrátként 4-metil-umbelliferil-foszfát szubsztrátot cirkulál a SPR-ben. Az alkálikus foszfát hidrolizálja a szubsztrátot és egy fluoreszkáló vegyület (4-metil-umbelliferon) keletkezik. A fluoreszcenciát 450 nm-en méri a készülék.

Ha a mintában nincs Salmonella, akkor nincs fluoreszcencia.

A Salmonella kimutatás ELFA módszerének menetét a 7.sz. ábra szemlélteti. Az ELFA vizsgálat végrehajtása során az összes elvégzendő művelet a hőkezelt dúsító pipettázása a mintatartó küvettába.

## 6. SZELEKTÍV ÉS DIFFERENCIÁLÓ TÁPTALAJOK

Terjedelemi okok miatt később kerül közlésre.

## 7. MOLEKULÁRIS BIOLÓGIAI MÓDSZEREK

Terjedelemi okok miatt később kerül közlésre.

## 8. A MÓDSZER VÁLASZTÁS SZEMPONTJAI-

### 8.1 Kihívások a mikrobiológiai vizsgálatokkal szemben

A vizsgáló és kalibráló laboratóriumok alkalmasságának általános követelményei -t az MSZ EN ISO/IEC 17025:2001 szabvány tartalmazza. E szabvány 5.4 pontja a vizsgáló módszerekkel kapcsolatban előírja, hogy elsősorban nemzetközi, regionális és nemzeti szabványokat kell alkalmazni (ezeket nem kell kiegészíteni, újra írni, mint belső eljárásokat, ha a személyzet eredeti formában használni tudja), másrészt hogy a laboratóriumban kifejlesztett, vagy átvett módszert a használatba vétel előtt validálni kell. Validálni kell a

- nem szabványos módszereket

- saját kifejlesztésű módszereket
- működési területen kívül eső szabványos módszereket
- szabványos módszerek kiegészítéseit, módosításait

A vizsgálati módszer jellemző paramétereinek meghatározására szolgáló eljárás mikrobiológiai területen az EN ISO 16140 szabványban van rögzítve mind a jelenlét/hiány próbákra, mind a szám meghatározási módszerekre vonatkozóan.

A validálás annak igazolása, hogy az alternatív módszer ( gyors, érzékeny, egyszerű, automatizált, olcsó) összehasonlítható eredményt ad a referencia módszerrel ( ISO, CEN szabványokban előírt ). A korszerű mikrobiológiai vizsgálati módszerek többsége szerencsére nemzetközi validáló szervezetek (AOAC, AFNOR, MICROVAL) által validált, amint azt az 1.sz ábra mutatja. Ez igaz a BIOLINE módszerre is.

Az élelmiszeripar fejlődése, a gyártott élelmiszer termékek és a kereskedelmi tevékenység bővülése miatt egyre inkább szükséges az élelmiszerek, illetve azok alapanyagai mikrobiológiai állapotának pontos ismerete. Az élelmiszerbiztonságot, -minőséget érintő korszerű megítélés a módszerekkel szemben is új követelményeket állít: egyszerűség, gyorsaság, munka és anyagtakarékosság, reprodukálhatóság, károsodott sejtek kimutatása, nagyszámú kísérő mikroflóra mellett a kórokozó és feltételesen kórokozó mikroorganizmusok kimutatása, a preventív, gyártástechnológiába beépülő szabályozási és ellenőrző (surveillance) rendszerek kiszolgálása. Ez az objektív szükségszerűség az elmúlt tíz évben hazánkban is forradalmasította a mikrobiológiai szemléletmódot és az igénybe vehető módszereket egyaránt.

Még ma is hetente jelennek meg új eljárások, alkalmazások a mikrobiológusok munkája, de még inkább a diagnosztika és a termelésirányítás segítésére.

Az általunk vizsgált módszerek (de a legtöbb új módszer) előnyei a munka, idő, táptalaj megtakarítás, ennek megfelelően több vizsgálati lehetőség, így nagyobb biztonság. Hátrányként egyes esetekben a műszerek, táptalajok magas ára, másrészt a hivatalos módszergyűjteményekbe való lassú bekerülésük jelölhető meg.

### 8.2 Mi határozza meg, hogy melyik módszert válasszuk?

A vizsgálat célja, a biztonsági szint, a mintavételi terv, az érzékenység, a specifitás, a pontosság, az élelmiszer összetétele, a validálás ténye, a vizsgálati idő, az automatizálás lehetősége adattárolás, adatelemzés, a szervíz és céginformációk és végül a vizsgálati költség.

A műszeres vizsgálatokat magas beszerzési költség és olcsó üzemeltetési költség jellemzi, ezért ezek csak teljes kihasználás mellett gazdaságosak. A műszert nem igénylő megoldások anyagköltsége a magasabb

A fenti szempontok figyelembevételére után a még oly sok új mikrobiológiai módszer közül is csak egy-két módszer marad. A módszer kiválasztásban alapkövetelmény, hogy fals negatív eredmény nem fordulhat elő, és a fals pozitív eredmények százalékos aránya is lehetőleg alacsony legyen.

A screening módszerrel kapott pozitív eredmény mindig megkapja a valószínűleg jelzöt, amit minden esetben a klasszikus megerősítő vizsgálatnak kell követnie.

### 8.3 Mikrobiológiai vizsgálatok a HACCP programokban

Folyamatellenőrzés során főleg fizikai indikátorok ( °C, idő, pH, a<sub>w</sub>) és kémiai indikátorok (savak, tart.szer konc.) mérését preferálják.

Kockázatbecslésre azonban nagyszámú, gyors mikrobiológiai vizsgálatra van szükség. Így:

- Alap- adalék és segédanyag vizsgálat
- Eloszlásvizsgálat, mintavételi terv



Matematikai modellezés  
Technológiai műveletek méretezése  
Környezet vizsgálatok  
Challenge test  
HACCP verifikálás (késztermék vizsgálat)

### *9. Összefoglalva*

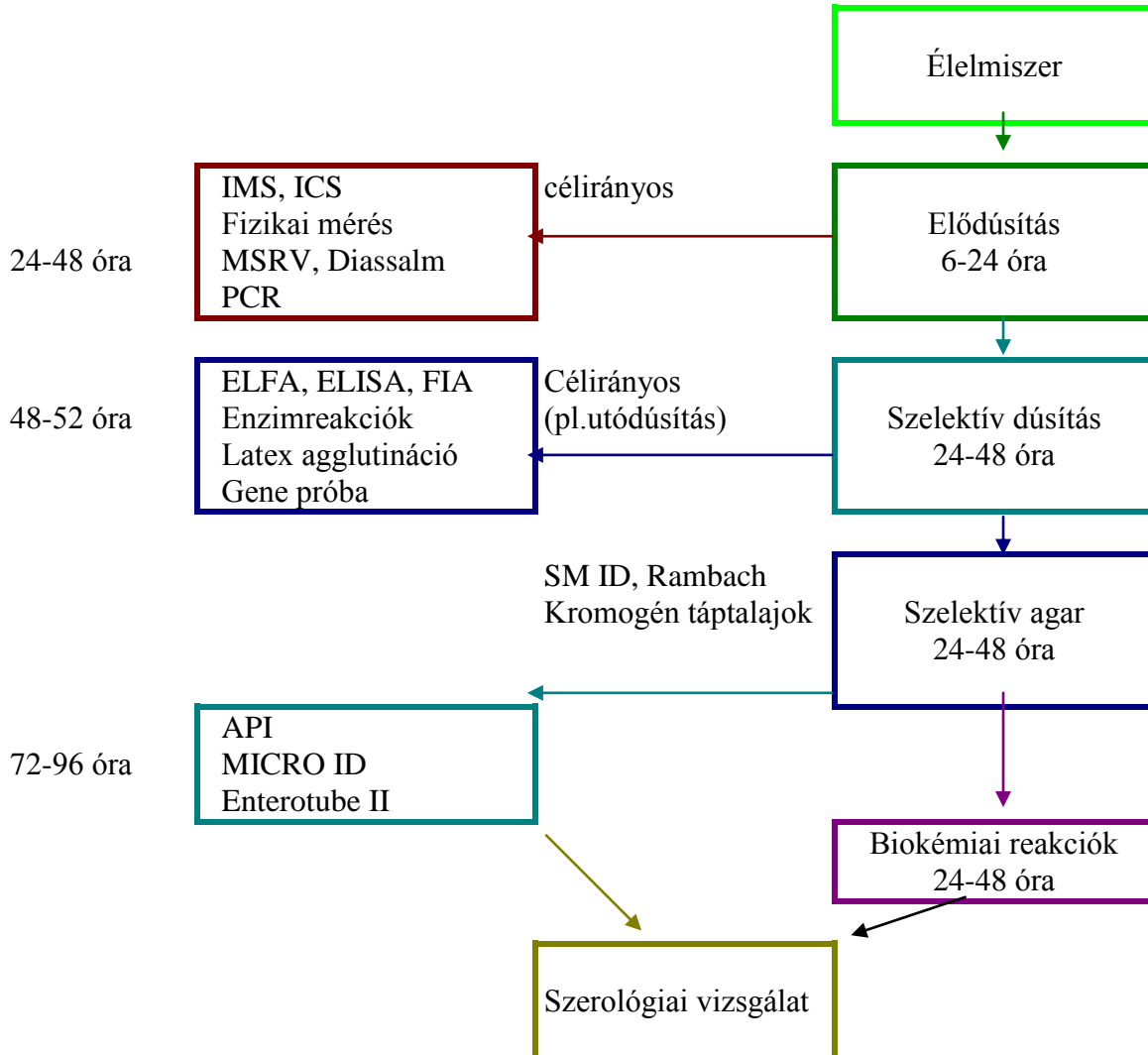
A klasszikus idő és munkaigényes mikrobiológiai vizsgálati módszerek gyors diagnosztikai módszerekkel való helyettesítése napjaink követelménye annak érdekében, hogy a minőségbiztosítási rendszereket maximálisan kielégítse. A mikroorganizmusok széles körének kimutatási lehetősége mellett kompatibilisnek kell lennie a hagyományos módszerekkel, amelyekre jelenleg a szabályozások vonatkoznak.

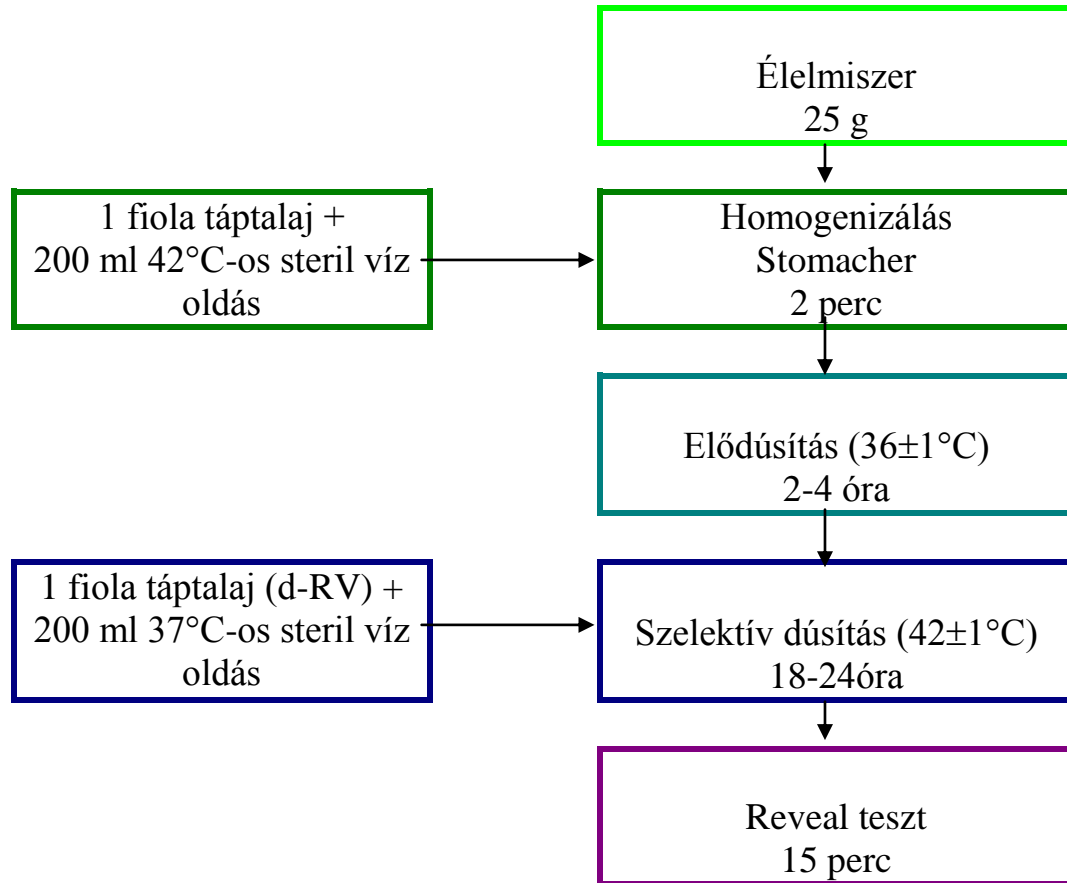
Megállapítható továbbá, hogy az alternatív módszerekkel elérhető, hogy 24 órán belül Salmonella vizsgálati eredményt kapjunk még szubletálisan sérült Salmonella sejtek esetében is, ha kihasználjuk a mikroökológiában, a termék és technológiai ismeretekben, valamint a korszerű technikában rejlő lehetőségeket.

**KORSZERŰ SALMONELLA VIZSGÁLATI MÓDSZEREK**  
AOAC 2003  
34 gyártó

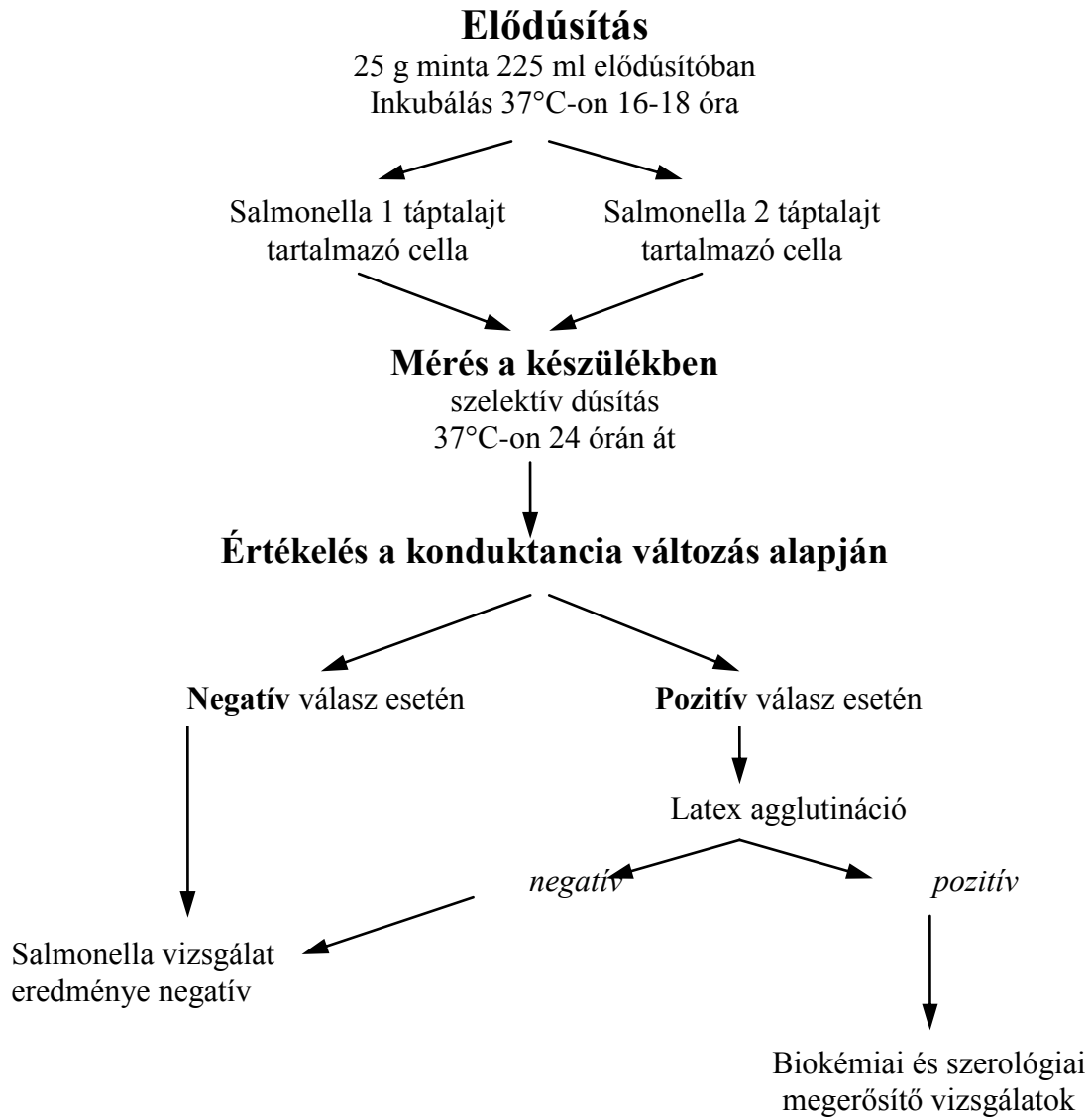
	<b>ÖSSZES MÓDSZER</b>	<b>AOAC AFNOR DANVAL validált</b>	<b>MÓDSZER FAJTÁK</b>
DÚSÍTÁS	13	8	IMS, ICS, MSRV, Diassalm
KIMUTATÁS	45	23	ELISA, ELFA, PCR, Konduktometria, Reveal

### A SALMONELLA VIZSGÁLATOK IDŐDIAGRAMJA



**REVEAL SALMONELLA TEST****24 ÓRA**

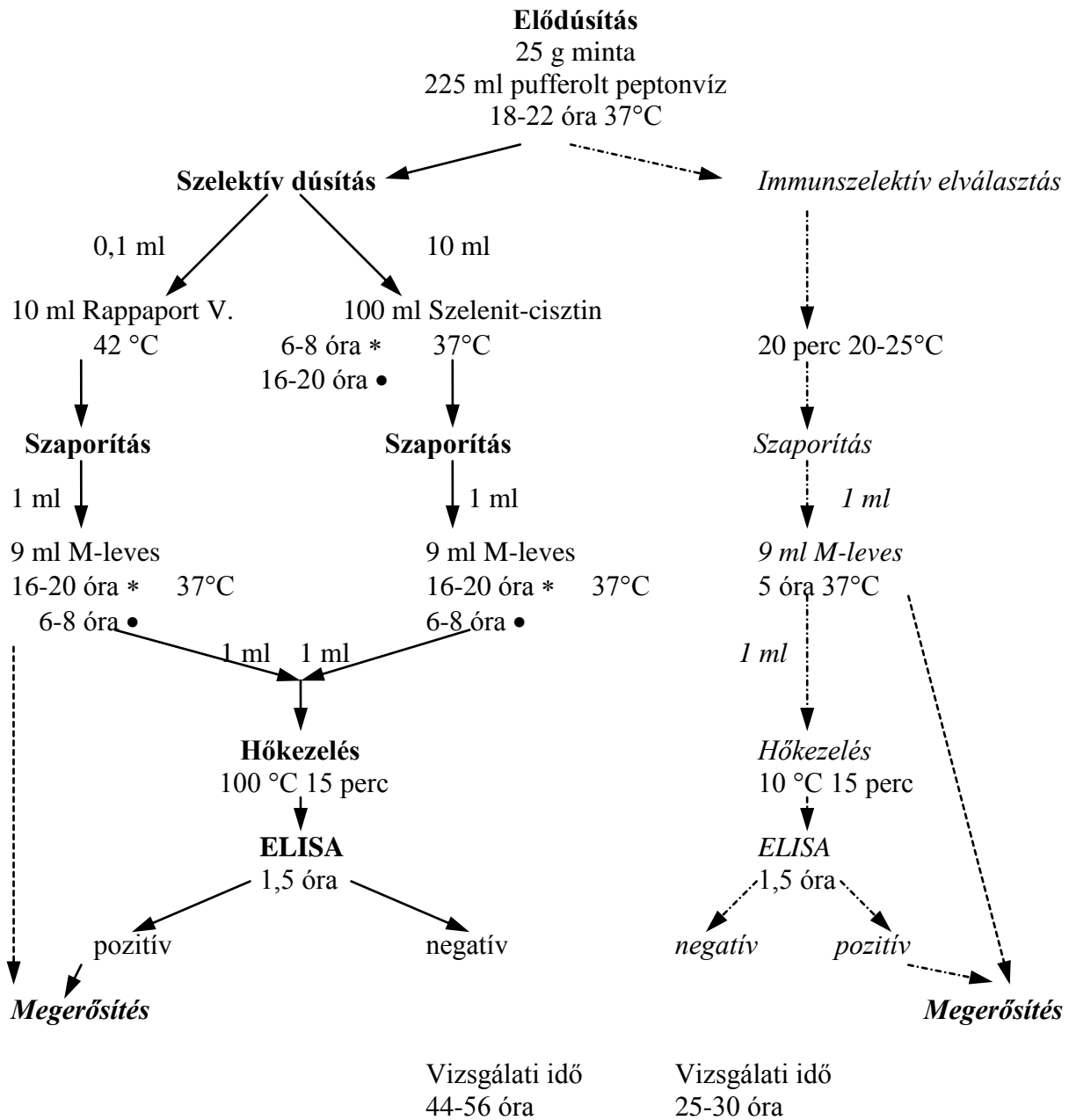
## Salmonella kimutatás konduktometriás eljárással



## Salmonella kimutatás ELISA módszerrel

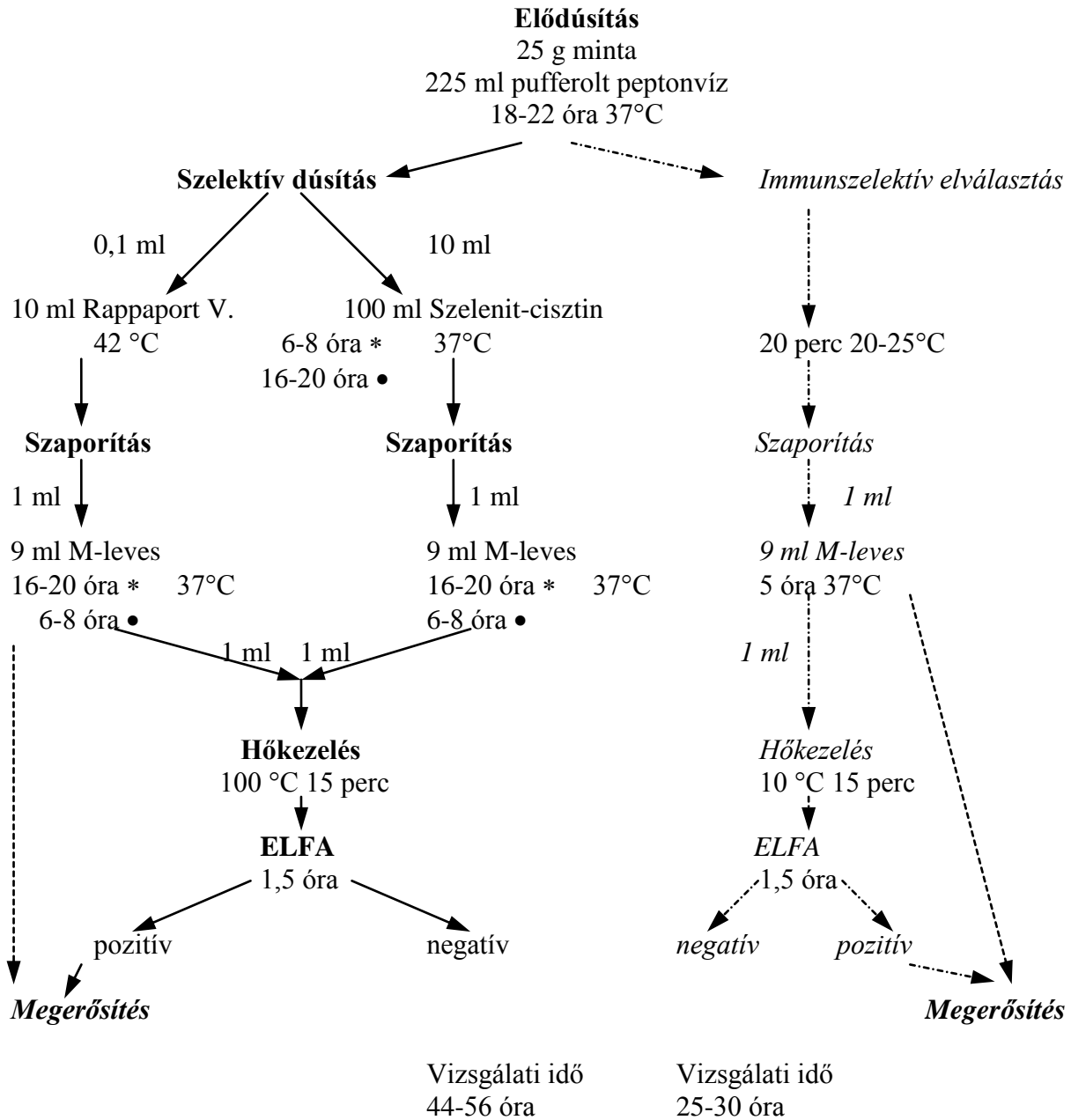
*Standard ELISA módszer*

*Immunszelektív dúsítással kombinált  
ELISA módszer*

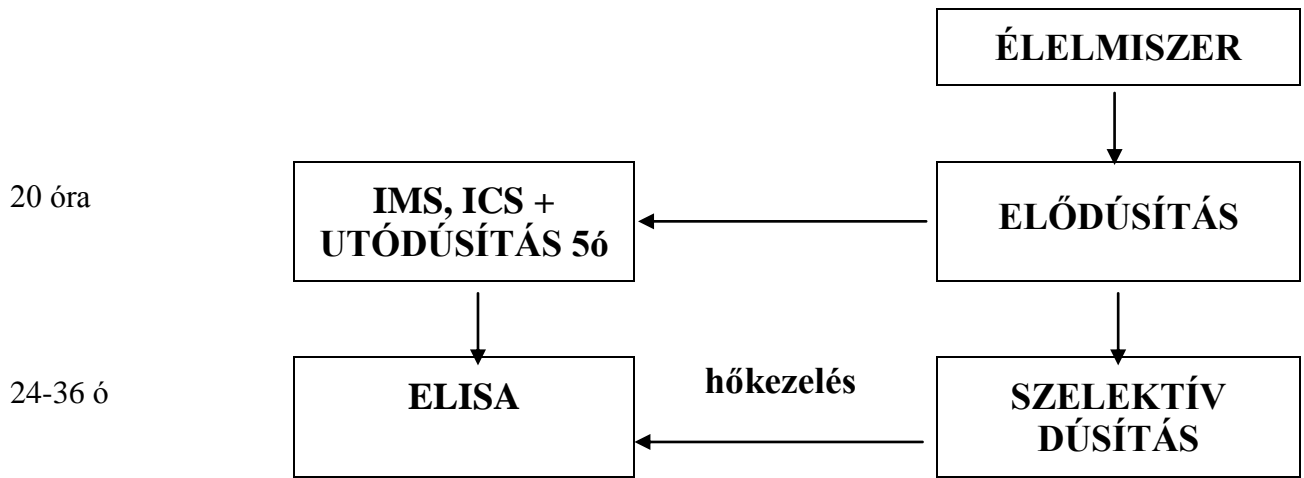


- nagyszámú kísérő flóra
- \* kevés kísérő flóra

## Salmonella kimutatás VIDAS ELFA módszerrel



- nagyszámú kísérő flóra
- \* kevés kísérő flóra

**BIOLINE ELISA VIZSGÁLATOK FOLYAMATA**



## 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 6579:2003 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 01. 26.

Tabajdiné P.V.: (2000) Élelmiszerek Salmonella vizsgálatának újabb módszerei I. Édesipar XLVI évf. 2-3. szám 19-24. 10-16.

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.

Hans-Wilhelm Warnecke: (2001) Method for detection of Salmonella species within 18 hours. *Fleisch Wirtschaft* **8** 79-81.

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.

Bacteriological Analytical Manual /th Edition (1996) AOAC International

Rapid Analysis Techniques in Food Microbiology (1994) Edited by P.Patel Blackie Academic

Collins and Lyne's: (1995) Microbiological Methods Butterworth

M.R. Adams and M.O.Moss (1995) Food Microbiology Royal Society of Chemistry

E.de Boer, R.R.Beumer: (1999) Methodology for detection and typing of foodborne microorganisms *International Journal of Food Microbiology* 50/1-2

D.C.Kilsby: (1999) Food microbiology: Challenges for the future *International Journal of Food Microbiology* 50/1-2

Tabajdiné P.V., Kovácsné D.H., Fábrián A.: (1998) Korszerű mikrobiológiai vizsgálati módszerek az élelmiszerellenőrzésben. *Konzervújság* 1. 11-14