

Mikrobiológiai vizsgálati módszerek fejlődése a hazai élelmiszer vizsgálatok gyakorlatában

Tabajdiné dr. Pintér Vera

„A levegő tisztasága, nedvességtartalma és hőmérséklete,
a zaj és az izgalom, a fizikai munka mennyisége 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

1. BEVEZETÉS

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

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

Élelmiszerekkel (minden olyan feldolgozott, részben feldolgozott vagy feldolgozatlan anyag vagy termék, amelyet emberi fogyasztásra szánnak, beleértve az ivóvizet is) szemben támasztott legfontosabb követelmények:

- Egészségre ártalmatlan (az élelmiszerellátás biztonsága a világ minden táján központi kérdés)
- Jó minőségű (kiváló érzékszervi tulajdonság, megfelelő beltartalmi érték)
- Gazdaságosan előállítható

E követelmények és az élelmiszerek mikrobiológiai állapota között szoros összefüggés van. Élelmiszereink és azok alapanyagai nemcsak az ember számára, hanem a mikroorganizmusok számára is tápanyagul szolgálnak. A mikrobák az élelmiszerminőség fontos részesei úgyis, mint azok hasznos létrehozói a különböző biotechnológiai folyamatokban, de úgyis, mint azok romlásának okozói, vagy biztonságának veszélyeztetői. Ez utóbbiak az élelmiszerek szinte valamennyi minőségi jellemzőjét befolyásolják, a közvetlenül érzékelhető külső (szín, illat, íz, állag) és a rejtett belső (összetétel, tápérték, toxikológia) tulajdonságokat egyaránt.

A káros kórokozó és romlást okozó mikroorganizmusok veszélyeztethetik az élelmiszerbiztonságot és a romlásmentes eltarthatóságot a nyersanyagtól kezdve a feldolgozás, forgalmazás teljes vertikumában (szántóföldtől az asztalig).

Az élelmiszerek megfelelő mikrobiológiai állapotának, így élelmiszerbiztonsági és romlásmentes eltarthatóságának való megfelelés új kihívások elé állította az élelmiszer-mikrobiológusokat is. Az utóbbi ötven évben élelmiszerellátásunk, szokásaink többet változtak, mint előtte évezredek alatt.

- Az élelmiszereket tömegtermeléssel állítják elő, iparszerű az állattenyésztés és növénytermesztés, központi a vízellátás, így rövid idő alatt nagy veszteség és kockázat keletkezhet.

- A globalizáció, a nemzetközi kereskedelemben az áruk szabad áramlása, a túrizmus fejlődése fokozódó mikrobás terhelést, jelentős mikrobaforgalmat is eredményez. Adott területen addig nem honos mikrobák, mikrobacsoportok jelennek meg, amelyek mind egészségügyi, mind minőségi problémákat jelenthetnek. Ezek kimutatási módszerei is hiányoznak a napi gyakorlatból.
- Hazánkban a 2004. évi Európai Unióhoz való csatlakozás, és Világkereskedelmi Szervezeti tagságunk hatására piacunk nyitottá vált. Ezzel egyidőben a nemzeti szabályozás helyett uniós szabályok (pl. új mikrobiológiai határérték rendelet) léptek életbe. Az élelmiszer előállító elsődleges felelőssége fokozatosan érvényre jut. A kockázatbecslésen alapuló HACCP rendszerek kiépültek az élelmiszeriparban.
- Az egészséges táplálkozási igény, az új táplálkozási szokások új tartósítási technológiák, új nyersanyagok megjelenését eredményezték, amelyek hatásvizsgálata új kihívást jelentett.
- A fokozódó igény a feldolgozottsági fok növelésére kiterjedtebb veszélyforrást jelent.
- Új kereskedelmi formák egyre hosszabb minőségmegőrzési időtartamot követelnek, amelyhez új antimikrobás ágensek, technológiák szükségesek.
- Immunrendszerünk gyengülése tapasztalható, miközben a kórokozók virulenciája, patogenitása egyre növekszik.

Mindezek a hatások szemléletváltást követeltek meg az élelmiszer-mikrobiológusoktól is. A késztermék vizsgálat helyett a preventív, technológiába beépülő szabályozási rendszer igénye merült fel a „rendőr” szerep helyett a „házi orvos” szerep lett a mértékadó. Ennek megfelelően a mikrobiológiai vizsgálatokkal szembeni új követelmények fogalmazódtak meg.

2. A MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOKKAL SZEMBENI ÚJ KÖVETELMÉNYEK

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 módszer tehát gyors vagy gyorsított, ugyanakkor munka és anyagtakarékos és lehetőleg egyszerű legyen, miközben megbízható (validált), a károsodott sejtek kimutatására, sőt a nagyszámú kísérő flóra mellett kórokozó és romlást okozó mikroorganizmusok kimutatására is képes legyen. Lehetőleg még a biofilmet alkotó és az életképes, de nem tenyészthető (VNC) mikrobák kimutatását is tegye lehetővé.

Összességében a hatékonyság növelése volt a cél, hogy gyorsabb legyen a visszacsatolás a minőségbiztosítási rendszerben, a meg nem felelő termék gyorsabban kiszűrhető legyen, csökkenjen a rizikó faktor mind élelmiszerbiztonsági, mind eltarthatóság szempontjából, kevesebb legyen a nyersanyag és késztermék tárolási költség (hely, hűtési költség), mindemellett lehetőség szerint alacsonyabb legyen a vizsgálati és labor költség is.

Egyes élelmiszer előállítók belső élelmezésegészségügyi előírásaikban tételenként 10, 15, 30, sőt 60 elemi mintából írják elő a Salmonella mentességet. E szigorú határértékek metodikai szempontból is új kihívást jelentenek a mikrobiológusok számára.

A fenti célok érdekében a társtudományok analitikai kémia, enzimológia, fizikai kémia, immunológia, műszeres elektronika, molekuláris biológia, virológia, nanotechnológia) minden eredménye robbanásszerűen vonult be a mikrobiológiába az alternatív módszerek kialakításánál. 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.

A kezdeti időkben (1980-1995) a megjelenő nagyszámú kezdeményezés mikrobiológusok általi elfogadása széles skálán mozgott. Sokan csak a hagyományos tenyésztési módszerekben bíztak, de legalább annyian örültek az új, hatékonyság lehetőségét magukban rejtő újnak. A MÉTE kezdetektől teret adott az új gondolatok megismertetésének, számos rendezvénnyel segített az új módszerek elterjesztésében. A hatályos mikrobiológiai határérték rendeletekhez azonban a legtöbb országban a klasszikus szabványos módszerek voltak rendelve, így az új módszerek az ipari gyakorlatban kezdtek elterjedni, különösen azután, amikor a nemzetközi szervezetek (AFNOR, AOAC, MICROVAL) elkezdtek ezeknek a módszereknek a validálását a 2004-ben megjelelő ISO 16140 szabvány alapján.

A nagy áttörést az jelentette, amikor az EU mikrobiológiai határérték rendelet bár minden kritériumhoz ISO szabványos (referencia) módszert rendelt, megengedte az alternatív módszerek és az alternatív indikátor mikroorganizmusok alkalmazási lehetőségét, továbbá előírta a trendanalízis és a fázisvizsgálatok szükségességét patogénekre vonatkozóan is. Az új rendelet nagy pozitívuma (néhány nagy hibája mellett) a mikroökológiai szemlélet fontosságának kiemelése az élelmiszer mikrobiológiában.

Elhárult tehát minden akadály az elől, hogy a jelenlét/hiány próbák, a szám meghatározások és az identifikálás területére a legalkalmasabb alternatív módszerek bekerüljenek. 2012 végén az AFNOR által validált és érvényes státusszal rendelkező alternatív mikrobiológiai vizsgálati módszerek száma meghaladja a 120-at, melyekhez a szükséges kiteket, eszközöket több, mint 20 cég állítja elő. A legtöbb vizsgálati módszer (több, mint 30) az élelmiszeripari és humán vizsgálatok területén is a legfontosabb Salmonella kimutatásra került kidolgozásra és bevezetésre.

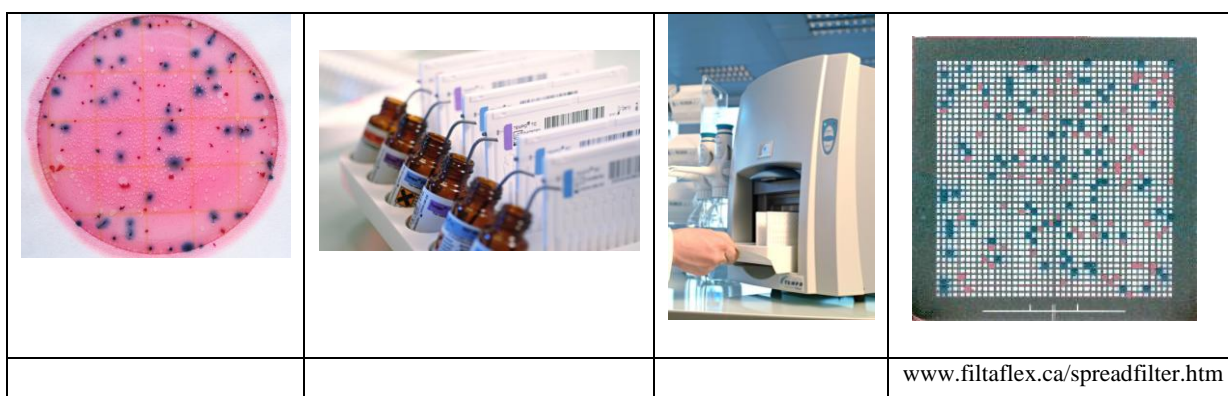
Az alternatív módszerek megjelenése jót tett a klasszikus mikrobiológiai vizsgálatoknak is, azok újragondolása szép új megoldásokat eredményezett. Különösen igaz ez a Salmonella vizsgálatokra, ahol a túlzott egységesítési törekvés megváltozott, és újra a mikroökológiai szemlélet az uralkodó a területen, ami az élelmiszervizsgálatok során elengedhetetlen.

3. A GYORS MIKROBIOLÓGIAI VIZSGÁLATOK CSOPORTOSÍTÁSA

A mikrobiológiai vizsgálati módszerek csoportosítása didaktikai szempontból az alábbi:

3.1. Hagományos módszerek gyorsítása, automatizálása


- Kész portáptalajok és redy-to-use táptalajok alkalmazása
- Gravimetriás adagolás, hígítás
- Spirál lemez módszer
- Petri-film típusú eszközök
- TEMPO készülék mikrobaszámok automatikus meghatározására
- Hidrofób hálózatos membránfilterek (HGMF)
- Új szelektív táptalajok (kromogén szubsztrátot tartalmazó szelektív és izoláló táptalajok)
- Telepszámlálás automatizálása
- Egyszer használatos eszközök (Petri csészék, kémcsövek, pipetták, bemérő és mintavevő edények)



3.2. Direkt sejtszámlálás módszerei

A mikrobák számának meghatározását egy rövid előkészítés (szűrés, festés stb.) után közvetlen számlálással végezzük megfelelő mikroszkóp, vagy lézeres értékelést követően. Az egy-két órát igénylő vizsgálatok köre azonban limitált, mind mátrix, mind nagyságrend vonatkozásában.

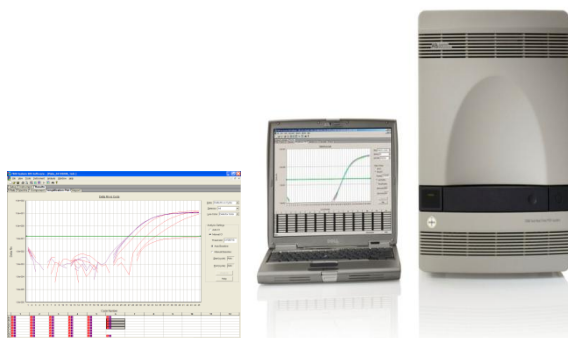
- Részecskeszámlálás
- Flow citometria
- DEFT technika (COBRA, BACTO SCAN)
- Lézeres értékelés (ChemScan)
- Immunfluoreszcencia

3.3. Sejtalkotók szelektív elemzése

A mikrobák jelenlétének kimutatását, azok azonosítását valamelyik sejtalkotó (ATP, DNS szekvencia, zsírsavösszetétel, fehérje összetétel, patogenitásért felelős gén szakasz) speciális érzékelésével végezzük el.

- ATP meghatározás
- DNS hibridizációs módszer
- PCR
- Zsírsav analízis (GC)
- Fehérje analízis (MALDI TOP)
- LAL teszt (sejtfal lipopoloszacharid kimutatás)
- Patogenitási faktor (p₆₀)



3.4. Mikroba metabolitok mérése

A mikrobák jelenlétét az általuk termelt anyagcseretermékek kémiai mérésével közvetlenül a termékből, vagy zárt csomagolás esetén a „head space”-ből mérjük. Különösen romlások meghatározásánál hasznos gyors eljárás, amelyeken alapszanak az új típusú nano érzékelők is. A leggyakrabban mért paraméterek:

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

3.5. Mikrobaszaporodás detektálása

A mikrobaszaporodást szelektív és differenciáló táptalajok alkalmazásával, folytonos fizikai méréssel (impedancia, konduktancia, turbiditás, hőmenyiség, redoxpotenciál, beütésszám)

követjük nyomon. Az állandó hőmérsékleten mért 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 változás mértéke szolgál az adott baktérium jelenlétére.

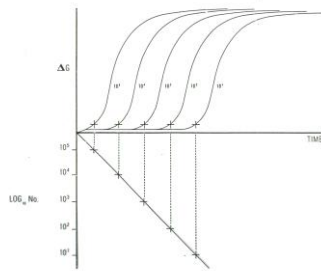
Impedancia, konduktancia mérés (Malthus, Rabbit, BacTrac)

Turbidimetria (Bioscreen)

Mikrokalorimetria (DSC)

Radiometriás módszerek

Redoxpotenciál mérés



3.6. Immunológiai módszerek

Ezeknél a módszereknél nagy érzékenységű, adott mikrobára, vagy mikroba anyagcseretermékekre specifikus befogó antitestek vannak adszorbeálva a mikroküveték felületére, amelyekbe a mintát pipettázzuk.

Amennyiben jelen vannak a vizsgálandó antigének a mintában, specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel. A mintában lévő kísérő anyagok mosással történő eltávolítása után specifikus, enzimmel, vagy alkálikus foszfatázzal jelzett antitest hatására egy komplex ("szendvics") keletkezik.

Az adott mikroba jelenlétét láthatóvá egy enzim-szubsztrát színreakcióval, agglutinációval, vagy mérhetővé színintenzitással, fluoreszcenciával vagy beütésszámmal tesszük.

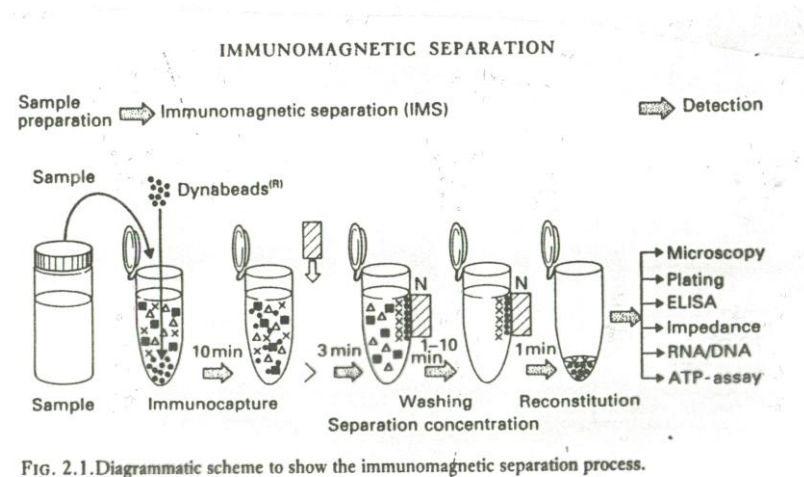
- ELISA, ELFA (**VIDAS**)
- RIA
- Immunfluoreszcencia
- Latex agglutináció



3.7. Sejtkoncentráció

A fenti módszerek tovább gyorsíthatók a kimutatáshoz szükséges sejtszám koncentrációval való elérésével, akár közvetlenül az élelmiszerből is.

- Membrámszűrés (legrégebbi sejtkoncentrációra alkalmas módszer, de csak tükrös levek esetén)
- Immunszelektív felületek alkalmazása a szelektív dúsítás helyett
Immuncapture system (ICS)
Immunmágneses szeparáció (IMS)



A sejtkoncentráció ELISA, impedimetria, mikroszkópos, PCR vagy hagyományos lemezes technikával való kombinálással akár 24 órán belül valószínűsíthetjük a pozitív eredményt, illetve adhatjuk meg a negatív eredményt.

3.8. Korszerű diagnosztikai eljárások

A kitenyésztett mikroorganizmusok azonosítására szolgáló gyors, vagy gyorsított eljárások:

- Immunológiai módszerek (Path stick, Single path, Reveal) immunkromatográfia
- Molekuláris diagnosztika (PCR, szekvenálás)
- Kromogén táptalajok
- Biokémiai módszerek (Identifikáló kitek: API, BBL Crystal, VITEK)



4. Alternatív módszerek megjelenése a hazai gyakorlatban

A fent felsorolt vizsgálati módszerek megjelenése a hazai mikrobiológiai gyakorlatban az alábbi táblázat szerint alakultak.

1985-1990	1990-1995	1995-2000	2000-2005	2005-
Kész táptalaj ELISA	Gravimetriás adagolók ATP mérés ELFA (VIDAS) Azonosítás (API)	Szaporodás detektálása Petri film Egyszer használatos eszközök Sejtkoncentráció Azonosítás (zsírsav)	PCR Kromogén táptalajok Immunkroma- tográfia Azonosítás (BBL Crystal)	TEMPO Fág technika Újra értékelések, validálások (pl. dúsítások vezetése, mátrix hatások elemzése) Azonosítás: molekuláris diagnosztika

5. Kórokozó vizsgálatok

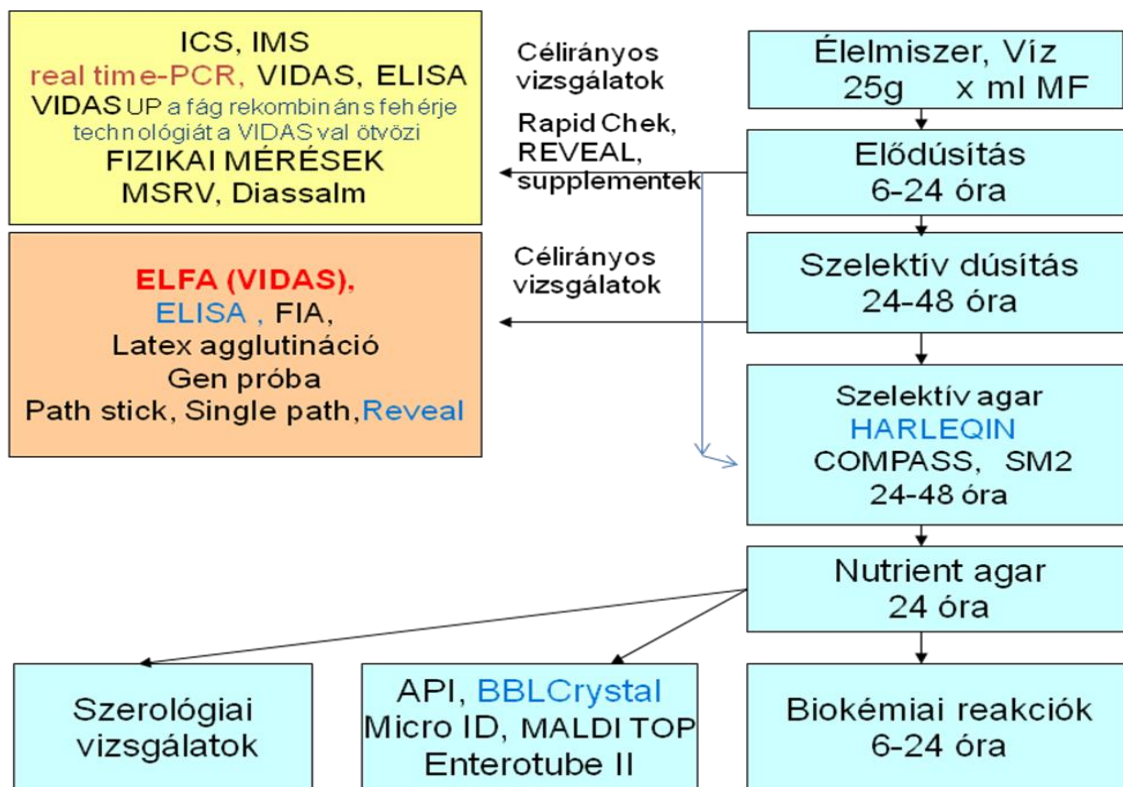
A kórokozók kimutatása élelmiszerekből ma is az egyik legfontosabb mikrobiológiai feladat. Továbbra is első helyen áll az élelmiszerek okozta kóroki tényezők között a szalmonella, ezen belül a *S. Enteritidis* abszolút túlsúlya Magyarországon is, ezért a Salmonella vizsgálatok példáján keresztül mutatom be a módszertani lehetőségeket.

A HACCP rendszerek működtetése, validálása és verifikálása, a különböző határértékeknek (10, 15, 30, sőt 60 elemi mintából való Salmonella mentesség) 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.

5.1. Kórokozó vizsgálatok időigénye

A Salmonella vizsgálatok időigényét az alábbi ábrán foglaltam össze. Jobb oldalon a klasszikus vizsgálati lépések, míg a bal oldalon az alternatív vizsgálati lehetőségek kapcsolódási lehetőségei és időigénye látható.



Joggal merül fel a kérdés, hogy a sokféle módszer között hogyan tudjuk kiválasztani a számunkra legmegfelelőbbet? Erre szeretnék választ adni az alábbiakban a jelenlét/hiány próbák esetére azt állítva, hogy ha a megadott szempontokat végig vizsgáljuk, a nagyon sok közül nem marad 2-3-nál több a listán.

5.2. A módszer választásának szempontjai

A módszerválasztások esetén az alábbi szempontokat célszerű figyelembe venni a megadott sorrendben: a vizsgálat célja, a gyártás biztonsági szintje, a mintavételi terv, validáltság (érzékenység, specifitás, pontosság), károsodott sejtek kimutatási képessége, a mátrix hatás, vizsgálati idő, automatizálás- adattárolás- adatelemzés lehetősége, szerviz és céginformációk, vizsgálati költség.

5.2.1. Vizsgálat célja

Döntő vizsgálat esetében akkreditált laboratóriumokban végzett, élelmiszerkönyvekben, rendeletekben előírt szabványos módszerek az irányadók, vagy a kereskedelmi szerződésekben rögzített módszereket kell alkalmazni.

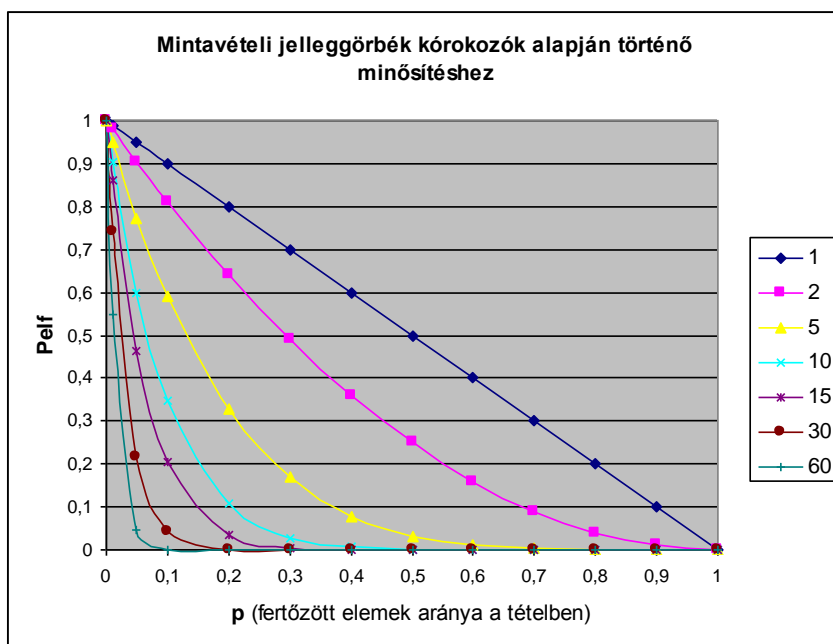
Belső ellenőrzésre, folyamatszabályozásra alkalmazhatók az ettől eltérő módszerek is, amennyiben azok validáltak.

5.2.2. Biztonsági szint

Ennek meghatározása attól függ, hogy a gyártó milyen biztonsággal akarja garantálni az adott mikrobára vonatkozó határértéket. Ez a gyártó mindenkorai stratégiájához, kockázatvállalásához igazodik. Például, ha kórokozókra vonatkozóan 95 %-os biztonsággal akarjuk a termékünket gyártani 10 mintaelemes előírás esetén, akkor 30 mintaelemes belső ellenőrzést kell végezni. Amennyiben ugyanilyen elvárás esetén 98 %-os biztonsághoz 60 mintaelem vizsgálatára van szükség.

5.2.3. mintavételi terv

A megválasztott biztonsági szint eléréséhez szükséges mintavételi terv alapján határozható meg, hogy milyen gyakorisággal hány mintát kell vizsgálni. Ez függ a gyártástechnológiától (van, vagy nincs a technológiai műveletek során jelentős mikrobacsökkentő lépés, vagy nincs) és a tételen belüli eloszlástól is. Egészem más módszert igényel 10 minta/nap mint a 100 minta /nap.



Elfogadás valószínűsége $P_{elf} = (1-p)^n$

n: mintaszám

p: fertőzött egyed

Kórokozók esetén a biztonságos tételminősítéshez (döntéshez) sok mintára van szükség ahhoz, hogy az elsőfajú hiba ne legyen túl nagy. Az ábráról jól látható, hogy 1-2 minta alapján való minősítés <10 % alatt fertőzött tételek esetén gyakorlatilag hatástalan.

5.2.4. Validálás –érzékenység, specifitás, pontosság

A kórokozók előfordulása egy tételben nem homogén, továbbá a szennyezettség mértéke is alacsony, így Salmonellából 1 sejtet is megbízhatóan kell tudni kimutatni akár 1 000 0000 kísérő egyéb mikroba közül! Ez azt jelenti, hogy a módszer szelektív is legyen, de megfelelően érzékeny, hogy a sérült sejtek et is képes legyen azonosítani. Ezeket az elvárásokat a validálási eljárások igazolják, melyek alapja az MSZ EN ISO 16140 szabvány

A jelenlét/hiány vizsgálatok jellemző paraméterei: . A validálás annak igazolása, hogy az alternatív módszer (gyors, érzékeny, egyszerű, automatizált, olcsó) összehasonlítható eredményt ad a referencia módszerrel.

Relatív pontosság: $100 (p+n) / N \%$
 Relatív specifitás: $100 n / (n+fp) \%$
 Relatív érzékenység: $100 p / (p+fn) \%$

	Referencia módszer +	Referencia módszer -
Alternatív módszer +	p	fp
Alternatív módszer -	fn	n

Kórokozók esetén az elsőfajú döntési hibára, azaz a relatív érzékenységre kell a figyelni a módszerválasztásnál. Ez az érték a lehető legnagyobb, ennek megfelelően a fals negatív eredmény a lehető legkisebb legyen.

Ahhoz, hogy ne kapjunk fals negatív eredményt, a dúsításokat úgy kell vezetni, hogy 1-5 sejt/25 g mintából nagyszámú kísérőflóra és sérült sejt esetén is elérjük az adott vizsgálati módszer kimutatási határát. A leggyakrabban alkalmazott alternatív módszerek esetén az alábbi értékeket:

Módszer	Sejt / elődúsított minta	Sejt / dúsított minta	Sejt/mérő cella
Szabványos módszer	10^{3-4} /ml	10^{4-6} /ml RVs	10^{2-3} /0,01 ml kacs
ELISA	10^{3-4} /ml	10^{7-8} /ml RVs	$5 \cdot 10^6$ /0,2 ml
VIDAS SLM	10^{3-4} /ml	10^{6-7} /ml RVs	$5 \cdot 10^6$ /0,5 ml
VIDAS ICS2 SLM	10^{3-4} /ml	10^{6-7} /ml M-leves	$5 \cdot 10^5$ /0,5 ml
RAPID CHEK RAPID SELECT	10^{5-6} /ml	-	$5 \cdot 10^5$ /0,5 ml
real time PCR	10^{2-3} /ml	-	5-10 /0,01 ml

5.2.5. Mátrix hatás

Egyes élelmiszerek összetétele befolyásolhatja a vizsgálati módszert. A kimutatást gátló tényezők megnyilvánulnak abban, hogy az előbbi táblázatban felvázolt kimutatási határt nem éri el az adott mikrobacsoport a elődúsítás-dúsítás, vagy a műszeres mérés során. Okozhatja szaporodást gátló anyag jelenléte, tápanyaghiány, nagyszámú kompetitív flóra, keresztreakció, vagy enzim inhibitorok jelenléte.

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. Az elődúsítás és a dúsítás vezetése alapvetően meghatározza a módszer érzékenységét mind az elődúsító, mind az elődúsítási időtartam megválasztásával

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 kísérő mikroflórát pedig brillantzöld oldat hozzáadásával lehet visszaszorítani.

Hagymát, fokhagymát tartalmazó termékek fitoncid hatásának neutralizálására van szükség.

Tojásfehérje inhibitor hatását okozó ovotranszferin protein vas vegyületek adagolásával csökkenthető.

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

Sok terméknel az alkalmazott tartósítási technológia (pl. hőkezelés) után szubletálisan sérült sejtek maradnak vissza. Ez esetben megfelelő időtartamú elődúsításra van szükség.

A Ferrioxamine E szerves vas vegyület elősegíti a szalmonella növekedését, nem segíti az E.coli, Proteus, Providencia baktériumok fejlődését, így szelektíve előnyhöz juttatja már az elődúsítás fázisában a szalmonellákat. A vasvegyületek alkalmazása az elődúsítóban megnöveli a szalmonellák motilitását is a félfolyékony tápközegekben.

Fág technológiák alkalmazása is segíti a szalmonellák kimutatásának gyorsítását (fág rekombináns fehérje technológia – VIDAS UP, vagy a fágokat tartalmazó elődúsító alkalmazása-RAPID CHEK).

Amennyiben az elődúsítás vezetése nem megfelelő-kimutatási határt nem éri el -fals negatív
vashiányos tápközeg tojástermékek esetén
nagyszámú kísérő mikroflóra
gátlóanyagok jelenléte

Szabványos vizsgálat ELISA, ELFA PCR esetében is.

ELISA, ELFA: immunológiai keresztreakció (fals pozitív),

- enzim inhibitorok jelenléte - fals negatív

PCR: - holt sejtek - fals pozitív

- enzim inhibitorok jelenléte - fals negatív, vagy nincs eredmény

<i>Módszer</i>	<i>Gátló tényezők elődúsítás során</i>	<i>Gátló tényezők műszeres mérés</i>
ELISA, ELFA	Szaporodás gátlás Tápanyaghiány Kompetitív flóra (kimutatási határ nem érhető el)	Keresztreakció Enzim inhibitor
PCR		DNS polimeráz enzim inhibitor Mátrix hatás
Impedancia, konduktancia		Mátrix hatás Kompetitív flóra

Kiegészítő és tisztítási műveletek (IMS, Szűrés, ICS, Dip stik, fágok) beiktatásával sok hiba kiküszöbölhető, de jelentősen megrálgítja a módszert.

Az alternatív módszerek elemzése ráirányította a figyelmet a referencia módszer hibáira is.

Napjainkban már a legtöbb kereskedelmi forgalomban lévő alternatív vizsgálati módszer nemzetközi szervezetek (AFNOR, AOAC, MICRVAL) által validált, így a legtöbb esetben a mátrix hatás is jól tanulmányozható, így megkönnyíti számunkra a választást.

5.2.6. Vizsgálati idő

Folyamatellenőrzés esetében nem lehet több néhány óránál, Nyersanyagok és a késztermék esetében a minőségmegőrzési időtartam, szállítási határidő és a raktárkapacitás függvénye. Cél, hogy speciális dúsítási eljárásokkal minél előbb érhük el a detektáláshoz szükséges sejtkoncentrációt. A Salmonella vizsgálati módszerek idődiagramja alapján a vizsgálatra szánt idő alapján lehet választani.

5.2.7. automatizálás lehetősége adattárolás, adatelemzés

A korszerű termelésirányítás megköveteli a számítógépes adatnyilvántartást, adatelemzést.

5.2.8. szerviz és céginformációk

A műszerek javításának gyorsasága, a fejlesztések, módosítások, újítások gyors bevezetése ma már alapkövetelmény.

5.2.9. 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.

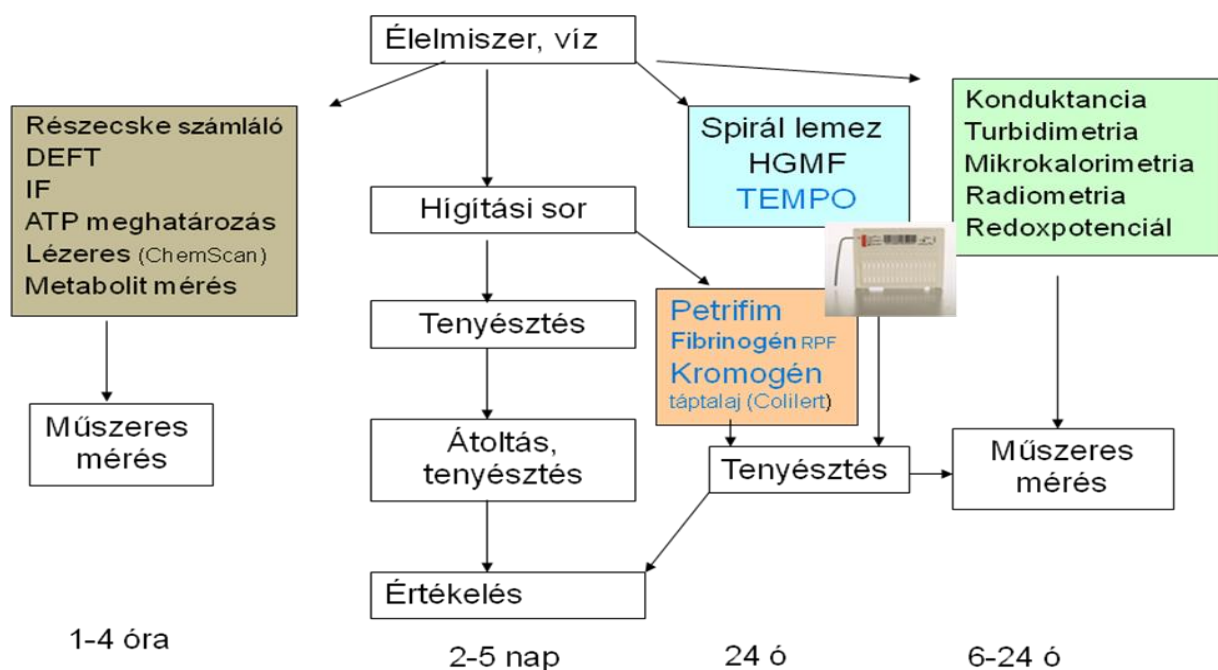
A fenti szempontok figyelembevételére után a még oly sok új mikrobiológiai módszer közül is csak egy-két módszer marad. A módszer kiválasztásban alapkövetelmény, hogy fals negatív eredmény nem fordulhat elő, és a fals pozitív eredmények százalékos aránya is lehetőleg alacsony legyen.

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

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.

6. Mikroorganizmusok számának meghatározása

A mikrobaszám meghatározására szolgáló alternatív vizsgálati módszerek száma jóval kevesebb, mint a kóros igényel, ami költségessé teszi alkalmazásukat, másrészt az egyes mikrobacsoportokra vonatkozóan (a vizsgálatok köre széles – sokféle mikroba és mikrobacsoport így az egy módszerre eső vizsgálatok száma jóval kevesebb, mint kórokozók esetén---a fejlesztés is kevesebb.



Szám meghatározás jellemző paraméterei ISO 16140:2008 szabvány szerint:

- Linearitás, relatív pontosság -Regressziós eljárással való becslés
- Kritikus szint
- Detektálási limit
- Meghatározási limit
- Ismételhetség (két mérési eredmény között megengedett eltérés azonos laboratóriumban, azonos mintából mérve)
- Összehasonlíthatóság (két labor mérési eredménye között megengedhető eltérés, ugyanabból a homogén mintából mérve)

7. Mikrobiológiai vizsgálati módszerek fejlődése Magyarországon

A MÉTE Mikrobiológiai Szakosztálya 50 éve alatt jelentős fejlődésen mentek át a mikrobiológiai vizsgálatok.

A hazai élelmiszer-mikrobiológiai módszertani fejlődés szorosan együtt haladt a nemzetközi fórumokon megjelenő tendenciákkal. A MÉTE Mikrobiológiai Biotechnológiai és Higiénia Szakosztálya segítette az aktuális folyamatokat. Iparági mikrobiológiai rendezvények, szakmai konzultációk, határérték-rendelet kidolgozásában való részvétel (szakmai érdekképviselő), fiatal szakemberek támogatása, az új módszerek ismertetése, bemutatók szervezése itthon és külföldön.

A folyamat a 60-as években az iparági gyakorlatban módszerkiválasztás a gyártásközi és késztermék vizsgálatok végzésére vel kezdődött.

A 70-es 80-as években módszeregységesítés, szabványosítás, határértékek kidolgozása, matematikai statisztikai módszerek alkalmazása (termékek mikrobiológiai állapotának felmérése és eloszlásvizsgálatok, körvizsgálatok szervezése, értékelése)

A 90-es években az alternatív módszerek útkeresése

Az ezredfordulón az alternatív módszerek széles körének megjelenése

Majd az utóbbi időben a hagyományos és az alternatív módszerek harmonizálása, a módszerek teljesítményértékelése

Módszerfejlesztés

Nemzetközi kereskedelem hatására egységesítés 1970-1990
szakképzések

Patogén és higiéniai indikátor mikrobák

- ISO
- ICMSF
- ICUMSA
- ICC
-

Szabványosítás (tenyésztéses)

1. Élelmezésegészségügyi rendelet

Tételminősítő rendszerek
összehasonlítása

Romlást okozó mikrobák

Nemzeti keretek között (ipar, ellenőrzés,
egyetem) szakmai kapcsolatok

- módszerösszehasonlító vizsgálatok (táptalaj
összetétel, alapsuszpenzió készítés, leoltási mód,
tenyésztési körülm.)

- matematikai statisztikai értékelés
(ismételhetőség, összehasonlíthatóság
meghatározása)

- szabványosításra való előkészítés
(döntő vizsgálati módszer)

- harmonizáció az ellenőrzésben
iparban
oktatásban

- országos szintfelmérő vizsgálatok
Iparági és ipari laboratóriumok fénykora
(fázisvizsgálatok, ok-okozat elemzések)



Módszerfejlesztés

Ellenőrzés összevonása, HACCP-gyors módszerek 1980-1990

HACCP kiépítés

Kritikus pontok meghatározása

Technológia méretezések

Fázisvizsgálatok

Team munka

Szaktudás, szakképzés

Gyors módszerek (útkeresés)

(Kórokozókra és romlást okozókra egyaránt)

1. Gyors mikrobiológiai tanfolyam 1988

Preventív ipari mikrobiológiai ellenőrzési
módszerek (pl. cukoripar, konzervipar)

Direkt sejtszámlálás—élesztőgomba-
almasűrítmény

ELISA-Salmonella, mikotoxinok, enterotoxin

- Validálás, verifikálás a kórokozókra és
a romlást okozókra is.

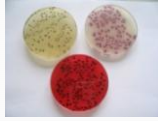
KÖRVIZSGÁLATOK - módszertani
Varianciaanalízis mellett regresszió

Módszerfejlesztés

HACCP-gyors módszerek - akkreditálás 1990-2000 –magánlaboratóriumok megjelenése

HACCP (kiterjesztése és szűkítése) csak kórokozókra

- Fizikai
- Kémiai
- Kórokozók
- Molekuláris biológiai



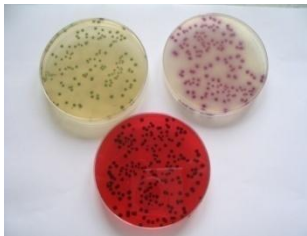
Gyors módszerek (kórokozókra)

ELISA, ELFA Listeria, E.coli O157
MALTHUS, RABIT, BacTrac
Kromogén szubsztrátos táptalajok
Biolumineszcencia
Identifikáló rendszerek

Kórokozók vizsgálati módszereinek fejlesztése

Privatizáció
Iparági laboratóriumok hanyatlása és megszűnése

KÖRVIZSGÁLATOK- laborellenőrző
Ismert folyóiratban való megjelenés elég az akkreditációhoz



Módszerfejlesztés

gyors módszerek – validálás – szabványos vizsgálati módszerek 2000-2012

Validálás – egységesítés-2073/EU

KÖRVIZSGÁLATOK- laborellenőrző
Az akkreditációhoz szabványos, vagy validált vizsgálati módszer szükséges

Visszavezethetőség

Túlzott egységesítés

mátrix hatás (új előkészítési szabványok 5 db)

mikroökológiai környezet

Laboratóriumi követelmények

túlzott adminisztráció

ISO 7218:2008...oldal (ált.irányelvek)

EA 4/10 NAT

ISO 17025

ISO 6887 sorozat

Gyors módszerek gyakorlati alkalmazása (kórokozókra)

VIDAS, TEMPO, PCR, ELISA,
veztőképesség mérésen alapuló,
kromogén táptalajok

Identifikálás – molekuláris mikrobiológia
(pl. Riboprinter)

PremiTest Salmonella
szerotípus



Kórokozókra több, mint 100 féle módszer

Kevésbé praktikusak és nem validálhatók már
kiestek

Kórokozók egy lépésben 24 ó alatt!!



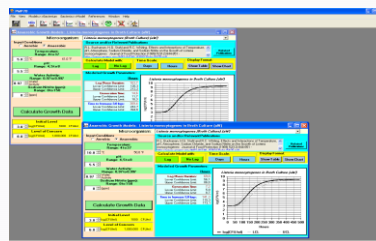
Mikrobiológiai vizsgálatok a HACCP programokban

FOLYAMAT ELLENŐRZÉS

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

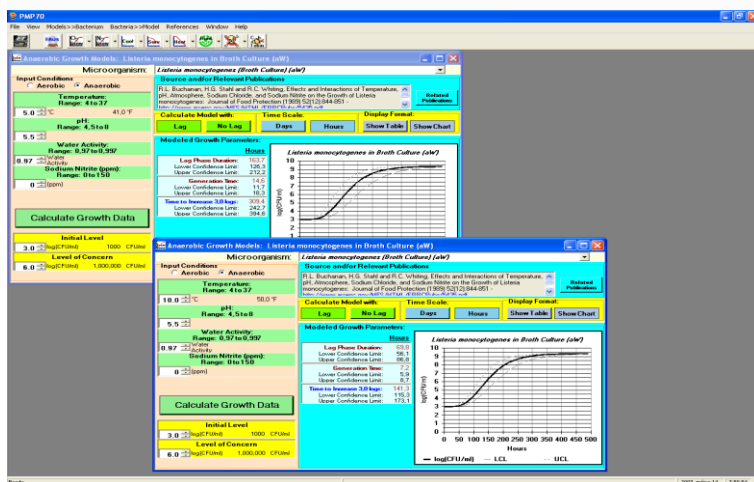
KOCKÁZATBECSLÉS

alap-, adalék-, segédanyag vizsgálat
eloszlásvizsgálat, mintavételi terv
prediktív modellezés
technológiai műveletek méretezése
környezet vizsgálatok
challenge test
HACCP verifikálás (késztermék vizsgálat)



Megfelelő biztonságu becsles

—————> nagyszamu vizsgalat



Mikrobiológiai vizsgálatok a HACCP programokban

Folyamatellenőrzés során főleg fizikai indikátorok ($^{\circ}\text{C}$, idő, pH, a_w) 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)

Igény

Gyorsabban, könnyebben, jobban

- Érzékenység 100 %
- Specifitás 100 %
- Nem destruktív
- Flexibilis
- „gombostű a széna kazalban”
- Detektálás+identifikálás
- Teljesen automatizált
- Gyors
- Multifunkcionális (Salmonella, Listeria..)
- Költség: o (eszköz, anyag, személy, labor, hulladék)
- Hatóság és a partner által elfogadott

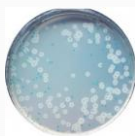
Valóság

- Drágább
- Speciális ismereteket igényel
- Validálási kötelezettség
- Műszerigény
- Mátrix hatás elemzés szükséges
- Megerősítő vizsgálat szükségessége pozitív esetben
- Paradigmaváltás szükségessége

KÖVETKEZTETÉSEK

24 órán belül kiadható

Salmonella,
L. monocytogenes,
E.coli o157,
Campylobacter,
Staph. enterotoxin,
E.coli szám,
Mikrobaszám,
Koag. pozitív Staphylococcus szám,
E.coli szám
Enterobacteriaceae eredmény
 eleget téve az új EU direktíva előírásainak.



- Összefoglaló értékelés
- 24 ó alatt kiadható a patogének negatív eredménye
- Rávilágított a vizsgálat a klasszikus módszer hibáira ill. az elődúsítás megfelelő átgondolására
- A patogén vizsgálat nem egy standard módszer automatikus alkalmazása, hanem a mátrix tulajdonságait is figyelembevevő optimális elődúsítás kiválasztását is jelenti
- A kockázatbecslésekhez szükséges nagyszámú adat nyeréséhez elengedhetetlenek a gyors vizsgálatok
- Biztonságos mintavételi tervek kiszolgálása már elképzelhetetlen gyors módszerek nélkül

LELTÁR

Módszerfejlesztés beérett (mikrobiológiai alapokon műszeres analitika)

A módszer egységesítés „túl jól is” sikerült

A módszertani körvizsgálatok a validálási protokoll részei

A romlást okozók ma sok gondot okoznak (*A baktériumok is szeretik az élelmiszereinket*),

A direkt módszerek nem fejlődtek

Megszűntek az iparági laboratóriumok, de

Alakultak magánlaboratóriumok

A MÉTE Mikrobiológiai Szakosztálya működik

Tudományos igényű határérték rendelet helyett EU rendelet (sok szakmai hibával, visszafejlődés)

A mikrobiológia szerepének hangsúlyozása, jelentőségének elismertetése az élelmiszeripar érdekében

Romlást okozók vizsgálatainak iparági egységesítése nem fejeződött be

Koordináció ipar, ellenőrzés, kutatás, oktatás között hiányzik

RENGETEG EREDMÉNY KIHASZNÁLATLANUL

MÉTE SZELLEMISSÉG---ÉLELMISZER MIKROBIOLÓGIAI KORSZRÚ VIZSGÁLATOK a vizeseket és a gyógyszereseket messze megelőzi