

Élelmiszerekben és takarmányokban előforduló patogén mikroorganizmusok kimutatási módszereivel szembeni követelmények

Tabajdiné Pintér Vera

FoodMicro Kft.

1047 Budapest Fóti út 56.

T/F: 303 16 13

www.foodmicro.hu

ÉLELMISZERMIKROBIOLÓGIAI SZEMINÁRIUM

2010. április 15.

- Egészségre ártalmatlan
 - Jó minőség (érzékszervi tulajdonság, beltartalom)
 - Gazdaságosan előállítható
-
- Késztermék vizsgálat már túl késő
Preventív, technológiába beépülő szabályozási rendszer
Élelmiszeripar (2002)
Vízi közművek (ivóvíz, egyedi vízellátás, vízkezelés, vizes technológiák)
- WTO - EU szabályozás
nemzeti szabályozás helyett
- Tömeges termelés, iparszerű állattenyésztés és növénytermesztés, központi vízellátás
 - Nemzetközi kereskedelem, túrizmus (mikrobaforgalom)
 - Új táplálkozási szokások (új tartósítási technológiák) egészséges
 - 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

Szabályozás 2073/2005/EK és 4/1998 EüM (határértékek módszerek)

Élelmiszerbiztonság – technológiai higiéniai kritériumok

Mikroökológiai szemlélet

Minden kritériumhoz referencia módszer tartozik

Alternatív (validált) módszerek alkalmazási lehetősége

Alternatív indikátor mikroorganizmusok alkalmazási
lehetősége (csak technológiai higiéniai paraméterekre)

Trendanalízis szükségessége

Fázisvizsgálatok szükségessége patogénekre vonatkozóan

Minőségmegőrzési idő validálás *L.monocytogenes*-re
vonatkozóan (prediktív mikrobiológiai modellek,
challenge teszt, kockázatbecslés, kockázatelemzés)

Hatósági vizsgálatokra vonatkozó szabályozás

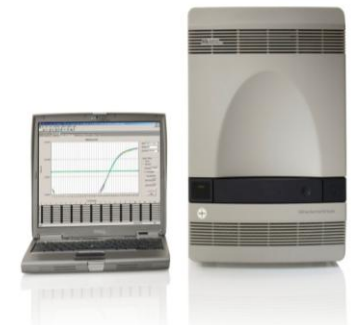
Módszer követelmények: EU szabványos vagy validált és akkreditált vonatkozó rendeletek alapján

Vállalkozói, vállalati laboratóriumokra vonatkozó előírás

Akkreditáltság nem kötelező, de a piac elvárja
Élelmiszerlánc törvény értelmében engedélyeztetni kell
Speciális export feltételeknek megfelelő módszerek, de validált egyes alternatív módszerek is elfogadottak (USA, Svéd)

Szabványos (referencia) **?** Alternatív-gyors?

Előnyök? Hátrányok?



- Gyors vagy gyorsított
- Egyszerű
- Munka és anyagtakarékos
- Validált
- 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
- Nanotechnológia

Jelenlét/hiány

Szám meghatározás

Identifikálás

Igény

Gyorsabban, könnyebben, jobban

- Érzékenység 100 %
 - Specifitás 100 %
 - Nem destruktív
 - Flexibilis
- „gombostű a széna kazalban”
 - Detektálás+identifikálás
 - Teljesen automatizált
 - Gyors
- Multifunkcionális (Salmonella, Listeria..)
- Költség: 0 (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

Mikrobiológiai gyors módszerek iránti igény

- Tudatos módszerfejlesztés
- Kockázatbecslés és kommunikáció

pl. összehangolt monitoring program *L.monocytogenes* előfordulási gyakoriságára RTE élelmiszerekben 2010/75/EU

- Rendkívüli helyzet, botrány

globális – bárhol mérik, akárhol robban

- megbetegítés-----bioterrorizmus

hazai –nagy romlás, vagy tömeges megbetegedés

- média botrány

- konkurenciának is van (divat)

Mikrobiológiai gyors módszerek iránti igény

• Mit?

Salmonella, Listeria monocytogenes, E.coli O157,
Campylobacter....

• Miből?

Nyersanyag - nagy a_w (hús, tej, baromfi) –
virulens, de sok kísérő flóra
- alacsony a_w (édesség, gabona...)

túlélő

Kivel?

Saját labor

• Mivel?

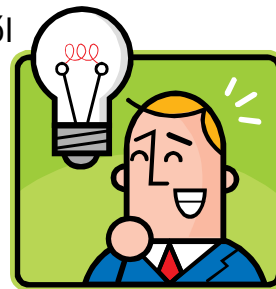
Több, mint 60 AOAC vizsgálati módszer csak
Salmonellára (nehéz a választás)

• Hogyan?

Csak a minimális kötelezőt
Minőségbiztosítási szemlélet adott keretből

• Vizsgálat iránya?

Jelenlét/hiány



Mit?

mikroökológiai ismeretek

Miből?

Feldolgozott termék
- sérült, stresszelt sejtek
- holt sejtek

Kivel?

Külső **akkreditált** labor

Mivel?

Műszeres, egyszerű - képzettség, ismeret

Hogyan?

TQM szemlélet (vállalati érdek-pl. raktárkapacitás)

Tudatos mikroökológiai higiéniai alapon

Vizsgálat iránya?

szám meghatározás

Mikrobaszaporodás detektálása

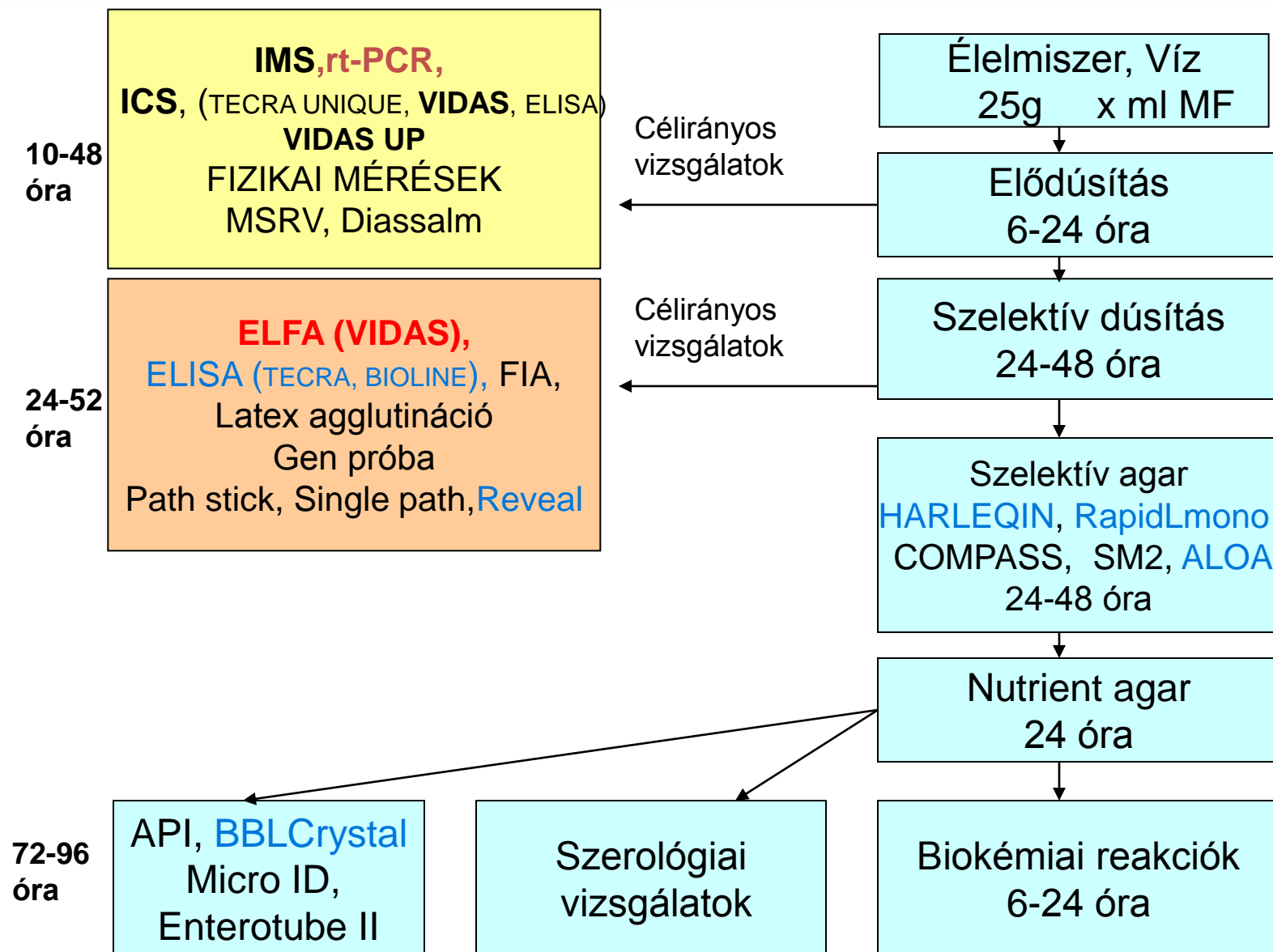
- Impedancia, konduktancia mérés (Malthus, Rabbit, BacTrac)
- Turbidimetria (Bioscreen)
- Mikrokolorimetria (DSC)
- Radiometriás módszerek
- Redoxpotenciál mérés

Immunológiai módszerek

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

Molekuláris biológia (PCR)***Korszerű diagnosztikai eljárások*** ***Sejtkoncentráció***

- Immunológiai módszerek (Path stick, Single path, Reveal)
- Molekuláris diagnosztika (PCR)
- Kromogén táptalajok
- Biokémiai módszerek (Identifikáló kiték: API, BBL Crystal, VITEK)
- Szűrés
- IMS
- Immuncapture system ICS
- PCR



A vizsgálat célja

A gyártás biztonsági szintje

Mintavételi terv

Validálás –érzékenység, specifitás, pontosság

Mátrix hatás

Vizsgálati idő

Automatizálás, adattárolás, adatelemzés

Szerviz és céginformációk

Vizsgálati költség

- **a vizsgálat célja**

Döntő vizsgálat

Belső ellenőrzésre, folyamatszabályozásra.

- **biztonsági szint**

A gyártó milyen biztonsággal akarja garantálni az adott mikrobára vonatkozó határértéket.

Ez a gyártó stratégiájához, kockázatvállalásához igazodik. Pl. tételenként 10 mintaelem 60 %-os, 60 mintaelem 90 %-os biztonságot jelent a jelenlét hiány próbáknál.

a. FDA I. 60*25 g (4*375g) minta negatív eredménye azt jelenti, hogy 95%-os biztonsággal a tételből kivett 20*25 g minta eredménye negatív, 98%-os biztonsággal a tételből kivett 10*25 g minta eredménye negatív

b. FDA II. szerint 30*25 g (2*375g) minta negatív eredménye azt jelenti, hogy 95%-os biztonsággal a tételből kivett 10*25 g minta eredménye negatív

c. ICMSF 10*25 g (250g) minta negatív eredménye azt jelenti, hogy a szokásos tételminősítés eredménye megfelelő

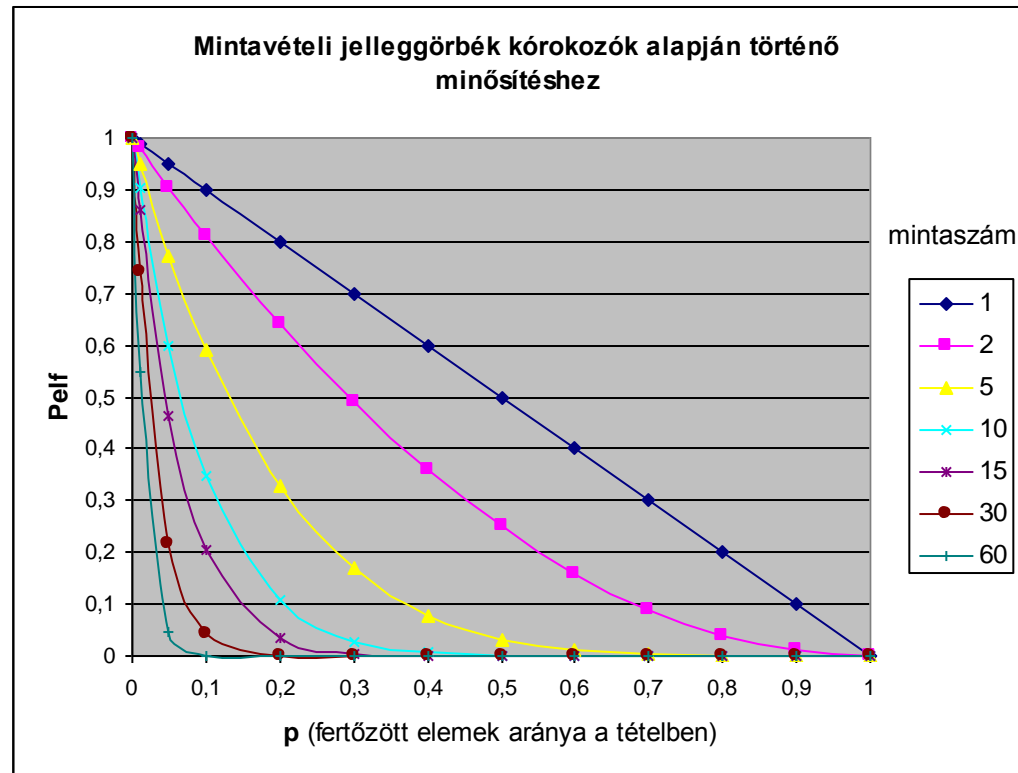
- **mintavételi terv**

A megválasztott biztonsági szint eléréséhez szükséges mintavételi terv alapján határozható meg, hogy milyen gyakorisággal hány mintát kell vizsgálni. Ez függ a tételen belüli eloszlástól is. Egészem más módszert igényel 10 minta/nap vagy 100 minta /nap.

$$P_{\text{elf}} = (1-p)^n$$

n : mintaszám

p : fertőzött egyed



Biztonságos döntéshez sok minta — kis mintaszám esetén másodfajú hiba lehetősége nagy
1-2 minta alapján való minősítés 10 % alatt fertőzött tételek esetén gyakorlatilag hatástalan.

Kórokozók esetén (0 tolerancia)

Mintaelem: 10 (250g),	15 (375g),	30 (750 g),	60 (1500 g)
95% bizt.: 80 g	125 g	250 g	500g

pl. 30 elemi minta (750 g) negativitása esetén 95 %-os biztonsággal csak azt állíthatjuk, hogy a tételből kivett minta (250 g) eredménye negatív lesz.

= ha 95%-os biztonsággal akarjuk gyártani termékünket 10 mintaelemes vizsgálatra, akkor 30 mintaelemes belső ellenőrzést kell végezni.

A vizsgálat célja

A gyártás biztonsági szintje

Mintavételi terv

Validálás –érzékenység, specifitás, pontosság

Mátrix hatás

Vizsgálati idő

Automatizálás, adattárolás, adatelemzés

Szerviz és céginformációk

Vizsgálati költség

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

- **validálás**

AOAC, AFNOR, EU MICROVAL stb.).

érzékenység

Lehetőség szerint alacsony legyen a kimutatási határa a módszernek. (Minél rövidebb ideig tartó dúsítással legyen elérhető.)

specifitás

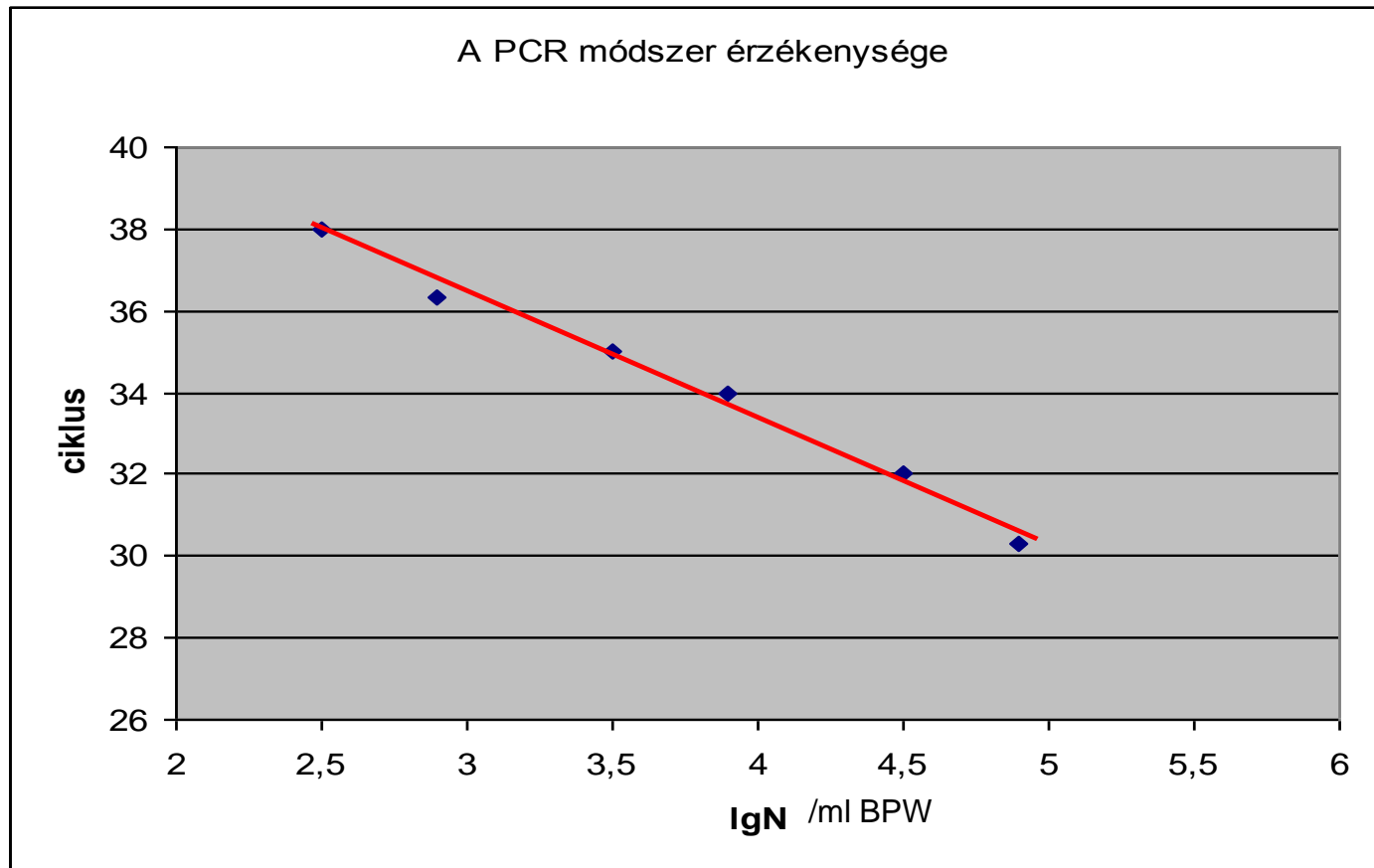
A kimutatandó kórokozó szelektív kimutatására legyen lehetőség,

pontosság

A fals pozitív és fals negatív eredmények aránya a lehető legalacsonyabb legyen, de főleg a fals negatív eredményeké.

- Érzékenységi adatok (1-5 sejt/25 g esetén)

Módszer	Sejt / dúsított minta	Sejt/mérő cella
ELISA	$10^7/\text{ml}$	$5 \cdot 10^6/0,2 \text{ ml}$
ELFA (VIDAS)	$10^6/\text{ml}$	$5 \cdot 10^5/0,5 \text{ ml}$
PCR	$10^{2-3}/\text{ml}$	5-10 /0,01 ml



1-5 sejt/12 μ l PCR ____ 10-50 sejt/ml BPW ____ 1---10⁴ dúsulás a BPW-ben

A vizsgálat célja

A gyártás biztonsági szintje

Mintavételi terv

Validálás –érzékenység, specifitás, pontosság

Mátrix hatás

Vizsgálati idő

Automatizálás, adattárolás, adatelemzés

Szerviz és céginformációk

Vizsgálati költség

• Élelmiszer összetétele

Kimutatást gátló tényezők

Módszer	Gátló tényezők elődúsítás	Gátló tényezők műszeres mérés
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

- Az elődúsítás célja a sérült sejtek reszuszitációja, ami döntően függ az elődúsító összetételétől és a vizsgálandó élelmiszer-től.
- **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** inhibítor hatása annak köszönhető, hogy ovotranszferin protein tartalma leköti a Salmonella növekedéséhez szükséges vasat. Vas vegyületek adagolása az elődúsítóhoz az inhibítor 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.
- **Tartósított termékek** (pl. hőkezelés) szubletálisan sérült sejteket tartalmazna, ezek csak megfelelő elődúsítás után tenyészthetők.
- Salmonella sejtek repair kapacitását növelik, **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.
- Ferrioxamine E 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.

- **Előkészített húsok**
Fűszerezés, felületi kezelés hatása
- **Csokoládé , kakaópor,** kakaó inhibíciója
- **Fűszerek** részleges vagy teljes inhibíció Sötét színű gyümölcsök (pl. szeder, narancs)
- **Pisztácia**

A vizsgálat célja

A gyártás biztonsági szintje

Mintavételi terv

Validálás –érzékenység, specifitás, pontosság

Mátrix hatás

Vizsgálati idő

Automatizálás, adattárolás, adatelemzés

Szerviz és céginformációk

Vizsgálati költség

- **vizsgálati idő**

Folyamatellenőrzés esetében nem lehet több néhány óránál, nyersanyagok és a késztermék esetében a minőségmegőrzési időtartam, szállítási határidő és a raktárkapacitás függvénye.

- **automatizálás lehetősége adattárolás, adatelemzés**

A korszerű termelésirányítás megköveteli a számítógépes adatnyilvántartást, adatelemzést.

- **szervíz és céginformációk**

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

- **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

Összefoglaló értékelés

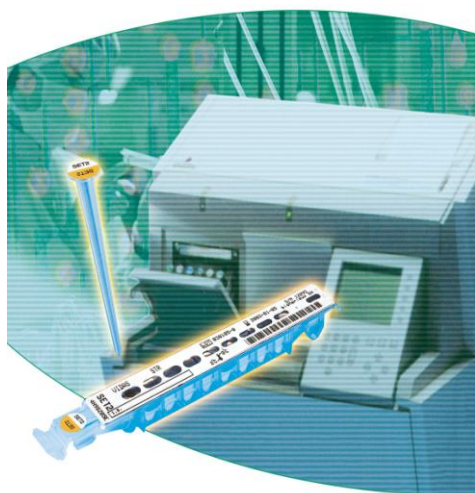
- Ma már néhány óra alatt kiadható a patogének negatív eredménye
- A megfelelő módszer kiválasztása széleskörű elemzés alapján lehet optimális
- A kockázatbecslésekhez szükséges nagyszámú adat nyeréséhez elengedhetetlenek a gyors vizsgálatok
- Az elődúsítás megfelelő vezetése mátrixonként és módszerenként más és más lehet
- Biztonságos mintavételi tervek kiszolgálása már elképzelhetetlen gyors módszerek nélkül
- A PCR a többi gyors módszertől eltérően lehetőséget nyújt a nyersanyag utólagos higiéniai minősítésére is

Patogén vizsgálatok Real Time PCR



BAX Q7

Telepszámlálás TEMPO



**Köszönöm
megtisztelő
figyelmüket!**



Köszönöm megtisztelő
figyelmüket!

