

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék

PATOGÉN MIKROORGANIZMUSOK KIMUTATÁSÁRA SZOLGÁLÓ GYORS
MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Rohonczy Kata

Doktori értekezés

Budapest

2014

A doktori iskola

megnevezése: Élelmiszertudományi Doktori Iskola

tudományága: Élelmiszertudományok

vezetője: Dr. Felföldi József, PhD

Egyetemi tanár

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Élelmiszertudományi Kar,

Fizika- Automatika Tanszék

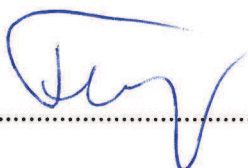
Témavezető: Mohácsiné Dr. Farkas Csilla, PhD

Egyetemi tanár

BUDAPESTI CORVINUS EGYETEM, Élelmiszertudományi Kar,

Mikrobiológiai és Biotechnológia Tanszék

A jelölt a Budapesti Corvinus Egyetem Doktori Szabályzatában előírt valamennyi feltételnek eleget tett, az értekezés műhelyvitájában elhangzott észrevételeket és javaslatokat az értekezés átdolgozásakor figyelembe vette, azért az értekezés nyilvános vitára bocsátható.



Az iskolavezető jóváhagyása



A témavezető jóváhagyása

A Budapesti Corvinus Egyetem Élettudományi Területi Doktori Tanácsának 2013. október 1 -i határozatában a nyilvános vita lefolytatására az alábbi bíráló Bizottságot jelölte ki:

BÍRÁLÓ BIZOTTSÁG:

Elnöke

Biacs Péter, DSc

Tagjai

Hoschke Ágoston, CSc

Beczner Judit, CSc

Dlauchy Dénes, PhD

Reichart Olivér, PhD

Opponensek

Belák Ágnes, PhD

Ágoston Réka, PhD

Titkár

Kiskó Gabriella, PhD

*“Tanulj a tegnaptól,
élj a mánnak és reménykedj a holnapban.
A legfontosabb azonban, hogy ne hagyd abba a kérdezést.”*

(Albert Einstein)

TARTALOMJEGYZÉK

TARTALOMJEGYZÉK

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

1. BEVEZETÉS	8
2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	10
2.1. Az élelmiszerbiztonság helyzete napjainkban.....	10
2.2. Zoonotikus megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon.....	13
2.2.1. <i>Salmonella</i> okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon	13
2.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon	14
2.2.3. Verotoxint termelő <i>E. coli</i> okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon	15
2.2.4. Termotróf <i>Campylobacter</i> okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon	17
2.3. Az élelmiszerbiztonsági szempontból fontos baktérium fajok jellemzése.....	18
2.3.1. <i>Salmonella</i> nemzetség előfordulása és jellemzői	18
2.3.2. <i>Listeria monocytogenes</i> előfordulása és jellemzői	19
2.3.3. Verotoxint termelő <i>E. coli</i> O157:H7 előfordulása és jellemzői	20
2.3.4. <i>Campylobacter</i> spp. előfordulása és jellemzői	22
2.4. Patogének kimutatására szolgáló hagyományos mikrobiológiai módszerek	23
2.4.1. <i>Salmonella</i> spp. hagyományos kimutatási módszerei	25
2.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i> hagyományos kimutatási módszerei	25
2.4.3. <i>Escherichia coli</i> O157 hagyományos kimutatási módszerei.....	26
2.4.4. <i>Campylobacter</i> fajok hagyományos kimutatási módszerei.....	27
2.5. Miniaturizált biokémiai tesztek	28
2.5.1. BBL CRYSTAL	28
2.5.2. API teszt	28
2.6. Patogének kimutatására szolgáló alternatív mikrobiológiai módszerek	29
2.6.1. Korszerű új differenciáló táptalajok	29
2.6.2. Immunológiai módszerek	34
2.6.3. Molekuláris biológiai módszerek	38
3. CÉLKITŰZÉSEK	42
4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	44
4.1. Hagományos tenyésztési eljárások.....	44
4.1.1. <i>Salmonella</i> vizsgálat tenyésztési módszerrel	44
4.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> vizsgálat tenyésztési módszerrel	46
4.1.3. <i>E. coli</i> O157 kimutatása tenyésztési módszerrel.....	47
4.1.4. <i>Campylobacter</i> nemzetség kimutatása tenyésztési módszerrel.....	48
4.2. Patogén mikroorganizmusok kimutatására alkalmazott kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok	49

4.2.1. <i>Salmonella</i> nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalajok	49
4.2.2. <i>L. monocytogenes</i> vizsgálatára használt kromogén táptalajok	50
4.2.3. <i>Campylobacter</i> nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalaj.....	50
4.3. Immunológiai módszerek patogén mikroorganizmusok kimutatására.....	50
4.3.1. <i>Salmonella</i> nemzetség kimutatására alkalmas immunológiai eljárások	50
4.3.2. <i>L. monocytogenes</i> kimutatására alkalmas immunológiai eljárás	52
4.3.3. <i>E. coli</i> O157 kimutatására alkalmas immunológiai eljárás	53
4.4. Kórokozók kimutatására alkalmazott molekuláris vizsgálati módszerek	54
4.4.1. Real - time PCR vizsgálat menete.....	54
4.5. Kórokozók kimutatására alkalmazott miniatürizált biokémiai azonosító rendszer.....	57
4.6. Kórokozók kimutatására alkalmazott szerológiai azonosító vizsgálatok	58
4.7. Statisztikai módszerek.....	58
4.8. Mesterséges fertőzéshez használt baktériumtörzsek	59
4.9. Vizsgálati tervek.....	60
4.9.1. <i>Salmonella</i> vizsgálati terv	60
4.9.2. <i>Listeria monocytogenes</i> vizsgálati terv	62
4.9.3. <i>E.coli</i> O157 vizsgálati terv	63
4.9.4. <i>Campylobacter</i> vizsgálati terv.....	64
5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK	65
5.1. Korszerű új differenciáló táptalajok vizsgálati eredményei	65
5.1.1. <i>Salmonella</i> spp. vizsgálata kromogén szubsztrátot tartalmazó agaron	65
5.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> jelenlétének kimutatása kromogén szubsztrátos táptalajon	69
5.2. Patogének kimutatására alkalmas immunológiai módszerekkel végzett vizsgálati eredmények	74
5.2.1. <i>Salmonella</i> vizsgálata VIDAS SLM és VIDAS ICS2+SLM módszerrel	74
5.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> vizsgálata VIDAS LMO2 módszerrel	77
5.2.3. <i>E.coli</i> O157:H7 vizsgálata VIDAS UP módszerrel	80
5.3. Patogének kimutatására alkalmas valós idejű PCR módszerekkel végzett vizsgálati eredmények	82
5.3.1. A kimutatási határ meghatározása TaqMan PCR módszerrel.....	82
5.3.2. <i>Salmonella</i> spp. vizsgálata real-time PCR módszerrel élelmiszer és takarmány mintákból.....	84
5.3.3. <i>E.coli</i> O157:H7 előfordulásának feltérképezése üzemi környezetben.....	86
5.4. Mátrix hatás elemzés.....	87
5.4.1. Élelmiszerek és takarmányok mátrix hatása patogének kimutatására kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajoknál	87
5.4.2. Élelmiszer és takarmány mátrixok hatása patogének kimutatására VIDAS vizsgálatoknál.....	89
5.4.3. Élelmiszerek és takarmányok mátrix hatása patogének kimutatására real –time PCR vizsgálatoknál	90
5.5. Dúsítások vezetésének optimalizálása.....	93
5.5.1. <i>Campylobacter</i> vizsgálatok eredményei	94

5.6. Vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra.....	100
6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK	102
6.1. Kórokozók vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal.....	102
6.1.1. <i>Salmonella</i> vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal.....	102
6.1.2. <i>Listeria monocytogenes</i> vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal.....	102
6.1.3. <i>E.coli</i> O157 vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajjal	103
6.2. Kórokozók vizsgálata immunológiai módszerekkel	103
6.2.1. <i>Salmonella</i> vizsgálata VIDAS módszerrel	103
6.2.2. <i>Listeria monocytogenes</i> vizsgálata VIDAS LMO2 módszerrel	104
6.2.3. <i>E.coli</i> O157 vizsgálata VIDAS UP módszerrel	104
6.3. Kórokozók vizsgálata molekuláris módszerekkel	104
6.3.1. <i>Salmonella</i> vizsgálata real-time PCR módszerrel	104
6.3.2. <i>E. coli</i> O157 real-time PCR.....	105
6.4. A három különböző elven működő eljárás összehasonlítása	106
6.5. Az élelmiszermatrix hatásának elemzése a különböző vizsgálati módszerekre.....	107
6.6. Dúsítások vezetésének optimalizálása.....	109
6.7. Vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra.....	109
7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK	110
8. ÖSSZEFOGLALÁS	112
9. SUMMARY	116
10. MELLÉKLET	119
10.1. IRODALOMJEGYZEK	119
10.2. MELLÉKLET	135
KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	141

10. MELLÉKLET

10.1. IRODALOMJEGYZEK

Abdulraouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1999–2006.

Acheson, D., Allos, B. M. (2001) *Campylobacter jejuni* Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases* 32 (8): 1201-1206. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/319760>

Anon, (2006) Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157: H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, *The Journal of the American Medical Association* 296: 2195–2196. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.296.18.2195>

Arguedas-Villa, C., Stephan, R., Tasara, T. (2010) Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiology* 27(5): 653–660. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.009>

Aznar, R., Solis, I. (2006) PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1(2): 115-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-006-0019-0>

Bacon, R.T., Ransom, J.R., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K. E., Smith, G. C. (2003) Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 4123-4128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.7.4123-4128.2003>

Bailey, J.S., Cosby, D.E. (2003) Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. *Journal of Food Protection* 66:2138–2140.

Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G. D. W., Holzapfel, W. H. (2006) Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology* 109(25): 127–131. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.030>

Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (2002) Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry* 48(8):1178-1185.

Bickley, J. et al. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22:153–158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb01131.x>

BioMerieux Vidas Instrument User's Manual Fiches Protocoles VIDAS® Pathogènes Ref : 99762 Version B 12/2005.

Borucki, M. K., Reynolds, J., Gay, C. C., McElwain, K. L., Kim, S. H., Knowles, D. P. Hu, J. (2004) Dairy Farm Reservoir of *Listeria monocytogenes* Sporadic and Epidemic Strains *Journal of Food Protection* 11: 2368-2626.

Boyd, B., Lingwood, C. (1989) Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 51: 207-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000185286>

Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F. (1973) Related vibrio in stools. *Journal of Pediatrics* 82: 493-495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80131-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80131-3)

Butzler, J. P., J. Oosterom. (1991) *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12: 1-8. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90043-o](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90043-o)

Centers for Disease Control and Prevention. (1993) Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42: 258-263.

Cheung, P.-Y., Kwok, K.K., Kam, K.M. (2007) Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test, and a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. *Journal of Applied Microbiology* 103: 219–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03210.x>

Corry, J.E.L. and Atabay, H.I. (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 90: 96–114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x>

Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J. (1972) Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 125: 390-392. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/125.4.390>

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 406–410. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00658.x>

Denny, J., Bhat, M., Eckmann, K. (2008) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease* 5:321-328.

Dezső, P., Nagy, J. (2005) A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények* 111(4): 153-158.

Dijk, S.V. Bruins, M.J.Gijs J.H. and Ruijs, M. (2009) Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* 47(2): 456-458.

EFSA (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection – Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2006, *EFSA Journal*, 100: 1-86.

EFSA (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 *EFSA Journal*, 9(3):2090-2468.

EFSA (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597-3039.

EFSA (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4):3129-3379.

Élelmiszerbiztonsági Szemelvények (2012) 6/2012.

(http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/eki/kozerdeku_anyagok)

Elizaquivel, P., Aznar, R. (2008) Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection* 71: 2110–2114.

Eriksson, E., Aspan, A., (2007) Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3: 21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-3-21>

Ethelberg, S., Sorensen, G., Kristensen, B., Christensen, K., Krusell, L., Hempel-Jorgensen, A., Perge, A., Nielsen, E. M. (2007) Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiology and Infection* 135(6): 900-907. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268807008047>

Faber, J. M., Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiological Reviews* 55(3): 476–511.

FAO/WHO. 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in Chicken Meat: Meeting Report, MRA Series 19.

Focke, F., Haase, I., Fischer, M. (2011) DNA-Based Identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 513–520. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf103702s>

Frye, D. M., Zweig, R., Sturgeon, J., , Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L., Mascola, L. (2002) An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria*. *Clinical Infectious Diseases* 35 (8):943-949.

Greig, J. D., Todd, E. C., Bartleson, C. A., Michaels, B. S. (2007). Outbreaks where food

workers have been implicated in spread of foodborne disease, part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection* 70:1752-1761.

Griffin, P.M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 739–761. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL.(ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y.

Habib, I., Uyttendaele, M., and De Zutter, L. (2011) Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiology* 28: 1117-1123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.001>

Habib, I., Samper, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D., and De Zutter, L. (2008). Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Applied and Environmental Microbiology* 74(17): 5483-5489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00161-08>

Hayden, K.J., Rizzo, D., Tse, J., Garbelotto, M. (2004) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94: 1075-1083. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1075>

Hendriksen R. S. (2003) A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization Laboratory Protocols Level 4 Training Course Isolation and identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157.

Hyeon, J.Y., Park, J.H., Chon, J.W., Wee, S.H., Moon, J.S., Kim, Y.J., Seo, K.H. (2012) Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for *Salmonella* detection in highly contaminated chicken carcasses. *Poultry Science* 91(5):1222-1226. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01936>

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, Simultaneous, R. (1992) Amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10: 413-417. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0492-413>

Holbrook, R. (2000) Detection of microorganisms in foods – Principles of culture methods. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The microbiological safety and quality of food* Chapter 62: 1761-1790. Aspen Publishers, USA.

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276–7280.

Hsin-Yi, C., Chou, C.C. (2001) Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. Coli* O157: H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology* 70: 189–195.

Hussein, H.S., Bollinger, L.M. (2005) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science* 71: 676–689.

Indu, M.N., Hatha, A.A.M., Abirohsh, C., Harssha, U., Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south –Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:153-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.012>

Ingham, S. C., Tautorius C. L. (1991) Survival of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and indicator bacteria on cooked uncured turkey loaf stored under vacuum at 3°C. *Journal of Food Safety* 11(4): 285–292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00059.x>

Innis, M.A., Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Chapter 1. pp. 3-12. *Academic Press, Inc.*, San Diego, California.

Isaacs, S., Aramini, J., Ciebin, B., Farrar, J.A., Ahmed, R., Middleton, D., Chandran, A.U., Harris, L.J., Howes, M., Chan, E., Pichette, A.S., Campbell, K., Gupta, A., Lior, L.Y., Pearce, M., Clark, C., Rodgers, F., Jamieson, F., Brophy, I., Ellis, A. (2005) An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Food Protection* 68: 191-198.

Jackson M. P, Neill RJ, O'Brien A. D, Holmes R. K, Newland J. W. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters* 44: 109-114. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90210-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(87)90210-2)

Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele M. (2011) Detection of low numbers of healthy and sublethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *International Journal of Food Microbiology* 28: 488-491. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.031>

Jasson, V., Samperis, I., Botteldoorn, N., Lopez-Galvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J., and Uyttendaele, M. (2009) Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology* 135: 248-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.007>

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. (1983) Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1 (8314-5): 76–76. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91616-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91616-1)

Karmali, M., Steele, B. T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stool. *Lancet* i: 619-620. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6)

Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 151: 775–782. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/151.5.775>

Kasza Gyula, Szeitzné Szabó Mária, Mészáros László, Oravecz Márton, Zoltai Anna, Vásárhelyi Adrienn, Cseh Júlia, Hidi Edit, Horváth Zsuzsa, Süth Miklós, Laczay Péter (2011) Élelmiszer-eredetű megbetegedések Magyarországon, EU-tagságunk tükrében. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 133:(6) 368-375.

Kathariou, S.(2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65(11): 1811-1829.

Keith, M. (1997) Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. *Journal of Food Protection* 60: 682–685.

Kim, J., Lim, J., Lee, C. (2013) Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>

Korsak, N., Degeye, J.N., Etienne, G., China, B., Daube, G. (2004) Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *Journal of Food Protection* 67(10): 2158-2164.

Koyuncu, S., Gunnar Andersson, M., Häggblom, P. (2010) Accuracy and Sensitivity of Commercial PCR-Based Methods for Detection of *Salmonella enterica* in Feed. *Applied and Environmental Microbiology* 76(9): 2815-2822. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02714-09>

Leclercq A., Lambert B., Pierard D., Mahillon J. (2001) Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1161-1164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.3.1161-1164.2001>

Lequin, R. (2005) "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clinical Chemistry* 51 (12): 2415-2418. DOI: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

Li, J., Smith, N. H., Nelson, K., Crichton, P.B., Old, D. C., Whittam, T. S., Selander, R. K. (1993). Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *Journal of Medical Microbiology* 38: 129-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-38-2-129>

Lockley, A. K., Bardsley, R.G. (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology* 11: 67-77. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(00\)00049-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(00)00049-2)

Mag, T. (2009) Humán megbetegedéseket okozó *Escherichia coli* törzsek patogenetikai jellemzése. Semmelweis Egyetem, Budapest. *Doktori értekezés* pp.18-19.

Mag, T., Nógrády, N., Herpay, M., Tóth, I., Rozgonyi, F. (2010) Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 29(2):249-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0836-z>

Maráz, A., Marin, F., Cava, R. (2006) Microbial analysis of food. In: Luning, P.A., Devlieghere, F., Verhé, R. (eds.) Safety in the agri-food chain. Chapter 11: 471-524. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands.

Manafi, M., and Kremsmaier, B. (2001) Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International Journal of Food Microbiology* 30: 257-262. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00610-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00610-9)

Mata, G. M. S. C.; Vanetti, M. C. D. (2012) Comparison of conventional and rapid methods for *Salmonella* detection in artisanal Minas cheese. *Journal of Food Research* 1(3):178-193., DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n3p178>

Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M L. (2013) Different assembly of acid and salt tolerance response in two dairy *Listeria monocytogenes* wild strains. *Archives of Microbiology* 195(5): 339-348. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-013-0878-6>

Mohr, J., Pollex G. (1998) Agglutinating monoclonal antibodies in diagnosis of salmonellosis. *Biotest Bulletin* 6: 75-83.

Morrison, D.M., Tyrrell, D.L., Jewell, L.D. (1986) Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *American Journal of Clinical Pathology* 86(1):108-12.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51: 263-273. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>

Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, H.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29: 407-439. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/path.1700290409>

Nadeau, E., Messier, S. & Quessy, S. (2002) Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection* 65: 73-78.

Narang, N., Fratomico, P. M., Tillman, G., Pupedis, K., Cray, W.C. Jr. (2009) Performance comparison of a fliC(h7) real-time PCR assay with an H7 latex agglutination test for confirmation of the H type of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 72: 2195-2197.

Neill, M. A., Agosti, J., Rosen, H. (1985) Hemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult hemolytic uremic syndrome. *Arch Intern Med.* 145 (12): 2215-2217. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.145.12.2215>

Ogunjimi, A. A., Choudary, P. V. (1999) Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23(3): 213-220. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244\(98\)00138-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244(98)00138-2)

Perez, J.M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y., Freydière, A.M. (2003) Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1130-1134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.3.1130-1134.2003>

Pless, P., Reissbrodt, R. (1995) Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture. *International Journal of Food Microbiology* 27(2-3): 147-159. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00160-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00160-8)

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3(1): 18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>

Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L. (2008) Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. 329 *International Journal of Food Microbiology* 121: 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>

Rantsiou, K., Lamberti, Cocolin, L. (2010) Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology* 141. Suppl 1:S75-S79. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.002>

Reiter, M. G., López, C., Jordano, R., Medina, L.M. (2010) Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses. *Food Analytical Methods* 3 : 253–260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9129-5>

Richard, C., Drider, D., Fliss, I., Denery, S., Prevost, H. (2004) Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 248-254. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.1.248-254.2004>

Riley, R., Guilleminault, C., Herran, J., Powell, N. (1983) Cephalometric analyses and flow-volume loops in obstructive sleep apnea patients. *Sleep* 6: 303-311.

Rohonczy, K., Fodor, A., Tabajdiné, P. V., Mohácsiné, F. C. (2007) Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló korszerű gyorsmódszerek összehasonlító vizsgálatai. *Hungalimentaria 2007 Konferencia Budapest 2007. október 25-26. Összefoglalók 18 p.*

Scheutz, F., Moller Nielsen, E., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, Nataro, R. J. P., Caprioli, A. (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May. *Euro Surveill.* 2011;16(24):pii=19889.

Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889>

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., A., and Teixeira, P. (2011) *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2, 200. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>

Skirrow, M.B. (1977) *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *British Medical Journal* 2:9-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.6078.9>

Smigic, N., Rajkovic, A., Antal, E., Medic, H., Lipincka, B., Uyttendaele, M., Devlieghere,

F.(2009) Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with Lactic Acid, Neutralized Electrolyzed Oxidizing Water and Chlorine Dioxide Followed by Growth Under Sub-optimal Conditions of Temperature, pH and Modified Atmosphere. *FOOD MICROBIOLOGY* 26(6): 629-637. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.010>

Sréterné Lancz, Zs., Frankovicsné Adrián, E., Fekete, A., & Kissné Fias, K.(2008) Állati eredetű élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága Magyarországon. *ÉLELMISZERVIZSGÁLATI KÖZLEMÉNYEK* Ksz. 54:78-89.

Sréterné Lancz Zs. (2011) A zoonotikus kórokozók elleni védekezés aktuális kérdései a baromfi-ágazatban - helyzetkép, várható jogszabályi változások. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest. 2011. április 19-20. Összefoglalók*, .25-27 p.

Starbuck, M.A.B., Hill, P.J., Stewart, G.S.A.B. (1992) Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). *Letters in Applied Microbiology* 15: 248-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1992.tb00775.x>

Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., Schoder, D. (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 106(2):651-659. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>

Sváb., J. (1973) Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági kiadó, Budapest.

Szeitzné Szabó, M. (szerk.) (2008) Élelmiszer-biztonsági helyzetelemzés és kockázatelemzés. Agroinform Kiadó, Budapest.

Tabajdiné, P.V. (2003) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. MÉTE 2003. november 19.

Tabajdiné, P.V., Rohonczy, K., Zoller, L. (2009) Patogén mikroorganizmusok kimutatása rekombináns fág fehérjékkel. Hungalimentaria 2009 Konferencia, Budapest 2009. április 22-23. *Összefoglalók* pp. 33.

Tabajdiné P.V.(2001) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. *Magyar Zoonózis Társaság 2001. évi kiadványa*. pp. 121-140.

Tauxe, Robert V. (1997) Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases Journal* 3(4):425-434. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0304.970403>

Temelli,S., Eyigor, A., Anar, S. (2012) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in red meat and meat products determined by VIDAS ECPT and LightCycler PCR. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36: 305-310.

Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., Debevere, J. (2003) Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology* 37(5) 386-391. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01415.x>

Valiente Moro, C., Desloire, S., Vernozzy-Rozand, C., Chauve, C., Zenner, L. (2007) Comparison of the VIDAS[®] system, FTA[®] filter-based PCR and culture on SM ID for detecting *Salmonella* in *Dermanyssus gallinae*. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (4): 431-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02119.x>

Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den, B.W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. (2008) Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology* 130: 285-297. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.027>

Vernozzy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., BoutrandLoei, S., Meyrand, A., Richard, Y. (1998) Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection* 61: 917-920.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V. (2008) Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection* 71: 356-364.

Walker, R. L., Kinde, H., Anderson, R. J., Brown, A. E. (2001). Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using more swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. *International Journal of Food Microbiology* 67: 123-129. DOI:

[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00427-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00427-5)

Walker, S. J., Archer, P., Banks J. G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. 68(2): 157–162.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x>

Wauters, G., Boel, A., Voorn, G.P., Verhaegen, J., Meunier, F., Janssens, M., Verbist, L. (1995) Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 33(4): 845-849.

Wernars K, Heuvelman CJ, Chakrabarty T, Notermans SHW (1991) Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 70:121-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04437.x>

Williams, L.K., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R., and Humphrey, T.J. (2009). Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *International Journal of Food Microbiology* 130: 131-134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.018>

Zoller, L., Mráz, B., Fodor, A., Tabajdiné, P. V. (2011) Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok jelentősége a mikrobiológiai gyakorlatba. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest*. 2011. április 19-20. Poszter

Törvények, rendeletek, szabványok

4/1998. (XI.11.) EüM. rendelet - *Az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről*

2073/2005/EK RENDELET (2005. november 15.) - *Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól*

MSZ EN ISO 16654:2001 .Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az *Escherichia coli* O 157 kimutatására (ISO 16654:2001)

MSZ EN ISO 16140-1:2004. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A választható módszerek validálásának protokollja (ISO 16140 :2003)

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ATCC: American Type Culture Collection

BPW: Buffered Pepton Water (Pufferolt Peptonvíz)

BSA: Bovine Serum Albumin (Szarvasmarha szérum albumin)

C. jejuni : *Campylobacter jejuni*

Campylobacter spp.: *Campylobacter* species

***E. coli* O157:** *Escherichia coli* O157

EFSA: European Food Safety Authority (Európai Élelmiszer-biztonsági Hivatal)

EHEC: Entero – Hemorrágiás *Escherichia coli*

ELFA: Enzyme-Linked Fluorescent Assay (enzimhez kötött fluoreszcens eljárás)

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (enzimhez kötött immunszorbens eljárás)

EU : Európai Unió

GMP : Good Manufacturing Practice (Jó Gyártási Gyakorlat)

Gy.f.: Gyorsfagyasztott

HACCP : Hazard Analysis and Critical Control Points (veszéylelemzés és kritikus szabályozási pontok)

HNCMB: Hungarian National Collection of Medical Bacteria (Orvosi Baktériumok Magyar Nemzeti Gyűjteménye)

HUS: Haemolitikus Urémiás Szindróma

ICS: Immuno-Concentration *Salmonella*

IPC: Internal Positive Control (belső pozitív kontroll)

L. monocytogenes: *Listeria monocytogenes*

MKTTn : Müller Kauffmann Tetrathionate-Novobiocin Broth

mPCR : multiplex polimeráz láncreakció

MUG: 4-metil-umbelliferil-D glükuronid

NCAIM: National Collection of Agricultural and Industrial Microorganisms (Mezőgazdasági és Ipari Mikroorganizmusok Nemzeti Gyűjteménye)

PCR : Polymerase Chain Reaction (polimeráz láncreakció)

qPCR: Valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció

real –time PCR: Valós idejű polimeráz láncreakció

rpm : percenkénti fordulatszám

RV : Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* Enrichment Broth (Rappaport-Vassiliadis *Salmonella* dúsító tápoldat)

Salmonella spp.: *Salmonella* species

SCVPH: Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health (A Községészségügyi Vonatkozású Állat-egészségügyi Intézkedések Tudományos Bizottsága)

subsp.: subspecies

TGE : Tryptone Glucose Yeast Extract (tripton-glükóz- élesztőkivonat táptalaj)

tke: telepkepző egység

TSB: Trypton Soja Broth

VIDAS: Vitek Immunodiagnostic Assay System

VTEC: Verotoxin-termelő *Escherichia coli*

WHO: World Health Organization (Egészségügyi Világszervezet)

1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évek élelmiszerbotrányai a figyelmet az élelmiszer-biztonság kérdéskörére irányították. Az élelmiszer eredetű kórokozók az általuk okozott humán megbetegedések és halálos esetek kapcsán növekvő aggodalomra adnak okot. Ennek következtében a biztonságos élelmiszerek iránti igény megnövekedett.

Bakteriális patogénekkal gyakorlatilag életünk bármely területén találkozhatunk. A baktériumok, amelyek talajból és vízből származnak, potenciális veszélyt jelentenek az élelmiszerekben. A jelenlegi táplálkozási irányzatok, valamint az élelmiszer technológia fejlődése magasabb igényeket támasztanak az élelmiszerek biztonságával kapcsolatosan, ezzel újabb kihívás elé állítva az élelmiszerek minőségével és biztonságával foglalkozó szakembereket. Ezért szükségessé vált monitoring programok alkalmazása, mint a GMP, valamint a hozzá szervesen kapcsolódó élelmiszerbiztonsági rendszer, a HACCP, mert ezek által a termelés folyamata nyomon követhető és a veszélyt jelentő patogének jelenléte kiküszöbölhető, illetve minimálisra csökkenthető.

A vizsgálati jelentések és elemzések azt mutatják, hogy napjainkban az élelmiszerbiztonsági helyzetet a zoonotikus (állatról emberre terjedni képes) kórokozók és az általuk okozott megbetegedések határozzák meg döntő mértékben. Az Európai Unió 2013-ban megjelent zoonózis jelentése alapján (EFSA, 2013), a leggyakrabban előforduló élelmiszer eredetű humán megbetegedéseket a termotróf *Campylobacter* fajok, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, és verotoxint termelő *E. coli* törzsek okozzák.

2011-ben az Európai Unió tagállamaiban összesen 220209 *Campylobacter* által okozott megbetegedést jelentettek be. Leggyakrabban csirkehús mintákból mutattak ki *Campylobacter*-t.

Salmonella leggyakrabban friss brojlercsirke és pulyka húsból mutatható ki. 2011-ben a szalmonellózis esetek száma a humán megbetegedéseket illetően 3,5 %-kal csökkent 2010-hez viszonyítva, és továbbra is statisztikailag szignifikáns csökkenő tendenciát mutat az Európai Unióban a hatodik egymást követő évben. Összesen 95548 megerősített humán megbetegedést jelentettek 2011-ben. Feltételezték, hogy a megfigyelt szalmonellózis esetek számának csökkenése elsősorban a baromfi populációk sikeres szalmonella-gyérítési programjának köszönhető, amelynek a legtöbb tagállam eleget tett.

A humán liszterózis esetek száma enyhén csökkent, összesen 1476 megerősített humán megbetegedést jelentettek 2011-ben. Az előző évekhez hasonlóan magas, 12,7%-os a halálozási arány. *Listeria monocytogenes*-t ritkán jelentettek határérték feletti értékben kiskereskedelemről származó készételekből.

Összesen 4000 megerősített verotoxikus *Escherichia coli* fertőzésről számoltak be 2010-ben, melyek zöme O157 szerocsoportra vezethető vissza. A bejelentett verotoxikus *Escherichia coli* okozta emberi megbetegedések száma is növekszik az Európai Unióban 2008 óta. Az élelmiszer-iparban a legtöbb verotoxikus *Escherichia coli* pozitív esetet marhahússal hozták összefüggésbe (EFSA, 2012). Az elmúlt évek legnagyobb járványai közé sorolható a 2011 nyarán az állati trágyával érintkező csírák okozta nagy mértékű HUS tüneteit okozó megbetegedés, amelyet *EHEC* csoportba tartozó *E. coli* O104:H4 baktériumra vezettek vissza (EFSA, 2013).

Az időigényes, hagyományos tenyésztéses eljárásokkal a patogének kimutatási időtartama akár 5 vagy annál is több napot vehet igénybe. Kórokozók kimutatására az elmúlt időkben igen sokféle eljárást próbáltak kifejleszteni a szabványos, hosszú és költséges munkafolyamatok rövidítésére.

A molekuláris biológia élelmiszer vizsgálatokba történő bevezetése jelentősen megváltoztatta az élelmiszerek biztonságának ellenőrzésére alkalmazott vizsgálati módszereket. Az immunológia, molekuláris biológia, automatizáció és számítógépes technológia tudományterületek fejlődésével az újonnan fejlesztett mikrobiológiai módszerek gyorsabbá, érzékenyebbé és megbízhatóbbá váltak.

A gyors módszerek alkalmazásával lehetővé válik a nagy mintaszám ellenére is a patogén mikroorganizmusok biztonságos kimutatása. A gyors mikrobiológiai módszerek bevezetéséhez összehasonlító vizsgálatok elvégzésére van szükség. Ezen mérési eredmények alapján meghatározható a laboratórium optimális működéséhez legmegfelelőbb módszerek kiválasztása.

Munkám során célul tűztem ki, hogy az élelmiszerbiztonsági szempontból jelentős baktériumok (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 és termotróf *Campylobacter jejuni*) élelmiszerekből történő kimutatására szolgáló korszerű gyors módszerekkel kapott eredményeket összehasonlítsam a szabványos tenyésztéses vizsgálatokkal és kiválasszak olyan patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló módszereket, amelyek nagy számú élelmiszer, takarmány, alapanyag és higiéniai mintát vizsgáló laboratóriumunk számára egyaránt optimális.

2. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

2.1. Az élelmiszerbiztonság helyzete napjainkban

Az élelmiszerbiztonság kérdésköre mindig is foglalkoztatta az emberiséget, sőt ez napjainkban egyre inkább kiemelkedő jelentőségűvé válik. Az élelmiszer-előállítás technológiájában bekövetkező változások új veszélyekkel és kihívásokkal járnak együtt, melyhez hozzájárul, hogy eddig nem ismert, vagy új tulajdonságokat mutató kórokozók jelennek meg. Változnak az ételfogyasztási és életmódbeli szokások is, melyek következtében kereslet jelentkezik az eddig szokásosan nem fogyasztott egzotikus ételek, a kíméletesen feldolgozott élelmiszerek, a természetes állapotot minél jobban megközelítő, de hosszú ideig tárolható és kényelmesen felhasználható élelmiszerek iránt. A nemzetközi élelmiszerkereskedelem robbanásszerű fejlődése, valamint az élelmiszerek egyre nagyobb tételekben történő előállítása fokozza az azonnali, több országra kiterjedő, nagy betegszámmal járó ételmérgezési események létrejöttének valószínűségét (Szeitzné, 2008).

A mikrobiológiai élelmiszerbiztonság helyzetének megítélésére az élelmiszer eredetű megbetegedések, valamint az élelmiszerláncban észlelt mikrobiológiai szennyeződések alakulása ad információt. Minden vizsgálat és elemzés azt mutatja, hogy napjainkban az élelmiszerbiztonsági helyzetet a zoonotikus (állatról emberre terjedni képes) kórokozók és az általuk okozott megbetegedések határozzák meg. Ezek a kórokozók az élő állatokba bekerülve azok megbetegedését okozhatják, illetve elsődleges szennyeződésként bekerülhetnek az élelmiszerláncba vagy másodlagos szennyeződésként nyersanyagokból, környezetből, eszközökről, személyekről keresztszennyeződésként jelentkezhetnek, ezért a környezet szennyezettségi állapota és a személyi higiénia a mikrobiológiai élelmiszerbiztonság tárgykörébe tartozik.

2.1.1. Jogszabályi háttér

Az EU tagállamaiban a többször módosított 2073/2005/EK rendelet 1. mellékletének 1. fejezete élelmiszer-biztonsági kritériumként előírja, hogy hús-, tej-, tojás-, csíráztatott magvak és darabolt zöldség-gyümölcs termékek 25 g-ja nem tartalmazhat *Salmonella*-t fogyaszthatósági idejük alatt, még az 1.2.-1.3 pontjai a fogyasztásra kész élelmiszerekre vonatkoznak, ezek 100/g *Listeria monocytogenes* tartalmazhatnak (mikroökológiai kritériumok függvényében).

A rendelet 14. pontja szerint az SCVPH 2003. januárjában kiadott egy szakvéleményt az élelmiszerekben levő verotoxikus *E. coli* (VTEC) baktériumról. A szakvéleményben az SCVPH arra a következtetésre jutott, hogy a VTEC O157-re alkalmazandó, végtermékre vonatkozó mikrobiológiai szabályozás valószínűleg nem csökkenti szignifikánsan a fogyasztók egészségét fenyegető kockázatot, ugyanakkor az élelmiszerláncban a fekáliás szennyezettség csökkentését célzó útmutatások hozzájárulhatnak a közegészséget fenyegető kockázatok csökkentéséhez (beleértve a VTEC-et is). Az SCVPH a következőképpen határozza meg azokat az élelmiszer-kategóriákat, ahol a VTEC veszélyt jelenthet a közegészségre:

- nyers vagy nem kellően hőkezelt marhahús,
- más kérődző állatokból származó hús,
- darált hús,
- érleléssel tartósított marhahús,
- valamint abból készült termékek,
- nyers tej és nyers tejből készült termékek,
- friss termékek, különösen csíráztatott magvak,
- nem pasztörözött gyümölcs és zöldséglevék.

A 2073/2005 EK mikrobiológiai határérték rendelet az élelmiszer-biztonsági kritériumok vizsgálata között előírta, hogy az élelmiszerek nem tartalmazhatnak patogén mikroorganizmusokat, tehát *E. coli* O157:H7-es szerotípusát sem. 2013-ban úgy módosult a rendelet, hogy a csírákat fogyasztásra kész élelmiszereknek kell tekinteni és a forgalomba hozott termékek 25g-ja eltarthatósági idejük alatt Shigatoxint termelő *E. coli* (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 és O104:H4 baktériumokat nem tartalmazhat (209/2013/EU RENDELET).

Magyarországon a 4/1998 (XI.11.) EüM sz. rendelet szerint az élelmiszerek 25 g-ja nem tartalmazhat *Salmonella*-t és egyéb kórokozót (*Campylobacter* fajok, verotoxin termelő *E. coli*) fogyaszthatósági idejük alatt.

2.1.2. Mikroökológiai környezet elemzése

Az élelmiszer-előállítás technológiájában bekövetkező változások új veszélyekkel és kihívásokkal járnak együtt a vizsgálati módszerekkel kapcsolatban is. Eddig nem ismert, vagy új tulajdonságokat mutató kórokozók jelennek meg, másrészt a technológiák során sérült sejtek kimutatására is kifinomultabb módszerekre van szükség.

A határértékrendeleteknek megfelelő, túlzott egységesítési törekvés az elődúsítási és dúsítási eljárásokat is leegyszerűsítette, elrejtve ezzel az élelmiszer-mátrix és a mikroökológiai környezet meghatározó szerepét a kórokozók 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 reszuscitációja, ami döntően függ az elődúsító összetételétől és a vizsgálandó élelmiszertől. 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.

A tojásfehérje inhibítor hatása például annak köszönhető, hogy ovotranszferin protein tartalma leköti a *Salmonella* növekedéséhez szükséges vasat. Vas vegyületek adagolása az elődúsítóhoz az inhibítor hatást csökkenti. Az elmúlt években kutatások folytak, hogy találjanak olyan vegyületeket, amelyek a *Salmonella* sejtek regenerálódó képességét növelik, ezzel az elődúsítás idejét lerövidítik. Pless és Reissbrodt (1995) tej és tojás termékek esetében a 20 µg/ml vas-ammónium-citrát és vas-klorid adagolásával elérték, hogy az elődúsítás 6-8 órára csökkenthető.

Tabajdiné (2001) vizsgálatai során különböző típusú vas vegyületeket választott a cél elérése érdekében. Vas-ammónium-citrát, a HUMET-R makro- és mikroelemek pótlására szolgáló roborálószer és élesztősejtek által metabolizált szerves vas vegyület felhasználásával vezetett elődúsításokat alkalmazott nyerstej és hőkezelt tej, valamint tojás termékek esetében. A *Salmonella* sejtek szaporodási képessége és repair kapacitása a vas vegyületeket tartalmazó elődúsítás után növekedett. A Ferrioxamine E egy olyan szerves vas vegyület, amely mellett, hogy elősegíti a *Salmonella* növekedését, nem segíti az *E. coli*, *Proteus*, *Providencia* baktériumok fejlődését, így szelektív 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 (Tabajdiné, 2001).

Mindezek a vizsgálati eredmények azt támasztják alá, hogy a módszerek érzékenységének növeléséhez elengedhetetlenül szükséges a mátrix hatások ismerete, a negatív hatások kiküszöbölése.

2.2. Zoonotikus megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon

2.2.1. *Salmonella* okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon

2.2.1.1. *Salmonella* nemzetség által okozott megbetegedések Európában

Az Európai Unió 2009-ben elkészült összefoglalója alapján a szalmonellózis, a második leggyakrabban jelentett zoonotikus fertőzés forrása, 108614 emberi megbetegedést okozott 2009-ben (2008-ban az esetszám 131468 volt). Az élelmiszer eredetű járványok leggyakoribb okozója a *Salmonella* maradt, legtöbbször csirke-, pulyka- és sertéshúsban mutatták ki a baktériumot (EFSA, 2011).

Az élelmiszerek közül a *Salmonella* leggyakrabban friss brojlercsirke és pulyka húsból mutatható ki. 2010-ben a szalmonellózis esetek száma a humán megbetegedéseket illetően 8,8%-kal csökkent 2009-hez viszonyítva, és továbbra is statisztikailag szignifikáns csökkenő tendenciát mutat az Európai Unióban a hatodik egymást követő évben. Összesen 99020 megerősített humán megbetegedést jelentettek 2010-ben. Feltételezték, hogy a megfigyelt szalmonellózis esetek számának csökkenése elsősorban a baromfi populációk sikeres szalmonella-gyérítési programjának köszönhető, amelynek a legtöbb tagállam eleget tett (EFSA, 2012).

A megerősített szalmonellózis esetszám csökkenő tendenciája megmaradt 2011-ben, 95 548 esettel. A legtöbb tagállamban teljesültek a *Salmonella* előfordulásának csökkentésére irányuló célkitűzések a szárnyas populációkban. Az élelmiszerek vonatkozásában a *Salmonella*-t leggyakrabban húsban és húskészítményekben mutatták ki. (EFSA, 2013)

Salmonella Stanley járványról számolt be az Európai Élelmiszerbiztonsági Hivatal 2012. szeptemberében. A járvány kitörése valószínűleg a pulyka feldolgozási láncsal volt kapcsolatban. Németország keleti részén, valószínűsíthetően élelmiszer eredetű akut gasztroenteritisz járvány tört ki főleg gyerekek és fiatalok között (Élelmiszerbiztonsági Szemelvények, 2012).

2.2.1.2. *Salmonella* nemzetség által okozott megbetegedések Magyarországon

Humán *Salmonella* fertőzések tekintetében hazánk az évente megjelenő uniós jelentések szerint a csatlakozás óta a legmagasabb morbiditású országok csoportjába tartozik.

A magyarországi humán szalmonellózis-morbiditás magas értéke nem csak a magas megbetegedési gyakoriságot jelzi, hanem azt is, hogy Magyarországon jól működik a felügyelet. A

járványokra vonatkozó adatokat Magyarországon már 1931 óta gyűjtik, a humán megbetegedések 1959 óta bejelentés kötelesek. A regisztrált esetek száma 1959-től 1996-ig szinte folyamatosan emelkedett. A járványok száma (járvány = két összefüggő megbetegedés) 1995-ben tetőzött (3450 járvány/év), a bejelentett egyedi megbetegedések száma 1996-ban érte el a maximumot (28 046 megbetegedés/év, incidencia: 274,6/100 000 lakos/év). Ezt követően 2004-ig mindkét mutató értéke folyamatosan csökkent. 2004-ben a regisztrált szalmonellózis esetek előfordulásának 1997 óta tartó csökkenő trendje megfordult, és 2005-ben a bejelentett megbetegedések összes száma 600-zal (8%), 2006-ban közel 1600-zal (20%) emelkedett az előző évihez viszonyítva. 2006-ban a sporadikus esetek száma 15%-kal, a járványos esetek száma 20%-kal volt több mint 2005-ben.

Magyarországon nemcsak a bejelentett betegek száma emelkedett, hanem a kiemelt járványok száma is. Míg 2004-ben 39, 2005-ben 37 közösségi illetve területi járványt regisztráltak, addig 2006-ban 60 ilyen járvány adatai kerültek be a nyilvántartásba. Továbbá a kiemelt járványokhoz tartozó megbetegedések és az egy járványra jutó betegek száma (járvány kiterjedtsége) is nőtt 2004-ről (16,7 eset/járvány) 2006-ra (30,6 eset/járvány). A családi járványok száma folyamatosan, jelentős mértékben visszaesett, a kiemelt, közösségi és területi járványok előfordulása a 2000. évet követően azonban már nem mérséklődött tovább (Szeitzné, 2008).

2.2.2. *Listeria monocytogenes* okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon

2.2.2.1. *Listeria monocytogenes* faj által okozott megbetegedések Európában

A *Listeria* baktérium élelmiszerfertőzést okozó szerepéről csak az 1980-as évek második felétől kezdve van tudomásunk. Ritka, de rendkívül súlyos, magas halálozási aránnyal járó megbetegedést, vetélést, agyhártyagyulladást, szepszist okozhat. A jelentés alapján a bejelentett humán liszteriózisok számának alakulása nem megnyugtató. 2006-ban 8,6%-kal emelkedett a korábbi évhez képest (2005-ben 1427; 2006-ban 1583), a legutóbbi 5 év során pedig 59 százalékkal. A főként tejtermékek, hal- és húskészítmények fogyasztásához kapcsolható fertőzések döntően (56%) 65 év feletti idős embereket érintettek (EFSA, 2007).

A 2008. évi adatokhoz képest a *Listeria* fertőzések 19%-os emelkedést mutattak 2009-ben, 1645 megerősített esettel. Köztudott, hogy a *Listeria* okozta fertőzések halálozási aránya magas, különösen veszélyes a betegség az idős emberekre. A becslések szerint 270 ember halálát okozta liszteriózis az Európai Unióban 2009-ben, ami 17%-os halálozási arányt jelent a fertőzöttek körében. Az élelmiszereket tekintve a baktérium a fogyasztásra kész élelmiszerekben fordul elő a leggyakrabban (0,3-1,1 %), a füstölt halak, hőkezelt hús- és sajt-készítmények a leggyakoribb közvetítői a kórokozónak (EFSA, 2011).

A humán liszteriózis esetek száma enyhén csökkent, összesen 1601 megerősített humán megbetegedést jelentettek 2010-ben. Az előző évekhez hasonlóan magas, 17%-os volt a halálozási arány. A kiskereskedelemből származó készételek ellenőrzése során *Listeria monocytogenes* vizsgálatokor ritkán jelentettek határérték feletti értéket. Az előző évekhez képest nem volt jelentős változás az általa okozott megbetegedések számát illetően (EFSA, 2012).

Az EFSA legutóbbi zoonózis jelentése szerint a liszteriózis esetszám 1476-ra csökkent, és a *Listeriát* csak ritkán mutatták ki határérték feletti mennyiségben fogyasztásra kész élelmiszerekben (EFSA, 2013).

2.2.2.2. *Listeria monocytogenes* által okozott megbetegedések Magyarországon

Hazánkban a liszteriózis 1998 óta bejelentendő betegség. Azóta (10 év alatt) mindösszesen 100 körüli esetet regisztráltak. Az évente bejelentett megbetegedések száma 4–25 között változott. A halálozási arány 0–50% között alakult (medián 22,2%). Az esetek kormegoszlása újszülött / csecsemő 12%, 1–14 éves 3,4%, 15–19 éves 0%, 20–49 éves 20%, 50–59 éves 20%, >60 éves 43%. A betegek túlnyomó többségénél megállapítható valamilyen, a betegség kialakulására hajlamosító tényező: a beteg kora, illetve klinikai állapota (terhesség, csökkent ellenálló-képességgel járó alapbetegség, alkoholizmus, cukorbetegség, rosszindulatú daganat stb.) (Szeitzné, 2008). 2010-ben 18 esetet jelentettek.

(http://193.225.82.27/fileadmin/media/AOK/11_12_I_AOK_kotelezo_adatok.pdf)

2.2.3. Verotoxint termelő *E. coli* okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon

2.2.3.1. Verotoxint termelő *E. coli* által okozott megbetegedések Európában

A verotoxin-termelő *E. coli* (VTEC) járványtana a szarvasmarha eredetű nyers vagy elégtelenül hőkezelt termékek, a trágyával szennyezett zöldségek és víz fogyasztásához kötődik, de egyéb, főként kérődző fajok is terjeszthetik.

A mikroba az Amerikai Egyesült Államokban, Japánban, Nyugat-Európa egyes országaiban jelentős számú megbetegedést okoz, a hazai epidemiológiai helyzet azonban egyelőre kedvezőnek mondható. Az Európai Unióban az incidencia 1,3/100 000 lakos /év (Sréterné et al., 2008). A verotoxikus *Escherichia coli* (VTEC) 3573 emberi megbetegedést okozott 2009-ben, ami 19%-os emelkedést mutat 2008-hoz képest. Az állatok és az élelmiszerek között leggyakrabban szarvasmarhában és marhahúsban jelentették a baktérium jelenlétét (EFSA, 2011). Az EFSA legutóbbi felmérése szerint összesen 9485 megerősített verotoxikus *Escherichia coli* (VTEC) fertőzést jelentettek. Ez a 2010. évi adatokhoz képest 159,4%-os emelkedést jelent, mely a 2011 nyarán elsősorban Németországot érintő nagy VTEC/STEC járványnak tulajdonítható (EFSA, 2013). 2011 nyarán Németországban véres hasmenéssel, és az esetek egy részében súlyos szövődménnyel járó megbetegedések járványszerű előfordulását észlelték, melynek hátterében a shigatoxint termelő enterohemorragiás (EHEC), O104 szerocsoportú *E. coli* (EHEC) áll, melynek következményeként véres hasmenés, HUS szindróma lépett fel. A németországi járvány jelentőségét elsősorban a véres hasmenéssel kórházba kerülő betegek magas száma adja. Véres hasmenést okozó *E. coli* fertőzések Európában eddig csak kis számban, és elsősorban fiatal gyermekek körében fordultak elő. Jelen járvány érdekessége, hogy a súlyos tünetegyüttest egyszerre sok betegnél, és döntően felnőtt nők körében figyelték meg (Scheut et al., 2011).

2.2.3.2. Verotoxint termelő *E. coli* által okozott megbetegedések Magyarországon

Az Országos Epidemiológiai Központban működő referencia-laboratórium adatai szerint Magyarországon 2000–2005 között mindösszesen 58 laboratóriumi vizsgálattal megerősítetten, verotoxin-termelő *E. coli* által okozott megbetegedést diagnosztizáltak (évente 5–20 esetet), melyek túlnyomó többsége szórványosan jelentkezett. Kiterjedt járványok nem fordultak elő. A kis esetszám és a hosszú lappangási idő miatt nem sikerült egy meghatározott élelmiszert azonosítani a fertőzés terjesztőjeként.

Az elmúlt tíz évben néhány felmérő vizsgálat során, 2005 óta pedig a marhahúsból végzett rendszeres monitoring vizsgálatok eredményei alapján elmondható, hogy hazánkban a kockázatot jelentő élelmiszerekben előfordulása ritka. 2005-ben 149 marhahús minta vizsgálata során csak 2 izolálás történt (1,3%), mindkét törzs VT-2 típusú toxint termelt. A 2006. évi monitoring programban pozitív minta nem volt. Nyers tejmintákban az előfordulási arány 1% alatti.

A verotoxin-termelő *E. coli* hazánkban egyelőre nem jelent komoly közegészségügyi problémát (Szeitzné, 2008).

2.2.4. Termotróf *Campylobacter* okozta megbetegedések alakulása Európában és Magyarországon

2.2.4.1. Termotróf *Campylobacter* által okozott megbetegedések Európában

A 2009. évi zoonózis jelentés szerint a kampilobakteriózis maradt a legtöbbet jelentett zoonótikus megbetegedés, enyhe növekedést (4%) mutatva a 2008. évi esetszámhoz viszonyítva. 2008-ban 190 566, míg 2009-ben 198 252 megbetegedést jelentettek a tagállamok. Az előző évhez képest megfigyelhető teljes növekedés 75,3 %-át az Egyesült Királyság és Magyarország által bejelentett megerősített esetek eredményezik. A fertőzés halálozási aránya 0,02% volt az Unióban, ami alacsonyabb, mint a *Salmonella* okozta fertőzések halálozási aránya (0,08%). Ezek az adatok a *Salmonella* okozta fertőzések tekintetében körülbelül 90 halálesetet, míg a *Campylobacter* vonatkozásában 40 halálesetet jelentenek. Az élelmiszereket tekintve a *Campylobacter* nyers szárnyashúsban fordult elő a leggyakrabban (átlagosan a vizsgált minták 31 %-a volt pozitív), élő állatok közül pedig szárnyasokban, sertésben és szarvasmarhában volt legtöbbször jelen a baktérium (EFSA, 2011). Az EFSA 2013-ban megjelent felmérése alapján a leggyakrabban jelentett zoonózis a kampilobakteriózis volt, 220 209 megerősített humán esettel. Az Unióban még mindig magas a *Campylobacter* jelenléte a brojler húsokban (EFSA, 2013).

2.2.4.2. Termotróf *Campylobacter* által okozott megbetegedések Magyarországon

A *Campylobacter* spp. okozta fertőzések előtérbe kerültek, azonban az élelmiszerek közvetítő szerepére kevés laboratóriumi vizsgálattal alátámasztott adat van (Kasza et al., 2011).

A kampilobakteriózis bejelentések száma 2011-ben mérsékelten meghaladta az előző év augusztusában regisztráltat, és harmadával volt több, mint a 2005-2009. évek augusztusában regisztrált középérték. Magyarországon 2010-ben 5961 esetet jelentettek.

(http://193.225.82.27/fileadmin/media/AOK/11_12_I_AOK_kotelezo_adatok.pdf)

2011-ben az Országos Epidemiológiai Központ adatai szerint a bakteriális megbetegedések közel fele kampilobakteriózis volt.

(http://epa.oszk.hu/00300/00398/00466/pdf/epinfo_EPA00398_2011_44.pdf)

Az Európai Unió baromfi vágóhidakon végzett vizsgálatai alapján megállapítható, hogy az uniós átlag adatainál a hazai adatok *Campylobacter* vonatkozásában lényegesen jobbnak bizonyultak. A vakbél poolminták 50,5%-a (EU átlag 71,2%), a nyakbőr minták 56,1%-a (EU átlag 75,8%) bizonyult *Campylobacter* pozitívnak. Voltak olyan tagállamok, ahol a minták 100%-a pozitív volt. Magyarországon a pozitív minták 42,2%-a <100 tke/g mennyiségben bizonyult *Campylobacter* szennyezettnek, így a kontamináció mértéke is alacsonyabb volt, mint az EU átlag. A felmérő vizsgálat egyik megállapítása az volt, hogy országonként nincs szignifikáns különbség a vágóhidakon a *Campylobacter* pozitivitásban, azonban a szennyezettség mértékében igen. Emiatt tervezi a Bizottság kvantitatív mikrobiológiai kritérium bevezetését a vágóhidakon (Sréterné, 2011).

2.3. Az élelmiszerbiztonsági szempontból fontos baktérium fajok jellemzése

2.3.1. *Salmonella* nemzetség előfordulása és jellemzői

Szalmonellának neveznek mintegy 2000-féle, biokémiaiilag és szerológiaiilag rokon baktériumot. 1997-ben az összesen 389 szalmonella-eredetűként nyilvántartott hazai ételfertőzőési esemény közül 364 esetben (93,6%) *S. Enteritidis* volt a kórokozó. A FAO/WHO (2009) felmérései és más külföldi szakirodalmi adatok (Greig et al., 2007) egyaránt azt mutatják, hogy az iparosodott országokban a szalmonellózisok gyakoriságának a növekedése ugyancsak főként a *Salmonella* Enteritidis (Isaacs et al., 2005), továbbá a *S. Typhimurium* DT104 törzs jelentkezésének és terjedésének a következménye (Ethelberg et al., 2007).

A szalmonellák az emberi és állati tápcsatornában előforduló, *Enterobacteriaceae* családba tartozó Gram-negatív, fakultatív anaerob baktériumok. Peritrich csillók segítik az önálló mozgásban, helyváltoztatásban, kivéve néhány törzs, mint például *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Gallinarum biovar Gallinarum (*Salmonella* Gallinarum) és *S. enterica* subsp. *enterica* ser. Gallinarum biovar Pullorum (*Salmonella* Pullorum) (Li et al., 1993).

A szalmonellák hőtűrése nem tér el a nem spórás baktériumoknál általában tapasztalt hőtűréstől. (Bacon et al., 2003). A fagyasztást túlél, a jégben hosszú ideig életben maradnak, és egyes szerotípusok – ha lassan is – 5-10 °C közötti hőmérsékleten is szaporodnak (Ingham et al., 1991).

A szalmonellózis tünetei: hasmenés, hasi görcsök, láz és hányás rendszerint 24 órán belül jelentkeznek a szennyezett élelmiszer elfogyasztása után, többnyire viszonylag rövid ideig tartanak, s csekély halálozási rátájúak. A *S. Enteritidis*-nek gyakorlatilag minden gazdasági állatfaj, sőt „házi kedvencek” is a hordozói lehetnek, de a megbetegedésekkel elsődlegesen a baromfi és a tojás szennyezettségét hozzák kapcsolatba (EFSA, 2011).

A húsok szennyeződése elsősorban a vágás során következik be, ha nem megfelelő a kültakaró letisztítása, vagy ha a béltraktus megsértésével vagy a kuláré helytelen eltávolításával széklet kerül az állatok testére és környezetébe. A nyers húsokkal, a nem hőkezelt és nem kellő mértékben hőkezelt húskészítményekkel a szalmonellák eljuthatnak a fogyasztó asztalára. Veszélyforrást jelenthet az utószennyeződés is. Nyers termékekből leggyakrabban friss brojlercsirke, pulyka- és sertéshús mintákból észleltek szalmonella pozitivitást. A szalmonella kimutatható ritkán egyéb élelmiszerekből, mint például a tejtermékek, gyümölcsök és zöldségek (EFSA, 2011).

2.3.2. *Listeria monocytogenes* előfordulása és jellemzői

A *Listeria monocytogenes*-t először 1926-ban azonosították nyulakban és tengerimalacokban kialakult mononucleosis kórokozójaként (Murray et al., 1926).

A *Listeria monocytogenes* Gram-pozitív, pálca alakú, nem spórás, fakultatív anaerob baktérium, emberre és állatra egyaránt veszélyes kórokozó. Rezisztens számos szélsőséges környezeti hatással szemben, mint például az alacsony hőmérséklet és pH, vagy a nagy só koncentráció (Melo et al., 2013). A környezetben való elterjedésének oka, hogy viszonylag hosszú ideig képes a túlélésre számára kedvezőtlen környezeti körülmények között, illetve, hogy az egyik leginkább hidegtűrő nem spórás baktérium (Ingham et al., 1991).

Szaporodásához szükséges hőmérséklet optimuma 30-37 °C között van. 60 °C-nál nagyobb hőmérsékleten elpusztul, viszont 5°C alatt is képes a lassú szaporodásra (generációs ideje 13-130 óra) (Walker et al., 1990).

Listeria monocytogenes váltakozó gyakorisággal mutatható ki az ember és a háziállatok bélrendszeréből és húgy-nemi szervrendszeréből (Borucki et al., 2004). A baktérium a váladékokkal kerül a külső környezetbe, és mivel nagyon ellenálló, ott hosszú ideig képes életben is maradni. Az állati eredetű élelmiszerek fertőződése is innen ered. A korábban ritka kórokozónak számító *L. monocytogenes*-t egyre gyakrabban igazolják az 1960-as évek óta, mely valószínűleg a háztartási hűtőberendezések és a félkész élelmiszerek széles körű elterjedésével magyarázható. Noha az általános népességben ma sem tartozik a gyakori fertőzések közé, ritka előfordulása ellenére népegészségügyi jelentősége nagy, mivel az általa okozott szisztémás betegség halálozási aránya kiemelkedően magas (Frye et al., 2002).

Leggyakrabban élelmiszerhigiéniai problémát a kórokozóval fertőzött darált hús, tej, lágysajt, hidegkonyhai termékek, nyers zöldségfélék, savanyított készítmények okozzák, főleg úgy hogy ezeket nem megfelelő hőkezelés után vagy hőkezelés nélkül túl hosszú ideig tárolják hűtőszekrényben (Faber és Peterkin, 1991). Itt különös jelentősége van a hűtőszekrényben történő hosszú ideig való tárolásnak, ugyanis szobahőmérsékleten történő tárolás esetén a többi baktérium túlnövi ezt a kórokozót, nem teszi lehetővé a szaporodását (Arguedas-Villa et al., 2010; Faber és Peterkin, 1991). A baktériumot a hőkezelés - beleértve a pasztörizálást is - elpusztítja.

A *Listeria monocytogenes* számos virulencia faktorát azonosították, és alaposan jellemezték molekuláris és sejt biológiai szinten, ideértve a hemolizint (listeriolysin O), két különböző foszfolipázt (PCPLC és PIPLC), és egyéb fehérjéket. A virulencia faktorok kimutatására alapozott módszerek segíthetnek a *L. monocytogenes* biztonságos kimutatásában (Kathariou, 2002).

2.3.3. Verotoxint termelő *E. coli* O157:H7 előfordulása és jellemzői

Az *E. coli* O157:H7 az *Enterobacteriaceae* család tagja, Gram-negatív, rövid 0,7 - 1,5 µm - szer 2 - 5 µm hosszú - pálcá alakú, körkörös csillós baktérium. A baktérium kataláz pozitív, oxidáz negatív, laktóz bontó, a fagyasztást is jól tűri, sztreptomycinre érzékeny, tetraciklinre rezisztens lehet, béta-glükoronidáz enzimet nem termel, és a D-szorbitolt nem fermentálja (Hendriksen, 2003).

Az *E. coli* O157:H7 szerotípusát elsősorban szarvasmarhák, háziállatok hordozzák, de kontakt fertőzés útján is gyakran fertőzéseket, megbetegedéseket okoznak. Az EHEC csoportba tartozó, verotoxint termelő *Escherichia coli* (VTEC) törzset, mint vérzéses vastagbél gyulladás (Johnson et al., 1983; Riley et al., 1983) és humán hemolitikus urémiás szindróma (Karmali et al., 1983; Karmali et al., 1985; Neill et al., 1985) okozóját, nem kellően hőkezelt hamburger-hús vizsgálata kapcsán ismertek fel. A kimutatott kórokozót az *E. coli* törzs O157:H7 szerotípusaként határozták meg, amelyet korábbi vizsgálatok során ritkán izoláltak. Az általuk okozott megbetegedések, mint például a hemorrágiás kolitisz (vérzéses vastagbélgyulladás), vagy a hemolitikus urémiás szindróma (HUS) igen súlyos tünetekkel járnak, ezen tünetek alapján nyilvánvalóvá vált, hogy detektálása kiemelkedő jelentőségű.

Az *E. coli* O157:H7 verotoxint termelő szerotípust gyakran társítják nyers tej tartalmú ételekkel (Denny et al., 2008; Hussein és Bollinger, 2005). Az utóbbi években történt élelmiszer eredetű járványok azt jelezték, hogy nem csak a nyers termékek, hanem a minimálisan feldolgozott élelmiszerek is problémát okozhatnak (Abdulraouf et al., 1993; Anon, 2006; Hsin-Yi és Chou, 2001; Vojdani et al., 2008; Smigic et al., 2009).

A minden korcsoportot érintő megbetegedés nagytömegű, véres székletürítéssel, haspuffadással, hasi görcsökkel jár. Kisgyermekeknél, időseknél súlyos szövődményként haemolitikus-urémiás szindróma (HUS), akut veseelégtenség, haemolitikus anémia, tromboticus thrombocytopheniás purpura (TTP) alakulhat ki. A kórokozó a vastagbélben fejti ki hatását, csecsemők enteritiszét okozó *E. coli*-hoz hasonlóan károsítja a bélbolyhokat. A kórokozó által termelt citotoxin (verotoxin) a vastagbélben kifejtett hatására jön létre az extraintestinális kórképre jellemző szervkárosodás. E károsító hatás következményei a vese-funkció károsodás és idegrendszeri tünetek (Morrison et al., 1986).

A verotoxin család két, immunológiailag megkülönböztethető (nem keresztreakáló) csoportra osztható: VT1-re és VT2-re. A *vtx1* és a *vtx2* 55% (A alegység) és 57% (B alegység) azonos-ságot mutat egymással (Jackson et al., 1987).

A *vtx1* erősen konzervatív, a *vtx2*-n belül azonban nagy a szekvencia-variabilitás. A legsúlyosabb emberi megbetegedésekhez a *vtx2* és a *vtx2c* altípus köthető. Minden verotoxin egy A és egy B alegységből áll. Az A alegység proteolitikusan A1 és A2 peptidekre bontható. Az A1 az enzimatikusan aktív régió, az A2 pedig az A1 és a B alegység pentamerje közötti kapcsolatot biztosítja. Ez a B pentamer köti a toxint a specifikus glikolipid receptorhoz (globotriaosylceramid - Gb3), amely általánosan előfordul az eukarióta sejtek felszínén, ám kiemelkedően magas koncentrációban található meg az emberi veseszövetben (Boyd és Lingwood, 1989; Mag, 2009). A verotoxin először intesztinális folyadékgyülemet idéz elő, amelyet valószínűleg az adszorptív bélsejtek szelektív pusztulása okoz, majd kiterjedt szövetkárosodás következik be. A károsodott sejteken keresztül a toxinnal együtt a bakteriális LPS és különböző gyulladásos mediátorok is a keringésbe jutnak. Ezt támasztja alá, hogy a véres hasmenéses megbetegedésekben gyakrabban alakul ki szövődményként HUS, mint a nem véres hasmenés esetében (Griffin, 1995; Mag et al., 2010).

Mivel előfordulhatnak szarvasmarhák bélrendszerében és bőrfelületén, a marhahús, valamint a tej élelmiszerbiztonsági szempontból fokozott kockázatot jelenthetnek. A fertőző adag O157: H7 becslések szerint 1-10 sejt. EHEC fertőzések többnyire élelmiszer vagy víz által hordozott és nem kellőképpen hőkezelt darált hús termékekben fordulnak elő (Centers for Disease Control and Prevention, 1993). Élelmiszerek esetén trágyával érintkező zöldségeken, gyümölcsökön szintén előfordulnak. Nyers zöldségféléken hűtött körülmények között is képesek elszaporodni. Az *E. coli* a legnagyobb kockázatot a darált húsokban jelenti, mert a kórokozó a hús felszínéről a belsejébe jut, ahol túléli a kolbásznál szokásos fermentálást is. Patogenitási jellemzője a verotoxin termelés. Ezek közül a legfontosabb lizogén lambda bakteriofág kódolt Shiga toxin (STX fehérjék), amely gátolja az eukariota sejtek fehérjeszintézisét. Az Stx2, Stx1 megegyezik a *Shigella dysenteriae* által termelt toxinnal (<http://www.nphl.org/EscherichiacoliO157-Fey.pdf.pdf>).

2.3.4. *Campylobacter* spp. előfordulása és jellemzői

A *Campylobacter* nemzetséget jól ismerik világszerte, mint az élelmiszer-eredetű bakteriális hasmenéses betegségek fő okozóját (EFSA, 2013).

Jellegzetessége, hogy nem szaporodik 30°C alatt, de hűtött körülmények között (4°C-on) hosszabb ideig túlél. Szaporodásához alacsony, 5-10 % oxigén-koncentrációt igényel.

A kampilobakterek citokróom-oxidáz pozitív, mikroaerofil, Gram-negatív, hajlított pálca alakú baktériumok, mozgásuk dugóhúzó-szerű. A környezeti tényezőkre, különösen a magas hőmérsékletre érzékenyek. Számos vadon élő és háziállat bélrendszerében kolonizálódnak, különösen a madárfajokat, a baromfit is beleértve. A *C. jejuni* sokféle vad- és háziállat mikrobiótájának is természetes része. Súlyos fertőzéseket okozhatnak gyermekek és idősek körében. *Campylobacter*-t 1972-ben izoláltak először hasmenéses betegek székletéből (Dekeyser et al., 1972; Butzler et al., 1973).

Az 1970-es években kifejlesztett szelektív tenyésztési módszerek kidolgozása után egyre több laboratórium vált alkalmassá *Campylobacter* kimutatására, amely mikroba mostanra a hasmenéses ételfertőzések leggyakoribb okozói közé tartozik. *Campylobacter jejuni*-t sokkal gyakrabban izoláltak, mint *Campylobacter coli*-t. A kampilobakterek az élelmiszer mátrixon belül sporadikusan oszlanak el, ezért a kisszámú patogénsejt kimutatása egy heterogén mikrobiotában gyakran problémát okoz (Van Deun et al., 2008).

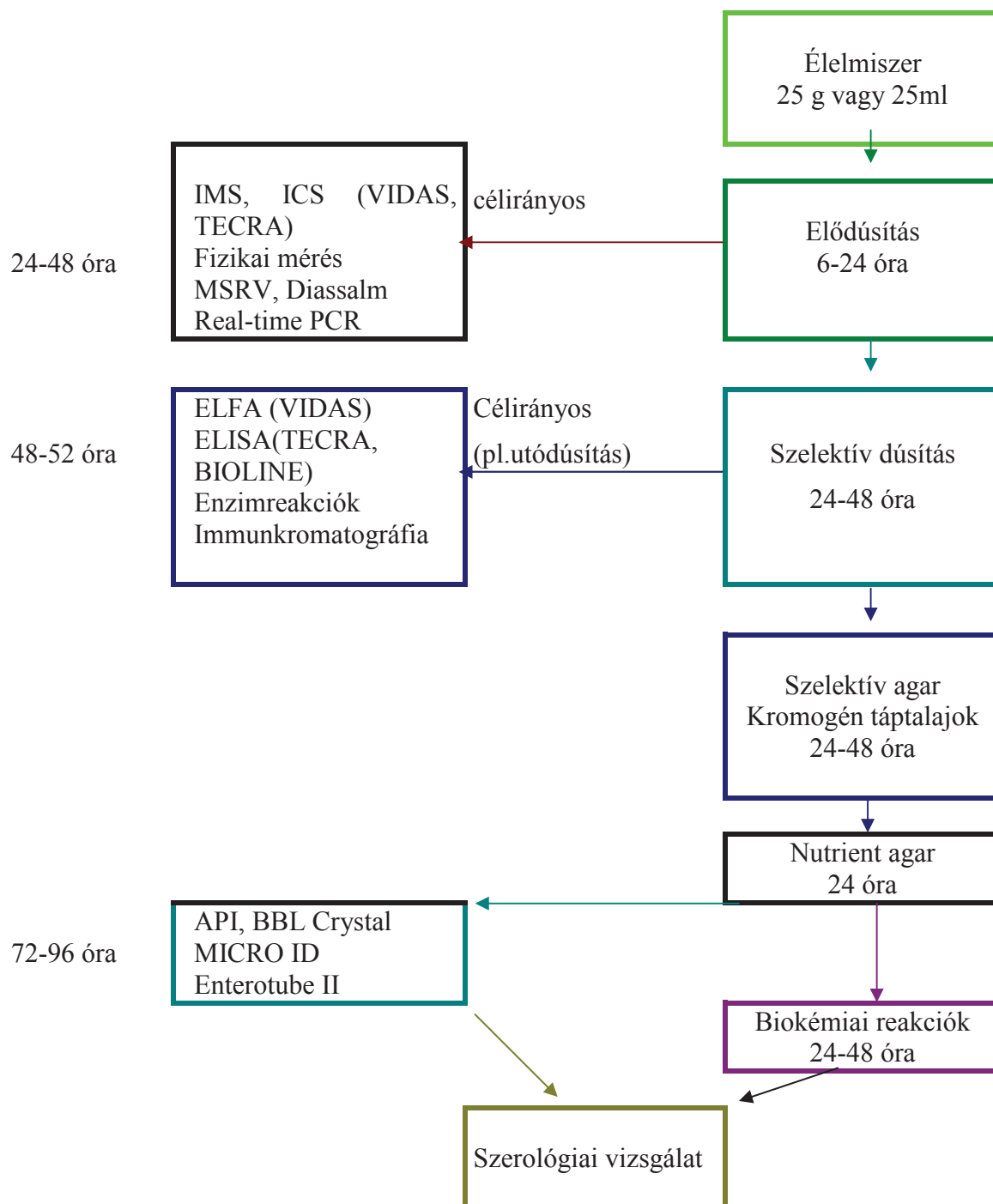
Vágott baromfi és nyerstej a kampilobakteriózis leggyakoribb forrása, de a vörös húsok és az ivóvíz is szennyezettek lehetnek *C. jejuni*-val. A madárfajok a leggyakoribb hordozói a *Campylobacter* fajoknak, valószínűleg azért, mert magasabb a testhőmérsékletük (Skirrow, 1977). Az esetek legtöbbször kapcsolatban állnak a nyers baromfi feldolgozásával, nem kellőképpen hőkezelt baromfihússal, vagy a nyersanyagok, főtt ételek kereszt-szennyeződésével (Butzler és Oosterom, 1991; Tauxe, 1997; Corry és Atabay, 2001; Nadeau et al., 2002). A kampilobakteriózis tünetei rendszerint lázat, hasi fájdalmat és véres hasmenést jelentenek. Halálos kimenetelű fertőzés ritkán fordul elő (Acheson és Allos, 2001).

Főként nyers, vagy nem kellően hőkezelt állati eredetű élelmiszerek közvetítésével okoz megbetegedést, vagy más élelmiszerek kereszt-szennyeződése révén. A nagyszámú sporadikus, *C. jejuni* okozta fertőzéshez képest a tömeges fertőzési események ritkák (Silva et al., 2011).

2.4. Patogének kimutatására szolgáló hagyományos mikrobiológiai módszerek

A patogén mikrobák hagyományos kimutatása tenyésztési módszerekkel történik. A meghatározott mennyiségű vizsgálati mintát elődúsítjuk a célpatógén számára szabványban előírt, tízszeres mennyiségű elődúsító oldatban, majd inkubáljuk a szabványban meghatározott ideig és hőmérsékleten. Az élelmiszerminták elsődleges dúsítása általában nem szelektíven történik, mivel ezzel az eljárással a szubletálisan sérült sejtek kimutathatósági esélye növelhető. Miután a mintában a keresett patogén baktérium mellett egyéb, a kísérőbióta részét képező baktériumok (romlást okozók, indikátor mikroorganizmusok és egyéb patogének) feldúsulnak egy újabb, szelektív dúsítási lépés szükséges a keresett mikroba célzott kimutatásához. A szelektív dúsítókban alkalmazott, a mikrobák növekedését gátló komponensek hatékonyságát befolyásolja az összetevők (például az antibiotikum) bármilyen szinergista vagy antagonista hatása, továbbá a vizsgált élelmiszermintá egyes komponensei is csökkenthetik a kimutatás eredményességét (Holbrook, 2000). A dúsításokat követően szelektív differenciáló táptalajokra történik a kioltás, majd a feltételezett patogén telepeket nutrient tápközegre oltjuk, mivel ez nem tartalmaz gátlóanyagot. Huszonnégy órás inkubálási idő után a telepekkel elvégezzük a biokémiai megerősítő vizsgálatokat és a szerológiai azonosítást minden feltételezetten pozitív esetben. A kórokozó mikrobák meghatározására alkalmazott vizsgálatok időigényét a *1. ábra* mutatja.

Kórokozó vizsgálatok időigénye



1.ábra : A patogén vizsgálatok időigénye

2.4.1. *Salmonella* spp. hagyományos kimutatási módszerei

Élelmiszerminták vizsgálatánál referencia módszerként a *Salmonella* kimutatásra az **MSZ EN ISO 6579:2006** szabványt használják. A minta BPW oldatban történő elődúsítását követően szelektív dúsítást végzünk kétféle, szalmonellák kimutatására használt tápoldatban (RV és MKTTn oldat), majd XLD és egy szabadon választható agar felületére szélesztünk. A feltételezeten pozitív esetben biokémiai próbákkal (1. táblázat) és szerológiai azonosító vizsgálatokkal igazoljuk a szalmonellák jelenlétét.

1. táblázat: A szalmonellák jellemző biokémiai reakciói (MSZ EN ISO 6579:2006)

Biokémiai reakció	Eredmény	Az eredmény százalékos valószínűsége
Glükóz bontás savképzéssel	+	100
Glükóz bontás sav és gázképzéssel	+	92
Laktóz- bontás	-	99
Szacharóz - bontás	-	99
Kénhidrogén képződés	+	92
Karbamid- bontás	-	100
Indol képződés	-	99
Lizin –dekarboxilálás	+	95
Voges-Proskauer -reakció	-	100
ONPG-reakció	-	99

2.4.2. *Listeria monocytogenes* hagyományos kimutatási módszerei

Élelmiszerminták vizsgálatánál *Listeria monocytogenes* kimutatásra az **MSZ EN ISO 11290-1**, szám meghatározásra pedig **MSZ EN ISO 11290-2** szabványt használják. Az **MSZ EN ISO 11290-1** szabvány szerint a minták kezdeti dúsítását feles erősségű Fraser tápoldatban, majd második dúsítását teljes erősségű Fraser dúsítóban végezzük. Szelektív Ottaviani Agosti (ALOA) agar felületére történő szélesztés és megfelelő inkubálás után értékeljük a telepeket. A feltételelesen pozitívnak ítélt telepeket biokémiai tesztekkel vizsgáljuk tovább. A *Listeria monocytogenes* Gram-pozitív vékony, rövid pálca, kataláz-pozitív, ramnóz-pozitív, xilóz-negatív. Mozgásvizsgálat ellenőrzésekor lágy agarba szúrókaccsal mély leoltást végzünk, pozitív esetben esernyő formájú növekedés tapasztalható. Végző azonosítás céljából CAMP

tesztet végzünk. Birkavéres agarra oltókaccsal ismert β -hemolizáló *Staphylococcus aureus* és *Rhodococcus equi* törzset szélesztünk. A *Listeria monocytogenes* α -hemolízise felerősíti a *Staphylococcus aureus* hemolízisét, ezért ásó alakú feltisztulás látható. A lisztériák jellemző biokémiai reakcióit a 2. táblázat mutatja.

2. táblázat: A lisztériák jellemző biokémiai reakciói (MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005)

Faj	Hemolízis	Savképzés		CAMP teszt	
		Ramnóz	Xilóz	<i>S.aureus</i>	<i>R.equi</i>
<i>L.monocytogenes</i>	+	+	–	+	–
<i>L.innocua</i>	–	V	–	–	–
<i>L.ivanovii</i>	+	–	+	–	+
<i>L.seeligeri</i>	(+)	–	+	(+)	–
<i>L.welshimeri</i>	–	V	+	–	–
<i>L.gray subs. grayi</i>	–	–	–	–	–
<i>L.gray subs. murray</i>	–	V	–	–	–
V: változó reakció (+):gyenge reakció +:Több, mint 90%-os biztonsággal pozitív reakció					
Megjegyzés: Ritkán előfordulnak olyan <i>L. monocytogenes</i> törzsek, ahol nem tapasztalható sem pozitív hemolízis, sem pozitív CAMP teszt.					

2.4.3. *Escherichia coli* O157 hagyományos kimutatási módszerei

Escherichia coli O157 hagyományos kimutatását az **MSZ EN ISO 16654:2001** szabvány írja le. Az élelmiszer mintát novobiocinnal kiegészített TSB levesben inkubáljuk, majd az *E. coli* O157 sejteket immunomágneses szeparáció segítségével elválasztjuk az elődúsított mintában lévő kísérő bióta tagjaitól. A verotoxin termelő *E. coli* baktérium a mintákban sokszor csak nagyon alacsony számban van jelen, ám ennek a módszernek a segítségével eredményes lehet a kitenyésztése. A teszt specifikus monoklonális ellenanyaggal borított gyöngyökből áll.

A gyöngyök elkeverhetők az élelmiszer szuszpenzióban. Ha a minta tartalmazza a keresett mikrobát, akkor az antigén determináns (epitop) csoportja révén hozzákötődik a gyöngy felületére rögzített antitestekhez. A vastartalmú gyöngyöket egy mágnes segítségével az edény falához lehet gyűjteni, majd a paramagnetikus gyöngy-baktérium komplexet CT-SMAC táptalajra oltva kitenyészik a kórokozó. A kórokozó végső azonosításának érdekében szerológiai vizsgálatot végzünk. Az *E. coli* O157 baktériumra jellemző biokémiai reakciókat a 3. táblázatban foglaltam össze.

3. táblázat: Az *E. coli* O157 jellemző biokémiai reakciói (Leclercq et al., 2001)

Biokémiai reakció	Eredmény	Az eredmény százalékos valószínűsége
Szorbitol- bontás	-	0
Indol képződés	+	100
MUG -reakció	-	90,9

2.4.4. *Campylobacter* fajok hagyományos kimutatási módszerei

Élelmiszerminták vizsgálatánál *Campylobacter*-ek kimutatására az **MSZ EN ISO 10272-1:2006** szabványt használják. Ennél a vizsgálatnál a mintát Bolton szelektív dúsítóban inkubáljuk, majd a feldúsított mintákat szelektív mCCDA (Módosított aktív szén-cefoperazon-dezoxikolát agar) táptalajra és egy másik *Campylobacter*-ek kimutatására szolgáló táptalajra szélesztjük, és meghatározott ideig és hőmérsékleten mikroaerofil körülmények között inkubáljuk. A *Campylobacter*-nek vélt telepeket mikroszkópos vizsgálatnak vetjük alá, ahol morfológiai azonosítást és mozgásvizsgálatot végzünk. A *Campylobacter* fajokra oxidáz-pozitívítás jellemző, ami szükségessé teszi az oxidáz-teszt elvégzését. További azonosító vizsgálatokkal eldönthető a faji azonosítás is. Ez esetben kataláz-teszt, nalidixin–sav próba, cefalotin érzékenység, hippurát hidrolízis, és indol acetát próba elvégzése is szükséges (4. táblázat).

4. táblázat: A *Campylobacter* fajok biokémiai jellemzői (MSZ EN ISO 10272-1:2006)

Azonosító vizsgálatok	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Kataláz	+	+	+	–
Nalidixin-sav	S ^a	S ^a	R/S ^b	S
Cefalotin	R	R	R	S
Hippurát hidrolízis	+	–	–	–
Indolacetát	+	+	–	+
Kulcs: +: pozitív, –: negatív R: rezisztens, S: érzékeny				
^a : A rezisztenciát a <i>C. jejuni</i> és <i>C. coli</i> is mutathatja				
^b : Érzékeny és rezisztens <i>C. lari</i> is létezik				

2.5. Miniaturizált biokémiai tesztek

2.5.1. BBL CRYSTAL

A BBL CRSTAL teszt 29 dehidratált biokémiai és enzimikus szubsztrátot tartalmaz. A módszer elve, hogy 24 órás tenyészetből veszünk le telepeket, melyet a teszthez tartozó folyadékba oltunk. Az inokulált folyadékkal megtöltjük a teszt celláit, a fedőlapot lezárjuk, majd inkubáljuk. Az ajánlott inkubációs idő elteltével a paneleket BBL Crystal Panel Viewer segítségével leolvassuk és végül az eredménylapon rögzítjük. Az eredmények kiszámításának eredményeként egy profilszám jön létre. Az azonosításhoz a kapott profilszámot és a sejt morfológiáját meg kell adni a számítógépre installált BBL Crystal ID System Electronic Codebook Software-nek. Az adatbázis segítségével leolvashatjuk az eredményt és a hozzá tartozó százalékos valószínűséget (Wauters et al., 1995).

2.5.2. API teszt

Az API teszt (BioMerieux) olyan biokémiai miniaturizált gyorsmódszer, ami kombinálhatóvá teszi a standard módszert számos különböző biokémiai teszttel. A teszt mintatartói dehidratált szubsztrátokat tartalmaznak, melyek az enzimikus reakciókat, vagy cukroknál a fermentációt demonstrálják. Huszonnégy órás tenyészetből veszünk le telepeket, melyből egy kacsnyit a teszthez tartozó folyadékba szuszpendálunk.

A tesztlap reakciótereibe buborékmentesen bemérjük az adott mennyiségű szuszpenziót. A tesztlapon található aláhúzással jelölt reakciók, amelyeket parafinolajjal kell lezárni. Az inkubálókádat lezárjuk, és inkubáljuk a használt teszt típustól függően adott ideig és hőmérsékleten. Az elbírálás színreakció alapján történik (néhány reakciónál a hozzáadott reagens segítségével). Létrejön egy analitikus profil index (a teszt neve is ebből ered) és a rendszerhez tartozó apiweb™ on-line adatbázis segítségével leolvashatjuk a meghatározás eredményét a hozzá tartozó százalékos valószínűséggel (Wauters et al., 1995).

2.6. Patogének kimutatására szolgáló alternatív mikrobiológiai módszerek

2.6.1. Korszerű új differenciáló táptalajok

2.6.1.1. Kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajok

A hagyományos tenyésztési vizsgálatokban sokféle táptalaj, tápközeg áll rendelkezésre különféle mikrobák, mikrobacsoportok élelmiszerekből való kimutatására.

Napjainkban egyre jobban előtérbe kerülnek azon táptalajok, amelyek összetételükben fogva különböző mikroorganizmusok differenciálására és szelektálására alkalmasak. Egyre inkább tért hódítanak az új generációs kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajok, melyek a növekvő mikrobák, mikrobacsoportok anyagcseretermékeivel szemmel látható reakciót adnak, különböző színű telepeket képeznek. A kromogén táptalaj alapelve, hogy a baktériumok szaporodásuk során specifikus enzimeket termelnek, melyek a táptalajban lévő egy vagy több kromogén szubsztáttal enzim-szubsztát reakcióba lépnek, melyet színváltozás követ.

Hatalmas előnyük ezen táptalajoknak a nagy specifikusság, könnyű felhasználhatóság, mely a minták értékelését gyorsítja, és így a laboratórium áteresztő képességét is növeli. Egyes esetekben egyetlen táptalajon több mikrobát, mikrobacsoportot el lehet különíteni. A kromogén táptalajok segítségével helyettesíthetünk egyes biokémiai tesztek, sőt mikrobák azonosítását is elvégezhetjük. A kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajok használata nagymértékben megkönnyíti és meggyorsítja a mikrobiológus munkáját (Zoller et al., 2011).

2.6.1.2. *Salmonella* nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalajok

- Harlequin *Salmonella* ABC (LabM)

A *Salmonella* nemzetség tagjait az *Enterobacteriaceae* család egyéb képviselőitől az általuk termelt galaktozidáz enzimek aktivitásának segítségével lehet elkülöníteni. Ez a táptalaj is ezt a tulajdonságot használja fel a *Salmonella* spp. telepek kimutatásához. A táptalaj kettős kromogén rendszert alkalmaz, hogy elkülönítse a *Salmonella* spp.-t az élelmiszer mintában jelen lévő kísérő mikrobióta tagjaitól.

Az első szubsztrát a CHE-Gal amely, a β -galaktozidáz enzim metabolizmusa során fekete telepeket képez a vas hatására. A *Enterobacteriaceae* családba tartozó legtöbb baktérium galaktozidáz-pozitív, ezért ezek a baktériumok feketék a Harlequin *Salmonella* ABC táptalajon. A másik szubsztrátot (az X-a-Gal-t) a *Salmonella*-k hidrolizálják és ezek zöld színű telepek formájában figyelhetők meg a táptalajon, így egyszerűen elkülöníthető a fekete és szinte len egyéb mikroorganizmusoktól. A *Salmonella* elkülönítésére használt táptalajok nem túl specifikusak, ezért gyakran további biokémiai és szerológiai vizsgálatokat igényelnek. A továbbfejlesztett ABC táptalajok nagymértékben csökkentik a hamis-pozitív telepek számát, amellyel időt, munkát és költséget takaríthatnak meg a laboratóriumok. (<http://www.labm.com/products/harlequin-salmonella-abc-medium>)

- ChromID™ *Salmonella* Agar (SM2) (bioMérieux)

A chromID™ *Salmonella* Agar (SM2) szelektív és differenciáló médium, amely szalmonellák kimutatására alkalmas humán és élelmiszermintákból. A táptalaj alkalmazható specifikusan a laktóz (+) pozitív szalmonellák kimutatására is. A táptalaj specifikussága a 3 féle kromogén szubsztrátnak köszönhető. Az elkülönítés során rózsaszínű telepek jelzik a Salmonellák jelenlétét az észteráz enzimnek köszönhetően, egyéb baktériumok más színnel jelennek meg a táptalajon. A szelektív összetétel gátolja a Gram-pozitív baktériumok és az élesztőgombák növekedését. (<http://www.biomerieux-usa.com/upload/chromID-Salmonella-Detection-Technical-Shee-2.pdf>)

- Compass *Salmonella* agar (Biokar)

A korábban említett táptalajokhoz hasonlóan, a Compass *Salmonella* Agar is szelektív és differenciáló tápközeg. Szelektivitását az észteráz és β -glükózidáz enzimek működése biztosítja. A kísérő mikrobióta tagjai, amelyek észteráz (+/-) és β -glükózidáz (+) sajátosságúak, a táptalajon kék színű, a *Salmonella* nemzetség tagjai észteráz (+) és β -glükózidáz (-) tulajdonságuk miatt vörös színű telepeket mutatnak. Ezzel a táptalajjal jól elkülöníthetők az atípusos szalmonellák (laktóz (+), szacharóz (+), H₂S (-), propilén glikol (-), lizin dekarboxiláz (-), glükuronát (-).

([http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/8AF14C118957DEB2C12574C90031DBBD/\\$file/TDS_BM066_v6.pdf](http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/8AF14C118957DEB2C12574C90031DBBD/$file/TDS_BM066_v6.pdf))

2.6.1.3. *L. monocytogenes* vizsgálatára használt kromogénis táptalajok

- Harlequin *Listeria* Chromogenic Agar (LabM)

Ez a tápközeg az ISO 11290-es szabványnak megfelelő táptalaj *Listeria monocytogenes* izolálására és előzetes azonosítására. A specifikus differenciálás a szabadalmazott lecitin szubsztráton alapul, amely láthatóvá teszi a foszfolipáz enzim jelenlétét. Az enzimaktivitás eredményeképpen a kérdéses telepeket egy precipitációs zóna veszi körül.

A kromogén szubsztrát és a foszfolipáz enzim reakció együttes alkalmazásával lehetővé válik a *Listeria monocytogenes* (kék telepek opálos udvarral) és a *Listeria* fajok (kék telepek opálos udvar nélkül) egyszerű elkülönítése.

(<http://www.labm.com/products/harlequin-listeria-chromogenic-agar/>)

- RAPID *L'Mono* (Biorad)

Az ALOA-hoz hasonlóan a RAPID *L'Mono* is a foszfolipáz-C (PIPLC) enzim aktivitását használja fel, ahol a pozitív reakció hatására változnak a telepek kék színűre, a fenti esetben pedig a β -D glükózidáz enzim hatására jön létre a színreakció. A táptalaj szelektivitása a LiCl, antibiotikumok és antifungicid anyagok kombinációjának köszönhető.

Specifikus a *L. monocytogenes*-re, és 24-48 órával a dúsítás után közvetlenül alkalmasak a telepek az identifikálásra.

A táptalaj működési elve a következő:

A foszfolipáz C (PIPLC), valamint a xilóz-negativitás a *L. monocytogenes*-re és a *L. ivanovii*-ra egyaránt jellemző., A többi *Listeria* faj PIPLC-negatív. A *L. ivanovii* kék telepeket képez és mivel xilóz pozitív sárga udvar látható a telepek körül. A *L. monocytogenes* telepei is kék, de udvar nem látható körülötte, mert xilóz-negatív. A táptalaj sok esetben pozitív eredményt mutat, amikor a hagyományos módszer már kudarcot vallott.

(http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/355-5294_356-3694_RLTechSheetV8_121806_US.pdf)

- Compass *Listeria* Agar (Biokar)

A Compass *Listeria* Agar *L. monocytogenes* kimutatására használt kromogén szubsztrátot tartalmazó differenciáló táptalaj. Szelektív működését annak köszönheti, hogy a *Listeria* nemzetség tagjai hidrolizálják az 5-bróm-4-klór-3-indolil- β -D-glükopiranozidot (vagy X- β -glükózid). A hidrolízis eredményeként kapott termék kék csapadékot képez a telepek közepén. Foszfátidil-inozit szubsztrátot használ a *Listeria monocytogenes*-ben jelen lévő foszfolipáz-C kimutatására. Amikor lebomlik, átlátszatlan csapadék képződik a telepek körül. A háttér mikrobióta gátlására a gyártó litium-kloridot és antibiotikum keveréket alkalmazott. (<http://www.noackgroup.com/Live/publish/templates/Resources/1/MDART/BKRBM%20123%2008/Leaflet%20Compass%20Listeria%20Agar%202009.pdf>)

2.6.1.4. *E.coli* O157 vizsgálatára használt kromogén táptalaj

- Harlequin™ SMAC-BCIG - (LabM)

Az *E. coli* O157 azonosításakor bekövetkező téves-pozitív eredmények csökkentésére fejlesztették ki e táptalajt, amely rendszerint a szorbitolt nem fermentáló *E. coli* jelenlétében fordul elő. Az *E.coli* O157 ezen a táptalajon színtelen telepeket hoz létre, míg más mikroorganizmusok rózsaszínűt, lilát, attól függően, hogy képesek-e hasznosítani a szorbitolt és a β -glükuronidot.

(<http://www.labm.com/products/harlequin-smac-bcig/>)

2.6.1.5. *Campylobacter* nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalaj

- Brilliance Campy Count Agar (Oxoid)

Ezt az új tápközeget speciálisan arra fejlesztették ki, hogy egyszerűsítsék a *C. jejuni* és *C. coli* kimutatást és számának meghatározását. A hagyományos kampilobaktériumok kimutatására szolgáló táptalajok a kísérő mikrobióta növekedését nehezen vagy egyáltalán nem képesek visszaszorítani. Ezen a táptalajon a *Campylobacter* bordó színű telepet képez, így a világos agaron nehézségek nélkül leolvasható az eredmény.

(http://www.oxoid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1185&org=43&sec=1&c=UK&lang=EN)

2.6.1.6. Szelektív és differenciáló félfolyékony tápagar

Szelektív dúsító félfolyékony tápagarak szelektivitásukat antibiotikumoknak, a mikroorganizmusok mozgásképesének lehetővé tételével, míg differenciáló képességét indikátor rendszereknek köszönhetik.

- Diagnostic Semi Solid *Salmonella* Agar (Diassalm) (LabM)

A Diassalm *Salmonella* nemzetség vizsgálatára használt differenciáló, félfolyékony, szelektív és dúsító táptalaj. Szelektivitását malachit-zöld oxalát, magnéziumklorid és novobiocin biztosítja, míg differenciáló képességét két indikátor rendszer a szacharóz-brómkrezol-zöld és a vasammóniumszulfát - nátriumtiosulfát adja. A motilis szalmonellák migrációja hatására a táptalaj közepétől a Petri csésze szélei felé a migrációs zónában a táptalaj eredeti zöld színe lilára változik. A táptalajon lehetőség van megerősítő vizsgálatok elvégzésére is. A táptalajon elhelyezett, polivalens H savóval átitatott papírkorong mentén szalmonellák jelenléte esetén jellegzetes gátlás alakul ki. A gátlási zóna szélén a biokémiai reakciók intenzívebben jelentkeznek, a kénhidrogén termelés itt jól látható. Amennyiben a vizsgálat *Salmonella* Enteritidis-re irányul, a táptalaj erre a mikrobára 0,015 g nitrofrantoinnal tehető szelektív. A vasvegyületek alkalmazása az elődúsítóban megnöveli a szalmonellák motilitását is a félfolyékony tápközegekben, a zóna átmérője több, mint kétszeresére növekszik mind a 37 °C, mind a 42 °C hőmérsékleten történő inkubálás esetén. A Diassalm táptalajon vizuálisan jól értékelhető a lila szín és mozgás alapján a feltételezeten *Salmonella* jelenlét, továbbá a migrációs zóna széli részéről közel szintenyészetben izolálható a *Salmonella* (Tabajdiné, 2003).

Lehetőség van a Diassalm táptalaj esetében MUCAP reagenssel (4-methyl-umbelliferyl caprylate) (Biolife) történő megerősítő vizsgálat elvégzésére, amely a C8 észteráz reakción alapul. A reagensből 10 µl-t csöppentve a motilitási zónára, 365 nm hullámhosszú UV fényben a csöppentés helyén fluoreszkál *Salmonella* jelenléte esetén (Pless és Reissbrodt et al., 1995; Rohonczy et al., 2007).

2.6.2. Immunológiai módszerek

2.6.2.1. ELISA módszer

Az ELISA (Enzyme- Linked ImmunoSorbent Assay) módszer egy indirekt szendvics immunvizsgálati módszer, amely a célantigének kvalitatív kimutatására alkalmas, néhány óra alatt kivitelezhető, kevésbé eszközigényes módszer.

Sokféle ELISA teszt került kereskedelmi forgalomba. A vizsgálat elvégezhető elődúsítóból, elődúsítást követő szeparálás után, szelektív dúsítást követően, utódúsítóból, vagy közvetlenül sejtenyészetből. Az ELISA módszernél az a legfontosabb, hogy a kimutatáshoz szükséges, általában 10^7 sejt/ml sejtsűrűséget elérjük .

Amennyiben a mintában jelen van a keresett antigén, kialakul az antigén-antitest komplex és a mintában levő antigén leköti a szilárd fázishoz. A mosást követően a vájatokba ellenanyaggal konjugált enzimet mérünk (ún. konjugátum). Ha a mintában jelen volt a patogén antigénje, az enzimkapcsolt ellenanyag specifikusan kötődni tudott hozzá. A lekött enzimek mennyisége és összaktivitása arányos a kialakult immunkomplex mennyiségével. Újabb mosás után az enzimaktivitást kromogén szubsztátoldat hozzáadásával határozzuk meg, amely az enzim hatására színes terméké alakult.

A bemért kontrollok és a minták abszorbanciáját (OD-értékét) 450/620 nm hullámhosszon olvassuk le, majd a tesztleírásnak megfelelően kiértékeljük a kapott eredményeket (Lequin, 2005).

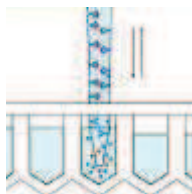
2.6.2.2. ELFA módszer (VIDAS bioMerieux)

A VIDAS technológia több paramétert képes teljesen automatikusan, immunológiai módszerrel meghatározni.

A módszer elve:

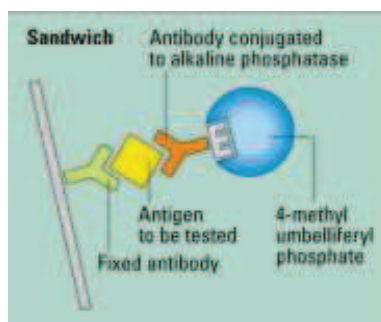
- A nagy érzékenységgű, célmikrobára specifikus befogó monoklonális antitestek egy, a készülékben elhelyezett pipettahegy (SPR= Solid Phase Receptacle) felületére vannak adszorbeálva.

- A mintatartó küvettából a minta a pipettahegybe cirkulál a szükséges reakció ideig. Amennyiben jelen vannak a keresett antigének a mintában, ezek specifikusan reagálnak a kötött antitestekkel (2. ábra).



2. ábra: Az antigéncsapda működése (BioMerieux)

- A minta visszakerül a küvettába, majd az SPR mosási lépése következik.
- A következő munkafázisban specifikus, alkalikus foszfátazzal jelzett antitest (konjugátum) cirkulál az SPR-ben. Hatására egy komplex ("szendvics") molekula keletkezik (3. ábra).



3. ábra: A második antitest és a konjugált enzim hozzákötődik a rögzített antigénhez (BioMerieux)

- A nem kötött konjugátum egy további lépésben mosással eltávolításra kerül, majd szubsztrátként 4-metil-umbelliferil-foszfát cirkulál az SPR-ben. Az alkálikus foszfátáz hidrolizálja a szubsztrátot és egy fluoreszkáló vegyület (4-metil-umbelliferon) keletkezik. A fluoreszcenciát 450 nm-en méri a készülék.

Ha a mintában nincs jelen a keresett antigén, akkor a készülékben mért fluoreszcenciás jel értéke < 0.05)

Az elemző modul a vizsgálat minden szakaszában automatikusan elvégzi a lépéseket, az eredmény kinyomtatását is beleértve. A készülék minden egyes termosztát blokkja 6 mintatar-

tó csík (strip) befogadására alkalmas, amelyeket egy időben képes kezelni. A miniVIDAS azonos időben blokkonként különböző patogének vizsgálatára alkalmas (4.ábra).



4. ábra: MiniVIDAS készülék (BioMérieux)

Új generációs ELFA technika (LMO2)

Az elsődleges különbség az első generációs és a második generációs protokollok közt az anti-testek javítása. Az első generációs vizsgálatok az egyenes antigén-antitest kölcsönhatás fenn-tartását vették alapul és poliklonális antitesteket használtak. A második generációs tesztekben kifinomultabb monoklonális antitesteket alkalmaznak, amelyek továbbra is széleskörűen biz-tosítják az antitestek kötődését, de mellette a célantigének nagyobb specifitására is hang-súlyt fektetnek.

A bioMérieux cég által fejlesztett korszerű ELFA technológia és az új antitestek használatával lehetőség nyílik az immunológiai kötődés és detektálás optimalizálására. Az IgG papainnal történő emésztése során a molekula három fragmentumra esik szét. Ezek közül két fragmen-tum egyforma méretű, nehéz és könnyű láncot egyaránt tartalmaz, és antigénkötő hellyel ren-delkezik (Fab fragmentumok). A harmadik fragmentumnak, amely csak a nehéz láncot tartal-mazza, antigénkötő helye nincs (Fc fragmentum). Az új eljárás eltávolítja a tapadó Fc frag-mentumokat, ezáltal az antitest – enzim konjugátum kapcsolat jelentős mértékben stabilizáló-dik.

Az Fc fragmentumok eltávolításával csökkenthető az élelmiszer mátrixból és más baktériu-mok nem-specifikus kötődéséből adódó interferencia, amelyek hatására hamis jelek keletkez-nek. Ennek eredményeként a módszer specifitása növekszik.

A két kisebb antitest Fab fragmentum optimalizált elhelyezkedése támogatja az antigén kötődését, ezáltal javul a módszer érzékenysége.

Új generációs ELFA technika (VIDAS UP)

VIDAS UP *E. coli* O157:H7

A fágok baktériumokon élősködő vírusok, amelyek kizárólag baktériumokat támadnak meg.

A fágok szaporodási ciklusában a legfontosabb fázis a gazda szervezet szelektív felismerése és a specifikus fehérjék kötődése a gazda baktériumokhoz.

A bakteriofág csak a gazda szervezettel együtt képes fejlődni, ezért fejlett, nagy érzékenységgű gazdasejt felismerési mechanizmussal rendelkezik.

A fág kutatás reneszánszát éli. Gyógyászati, élelmiszeripari felhasználás mellett a mikrobiológiai diagnosztikában is új lehetőséget teremtett.

A baktériumok kimutatási módszereinek fejlesztésében a fágok fajspecifikus fehérjéi biztosítanak lehetőséget.

A fajspecifikus fehérje előállítási folyamat lépései:

- a kérdéses patogénre specifikus fág keresése és azonosítása
- a fehérje sokszorozítása
- klónozás
- a rekombináns fehérje előállítása és tisztítása
- a rekombináns fehérje jelölése

A fág rekombináns fehérje technológiát a Profos AG biotechnológiai cég fejlesztette ki, a bioMérieux pedig ezt a technikát integrálta a VIDAS élelmiszer eredetű patogén kimutatási módszerrel.

Ez a rekombináns fág fehérje speciális és érzékeny eszköz a megfelelő élelmiszer patogén befogására és detektálására; kiküszöböli az élő fág esetleges mutációjából eredő veszélyeket.

A módszer előnyei:

- A rekombináns fág protein használatának köszönhetően érzékeny.
- A specifitásnak köszönhetően a pozitív eredmény alapján megbízható döntés hozható.
- Optimalizált protokoll (reagens és laborköltség csökkenés).
- Nagyon alacsony szennyezettségi szint detektálható
- Gyors (hét órán belül kaphatunk eredmény).

A VIDAS UP *E. coli* O157:H7 a fág rekombináns fehérje technológiát az ELFA technológiával ötvözi, amely eredményeként egy könnyen kezelhető gyors módszer áll a modern mikrobiológiai laboratóriumok rendelkezésére (Tabajdiné et al., 2009).

2.6.2.3. Tárgylemez-agglutináció

A tárgylemez-agglutináció a baktériumok szerológiai azonosítására használt immunológiai próba. A baktériumsejt számos szerkezeti eleme (sejtfal, tok, csilló) antigén tulajdonsággal rendelkezik, így vizes közegben, specifikus ellenanyag jelenlétében szabad szemmel könnyen megfigyelhető agglutináció alakul ki. Egy steril tárgylemezre egy csepp az adott antigén ellen termelt savót cseppentünk és az egynapos tiszta baktérium tenyészetből származó telepeket egy steril kacs segítségével felszuszpendáljuk. Amennyiben az agglutinációs teszt pozitív, a tárgylemezen másodperceken belül csapadékképződés figyelhető meg (Mohr és Pollex, 1998).

2.6.3. Molekuláris biológiai módszerek

2.6.3.1. Polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction - PCR)

A polimeráz láncreakció kifejlesztése Kary Banks Mullis nevéhez fűződik (Mullis et al., 1986). A PCR által, egy egyszerű elven alapuló technikával bővült a molekuláris biológia eszköztára. A korábban alkalmazott molekuláris biológiai módszerek munka- és időigényesek voltak, valamint magas technikai szaktudást igényeltek (Maráz et al., 2006).

A PCR módszer ciklikus, *in vitro*, enzimkatalizált, DNS-szintetizáló eljárás, amely lehetőséget teremtett arra, hogy kimutatható szintre növeljék a vizsgálni kívánt DNS-szakaszt (Mullis et al., 1986).

Egy meghatározott DNS szakasról viszonylag rövid idő alatt nagy számú másolat készíthető, két specifikus szekvenciájú oligonukleotid primer és egy DNS-polimeráz enzim segítségével.

A reakció lépései:

1. A duplaszálú templát DNS szálait hődenaturációval elválasztjuk egymástól.
2. A hőmérséklet csökkentésével lehetővé tesszük a primerek templát DNS-hez kapcsolódását (annealing).
3. A polimeráz enzim az egyszálúvá denaturált templáthoz kapcsolódó primerek végeit meghosszabbítja (elongáció) és közben elkészíti a templát DNS kiegészítő szálát.

Ha a denaturációs annealing és elongációs lépést ismétljük, a polimeráz az újonnan elkészített szálakat is templátként használja, és így a keletkezett DNS mennyisége exponenciálisan növekszik (Innis és Gelfand, 1990; Hayden, 2004).

A PCR reakció során az exponenciálisan felsokszorozott DNS agaróz vagy poliakrilamid-gélen mutatható ki, interkalálódó DNS festék (etidium-bromid) segítségével (Dezső és Nagy, 2005).

A hagyományos PCR használata a kutató laboratóriumokkal szemben nem terjedt el a rutin mikrobiológiai vizsgálatok területén az agaróz vagy poliakrilamid-gél hosszadalmas előkészítése, valamint az etidium-bromid festék karcinogén és mutagén hatása miatt. Az igazi áttörést a nagy mintaszámmal dolgozó rutin laboratóriumok számára a real-time PCR készülékek megjelenése jelentette. A real-time PCR protokollok mindegyikéről elmondható, hogy felhasználóbarát és nem igényel egészségi állapotot súlyosan veszélyeztető, bonyolult, előkészítési lépéseket ellentétben a hagyományos PCR eljárásokkal.

2.6.3.2. Real-time PCR

A valós idejű, real-time PCR-készülékek kifejlesztésével lehetőség nyílt az amplifikációs görbék, az úgynevezett PCR-kinetikai görbék felvételére (Higuchi et al, 1992).

A real-time PCR berendezések segítségével ciklusról ciklusra nyomon követhető a végtermék felsokszorozódása. A valós idejű detektálás fluorimetriás úton történik. A real-time PCR reakcióhoz szükség van egy olyan festékre vagy próbára (SYBR Green I fluoreszcens DNS-festék, TaqMan próba, vagy Skorpion próba), amely jelzi, hogy éppen mennyi DNS szál van a reakció elegyben. A fluoreszcens jelet detektálva minden ciklus végén mérhetjük a képződött DNS mennyiségét. A real-time PCR-készülékek megjelenésével nemcsak kvalitatív, hanem kvantitatív információhoz is juthatunk a vizsgálni kívánt nukleinsavat illetően (Bernard és Wittwer, 2002).

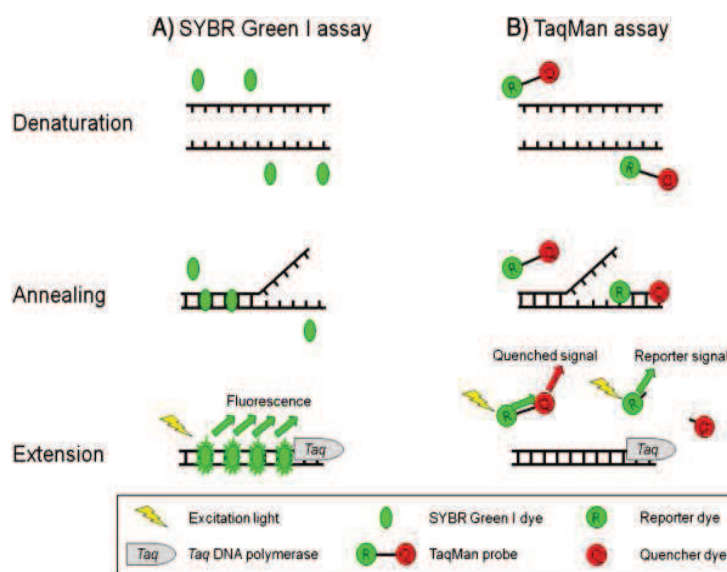
TaqMan próba

A TaqMan *Salmonella enterica* Kit (Applied Biosystems) úgynevezett TaqMan próbával működik. A próbapár két különböző fluoreszcens festékkel a PCR termékhez hibridizál a szekvencián belül. Amikor a két jelzés közel van egymáshoz, azaz ép próbákban, az egyik festék (reporter) által emittált fluoreszcens fényt a próba másik végéhez kapcsolt festék (quencher) képes elnyelni (Holland et al., 1991). A TaqMan próba működését a 5. ábra mutatja be.

SYBR Green I

A *Campylobacter*-ek vizsgálatánál egy úgynevezett SYBR Green I festéket használtam. Ez a festék a kétszálú DNS-hez képes kapcsolódni, és minden ciklus végén mérve, a keletkezett

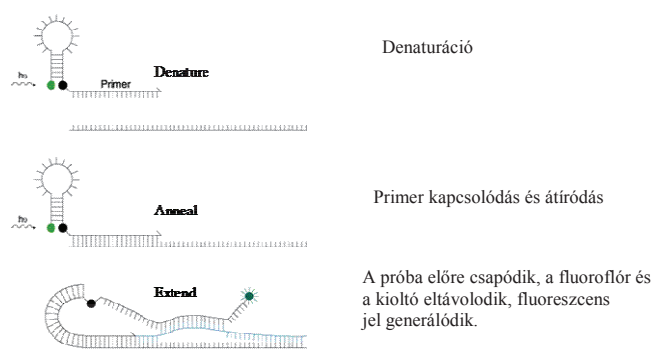
termék aktuális mennyiségével arányos jelet ad. Előnye még ennek a real-time PCR módszernek, hogy az amplifikáció végén olvadási görbék felvételével pontosan ellenőrizhető a specifikus termék jelenléte, így könnyen optimálható az eljárás. PCR alkalmazása igen elterjedt az orvosi diagnosztikában, genetikai betegségek kimutatásában, fertőzést okozó, patogén mikroorganizmusok detektálásában, igazságügyi orvosi vizsgálatoknál. Ennél a vizsgálatnál gondot okozhat, ha a primerek esetleg szekvenciájukból adódóan primer-dimereket képezhetnek, amely hamis eredményekhez vezethet (Ponchel et al., 2003). A SYBR Green I működését a 5. ábra mutatja be.



5. ábra: A SYBR Green I és a TaqMan próba működési elve (Kim, 2013)

Skorpion próba

A BAX[®] System PCR assay for *Salmonella* (DuPont, Qualicon) rendszer a Skorpion próbát alkalmazza. Ebben az esetben a próba tartalmaz egy primer régiót és egy 5'véget is. A próba működését a 6. ábra mutatja. A kereskedelmi forgalomban kapható automatikus BAX-PCR rendszer csökkenti az átfutási időt (beleértve az éjszakai dúsítási lépést) körülbelül 24 órára (Bailey és Cosby, 2003). A BAX rendszer leegyszerűsíti és megkönnyíti a *Salmonella* élelmiszerekből történő laboratórium kimutatását. A PCR reakcióhoz szükséges reagenseket (primerek, DNS-polimeráz, nukleotidok, a belső pozitív kontroll, és fluoreszcens festéket) a reakciócsőben elhelyezett liofilizált tabletta tartalmazza. Ez hatékonyan csökkenti a reagensek átviteli idejét, segít megelőzni az esetleges mérési pontatlanságból adódó hibákat és a kereszt-szennyezést. A BAX rendszer automatizált fluoreszcens detektálással, kiküszöböli az idő és munkaigényes gélelektroforézist. (Bailey és Cosby, 2003; Cheung et al., 2007)



6. ábra: A Skorpion próba működése (Lockley és Bardsley, 2000)

3. CÉLKITŰZÉSEK

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.

Az időigényes, hagyományos tenyésztési eljárásokkal a kimutatás időtartama akár 5 vagy annál is több napot vehet igénybe.

A kórokozók kimutatására az elmúlt időkben igen sokféle eljárást próbáltak a szabványos, hosszú és költséges munkafolyamat rövidítésére. A laboratóriumba kerülő gyors mikrobiológiai módszerek bevezetéséhez összehasonlító vizsgálatok elvégzése szükséges. Ezen mérési eredmények alapján kiválaszthatók a laboratórium optimális működéséhez legmegfelelőbb módszerek.

Az akkreditált laboratóriumban használt alternatív vizsgálati módszereket, a saját kifejlesztésű módszereket, működési területen kívül eső szabványos módszereket, szabványos módszerek kiegészítéseit, módosításait laboron belül vagy nemzetközi validáló szervezetek (AOAC, AFNOR, MICROVAL) által validálni kell. A validáló testületek által nem vizsgált mátrixokra irányuló vizsgálatok a működési területen kívüli kategóriába sorolandók, ezért ezeknél a mintáknál is házon belüli validálást végzünk az MSZ EN ISO 16140 szabványa szerint.

Célul tűztem ki az élelmiszer-biztonsági szempontból fontos, leggyakrabban előforduló, megbetegedést okozó baktériumok/fajok élelmiszerekből történő kimutatására szolgáló korszerű módszerek összehasonlító elemzését, és az ISO 16140 szabvány szerinti értékelését abból a célból, hogy rutin diagnosztikai laboratóriumi felhasználás biztonságát igazoljam.

Az alternatív mikrobiológiai módszerek kiválasztásánál a megfelelő relatív érzékenység, specifitás, pontosság értékek mellett mátrix hatás előfordulását, a napi mintaszámot, a rendelkezésre álló vizsgálati időt, az automatizáltságot, az adattárolás, az adatelemzés lehetőségét, a szerviz gyorsaságát és végül a vizsgálati költséget is az elemzés tárgyává kívánom tenni. Természetesen ezen szempontok mellett fontos kritérium volt, hogy a dolgozat készítés idejében milyen táptalajokhoz, műszerekhez és reagensekhez lehetett hozzájutni Magyarországon.

A megvalósítás fő lépései:

1. A rendelkezésünkre álló korszerű gyorsmódszerekkel és szabványos módszerekkel kapott eredmények összehasonlítása élelmiszer eredetű megbetegedést okozó *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 és termotróf *Campylobacter* esetén.

Alkalmazott alternatív mikrobiológiai diagnosztikai módszerek:

- Kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajok
 - Immunológiai vizsgálati módszerek
 - Molekuláris mikrobiológiai vizsgálati módszerek (real-time PCR)
2. Az alternatív diagnosztikai módszerek teljesítmény jellemzőinek összehasonlítása a nemzetközi szervezetek által mért adatokkal, és meghatározása az attól eltérő mátrixok esetén az MSZ EN ISO 16140 szabványa alapján.
 3. Az élelmiszermátrix hatásának elemzése a különböző vizsgálati módszerekre.
 4. Dúsítások vezetésének optimalizálása.
 5. Vizsgálati módszerkiválasztás, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra.

4. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

4.1. Hagyományos tenyésztési eljárások

4.1.1. *Salmonella* vizsgálat tenyésztési módszerrel

Salmonella tenyésztési vizsgálathoz felhasznált anyagok:

Elődúsító:

- Peptonvíz (pufferolt)(BPW); az ISO 6579 szerint (Merck 1.07228)

Szelektív dúsítók:

- Rappaport Vassiliadis *Salmonella* dúsító tápleves (RVS) (Merck 1.07666)
- MKTTn (LAB 202)

Nem szelektív táptalaj:

- TGE agar (Merck 1.10128)

Szelektív táptalajok

- XLD agar (Merck 1.05287)
- Diagnostic Semi Solid *Salmonella* Agar (Diassalm) (LabM LAB 537)

Megerősítéshez használt tápközegek:

- *Lysine* iron agar (Merck 1.11640)
- Tryptonvíz (Merck 1.10859)
- Urea broth (Merck 1.08483)
- Triple Sugar Iron Agar (Merck 1.03915)
- ChromoCult® Coliform Agar (Merck 1.10426)
- BBL™Crystal™ Enteric/Nonfermenter ID Kit (Becton Dickinson Microbiology System BD 245000)

Megerősítéshez használt reagens:

- Kovács-féle indol reagens (Merck 1.09293)

Tárgylemez agglutinációhoz alkalmazott savók :

- Enteroclons Anti-*Salmonella* I (A - E) + Vi (Sifin TR 1111)
- Enteroclons Anti-*Salmonella* (A - 67), omnivalent (Sifin TR 1101)

Salmonella vizsgálat menete tenyésztési módszerrel (MSZ EN ISO 6579:2006)

Az élelmiszer minta 25 g -jához steril körülmények között 225 ml BPW (Merck) elődúsítót adagoltam, majd inkubáltam 37 °C-on 24 óráig. Az elődúsított mintából 100 µl-t 10 ml RVS (Merck) szelektív dúsítóba pipettáztam és 42 °C-on 24 óráig inkubáltam, továbbá 1 ml-t 9 ml MKTTn szelektív dúsítóba pipettáztam és 37 °C-on 24 óráig inkubáltam. A szelektív dúsítók-ból kacsával szelektív XLD agar felületére szélesztettem, a lemezeket 24 órán keresztül 37 °C-on inkubáltam, illetve Diassalm (LabM) esetében a szelektív dúsító oldatból 100 µl-t a félfolyékony táptalaj közepére adagoltam, ezután a lemezeket 24 órán keresztül 42 °C-on inkubáltam. Diassalm táptalaj esetén a jellemző növekedést mutató lemez pereméről kacsos szélesztést végeztem XLD agarra, majd 37°C-os inkubátorba helyeztem 24 óráig. A típusos telepekből minden esetben a TGE agar felületére tisztító szélesztést végeztem és 37 °C-on 24 óráig inkubáltam. A különálló telepekből elvégeztem a biokémiai megerősítő vizsgálatokat, ehhez a szabvány szerinti klasszikus megerősítő vizsgálatokat és/vagy BBL Crystal miniaturizált biokémiai tesztet alkalmaztam. Feltételezetten *Salmonella* pozitívnak ítéltam a glükóz-pozitív, szacharóz-negatív, laktóz-negatív, H₂S-pozitív, ureáz-negatív, indol-negatív, ONPG- negatív tenyészeteket, illetve a BBL profilszám alapján *Salmonella*-nak ítélt telepeket.

A biokémiai tesztekkel pozitív minták egy napos ferde TGE agar tenyészetéről elvégeztem végső azonosítás céljából a tárgylemez-agglutinációt.

A vizsgálat kezdeti lépéseként kizártam az autoagglutinációt. Ennek érdekében, egy tárgylemezre egy csepp steril desztillált vizet cseppentettem és steril kacs segítségével kis mennyiségű baktérium-tenyészetet szuszpendáltam el benne, majd egy perc elteltével agglutinációra vizsgáltam. A tárgylemezen rögzépződést mutató törzsek szerológiai próbákra alkalmatlanok. A vizsgálat során a tárgylemezre cseppentettem egy csepp specifikus ellenanyag tartalmú agglutináló savót, majd steril kacs segítségével kis mennyiségű baktérium-tenyészetet szuszpendáltam fel benne. A meghatározást először polyvalens, Enteroclon Anti-*Salmonella* I (A - E)+Vi savóval végeztem el, majd negatív reakció esetén omnivalens, Enteroclon Anti-*Salmonella* (A - 67) savóval is megismétltem vizsgálatot. Ha két savóval végzett reakció egyikénél rögzépződés figyelhető meg, akkor a mintát *Salmonella* pozitívnak tekintettem. Ha mindkét esetben negatívnak ítéltam a tárgylemez agglutinációk eredményét, akkor a minta *Salmonella* negatív értékelést kapott.

4.1.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálat tenyésztési módszerrel

Listeria monocytogenes tenyésztési vizsgálatához felhasznált anyagok:

Dúsító oldatok első dúsításhoz:

- FRASER *Listeria* Selective Enrichment Broth (bázis) (Merck 1.10398)
- FRASER *Listeria* ammónium-vas(III) kiegészítő (Merck 1.00092)

Dúsító oldat szelektív dúsításhoz:

- FRASER *Listeria* Selective Enrichment Broth (bázis) (Merck 1.10398)
- FRASER *Listeria* szelektív kiegészítő (Merck 1.00093)

Szelektív táptalajok:

- *Listeria* szelektív agar OTTAVIANI és AGOSTI szerint (ISO 11290) (Merck 1.00427)

Nutrient táptalaj:

- *Columbia* agar (bázis) (Merck 110455); 5% defibrinált birkavérrel kiegészítve
- TGE agar (Merck 110128)

Megerősítéshez használt tápközegek és oldatok:

- *Columbia* agar (bázis) (Merck 110455); 5% defibrinált birkavérrel kiegészítve
- H₂O₂ oldat
- Ramnóz tápoldat (Sigma Aldrich 8057 Fluka)
- Xilóz tápoldat (Becton Dickinson Microbiology System BD 221705)

Gram-festéshez használt oldatok:

- Gram-féle kristályibolya oldat (Merck 1.09218)
- Etanol 70%
- Lugol - oldat (Merck 1.00567)
- Gram-féle safranin oldat (Merck 1.09217)

Listeria monocytogenes vizsgálat menete (MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005)

Az élelmiszer minta 25 g-jához steril körülmények között 225 ml feles erősségű Fraser (MERCK) elődúsítót adagoltam, majd inkubáltam 30°C-on 24 óráig. Az elődúsított mintából 100 µl-t 10 ml teljes erősségű (MERCK) szelektív dúsítóba pipettáztam és inkubáltam 37°C-on 48 óráig. A szelektív dúsítóból kacsával szelektív OTTAVIANI AGOSTI (ALOA) agar felületére szélesztettem, ezután inkubáltam a lemezeket 24-48 órán keresztül 37°C-on. A típusos telepekből (8. ábra) TGE agar (MERCK) felületére tisztító szélesztést végeztem és inkubáltam 37°C-on 24 óráig. A különálló telepekből elvégeztem a biokémiai megerősítő vizsgálatokat az MSZ EN ISO 11290 szabványban leírtak szerint. Az ALOA agaron a *Listeria monocytogenes*-re jellemző telepek morfológiáját a 7. ábra mutatja.



7. ábra: *L. monocytogenes* telepek ALOA agaron

Feltételeztem *Listeria monocytogenes* pozitívnak tekintettem a Gram-pozitív vékony, rövid pálcák, kataláz-pozitív, ramnóz-pozitív, xilóz- negatív tenyészeteket.

4.1.3. *E. coli* O157 kimutatása tenyésztési módszerrel

E. coli O157 tenyésztési vizsgálatához felhasznált anyagok:

Dúsító oldat:

- mTSB-Broth Novobiocinnal kiegészítve (Merck 109205)

Szelektív táptalajok:

- SMAC agar bázis (Merck 109207)
- CT-Supplement (Merck 109202)

Nem szelektív táptalaj

- TGE agar (Merck 110128)

Megerősítéshez használt tápközegek és oldatok:

Indol reakcióhoz felhasznált anyagok:

- Kovács-féle indol reagens (Merck 109293)
- Tryptonvíz (Merck 110859)

Tárgylemez agglutinációhoz használt savó:

- ANTI-COLI O157: (K-) (SIFIN TR 2218)

E. coli O157 vizsgálat menete tenyésztési módszerrel (MSZ EN ISO 16654:2001)

Steril körülmények között 25 g-ot bemértem a mintából és 225 ml 42 °C-ra előmelegített mTSB + Novobiocin dúsító oldatot (Merck) adagoltam hozzá, majd inkubáltam 24 óráig 42°C-on. Az inkubációt követően a mintából oltókacs segítségével CT-SMAC (Merck) felületére szélesztettem és a lemezeket aerob körülmények között 37°C-on 24 órán át inkubáltam. Az *E. coli* O157 telepeket TGE agarra szélesztettem tovább és inkubáltam 37°C-on 24 óráig. A tiszta tenyészetekből elvégeztem a biokémiai vizsgálatot és az indol reakciót a szabványban leírtak szerint. Trypton vízbe oltottam a feltételeken pozitív telepeket és 24 óráig 37°C-on inkubáltuk, majd 1 ml Kovács reagenst cseppentettem az inokulált tápközeghez és szobahőmérsékleten 10 percig állni hagytam. A felső zónában keletkező piros színű gyűrű pozitív, a sárgás barna gyűrű indol-negatív reakciót jelzett. A kitenyésztett izolátumok alkalmasak voltak arra, hogy tárgylemez agglutináló savóval meghatározzuk az O antigénjüket. A SMAC táptalajról egy napos inkubáció után elvégezhető a tárgylemez-agglutináció is. A vizsgálat során steril tárgylemezre cseppentettem egy csepp specifikus ellenanyag tartalmú agglutináló savót, majd steril kacs segítségével kis mennyiségű baktérium-tenyészetet szuszpendáltam el benne. A jól látható agglutináció néhány másodperc múlva alakult ki.

4.1.4. *Campylobacter* nemzetség kimutatása tenyésztési módszerrel

Campylobacter nemzetség tenyésztési vizsgálatához felhasznált anyagok

BOLTON szelektív dúsító:

- Bolton Broth (OXOID CM0983)
- Bolton Broth Selective Supplement (OXOID SR0183)

PRESTON szelektív dúsító:

- Nutrient Broth No.2 (OXOID CM0067)
- Preston *Campylobacter* Selective Supplement (OXOID SR0117)
- Modified Preston *Campylobacter* Selective Supplement (OXOID SR0204)

Elődúsítóhoz adagolt vér:

- 5% v/v Lysed Horse Blood (OXOID SR0048)

Táptalajok:

- *Campylobacter* Selective Blood Free Agar (CCDA) (OXOID PO0119)
- *Campylobacter* Blood-Free Selective Agar Base (OXOID CM0739)

- CCDA Selective Supplement (OXOID SR0155)
- *Campylobacter* Agar Base (OXOID CM0689) és 5% v/v Lysed Horse Blood (OXOID SR0048)

Biokémiai vizsgálat:

- Oxidáz teszt (Merck 1.13300)

Campylobacter spp. vizsgálat menete (MSZ EN ISO 10272-1:2006)

A mintából 25 g-ot vagy 25ml –t bemeztem steril zacskóba, majd 225 ml *Campylobacter* dúsító oldatot mértem rá és aerob körülmények között inkubáltam 4-6 órán át 37 °C-on, majd 41,5 °C-on 48 órát. Mintánként négy párhuzamos vizsgálatot végeztem, négy különböző *Campylobacter* dúsító oldat alkalmazásával (Bolton, Bolton vérrel kiegészítve, Preston illetve Preston dúsítót vérrel kiegészítve). A feldúsított mintákat szelektív mCCDA táptalajra, Brilliant Campycount agarra és Columbia véres táptalajra szélesztettem és 41,5 °C-on 48 óráig mikroaerofil körülmények között inkubáltam. Az eredményeket 0, 6, 24 és 48 óra időpontokban leolvastam. Ezzel párhuzamosan elvégeztem a minták qPCR vizsgálatát. A jellegzetes feltételezeten *Campylobacter* telepeket tovább szélesztettem Columbia véres agarra és inkubáltam 41,5 °C-on 24-48 óráig mikroaerofil körülmények között. Ezeket a telepeket mikroszkópos eljárással vizsgáltam tovább, ahol morfológiai azonosítást és mozgásvizsgálatot végeztem. A *Campylobacter* fajokra oxidáz pozitívítás jellemző, ennek igazolására oxidáz-tesztet végeztem. Az oxidáz teszthez gyári csíkot (Merck 1.13300) használtam, az oxidáz reagenssel átitatott szűrőpapírra egy 24 órás telepet vittem fel kaccsal és a színreakció alapján értékeltem az eredményt a teszthez mellékelt színskála segítségével. Az eredmény megerősítéséhez negatív és pozitív kontrollt is használtam. További azonosító vizsgálatként a feltételeken pozitív telepeket multiplex PCR módszerrel vizsgáltam tovább (Denis et al.,1999).

4.2. Patogén mikroorganizmusok kimutatására alkalmazott kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok

4.2.1. *Salmonella* nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalajok

- Harlequin *Salmonella* ABC (LabM HAL001)
- ChromID™ *Salmonella* Agar (SM2) (bioMerieux 43 621/ 43 629)
- Compass *Salmonella* agar (Biokar BM06608)

4.2.2. *L. monocytogenes* vizsgálatára használt kromogén táptalajok

- Harlequin *Listeria* Chromogenic Agar (LabM HAL010)
- RAPID *L'Mono* (Biorad 356 3694)
- Compass *Listeria* Agar (Biokar BM12308)

4.2.3. *Campylobacter* nemzetség vizsgálatára használt kromogén táptalaj

- Brilliance Campy Count Agar (Oxoid PO5305A)

4.3. Immunológiai módszerek patogén mikroorganizmusok kimutatására

4.3.1. *Salmonella* nemzetség kimutatására alkalmas immunológiai eljárások

VIDAS[®] Immuno- Concentration *Salmonella* II (ICS2)

A VIDAS[®] Immuno- Concentration *Salmonella* II (ICS2) teljesen automatizált rendszer, amely élelmiszerből- és környezeti mintákból szalmonellák dúsítására alkalmas VIDAS[®] készülékben használt teszt.

A VIDAS[®] Immuno- Concentration *Salmonella* II (ICS2) kit tartalma:

- ICS2 csík: Felhasználásra kész
- ICS2 SPR: Felhasználásra kész. Az SPR[®] felszíni antigének elleni ellenanyagokkal van bevonva.
- ICS2 Standard (S1)
- 1MLE (etalon sarzs beviteli, Master Lot Entry) kártya.

A méréshez felhasznált egyéb reagensek:

- Pufferolt pepton víz (BPW)
- RVS leves
- M-leves (Merck 110658)

Vizsgálat menete:

25g mintát aseptikus körülmények között steril zacskóba mértem és 225 ml BPW oldatot adagoltam rá és inkubáltam 24 órán át 37°C-on.

Az immunszeeparálási eljárást az elődúsítási lépés után alkalmaztam. Az 24 órán át inkubált BPW dúsítóból a szobahőmérsékletre előmelegített ICS2 csík mintatartó küvettájába adagoltam 800 µl-t. Mérésenként egy standard mintát is használni kell (S1). A csíkokat a készülékbe helyeztem és a gyártó útmutatója alapján elvégeztem a mérést. A mérés végeztével az ICS2 csík utolsó küvettájából a teljes mennyiséget áthelyeztem pipetta segítségével M- levesbe és 5-6 órára 41.5°C-os inkubátorba helyeztem.

VIDAS[®] SLM

A VIDAS[®] *Salmonella* (SLM) a VIDAS[®] készülékben használt kvalitatív teszt a *Salmonella* élelmiszer- és környezeti mintákban történő kimutatására az ELFA technika alkalmazásával.

A VIDAS[®] *Salmonella* (SLM) kit tartalma:

- SLM csík: Felhasználásra kész
- SLM SPR: Felhasználásra kész. Az SPR[®] felszíni antigének elleni ellenanyagokkal van bevonva.
- SLM Pozitív kontroll (C1)
- Negatív kontroll (C2)
- SLM Standard (S1)
- 1MLE (etalon sarzs beviteli, Master Lot Entry) kártya.

A méréshez felhasznált egyéb reagensek és anyagok:

- Vízfürdő (95-100 °C)
- Pufferolt pepton víz (BPW)
- RVS leves
- M-leves (Merck 110658)

Vizsgálat menete:

A vizsgálatot az ICS szeeparálás után M-levesből vagy hagyományos dúsítást követően RVS dúsító oldatból végeztem el. Az inkubálást követően 1 ml-t egy steril csőbe pipettáztam és lezárt állapotban 15 percre 100 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Miután a csövet lehűtöttem és homogenizáltam, a szoba hőmérsékletre előmelegített VIDAS csík mintaküvettájába pipettáztam 0.5 ml-t az oldatból. Mérésenként egy standard mintát is használni kell (S1), illetve szükség esetén kontrollokat (C1, C2).

Ezután a VIDAS csíkokat a készülékbe helyeztem és a gyártói útmutatót követve elvégeztem a tesztet. Amennyiben az eredmény pozitívnak bizonyult, minden esetben elvégeztem a megerősítő vizsgálatokat a kiinduló oldatokból az MSZ EN ISO 6579:2006 szabvány alapján.

4.3.2. *L. monocytogenes* kimutatására alkalmas immunológiai eljárás

VIDAS® LMO2

A VIDAS® LMO 2 a VIDAS készülékben használt kvalitatív teszt az *Listeria monocytogenes* élelmiszer- és környezeti mintákban történő kimutatására az ELFA technika alkalmazásával.

A VIDAS® LMO2 kit tartalma:

- LMO 2 csík: Felhasználásra kész
- LMO 2 SPR: Felhasználásra kész. Az SPR® felszíni antigének elleni ellenanyagokkal van bevonva.
- LMO 2 Pozitív kontroll (C1)
- Negatív kontroll (C2)
- LMO 2 Standard (S1)
- 1MLE (etalon sarzs beviteli, Master Lot Entry) kártya.

A méréshez felhasznált egyéb reagensek és anyagok:

- Feles erősségű Fraser dúsító
- Fraser + vas –ammónium –citrát dúsító

Vizsgálat menete:

25 g mintát aseptikus körülmények között stomacher tasakba mértem és 225 ml feles erősségű Fraser elődúsítót adagoltam hozzá, majd inkubáltam 24 órán át 30°C-on. Az inkubációt követően 0,1 ml-t az elődúsított oldatból 10 ml teljes erősségű Frasert tartalmazó csőbe transzportáltam és 24 órán át 37°C-os termosztátban inkubáltam.

A feldúsított mintából 500 µl- t a VIDAS csík mintaküvetájába pipettáztam. Mérésenként egy standard mintát is kell használni (S1), illetve szükség esetén kontrollokat (C1, C2).

Ezután a VIDAS csíkokat a készülékbe helyeztem és a gyártói útmutatót követve elvégeztem a tesztet az LMO2 programmal. Amennyiben az eredmény pozitív volt, minden esetben elvégeztem a megerősítő vizsgálatokat a kiindulási oldatból az MSZ EN ISO 11290 szabvány alapján.

4.3.3. *E. coli* O157 kimutatására alkalmas immunológiai eljárás

VIDAS® UP

A VIDAS® UP (ECPT) a VIDAS készülékben használt kvalitatív teszt az *E.coli* O157:H7 élelmiszer- és környezeti mintákból történő kimutatására az ELFA technika alkalmazásával.

A VIDAS® UP (ECPT) kit tartalma:

- ECPT csík: Felhasználásra kész
- ECPT SPR: Felhasználásra kész. Az SPR® felszíni antigének elleni ellenanyagokkal van bevonva.
- ECPT Pozitív kontroll (C1)
- Negatív kontroll (C2)
- ECPT Standard (S1)
- 1MLE (etalon sarzs beviteli, Master Lot Entry) kártya.

A méréshez felhasznált egyéb anyagok és eszközök:

- Vízfürdő (95-100 °C)
- Stomacher tasak
- Pufferolt pepton víz (BPW)

Vizsgálat menete:

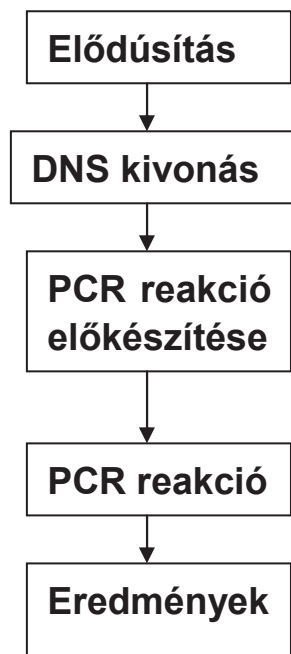
Az elődúsítást követően homogenizáltam a dúsító oldatot és 1 ml-t egy steril csőbe pipettáztam és lezárt állapotban 15 percre 100 °C-os vízfürdőbe helyeztem. Miután a csövet lehűtöttem és homogenizáltam, a szoba hőmérsékletre előmelegített VIDAS csík mintatartó küvettájába pipettáztam 0,5 ml-t az oldatból. Mérésenként egy standard mintát is kell használni (S1), illetve szükség esetén kontrollokat (C1, C2).

Ezután a VIDAS csíkokat a készülékbe helyeztem és a gyártói útmutatót követve elvégeztem a tesztet az ECPT programmal. Amennyiben az eredmény pozitív volt, minden esetben elvégeztem a megerősítő vizsgálatokat a kiindulási oldatból a MSZ EN ISO 16654:2001 szabvány alapján (BioMerieux Vidas Instrument User's Manual, 2005).

4.4. Kórokozók kimutatására alkalmazott molekuláris vizsgálati módszerek

4.4.1. Real - time PCR vizsgálat menete

A real-time vizsgálatok lépéseit a 8. ábrán szemléltetem.



8. ábra: Real - time PCR vizsgálat lépései

4.4.1.1. TaqMan Detection Kit-ek patogén mikroorganizmusok kimutatására (ABI)

A real time PCR vizsgálatokhoz Applied Biosystems 7300 Real-Time PCR System készüléket, TaqMan *Salmonella enterica* Detection Kit-et (ABI), TaqMan *Listeria monocytogenes* Detection Kit-et (ABI) és TaqMan *E.coli* O157:H7 Detection Kit-et (ABI) használtam.

A patogén detektáló kit tartalmazza az alábbi oldatokat:

- Target Assay Mix (TAM): A TAM oldat tartalmazza a célspecifikus primreket és próbákat, valamint az IPC kontrollt.
- Environmental Master Mix (EMM): Az EMM oldat a polimeráz enzimet tartalmazza.
- Negatív kontroll

Elődúsítás

Az élelmiszer minta 25 g-jához 37°C-ra előmelegített BPW elődúsítót adagoltam, majd Stomacher-rel 60 másodpercig homogenizáltam. A mintát inkubáltam 37°C-on 16 órán keresztül.

DNS extrakció PrepMan Ultra oldat használatával

Az elődúsított mintából 1 ml-t 2 ml-es Eppendorf csőbe mértem. A sejtek 3 percig 16000 rpm- en történő centrifugálásos ülepítését követően a felülúszót eltávolítottam, majd a PrepMan Ultra sejteltávolító oldatból 100µl-t adagoltam a sejtekre és 30 másodpercig vortex-szel kevertem. Ezután 95-100 °C-on 10 percen át fűtő blokkban hőkezeltam a mintát. Rövid keverés után a csöveket ismét centrifugáltam 3 percig 16000 rpm-en, majd a nukleinsavat tartalmazó felülúszót egy új Eppendorf csőbe pipettáztam. Végül 10 µl-t adagoltam a minta DNS-ből egy új Eppendorf csőbe, amely 90 µl DNáz mentes steril vizet tartalmazott.

PCR reakció előkészítése

A PCR mix tartalma mintánként végkoncentrációban 30 µl:

- 15 µl Environmental Master Mix (EMM)
- 3 µl Target Assay Mix (TAM)
- 12 µl genomiális DNS

A 18 µl premixet (EMM+TAM) előzetesen összemértem és a plate-re adagoltam, a minta DNS-ét ezt követően pipettáztam a vájakba, a pipetta hegyet minden minta DNS adagolása-kor sterilre cseréltem a kontamináció elkerülése érdekében. Minden futásnál DNáz mentes steril vizet használtam negatív kontrollként. Pozitív kontroll használatára külön nem volt szükség, mivel az TAM tartalmaz IPC (Internal Positive Control) kontrollt.

Real- time PCR reakció

A reakció különböző lépéseit a 5.táblázatban ismertetem.

5.táblázat: A Real- time PCR reakció lépései

	AmplyTaq Gold[®] Enzim Aktiválása	PCR reakció	
	Elődenaturáció	Denaturáció	Anneláció
Idő	10 min	15 sec	1 min
Hőmérséklet	95°C	95°C	60°C

Ezek a lépések 45 cikluson keresztül ismétlődnek. Ciklusonként megduplázódik a specifikus DNS szakaszok mennyisége. A detektálás a TaqMan reakción alapszik, amelynek lényege, hogy a PCR elegy tartalmaz egy rövid specifikus DNS szakaszt (próbát), amely kétféle festéssel jelölt. Ezek a rövid DNS szakaszok az egy szálú DNS-hez kötődnek. A Taq polimeráz enzim lánchosszabbítása során lehasítja ezt a rövid DNS szakaszt, a festékmolekulák távol kerülnek egymástól és ez mérhető fluoreszcens jelet ad. A Real-Time PCR-nél egy időben történik a sokszorozás és a detektálás.

Eredmények értékelése

Az eredmények értékelése a *Sequence Detection System* (SDS) és *Rapid FinderTM Software* (ABI) PCR értékelő programok alapján történt. A pozitív eredményt az elődúsítóból szabvány alapján erősítettem meg.

4.4.1.2. BAX® System PCR Assay (DuPont Qualicon)

Az elődúsított mintákból 10 µl –t 500 µl BHI levesbe mértem és 37 ± 1 °C-on 3 órán át inkubáltam. A következő lépésben 5 µl mintát adagoltam cluster csőbe, amely 200 µl proteázzal kiegészített lízis reagenst tartalmazott. A cluster csöveket 20 percig 37°C-on, majd 10 percig 95°C-os fűtőblokkban hőkezelttem. A cluster csöveket 5 percen keresztül hűtőblokkban lehűtöttem.

50 µl lizátumot a PCR csőbe mértem, amely tartalmazta a reakcióhoz szükséges összes reagenst és a belső kontrollt liofilezett tabletta formájában.

A liofilezett tabletta tartalmazza:

- A nukleotidokat és a polimerázt
- A célmikrobára specifikus primereket
- Belső kontrollt
- BSA-t (a polifenolokat tartalmazó minták gátló hatásának kiküszöbölése céljából)
- SybrGreen TM fluoreszcens festéket

A csöveket a BAX[®] System Q7 (DuPont Qualicon) real-time PCR készülékbe helyeztem és elindítottam a vizsgálatra előkészített programot.

Az amplifikált DNS fragmentumok fluoreszcens jelet generálnak, amelyet automatikusan felismer és elemez a BAX[®] szoftver.

4.4.1.3. Chromo4 Real-Time PCR Detection System (Biorad, Milan, Italy)

A *Campylobacter* qPCR vizsgálatához használt anyagok és eszközök:

DNS kivonást Rantsiou et al. (2008) módszere szerint végeztem el.

Vizsgálathoz használt primerek (Rantsiou et al., 2010):

Cj_rpoB1 (5'-GAGTAAGCTTGGTAAGATTAAAG-3')

Cjs_rpoB2 (5'- AAGAAGTTTTAGAGTTTCTCC-3')

Reakció Mix mintánként, végtérfogat 25 µl:

12,5	µl	<i>SYBR Green Mix</i>
1,0	µl	Cj_rpoB1 (az alkalmazott primer koncentrációja: 10 µM)
0,125	µl	Cj_rpoB2 (az alkalmazott primer koncentrációja: 10 µM)
10,375	µl	H ₂ O

A reakció mixhez mintánként 1,0 µl genominális DNS-t adagoltam.

A táptalajról izolált telepek multiplex PCR módszerrel Denis et al. (1999) módszerének alkalmazásával kerültek azonosításra.

Felhasznált primerek (Denis et al., 1999):

- 16S rRNA 857 bp (*C. jejuni*, *C. coli*)
- mapA 589 bp (*C. jejuni*)
- ceuE 462 bp (*C. coli*)

4.5. Kórokozók kimutatására alkalmazott miniatürizált biokémiai azonosító rendszer

- BBL™ CRYSTAL™ Enteric/Nonfermenter ID Kit (BD 245000)

BBL Crystal Teszt elvégzése

Egy steril kaccsal leemeltem steril körülmények között egy nutrient agaron jól elkülönülő telepet biokémiai azonosítás céljából. A telepet felszuszpendáltam egy BBL Crystal inokuláló folyadékcsőben. A lezárt csövet 10–15 másodpercig vortexeltem. Az összes inokulált folyadékot a teszt műanyag alapjába öntöttem és a teszt alaplappját két kézbe fogva óvatosan

végigfolyattam az inokulumot, míg minden cella meg nem telt. A maradék folyadékot visszafolyattam a beöntő nyíláshoz, és az alapot egy munkaasztalra helyeztem, majd rápattintottam a liofilizált tesztek tartalmazó fedőlapot. 18 – 24 órán át, 35 – 37°C-on inkubáltam a tesztet. Leolvasás: BBL Crystal Panel Viewer segítségével az eredményeket leolvastam. Az értékelés eredményeként egy szám jött létre: ez a profilszám. Az eredményt és a hozzá tartozó százalékos valószínűséget a tízjegyű profilszám és a telep morfológia alapján a BBL Crystal ID System Electronic Codebook segítségével adtam meg.

4.6. Kórokozók kimutatásra alkalmazott szerológiai azonosító vizsgálatok

A reakcióhoz alkalmazott oldatok :

- Enteroclon Anti-*Salmonella* I (A - E) + Vi (Sifin TR 1111)
- Enteroclon Anti-*Salmonella* (A - 67), omnivalent (Sifin TR 1101)
- Anti-Coli O157: (K-) (Sifin TR 2218)

A vizsgálat menete a 4.1.1. és 4.1.3. fejezetekben részletes bemutatásra kerültek.

4.7. Statisztikai módszerek

Regresszió analízis:

A regresszió analízis használata akkor indokolt, ha független változók együttes, lineáris kapcsolatára vagyunk kíváncsiak egyetlen függő változóval. Feltétele, hogy mind a független, mind a függő változónak normális eloszlásúnak kell lenniük, valamint folytonos változóknak és lehetőség szerint varianciájuk is homogén legyen. A regresszió-analízist gyakran szokták a korreláció-analízissel együtt emlegetni, hiszen az utóbbinak mintegy kiterjesztése a regresszió-analízis. A függő és független változók közötti kapcsolat megállapításához az analízis a legkisebb négyzetek módszerének segítségével egy egyenes egyenletét írja fel, mely a következőképpen néz ki: $Y = aX + b$ (Sváb., 1973)

Lineáris korrelációs együttható (r):

A korrelációs együttható a lineáris kapcsolat mérőszáma, értéke mindig egy -1 és 1 közötti szám. Ha $r=1$, akkor a mérési pontok 1 valószínűséggel egy egyenesen vannak, tehát lineáris kapcsolat van közöttük. Ha a két adatsor független egymástól, akkor a korrelációs együtthatójuk 0. Fordítva nem mindig biztos, ezért ekkor csak azt mondhatjuk, hogy x és y korrelálatlan. A függetlenség csak akkor következik a korrelálatlanságból, ha (X,Y) kétdimenziós normális eloszlású. (Sváb., 1973)

Jelenlét/hiány próbák jellemző paramétereinek meghatározása az MSZ EN ISO 16140-1:2004 alapján

1. Kimutatási határ
2. Relatív pontosság: $100 \cdot (p+n)/N \%$
3. Relatív specifikusság: $100 \cdot n / (n+f_p) \%$
4. Relatív érzékenység: $100 \cdot p / (p+f_n) \%$

A kórokozó mikroorganizmusok jellemző paramétereit az MSZ EN ISO 16140-1:2004 alapján a 6. táblázat mutatja.

6. táblázat. A kórokozó mikroorganizmusok jellemző paraméterei az MSZ EN ISO 16140-1:2004 alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	P	f_p
Alternatív módszerrel negatív	f_n	n

Ahol: f_p : hamis pozitív (referenciai módszerrel negatív, alternatív módszerrel pozitív)

f_n : hamis negatív (referenciai módszerrel pozitív, alternatív módszerrel negatív)

p: mindkét módszerrel pozitív

n: mindkét módszerrel negatív

N: összes vizsgálat

4.8. Mesterséges fertőzéshez használt baktériumtörzsek

A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok a FoodMicro Kft Mikrobiológiai Laboratóriumának törzsgyűjteményből származtak és a következők voltak:

Salmonella vizsgálatok esetén felhasznált baktérium törzsek:

- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (Salmonella Enteritidis) NCAIM B 02186
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Infantis (Salmonella Infantis) NCAIM B 02187
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Virchow (Salmonella Virchow) NCAIM B 02188
- *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Worthington (Salmonella Worthington) NCAIM B 02189
- *Citrobacter freundii* ATCC 8090
- *Enterobacter aerogenes* ATCC 35028
- *Proteus mirabilis* ATCC 12453

Listeria monocytogenes vizsgálatok esetén felhasznált baktérium törzsek:

- *Listeria monocytogenes* NCAIM B 01373
- *Listeria ivanovii* HNCMB 133006/99812
- *Listeria innocua* NCAIM B 01378

***E.coli* O157** vizsgálatok esetén felhasznált baktérium törzs:

- *Escherichia coli* O157 apatogén változat ATCC 51446

Campylobacter vizsgálatok esetén felhasznált baktérium törzs:

- *Campylobacter jejuni* ATCC 33290

4.9. Vizsgálati tervek

Általános szempontok:

- Minden új műszeres módszer esetén első lépésként meghatároztam törzstenyésztéssel a kimutatási határt (a dolgozat készítés időszakában a PCR *Salmonella* kimutató esetében történt).
- Minden új módszernél mesterségesen fertőzött mintákkal vizsgáltam, hogy a szokásos zavaró kísérő mikrobióta hogyan befolyásolja az adott alternatív módszert. Ennek jelentősége főleg az alternatív táptalajok és az immunológiai vizsgálatok körében van, így a dolgozatomban is ezekre tértem ki.
- Rutin laboratóriumi mintákból származó válogatott mintákkal végeztem a párhuzamos vizsgálatokat a megfelelő szabványos és alternatív módszerekkel az MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány szerinti jellemző paraméterek meghatározására és a mátrixok zavarónhatásának elemzésére.

4.9.1. *Salmonella* vizsgálati terv

Összesen 85 természetesen és 36 mesterségesen fertőzött mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez. A mesterségesen fertőzött mintákhoz tesztörzseket alkalmaztam (7. táblázat).

7. táblázat: Mesterségesen ferőzött mintákhoz felhasznált *Salmonella* törzsek:

Felhasznált baktérium törzsek	Törzstenyészetek kezdeti sejtszáma
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Enteritidis (<i>Salmonella</i> Enteritidis)	2,5 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Infantis (<i>Salmonella</i> Infantis)	2,6 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Virchow (<i>Salmonella</i> Virchow)	4,8 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> serovar Worthington (<i>Salmonella</i> Worthington)	2,2 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Citrobacter freundii</i>	5,6 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Enterobacter aerogenes</i>	6,1 x 10 ⁸ tke / ml
<i>E. coli</i>	8,2 x 10 ⁸ tke / ml
<i>Proteus mirabilis</i>	3,5 x 10 ⁸ tke / ml

Beoltási terv matrixonként:

1. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Enteritidis 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml
2. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Infantis 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml
3. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Virchow 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml
4. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Worthington 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml
5. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Enteritidis 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml + *Citrobacter freundii* 10⁻⁷ hígítás 1,0 ml
6. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Infantis 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml + *Enterobacter aerogenes* 10⁻⁷ hígítás 1,0 ml
7. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Virchow 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml + *Proteus mirabilis* hígítás 10⁻⁷ 1,0 ml
8. 25g minta + 225 ml BPW + *Salmonella* Worthington 10⁻⁸ hígítás 1,0 ml + *E. coli* 10⁻⁷ hígítás 1,0 ml
9. Vak minta: 225 ml BPW

4.9.1. 1. Korszerű új differenciáló táptalajok és immunológiai módszerek esetén

Mátrixok: darálthús, felvágott, tejtermék és saláták.

Mesterségesen fertőzött minták (sejtszáma <10 tke / 25 g) terméksoportonként 8 db + 1 negatív kontrol.

Természetes (rutin mintákból válogatott) minták: összesen 85 db.

4.9.1. 2. Real – time PCR vizsgálatok esetén

Mátrixok: nyershús, felvágott, csokoládé, fűszer, környezeti minta, takarmány.

Természetes (rutin mintákból válogatott) minták: összesen 1445 db.

Kimutatási határ meghatározása.

Kimutatási határ meghatározásához kalibrációs görbét készítettem. *Salmonella* Enteritidis 24 órás tenyészetéből BPW tápoldatban 10-es alapú hígítási sort készítettem (1-9-ig) és TGE agaron (inkubáció: 37°-on 24 óra) meghatároztam a mikrobaszámot. A hígítási sor 10^{3-9} tagjaiból, valamint ezek további felező hígításaiból 1-1 ml-t eppendorf csőbe pipettáztam, amelyből elvégeztem a DNS extrakciót és a real-time PCR készülékkel felvettem az egyes hígításokhoz tartozó amplifikációs görbéket és meghatároztam azt a legkisebb sejtszámot (kimutatási határ), amely még pozitív eredményt adott.

4.9.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálati terv

4.9.2. 1. Korszerű új differenciáló táptalajok és immunológiai módszerek esetén

Mátrixok: Mesterségesen fertőzött minták (sejtszáma <10 tke / 25 g) terméksoportonként 4 db és 1 db negatív kontrol.

Természetes (rutin mintákból válogatott) minták: összesen 147 db.

1. sorozat: darálthús, saláta, tej, gyf. zöldségek, gyf. sonka, gyf. tészta (63 minta)

2. sorozat: saláta, tej, darálthús (84 minta)

Minden mátrixból négy mintát mesterségesen fertőztünk a következő módon:

A törzstenyészetből 9 ml-es teljes Fraser dúsítóban tízes alapú hígítási sort készítettem és szabványos ALOA agaron meghatároztam a kiindulási tenyészetek kezdeti sejtszámát. A vizsgálati sorozatokhoz felhasznált törzseket a 8. és 9. táblázat tartalmazza.

8. táblázat: Első sorozat.

Felhasznált baktérium törzsek	Törzstenyészetek kezdeti sejtszáma
<i>L. monocytogenes</i>	$2,3 \times 10^8$ tke / ml
<i>L. ivanovii</i>	$5,9 \times 10^8$ tke / ml
<i>L. innocua</i>	$1,5 \times 10^8$ tke / ml

9. táblázat: Második sorozat.

Felhasznált baktérium törzsek	Törzstenyészetek kezdeti sejtszáma
<i>L. monocytogenes</i>	$1,2 \times 10^8$ tke / ml
<i>L. ivanovii</i>	$2,4 \times 10^8$ tke / ml
<i>L. innocua</i>	$1,7 \times 10^8$ tke / ml

1. 25g minta+ 225 ml feles erősségű Fraser + *L. monocytogenes* 10^{-8} hígítás 1,0 ml
2. 25g minta + 225 ml feles erősségű Fraser + *L. monocytogenes* 10^{-8} hígítás 1,0 ml + *L. ivanovii* 10^{-7} hígítás 1,0 ml
3. 25g minta + 225 ml feles erősségű Fraser + *L. monocytogenes* 10^{-8} hígítás 1,0 ml + *L. innocua* 10^{-7} hígítás 1,0 ml
4. 25g minta + 225 ml feles erősségű Fraser + *L. monocytogenes* 10^{-8} hígítás 1,0 ml + *L. innocua* 10^{-7} hígítás 1,0 ml+ *L. ivanovii* 10^{-7} hígítás 1,0 ml
5. Vak minta: 225 ml feles erősségű Fraser

4.9.3. *E.coli* O157 vizsgálati terv

A vizsgálathoz felhasznált törzset a 10. táblázat tartalmazza.

10. táblázat: *E. coli* O157 vizsgálatok esetén felhasznált baktérium törzs

Felhasznált baktérium törzs	Törzstenyészet kezdeti sejtszáma
<i>E. coli</i> O157	$2,7 \times 10^8$ tke / ml

Beoltási terv húsmintánként:

- 25g minta + 225 ml TSB + *E. coli* O157 10^{-7} hígítás 1,0 ml
- 25g minta + 225 ml TSB + *E. coli* O157 10^{-6} hígítás 1,0 ml
- 25g minta + 225 ml TSB + *E. coli* O157 10^{-5} hígítás 1,0 ml

4.9.3.1. Immunológiai módszerek és real- time PCR módszer esetén

Mátrixok: darálthús, felületi minták.

Mesterségesen fertőzött minták (sejtszáma <10 tke / 25 g) 3 db darálthús.

Higiéniai minták: összesen 47 db.

4.9.4. *Campylobacter* vizsgálati terv**4.9.4.1. qPCR módszer esetén**

Mátrixok: Kereskedelemről származó, hűtött, darabolt baromfi minták

Vizsgálati terv: 40 minta x 4 dúsító x 4 időpont.

- $t=0$ DNS extrakció és qPCR vizsgálat és számmeghatározás (qPCR és telepszámlálás)
- $t=6$ DNS extrakció, qPCR vizsgálat és szabványos vizsgálat
- $t=24$ DNS extrakció, qPCR vizsgálat és szabványos vizsgálat
- $t=48$ DNS extrakció, qPCR vizsgálat és szabványos vizsgálat

5. KUTATÁSI EREDMÉNYEK

5.1. Korszerű új differenciáló táptalajok vizsgálati eredményei

5.1.1. *Salmonella* spp. vizsgálata kromogén szubsztrátot tartalmazó agaron

A hagyományos mikrobiológiai vizsgálatoknál számos táptalaj áll a mikrobiológusok rendelkezésére a különböző mikrobák élelmiszerekből történő kimutatására. A kromogén táptalaj alapelve, hogy a baktériumok szaporodásuk során specifikus enzimeket termelnek, melyek a táptalajban lévő egy vagy több kromogén szubsztráttal enzim-szubsztrát reakcióba lépnek, melyet színreakció követ. Így egyetlen táptalajon akár több mikrobát, mikrobacsoportot is el lehet különíteni. A kromogén táptalajok segítségével helyettesíthetünk egyes biokémiai teszteket. Vizsgálataim során három különböző cég kromogén szubsztrát tartalmú táptalajai-val (COMPASS *Salmonella*, HARLEQUIN *Salmonella*, SM2) végzett vizsgálatok tapasztalatairól számoltam be.

A kromogén szubsztrátot tartalmazó agarra történő szélesztési módszerek összehasonlításához négy különböző élelmiszer mátrixot választottam. A mátrixok darálthús, felvágott, tejtermék és saláták voltak, amelyeket mesterségesen fertőztem, természetesen fertőződtek, illetve *Salmonella* negatív minták voltak. A *Salmonella*-val beoltott minták kiindulási sejtszáma <10 tke / 25 g volt. A vizsgálatok során alkalmazott egyéb törzseket a kompetitív mikrobióta tagjaiból választottam ki. A mesterségesen fertőzött minták és a negatív kontroll minták eredményeit a 11. táblázat mutatja. Összesen 121 mintát használtunk a kísérletek elvégzéséhez. A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

11. táblázat: Mesterségesen fertőzött és negatív kontroll minták eredményei kromogén szubsztrátot tartalmazó agar módszerrel

	Minták száma	Pozitív minta COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel	Pozitív minta HARLEQUIN <i>S.</i> módszerrel	Pozitív minta SM2 módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel	Negatív minta HARLEQUIN <i>S.</i> módszerrel	Negatív minta SM2 módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	9	8	8	8	8	1	1	1	1
Felvágott	9	8	8	8	8	1	1	1	1
Tejtermék	9	8	8	8	8	1	1	1	1
Saláták	9	8	8	8	8	1	1	1	1
Összes	36	32	32	32	32	4	4	4	4

A *Salmonella* spp. kimutatására szolgáló kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral végzett vizsgálatok eredményét a 12-18. számú táblázatokban foglaltam össze.

A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

5.1.1.1. *Salmonella* spp. vizsgálata COMPASS *Salmonella* kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral

12. táblázat: *Salmonella* spp. kimutatására alkalmas COMPASS *Salmonella* módszer és MSZ EN ISO 6579: 2006 eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma	Pozitív minta COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	27	10	10	17	17
Felvágott	22	2	2	20	20
Tejtermék	24	3	3	21	21
Salata	12	0	0	12	12
Összes	85	15	15	70	70

13. táblázat: COMPASS *Salmonella* és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel pozitív	$p^* = 32+15=47$	$f_p = 0$
COMPASS <i>Salmonella</i> módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 4+70=74$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+74) / 121 = 100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 74 / (74+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$

5.1.1.2. *Salmonella* spp. vizsgálata HARLEQUIN *Salmonella* kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral

14. táblázat: *Salmonella* spp. kimutatására alkalmas HARLEQUIN *Salmonella* módszer és MSZ EN ISO 6579: 2006 eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma összesen	Pozitív minta HARLEQUIN <i>Salmonella</i> módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta HARLEQUIN <i>Salmonella</i> módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	27	11	10	16	17
Felvágott	22	2	2	20	20
Tejtermék	24	3	3	21	21
Saláta	12	0	0	12	12
Összes	85	16	15	69	70

15. táblázat: HARLEQUIN *Salmonella* és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
HARLEQUIN <i>Salmonella</i> módszerrel pozitív	$p^* = 32+15=47$	$f_p = 1$
HARLEQUIN <i>Salmonella</i> módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 4+69=73$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+73) / 121 = 99,2 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 73 / (73+1) = 98,6\%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$

5.1.1.3. *Salmonella* spp. kimutatása SM2 kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral

16. táblázat: *Salmonella* spp. kimutatására alkalmas SM2 módszer és MSZ EN ISO 6579: 2006 eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma	Pozitív minta SM2 módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta SM2 mód- szerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	27	10	10	17	17
Felvágott	22	2	2	20	20
Tejtermék	24	3	3	21	21
Saláták	12	0	0	12	12
Összes	85	15	15	70	70

17. táblázat: SM2 és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
SM2 módszerrel pozitív	$p^* = 32+15=47$	$f_p = 0$
SM2 módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 4+70=74$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+74) / 121=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 74 / (74+0)=100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$

A táptalaj összehasonlító vizsgálatok eredményeit kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral a 18. táblázat tartalmazza, amelyben piros színnel az AFNOR által hús, tejtermék, tojás, tengeri halak, zöldségek, állati takarmány, környezeti mintákra vonatkozó értékeket tüntettem fel.

18. táblázat: Kromogén szubsztrát tartalmú agarral végzett *Salmonella* spp. tartalmú minták MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján meghatározott vizsgálati paramétereinek összefoglaló táblázata

	Relatív pontosság (%)		Relatív specifitás (%)		Relatív érzékenység (%)	
	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
COMPASS <i>Salmonella</i>	100	97,0	100	96,9	100	97,1
HARLEQUIN <i>Salmonella</i>	99,2	-	98,6	-	100	-
SM2	100	-	100	-	100	-

A 18. táblázat alapján megállapítható, hogy a HARLEQUIN *Salmonella* és COMPASS *Salmonella* és az SM2 táptalajokon mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A COMPASS *Salmonella* és SM2 táptalajok esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket. A COMPASS *Salmonella*-ra vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság, relatív specifitás és relatív érzékenység tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak. A HARLEQUIN *Salmonella* táptalajjal végzett vizsgálatoknál egy esetben hamis pozitív eredményt kaptam darálthús minta vizsgálatakor a kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajon, amelyet a biokémiai és szerológiai tesztek nem igazoltak.

5.1.2. *Listeria monocytogenes* jelenlétének kimutatása kromogén szubsztrátos táptalajon

A *Listeria monocytogenes* kimutatásához Harlequin™ *Listeria* Chromogenic Agar, Compass *Listeria* Agar, RAPID'L.Mono™ kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajokat alkalmaztam. A vizsgálat során felhasznált minták mesterségesen, természetes vagy negatív minták voltak. A mesterséges körülmények közt kontaminált minták kezdeti *L. monocytogenes* és *Listeria* spp. sejtszáma <10 tke / 25g.

A mesterséges fertőzött minták és a negatív kontroll minták eredményeit a 10.2. számú melléklet M1. és M2. táblázatok mutatják.

A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

Két sorozatban vizsgáltam a mintákat:

1. Az első sorozatban Harlequin™ *Listeria* és Compass *Listeria* Agar állt rendelkezésemre, ebben a sorozatban 63 minta, darálthús, saláta, tej, gyf. zöldségek, gyf. sonka, gyf. tészta mátrixok liszteriás szennyezettségét ellenőriztem.

1. sorozat

A *Listeria monocytogenes* jelenlétének kimutatása kromogén szubsztrátos táptalajok eredményeit a 19-28. táblázat tartalmazza.

19. táblázat: *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas kromogén szubsztrátot tartalmazó agar módszer és MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005 első sorozat eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma összesen	Pozitív minta Harlequin™ <i>Listeria</i> módszerrel	Pozitív minta Compass <i>Listeria</i> Agar módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta Harlequin™ <i>Listeria</i> módszerrel	Negatív minta Compass <i>Listeria</i> Agar módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	11	5	5	5	6	6	6
Gy. f. zöldségek	10	3	3	3	7	7	7
Gy.f. tészta	15	3	3	3	12	12	12
Gy.f. sonka	5	5	5	5	0	0	0
Tej	10	3	3	3	7	7	7
Saláták	12	4	4	4	8	8	8
Összes	63	23	23	23	40	40	40

20. táblázat: Első sorozat Harlequin *Listeria* Agar és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 24+23=47$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 6+40=46$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+46)/93=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 46/(46+0)= 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47/(47+0) = 100 \%$

21. táblázat: Első sorozat Compass *Listeria* Agar és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel Pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 24+23=47$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 6+40=46$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+46)/93=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 46/(46+0)= 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47/(47+0) = 100 \%$

22. táblázat: Az 1. sorozat összehasonlító értékelése

	Relatív pontosság (%)	Relatív specifitás (%)	Relatív érzékenység (%)
Harlequin™ <i>Listeria</i>	100	100	100
COMPASS <i>Listeria</i>	100	100	100

A 23. táblázat adatai alapján megállapítható, hogy a Harlequin™ *Listeria* és COMPASS *Listeria* eredmények 100 %-ban megegyeztek a referencia módszer eredményeivel.

2. sorozat

A második sorozatban Harlequin™ *Listeria* Chromogenic Agar, Compass *Listeria* Agar és RAPID'L.Mono™ agarral egészítettük ki a táptalajok listáját. Ebben a sorozatban darált hús saláta és tej mátrixok liszteriás szennyezettségét ellenőriztük. A vizsgált minták száma 84 darab.

23. táblázat: *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas Compass *Listeria* Agar, Harlequin *Listeria* Agar és RAPID'L.Mono™ módszer és MSZ EN ISO 11290:1996/A1:2005 második sorozat eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma összesen	Pozitív minta Harlequin™ <i>Listeria</i> módszerrel	Pozitív minta Compass <i>Listeria</i> Agar módszerrel	Pozitív minta RA-PID'L.Mono™ módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta Harlequin™ <i>Listeria</i> módszerrel	Negatív minta Compass <i>Listeria</i> Agar módszerrel	Negatív minta RA-PID'L.Mono™ módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darált-hús	30	13	13	13	13	17	17	17	17
Tej	28	9	9	9	9	19	19	19	19
Saláták	26	9	9	9	9	17	17	17	17
Összes	84	31	31	31	31	53	53	53	53

24. táblázat: Második sorozat Harlequin *Listeria* Agar és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel Pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 12+31=43$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 3+53=56$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (43+56) / 99 = 100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 56 / (56+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 43 / (43+0) = 100 \%$

25. táblázat: Második sorozat Compass *Listeria* Agar és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 12+31=43$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 3+53=56$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (43+56) / 99=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 56 / (56+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 43 / (43+0)= 100 \%$

26. táblázat: Második sorozat RAPID'L.Mono™ és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 12+31=43$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 3+53=56$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (43+56) / 99=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 56 / (56+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 43 / (43+0)= 100 \%$

A táptalaj összehasonlító vizsgálatok eredményeit kromogén szubsztrátot tartalmazó agarral a

27. táblázat tartalmazza, amelyben piros színnel az AFNOR által hús, tejtermék, tengeri halak, zöldségek, környezeti minták vonatkozó értékeket tüntettem fel.

27. táblázat: Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok MSZ EN ISO 16140 szabványban szereplő paramétereinek összefoglaló táblázata *L. monocytogenes* vizsgálatokor

	Relatív pontosság (%)		Relatív specifitás (%)		Relatív érzékenység (%)	
	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
Harlequin™ <i>Listeria</i>	100	-	100	-	100	-
COMPASS <i>Listeria</i>	100	97,3	100	98,9	100	95,6
RAPID'L.Mono™	100	98,6	100	97,9	100	99,2

28. táblázat: Két sorozatban vizsgált *L. monocytogenes* MSZ EN ISO 16140 szabványban szereplő paramétereinek összefoglaló táblázata

	Relatív pontosság (%)	Relatív specifitás (%)	Relatív érzékenység (%)
1. sorozat	100	100	100
2. sorozat	100	100	100
Összes	100	100	100

Harlequin™ *Listeria*, COMPASS *Listeria* és a RAPID'L.Mono™ táptalajjal végzett vizsgálatok esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket.

A 28. táblázat alapján megállapítható, hogy a Harlequin™ *Listeria*, COMPASS *Listeria* és a RAPID'L.Mono™ táptalajokkal mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A COMPASS *Listeria* és RAPID'L.Mono™ Agarra vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság, relatív specifitás és relatív érzékenység tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak.

5.2. Patogének kimutatására alkalmas immunológiai módszerekkel végzett vizsgálati eredmények

5.2.1. *Salmonella* vizsgálata VIDAS SLM és VIDAS ICS2+SLM módszerrel

Összehasonlító vizsgálatok eredményei ELFA módszerrel

Az ELFA módszerrel végzett mérésekhez négy különböző mátrixot választottam. A mátrixok darálthús, felvágott, tejtermék és saláták voltak, amelyeket mesterségesen fertőztem, természetesen fertőzöttek, illetve negatívak voltak. A *Salmonella* spp. -vel beoltott minták kiindulási sejtszáma <10 tke / 25 g.

A vizsgálatok során alkalmazott törzseket a kompetitív mikrobióta tagjaiból választottam ki. A *Salmonella* kimutatásának eredményeit VIDAS módszerrel a 10.2. mellékletben lévő M3. és M4. táblázat, valamint a 29-33. táblázat tartalmazza.

A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

29. táblázat: *Salmonella* spp. kimutatására alkalmas VIDAS SLM módszer és MSZ EN ISO 6579: 2006 eredményeinek összefoglaló táblázata rutin minták esetén

	Minták száma	Pozitív minta VIDAS SLM módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta VIDAS SLM módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	27	10	10	17	17
Felvágott	22	2	2	20	20
Tejtermék	24	3	3	21	21
Saláták	12	0	0	12	12
Összes	85	15	15	70	70

30. táblázat: VIDAS SLM és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 32+15=47$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 4+70=74$

p^* : Hagományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+74) / 121=100 \%$
- Relatív specifikitás: $100 \cdot 74 / (74+0)=100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0)=100 \%$

Salmonella vizsgálati eredmények VIDAS ICS2+SLM módszerrel

Összesen 85 természetesen és 36 mesterségesen fertőzött mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez VIDAS ICS2+SLM módszerrel.

31. táblázat: *Salmonella* spp. kimutatására alkalmas VIDAS ICS2+SLM módszer és MSZ EN ISO 6579: 2006 eredményeinek összefoglaló táblázata természetesen kontaminálódott minták esetén

	Minták száma összesen	Pozitív minta VIDAS ICS+SLM módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta VIDAS ICS+SLM módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	27	11	10	16	17
Felvágott	22	2	2	20	20
Tejtermék	24	3	3	21	21
Saláták	12	0	0	12	12
Összes	85	16	15	69	70

32. táblázat: VIDAS ICS2+SLM és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 32+15=47$	$f_p = 1$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 4+69=73$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+73) / 121 = 99,2 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 73 / (73+1) = 98,6 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$

Az összehasonlító vizsgálatok eredményeit VIDAS SLM és VIDAS ICS2+SLM a 37. táblázat tartalmazza, amelyben piros színnel az AFNOR által hús, tejtermékek, zöldségek, kakaós termékek, állateledel minták vonatkozó értékeket tüntettem fel.

33. táblázat: VIDAS készülékkel végzett *Salmonella* spp. tartalmú minták MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján meghatározott vizsgálati paramétereinek összefoglaló táblázata

	Relatív pontosság (%)		Relatív specifitás (%)		Relatív érzékenység (%)	
	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
VIDAS SLM	100	-	100	-	100	-
VIDAS ICS2+SLM	99,2	97,4	98,6	99,4	100	95,5

A 33. táblázat alapján megállapítható, hogy a VIDAS SLM, és VIDAS ICS2+SLM módszerekkel mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A VIDAS SLM módszer esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket. A VIDAS ICS2+SLM módszerrel végzett vizsgálatoknál egy esetben hamis pozitív eredményt kaptam darálthús minta vizsgálatakor, amelyet biokémiai és szerológiai tesztek nem igazoltak. A VIDAS ICS2+SLM módszerre vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság és relatív érzékenység tekintetében alacsonyabb, relatív specifitás tekintetében magasabb értékeket mutatnak.

5.2.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálata VIDAS LMO2 módszerrel

Listeria monocytogenes vizsgálatát két egymást követő évben is elvégeztem VIDAS készülékkel. Az első sorozatban a hat problémát okozó mátrixot választottam ki, a második évben a mátrixok számát háromra csökkentettem. A *Listeria monocytogenes* kimutatásának eredményeit VIDAS módszerrel a 34-38. táblázat tartalmazza.

A mesterséges fertőzött minták és a negatív kontroll minták eredményeit a 10.2. számú mellékletben lévő M5. és M6. táblázat mutatja.

A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

Első sorozat

Az ELFA módszerrel végzett mérésekhez hat különböző mátrixot választottam. A mátrixok darálthús, gyors fagyasztott zöldségek, gyors fagyasztott tészta, gyors fagyasztott sonka, tej és saláták voltak, amelyek mesterségesen fertőztem, természetesen fertőződtek, illetve negatívak voltak. A vizsgálatok során alkalmazott törzseket a kompetitív mikrobióta tagjaiból választottam ki.

A *Listeria* törzsekkel beoltott minták kiindulási sejtszáma <10 sejt / 25 g.

Összesen 63 mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez VIDAS LMO2 módszerrel.

34. táblázat: *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas VIDAS LMO2 módszer és MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005 első sorozat eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma összesen	Pozitív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	11	5	5	6	6
Gy.f. zöldségek	10	3	3	7	7
Gy.f. tészta	15	3	3	12	12
Gy.f. sonka	5	5	5	0	0
Tej	10	3	3	7	7
Saláták	12	4	4	8	8
Összes	63	23	23	40	40

35. táblázat: Első sorozat VIDAS LMO2 és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel Pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 24+23=47$	$f_p = 0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n = 0$	$n^{**} = 6+40=46$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (47+46)/93=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 46 / (46+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$

Második sorozat

A második sorozatnál a mérésekhez három különböző mátrixot választottam. A mátrixok ez esetben darálthús, tej és saláták voltak, amelyeket mesterségesen fertőztem, természetesen fertőzöttek, illetve *Listeria monocytogenes* negatívak voltak. A *Listeria monocytogenes* –el fertőzött minták kiindulási sejtszáma <10 sejt / 25 g. A vizsgálatok során alkalmazott törzseket a kompetitív mikrobióta tagjaiból választottam ki. Ebben a kísérletben 84 minta vizsgálatára került sor.

36. táblázat: *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas VIDAS LMO2 módszer és MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005 második sorozat eredményeinek összefoglaló táblázata

	Minták száma összesen	Pozitív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta VIDAS LMO2 mód- szerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	30	13	13	17	17
Tej	28	9	9	19	19
Saláták	26	9	9	17	17
Összes	84	31	31	53	53

37. táblázat: Második sorozat VIDAS LMO2 és a referencia módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

	Referencia módszerrel Pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	$p^* = 12+31=43$	$f_p=0$
Alternatív módszerrel negatív	$f_n=0$	$n^{**} = 3+53=56$

p^* : Hagyományos és alternatív módszerrel is pozitív mesterségesen fertőzött és válogatott minták összege.

n^{**} : Hagyományos és alternatív módszerrel is negatív kontroll és válogatott minták összege.

- Relatív pontosság: $100 \cdot (43+56) / 99=100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 56 / (56+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 43 / (43+0)= 100 \%$

Az összehasonlító vizsgálatok eredményeit VIDAS LMO2 a 42. táblázat. tartalmazza, amelyben piros színnel az AFNOR által hús, tejtermékek, tengeri halak, zöldségek, környezeti minták vonatkozó értékeket tüntettem fel.

38. táblázat: VIDAS LMO2 összehasonlításának összefoglaló táblázata

		Relatív pontosság (%)		Relatív specifitás (%)		Relatív érzékenység (%)	
		Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
1. sorozat	VIDAS LMO2	100	-	100	-	100	-
2. sorozat	VIDAS LMO2	100	97,6	100	98,3	100	96,7

A 38. táblázat alapján megállapítható, hogy a VIDAS LMO2 módszerrel mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A VIDAS LMO2 módszerrel végzett vizsgálatok esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket. A VIDAS LMO2 módszerre vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság, relatív specifitás és relatív érzékenység tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak.

5.2.3. *E.coli* O157:H7 vizsgálata VIDAS UP módszerrel

Az üzemi környezet feltérképezésekor a real-time PCR módszer mellett párhuzamosan VIDAS UP módszerrel is elvégeztem a minták vizsgálatát.

A vizsgálat során a VIDAS UP alternatív mikrobiológiai módszert összehasonlítottam a referencia módszerrel az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján. Meghatároztam a relatív pontosságot, relatív specifikusságot és a relatív érzékenységet. A *E.coli* O157:H7 kimutatásának eredményeit VIDAS UP módszerrel a 39-40. táblázat tartalmazza.

Az üzemi vizsgálatokkal párhuzamosan 3 darab mesterségesen fertőzött mintát is vizsgáltam mindkét készülékkel. Nyers darált hús mártixot oltottam be alacsony sejtszámmal. Az *E. coli* O157-t mesterségesen fertőzött minták kiindulási sejtszáma legalább <10 sejt / 25 g volt. Összesen 47 higiéniai és 3 mesterségesen fertőzött mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez VIDAS UP módszerrel.

A mesterségesen fertőzött minták mindegyike pozitív, a kontroll minta negatív eredményt adott.

A VIDAS UP gyorsvizsgálati módszer szabványos módszerrel történő összehasonlító vizsgálata az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján a relatív érzékenység, pontosság és specifikuság alapján történt.

39. táblázat: *E.coli* O157 kimutatására alkalmas VIDAS UP alternatív vizsgálati módszerek eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján

	Referencia módszerrel Pozitív	Referencia módszerrel negatív
Alternatív módszerrel pozitív	p = 3	f _p = 0
Alternatív módszerrel negatív	f _n = 0	n = 47

- Relatív pontosság: $100 \cdot (3+47) / 50 = 100 \%$
- Relatív specifikitás: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 3 / (3+0) = 100 \%$

Az összehasonlító vizsgálatok eredményeit VIDAS UP a 46. táblázat tartalmazza, amelyben piros színnel az AFNOR által hús, zöldség, környezeti minta vonatkozó értékeket tüntettem fel.

40. táblázat: VIDAS UP és a referencia módszer összehasonlításának eredményei az MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

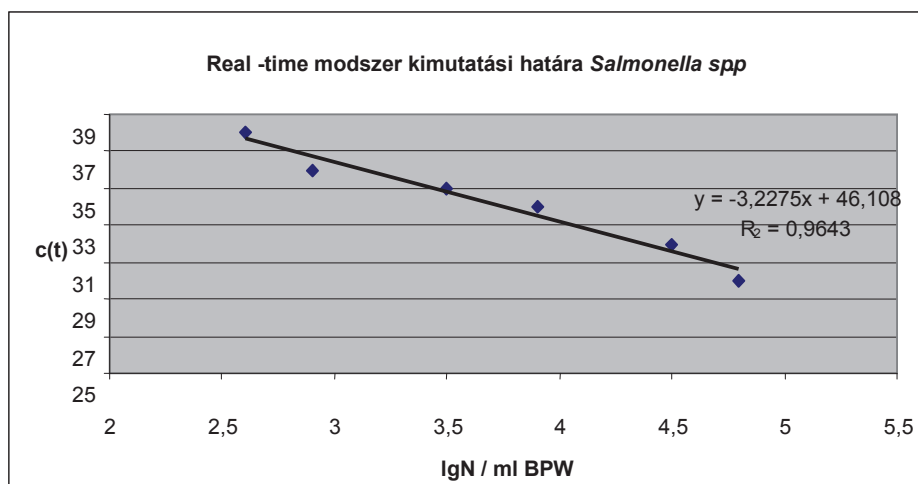
VIDAS UP	Relatív pontosság %		Relatív specifikusság%		Relatív érzékenység%	
	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
	100	98,4	100	96,9	100	97,4

A 40. táblázat alapján megállapítható, hogy a VIDAS UP módszerrel mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A VIDAS UP módszerrel végzett vizsgálatok esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket. A VIDAS UP módszerre vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság, relatív specifikitás és relatív érzékenység tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak.

5.3. Patogének kimutatására alkalmas valós idejű PCR módszerekkel végzett vizsgálati eredmények

5.3.1. A kimutatási határ meghatározása TaqMan PCR módszerrel

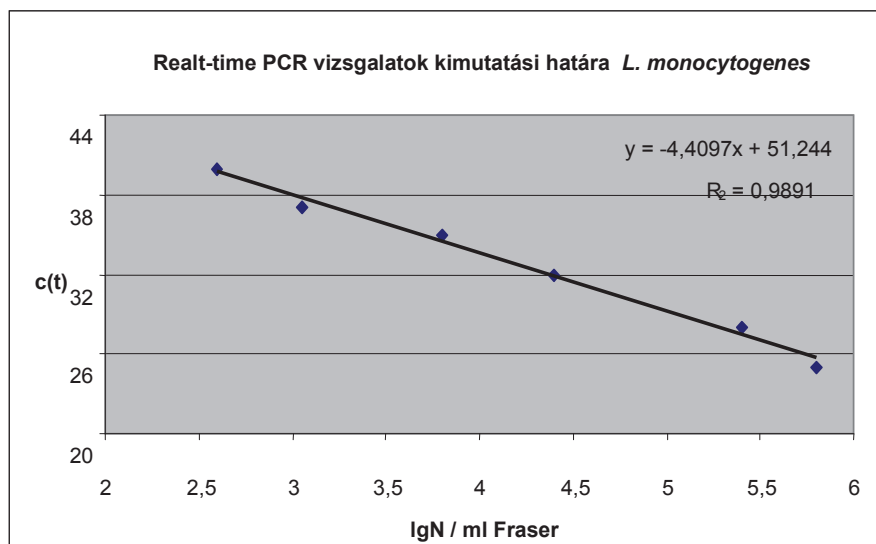
A Salmonella spp. kalibrációs görbét BPW tápoldatban határoztam meg. A kalibrációs görbét a 9. ábra szemlélteti.



9. ábra: Real – time PCR módszerrel BPW dúsítóban meghatározott kalibrációs görbe

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a szalmonellák biztonságos kimutatásához a BPW dúsítóban nagyobb, mint 2,5 log N/ml BPW(>300/ml BPW) sejtsűrűségre van szükség.

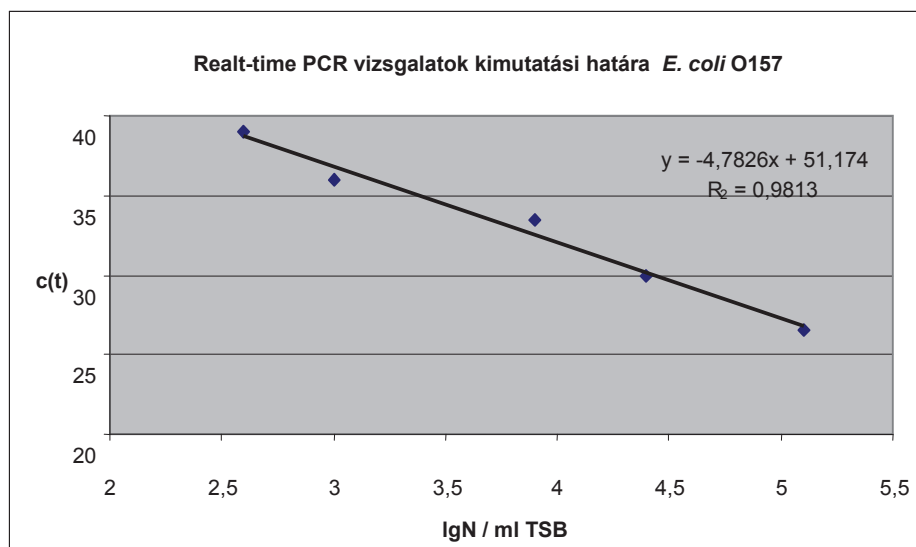
L. monocytogenes kalibrációs görbét feles erősségű Fraser levesben határoztam meg. A kalibrációs görbét a 10. ábra szemlélteti.



10. ábra: Real – time PCR módszer érzékenysége feles erősségű Fraser dúsítóban

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy a *Listeria*-k biztonságos kimutatásához a feles erősségű Fraser dúsítóban nagyobb, mint 2,5 log N/ml feles Fraser (>300/ml feles Fraser) sejtsűrűsége van szükség.

Az *E. coli* O157 kalibrációs görbét TSB levesben határoztam meg. A kalibrációs görbét a 11. ábra szemlélteti.



11. ábra Real – time PCR módszer érzékenysége TSB dúsítóban

A vizsgálati eredmények alapján megállapítható, hogy az *E. coli* O157 biztonságos kimutatásához a TSB dúsítóban nagyobb, mint 2,5 log N/ml TSB(>300/ml TSB) sejtsűrűsége van szükség.

Ha a mesterségesen fertőzött vagy természetesen fertőződött minták vizsgálatakor biztosan pozitív jelet szeretnénk kapni real-time PCR módszerrel, akkor a készülékbe helyezett mérő-cellában az elődúsított mintának (0,01 ml) minimum 5-10 sejtet kell tartalmaznia, amelyet akkor érünk el, ha az elődúsítást úgy irányítjuk, hogy az oldat egy ml-e 300-1000 célmikroorganizmus sejtet tartalmazzon. A real –time módszer legalacsonyabb kimutatható sejtszámát a 41. táblázat tartalmazza.

41. táblázat: A real –time módszer legalacsonyabb kimutatható sejtszáma

Módszer	Sejt/dúsított minta	Sejt/mérő cella
Real –time PCR	10^{2-3} /ml	5-10 / 0,01 ml

5.3.2. *Salmonella* spp. vizsgálata real-time PCR módszerrel élelmiszer és takarmány mintákból

A kiválasztott mátrixok típusa előkészített hús, húskészítmény, csokoládé, fűszer, takarmány volt. Az ISO 16140 szabvány alapján 5 féle mintatípust kell megvizsgálni a sikeres összehasonlításhoz. Ezen mátrixok kiválasztását a szalmonellák élelmiszeripari termékben vagy azok környezetében tapasztalt legvalószínűbb előfordulása indokolta. A real-time PCR módszerrel kapott vizsgálati eredményeket a 42. táblázatban mutatom be. A real-time PCR és referencia módszer összehasonlításának eredményei az MSZ EN ISO 16140:2004 szabvány alapján a 43. táblázat tartalmazza.

42. táblázat: Élelmiszer, takarmány és környezeti minták real-time PCR és hagyományos *Salmonella* vizsgálati eredményeinek összefoglaló táblázata

Mátrix	Pozitív PCR	Pozitív ISO 6579	Negatív PCR	Negatív ISO 6579	Összes minta inhibíció nélkül
Nyers hús	17	7	286	296	303
Fűszerezett húsok	27	23	168	172	195
Felvágott	12	10	80	82	92
Csokoládé	3	3	40	40	43
Fűszer	0	0	9	9	9
Takarmány	13	1	500	512	513
Környezeti minta	12	1	213	224	225
Zöldség, gyümölcs	6	4	14	16	20
Összesen	90	49	1310	1351	1400

43. táblázat: A real-time PCR és referencia módszer összehasonlításának eredményei az MSZ EN ISO 16140:2004 szabvány alapján élelmiszer, takarmány és környezeti minták vizsgálatakor

Élelmiszer mátrix	Összes vizsgált minta db	Relatív pontosság %		Relatív specifikus-ság %		Relatív érzékenység %	
		Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR	Saját értékek	AFNOR
Nyers hús	303	96,7	100	96,6	100	100	100
Fűszerezett húsok	195	97,9	100	97,7	100	100	100
Felvágottak	92	97,8	100	97,6	100	100	100
Csokoládé	43	100	-	100	-	100	-
Fűszer	9	100	-	100	-	100	-
Takarmány	513	97,7	98,5	97,7	100	100	96,7
Környezeti minta	225	95,1	-	95,1	-	100	-
Zöldség, gyümölcs	20	90,0	-	87,5	-	100	-
Összesen	1400	Átlag: 97,1	-	Átlag: 97,0	-	Átlag: 100	-

AFNOR (hús, tejtermék, zöldség és halászati termék, állateledel)

A 43. táblázat alapján megállapítható, hogy a real-time PCR módszerrel mért eredmények a fűszer minták kivételével eltérést mutatnak a referencia módszer eredményeihez képest. Minden megvizsgált mintacsoportnál a feltételesen pozitív mintákat szabványos módszerrel vizsgáltam tovább. Nyershús mintáknál 10, fűszerezett húsok esetén 4, felvágott mintáknál 2, takarmány minták esetén 12, környezeti mintáknál 11 és zöldség-gyümölcs esetben 2 tapasztaltam hamis pozitív eredményt. Hamis negatív eredményt egyetlen minta esetén sem figyeltem meg. A real-time PCR módszerre vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság, relatív specifitás és relatív érzékenység tekintetében magasabb értékeket mutatnak, kivéve takarmány minták esetén, ahol a relatív érzékenység adatok alacsonyabbak.

5.3.3. *E.coli* O157:H7 előfordulásának feltérképezése üzemi környezetben

A vizsgálat célja a hűtött helyeken, a húson, munka közben használt felületeken, környezetben az *E.coli* O157:H7 előfordulásának feltérképezése. Jelen vizsgálatunk keretében ennek a kérdéskörnek a higiéniai vonatkozását tártam fel: elsődleges célom azoknak a területeknek a feltárása, ahonnan a termék kontaminálódhat. A 2073/2005 EK mikrobiológiai rendelet az élelmiszer-biztonsági kritériumok között előírja, hogy az élelmiszer nem tartalmazhat élő *E. coli* O157:H7 sejtet. Mintavétel során azokat a helyeket részesítettük előnyben, ahol a vizsgált felületek közvetlenül érintkeznek a termékkel, és így fennáll a kontamináció lehetősége, valamint ahol az *E. coli* O157:H7 szaporodására optimális feltételek vannak.

47 darab higiéniai és 3 darab mesterségesen fertőzött mintát vizsgáltam. Az *E. coli* O157-tel mesterségesen fertőzött minták kiindulási sejtszáma <10 sejt / 25 g volt. A mintákat 3 alkalommal munka közben az üzem egész területéről vettem. A mintavétel módja tamponos törlés volt (100 cm² felületről). Ahol a minta jellege megkívánta (nyesedékhús), ott 25 g volt a vizsgálati alap.

A fenti szempontoknak megfelelően a vizsgált felületek vágólapok, kések, kezek, kesztyűk. Környezetben az *E. coli* O157:H7 szaporodására alkalmas helyek padozatok, raklapok, ajtók, falak, tisztítóeszközök voltak.

A vizsgálat során real-time PCR alternatív mikrobiológiai módszert hasonlítottam össze a referencia módszerrel az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján. Meghatároztam a relatív pontosságot, relatív specifikusságot és a relatív érzékenységet.

A 47 darab higiéniai minta esetén egyetlen alkalommal sem volt kimutatható *E. coli* O157:H7 hagyományos vizsgálati eljárással, és real-time PCR sem igazolta annak jelenlétét. A real-time PCR módszerrel kapott vizsgálati eredményeket a 44. táblázatban mutatom be. A real-time PCR és referencia módszer összehasonlításának eredményeit az MSZ EN ISO 16140:2004 szabvány alapján a 45. táblázat tartalmazza.

44. táblázat: *E.coli* O157 kimutatására alkalmas alternatív vizsgálati módszer eredményeinek összehasonlítása MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján

	Referencia módszerrel +	Referencia módszerrel -
Alternatív módszerrel: +	p = 3	f _p = 0
Alternatív módszerrel: -	f _n = 0	n = 47

- Relatív pontosság: $100 \cdot (0+47) / 47 = 100 \%$
- Relatív specifitás: $100 \cdot 47 / (47+0) = 100 \%$
- Relatív érzékenység: $100 \cdot 3 / (3+0) = 100 \%$

45. táblázat: A real – time PCR és a referencia módszer összehasonlításának eredményei az MSZ EN ISO 16140: 2004 szabvány alapján

Real-time PCR	Relatív pontosság:	Relatív specifikusság:	Relatív érzékenység:
	100%	100%	100%

A 45. táblázat alapján megállapítható, hogy a real-time PCR módszerrel mért eredmények nagyon jó egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. Az *E. coli* O157 real-time PCR-rel végzett vizsgálatok során nem tapasztaltam sem hamis pozitív, sem hamis negatív eredményeket.

5.4. Mátrix hatás elemzés

5.4.1. Élelmiszerek és takarmányok mátrix hatása patogének kimutatására kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajoknál

A vizsgálataim azt mutatták, hogy a *Salmonella* izolálására szolgáló kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajokkal végzett vizsgálatok összehasonlítható eredményei jobbak, mint az AFNOR által hat mátrix csoportba (hús, tejtermék, tojás, zöldség, takarmány, környezeti minta) mért értékek. Az eltérés oka a minták különbségéből adódhat.

A Harlequin *Salmonella* ABC agar specifikusságban való eltérés oka lehet, hogy egyes feltételeken *Salmonella* pozitívnak minősített telepek a valós *Salmonella* tenyészetekhez hasonló (sötétebb zöld) színt mutattak, viszont a megerősítő biokémiai és szerológiai vizsgálat során a *Salmonella* negativitás bizonyosodott be. Az azonosító vizsgálatok során *Citrobacter freundii* törzsek kerültek azonosításra.

Az irodalmi adatok is alátámasztják, hogy a kromogén szubsztrátot tartalmazó agarokon *Acinetobacter baumannii*, *Citrobacter freundii*, *Shigella dysenteriae*, *Morganella morganii*, *Hafnia alvei*, *Pseudomonas aeruginosa* okozhat hamis pozitív enzim reakciót 24 órát meghaladó inkubálás esetén (Dijk et al., 2009).

A pontosságban való eltérés oka lehet a dúsítás során nem elegendő mértékben gátolt kísérő mikrobióta következtében detektált téves pozitív *Salmonella* eredmény, vagy a szelektív táptalajon a *Citrobacter freundii* által termelt enzim detektálása.

Megfigyeléseink alapján a hagyományos táptalajon a *Citrobacter* és a *Proteus* hasonló telepeket képez, mint a H₂S-negatív szalmonellák. Ennek a hibás diagnosztikai eredménynek kiküszöbölésére alkalmasak a kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajok.

A vizsgálataim azt mutatták, hogy a *Listeria monocytogenes* izolálására szolgáló kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajokkal végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei jobbak, mint az AFNOR által négy mátrix csoportja (hús, tejtermék, zöldség, környezeti minta) mért értékek. Az eltérés oka itt is a minták különbségéből adódhat.

A Compass *Listeria* (BioRad) és a Harlequin agarral végzett vizsgálatok specifikusságban való eltérés oka lehet feltételelesen *Listeria monocytogenes* pozitív telepek azonosításakor a *Listeria* spp. és *Listeria innocua* telepek detektálása. Az irodalmi adatok alapján ismert, hogy *Enterococcus faecalis* és *E. faecium* adhat hamis pozitív reakciót kromogén szubsztrátos táptalajoknál környezeti minták vizsgálatakor. Előfordulhatnak olyan feltételelesen *Listeria monocytogenes* pozitívnak ítélt telepek, melyek gyengébb enzim aktivitásuknak köszönhetően 24 óra elteltével még nem képeznek a telepek körül megfelelő nagyságú halot, akár a *Listeria* nemzetség (pl. *L. ivanovii*) más tagjai. Ezeknek a tenyészeteknek az értékelését egy későbbi időpontban meg kellett ismételni (Richard et al., 2004).

A pontosságban való eltérés oka lehet a dúsítások során nem elegendő mértékben gátolt kísérő mikrobióta következtében detektált fals pozitív *L. monocytogenes* eredmény, vagy a szelektív táptalajon *Listeria* spp., *Listeria innocua*, *Enterococcus faecalis* és *E. faecium* által termelt enzim detektálása. A korábban említett okokból szükségesnek tartottam a dúsítások vezetésének optimalizálását.

Az irodalmi adatokkal egyezően mind megbízhatóság, mind értékelhetőség szempontjából a RAPID'*L. mono* táptalajt ítéltam a legjobbnak.

5.4.2. Élelmiszer és takarmány mátrixok hatása patogének kimutatására VIDAS vizsgálatoknál

A vizsgálataim azt mutatták, hogy a VIDAS ICS2-SLM módszerrel végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei a pontosság és specifikussági adatok tekintetében hasonlóak az AFNOR által öt mátrix csoportra (hús, tejtermék, zöldség, állateledel és kakaós termékek) mért értékekkel.

A specifikusságban való eltérés azt jelenti, hogy egyes mátrixok esetén a műszer pozitív szalmonella eredményt jelzett, ezzel szemben az elvégzett szabványos dúsítás, szelektív táptalajon való megjelenés, majd a biokémiai és szerológiai vizsgálat során a szalmonella negativitás bizonyosodott be.

A korszerű vizsgálati technikákkal végzett összehasonlító vizsgálatok rávilágítanak a „gold standard” módszer korlátaira. A nyers hús mátrix esetén hagyományos módszerrel negatívnak ítélt esetben a műszer pozitív jelzésekor az M levestől végeztem el a megerősítő vizsgálatot, amely szalmonella pozitivitást eredményezett a tenyésztési módszerrel ellentétben. Ennek oka lehet az elődúsítóban nagy mértékben elszaporodó versengő mikrobióta, amely nem engedi tápanyaghoz jutni a *Salmonella* nemzetség tagjait. A hagyományos vizsgálatkor szintén hiba forrása lehet az XLD agaron a *Proteus* nemzetség tagjainak rajzása. A kirajzott telepek befedik az agaron kinőtt *Salmonella* telepeket, ezzel megnehezítik, esetenként lehetetlenné teszik a vizsgálni kívánt telepek azonosítását.

Ezek a mérési nehézségek kiküszöbölhetőek az ELFA és molekuláris technikákkal.

A pontosságban való eltérés oka lehet, a dúsítás során nem elegendő mértékben gátolt kísérő mikrobióta következtében hamis pozitív *Salmonella* eredmény keresztreakció miatti detektálása.

Méréseim során megállapítottam, hogy a VIDAS LMO2 teszttel végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei jobbak, mint az AFNOR által négy mátrix csoportra (hús, tejtermék, zöldség, környezeti minta) mért értékek. Az eltérés oka a minták különbségéből adódhat.

Az eltérések oka lehet feltételelesen *Listeria monocytogenes* pozitív eredmények azonosításakor a *Listeria* spp. törzsek detektálása, továbbá az irodalmi adatokban már korábban említett *Enterococcus faecium* és *L. innocua* keresztreakció (Richard et al., 2004).

5.4.3. Élelmiszerek és takarmányok mátrix hatása patogének kimutatására real –time PCR vizsgálatoknál

A különböző élelmiszer mátrix hatását a szalmonellák kimutatására real –time PCR vizsgálatok esetén a 46. táblázat mutatja.

46. táblázat: Az élelmiszer mátrix hatása szalmonellák kimutatására real –time PCR vizsgálatoknál

Mátrix	Összes minta	Összes minta inhibíció nélkül	PCR inhibíció	Pozitív ISO 6579	Negatív ISO 6579
Nyers hús	303	303	0	0	0
Fűszerezett húsok	220	195	25	5	20
Felvágott	92	92	0	0	0
Csokoládé	44	43	1	0	1
Fűszer	9	9	0	0	0
Takarmány	524	513	11	1	10
Környezeti minta	231	225	6	0	6
Zöldség, gyümölcs	22	20	2	0	2
Összesen	1445	1400	45	6	39

A PCR pozitív minták esetében mindig elvégeztem a megerősítő vizsgálatot, amely alapján egy nyershús mintánál beigazolódott, hogy a negatív szabványos eredménnyel szemben valódi pozitív volt. Ennek oka a nagy számú kísérő mikrobióta (főleg *Proteus* spp.) jelenléte volt, mely a szabványos szelektív táptalajokon elfedte a *Salmonella* telepet.

45 esetben részleges vagy teljes inhibíciót figyeltem meg, amelyek eredményeit szabványos tenyésztési eljárással erősítettem meg. A megerősítő vizsgálatok 6 minta esetén valós pozitívítást eredményeztek.

Méréseim alapján a real-time PCR vizsgálatoknál teljes vagy részleges inhibíciót tapasztaltam a következő mintacsoportoknál:

- Előkészített (fűszerezett, marinált) húsok
- Csokoládé, kakaó alapú termékek
- Takarmány minták

- Környezeti minták
- Sötét, színes zöldség és gyümölcs minták

Előkészített húsok teljes vagy részleges inhibíciót okoztak.

Teljes inhibíciót tapasztaltam az előkészített húsoknál, ahol exponenciális görbék emelkedésének elmaradása tapasztalható. Ez azt jelzi, hogy a DNS felszaporítása nem ment végbe. Az élelmiszeriparban használt eljárások, mint például a fűszerezés, felületi kezelés hatása teljes inhibíciót okozhat. A 13. ábrán egy teljes inhibíciót mutató marinált húsminta PCR görbéje látható.

Részleges inhibíció esetén több ciklussal eltolódott az IPC görbe, ez azt mutatja, hogy a cél DNS felszaporítása nem a megfelelő módon ment végbe. A 14. ábrán egy részleges inhibíciót mutató fűszerezett hús minta PCR görbéje látható.

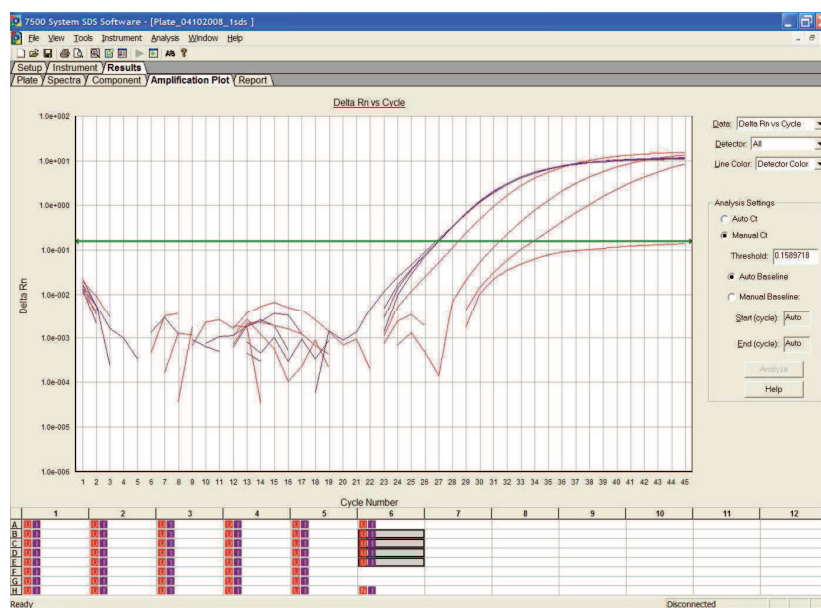
Egy kakaó alapú terméknel (**csokoládé**) szintén teljes inhibíciót tapasztaltam.

Takarmány és takarmány üzemből származó **környezeti minták** (porok) estén is teljes vagy részleges inhibíciót tapasztaltam. A minták színezéket tartalmaztak, amely gátolta a PCR reakciót.

A sötét vagy jelentős mennyiségű színyanyagot (önocianin, antocianin) tartalmazó **gyümölcsöknél, zöldségeknél** is teljes inhibíciót figyeltem meg.

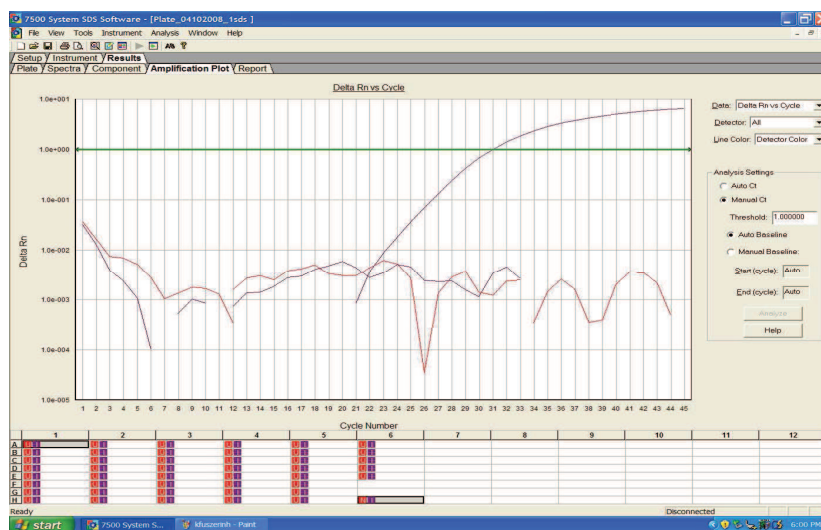
A 12. ábrán látható a BPW dúsítóból + mintából készített hígítási sorok amplifikációs görbéire egy példa 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 tke/ ml nagyságrendekben. Az egyes hígítások közt közel három ciklus különbséget tapasztaltam.

Példa hígítási sor amplifikációs görbéire



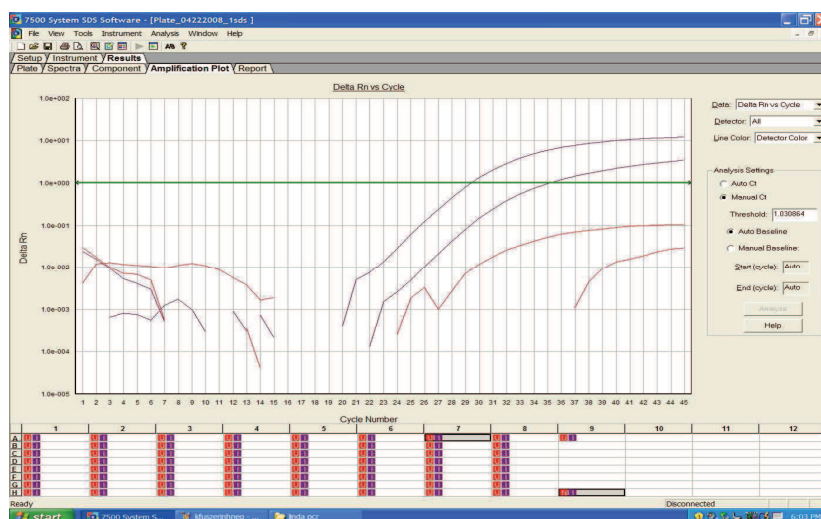
12. ábra: Példa hígítási sorok amplifikációs görbéire

Példa teljes inhibícióra



13. ábra: Példa teljes inhibícióra real-time PCR vizsgálat esetén

Példa részleges inhibícióra



14. ábra: Példa részleges inhibícióra real –time PCR vizsgálat esetén

5.5. Dúsítások vezetésének optimalizálása

A kórokozók vizsgálati eredményeinek összehasonlításakor rávilágítottam, hogy az eltérések az alkalmazott kimutatási módszerek mellett nagy mértékben a dúsítások vezetésétől függenek. A dúsítások nem megfelelő vezetése hamis negatív eltéréseket eredményezhet, mert a vizsgálati protokoll alapján végzett előkészítéssel nem minden esetben éri el a dúsító a kimutatáshoz szükséges sejtsűrűséget. Kórokozók esetén az 1-5 sejt / 25 g kimutatási határt úgy tudjuk elérni, ha az elődúsítás végén 10^{3-4} sejt / ml van az elődúsítóban. Az alkalmazott vizsgálati módszereknél a dúsításokhoz szükséges sejtsűrűséget a 47. táblázatban foglaltam össze.

47. táblázat: A *Salmonella* vizsgálati módszereknél optimális elődúsítás vagy dúsítás során elérendő sejtsűrűségek

Módszer	Sejt / elődúsított minta	Sejt / dúsított minta	Sejt/mérő cella
ISO	10^{3-4} /ml	10^{6-7} /ml RVs	10^2 /0,01 ml kacs
VIDAS SLM	10^{3-4} /ml	10^{6-7} /ml RVs	$5 \cdot 10^5$ /0,5 ml
VIDAS ICS2 SLM	10^{3-4} /ml	10^{6-7} /ml M-leves	$5 \cdot 10^5$ /0,5 ml
Real-time PCR	10^{2-3} /ml	-	5-10 /0,01 ml

Az elődúsítás és a dúsítás vezetése alapvetően meghatározza a módszer elméleti kimutatási határát mind az elődúsító, mind az elődúsítási időtartam megválasztásával. Az elődúsítás célja a sérült sejtek reszuszitációja, ami döntően függ az elődúsító összetételétől és a vizsgálandó élelmiszertől.

Kakaó és csokoládé termékek gátló hatást fejtenek ki a *Salmonella* szaporodására, amit sovány tejben történő elődúsítással kompenzáltunk, a várható nagyobb számban előforduló kísérő mikrobiótát pedig brillantzöld oldat hozzáadásával szorítottuk vissza.

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

A következő *Campylobacter* vizsgálati példával szemléltetem a dúsítás optimalizálását.

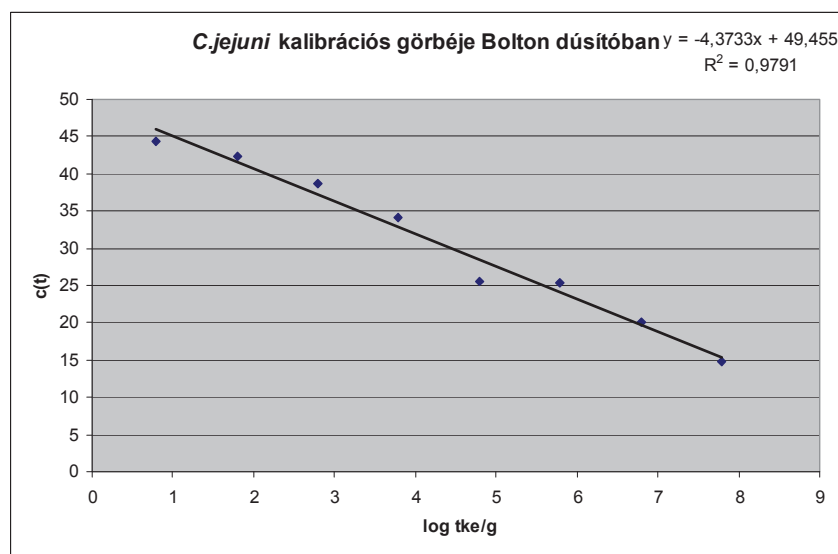
5.5.1. *Campylobacter* vizsgálatok eredményei

Az EU *Campylobacter* felmérő vizsgálat egyik megállapítása az volt, hogy országonként nincs szignifikáns különbség a vágóhidakon a *Campylobacter* pozitivitásban, azonban a szennyezettség mértékében igen. Emiatt tervezi a Bizottság kvantitatív mikrobiológiai kritérium bevezetését a vágóhidakon. (<http://www.hungalimentaria.hu/Default.aspx?tabid=165>).

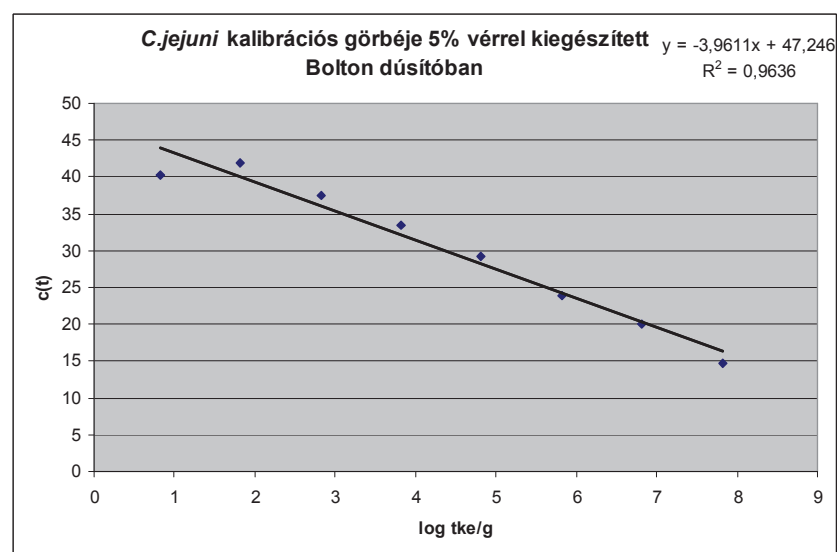
Az élelmiszer-eredetű kórokozók molekuláris módszerekkel történő kimutatása iránt egyre inkább növekszik az igény. A patogének gyors és specifikus kimutatásánál a PCR-alapú módszerek valós alternatívát kínálnak a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatok mellett. Manapság a kihívást ezen a módszerek alkalmazása során a cél DNS-szekvenciák PCR technikával történő amplifikációja, valamint patogének számának meghatározása előzetes dúsítás vagy tenyésztés nélkül a közvetlenül az élelmiszerből jelenti. Vizsgálatom célja volt négy különböző *Campylobacter* spp. kimutatására alkalmas szelektív dúsító oldat (Bolton dúsító, Bolton dúsító és 5%-os juhvér, Preston dúsító, Preston dúsító és 5%-os juhvér) összehasonlítása. Kísérletem tervezésénél abból indultam ki, hogy az egyes dúsítók összetevői inhibitorokat tartalmazhatnak, amelyek megnehezítik az eredményes kimutatást. Feltételeztem, hogy az alkalmazott dúsító oldatok eltérően befolyásolják a *Campylobacter* spp. szaporodását, mivel összetételük különböző. Az összehasonlító vizsgálat során hagyományos tenyésztési eljárásokat és egy optimalizált qPCR módszert alkalmaztam.

A vizsgálat első lépéseként a kimutatási határ meghatározása érdekében *Campylobacter jejuni* törzsből tízes alapú hígítási sort készítettem mind a négy dúsító oldatból.

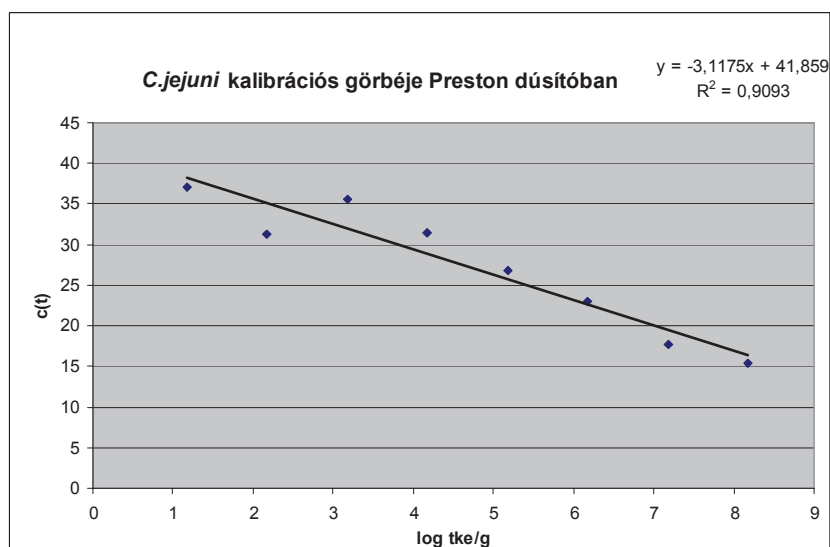
Meghatároztam mCCDA agaron a hígításokban lévő *Campylobacter* számot és ezzel párhuzamosan elvégeztem a qPCR vizsgálatot. Különböző hígítási fokok sejtszáma és a qPCR vizsgálatoknál leolvasott C(t) alapján kalibrációs görbét szerkesztettem. A C(t) értékeket ábrázolva a lgN értékek függvényében, az összefüggést lineáris regresszióval határoztam meg. Az ábrákon az egyenes egyenletét és a determinációs együttható (R^2) értékét is feltüntettem. A kalibrációs görbéről leolvasható, hogy a legalacsonyabb detektált sejtszám a két Bolton dúsítóban (10^1 tke/g és 10^2 tke/g a Preston dúsítók esetében. A kalibrációs görbéket a 15- 19. ábra mutatja.



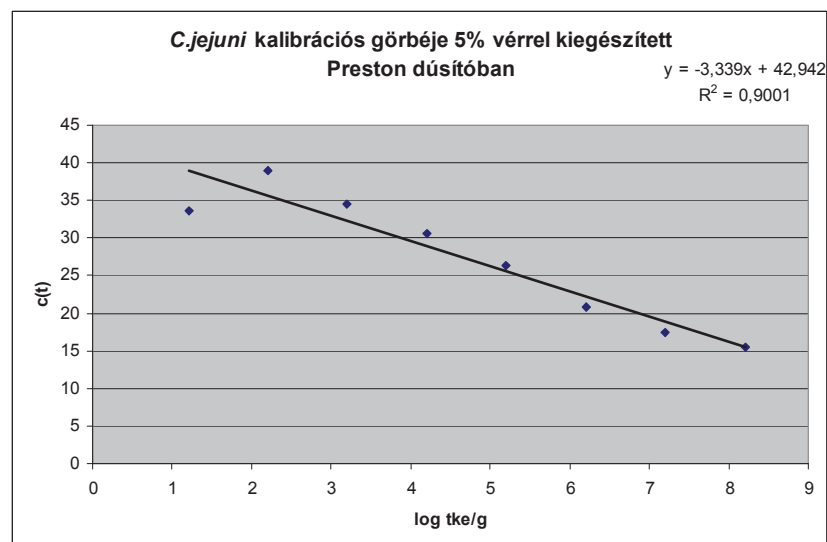
15. ábra: *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje Bolton dúsítóban



16. ábra: *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje 5% juhvért tartalmazó Bolton dúsítóban

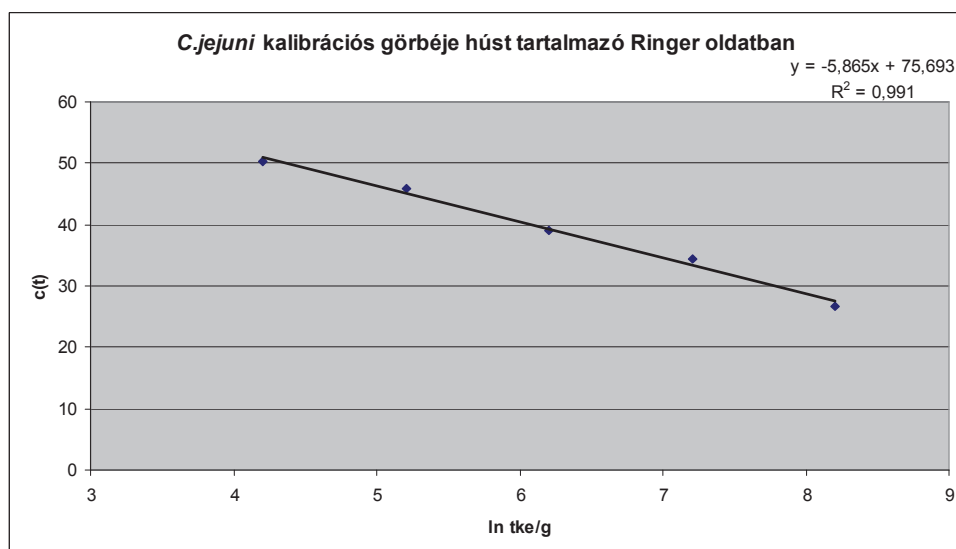


17. ábra: *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje Preston dúsítóban



18. ábra: *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje 5% juhvért tartalmazó Preston dúsítóban

Második lépésben kalibrációs görbét határoztam meg a csirke mintát tartalmazó Ringer oldatban. Az egyes hígítások mikrobaszámát felületi szélesztés módszerrel határoztam meg. A Ringer oldatba mért húsminta vizsgálatnál meghatározott kimutatási határ 10^{4-5} tke/g volt. A kalibrációs görbét a 19. ábra tartalmazza.



19. ábra: *Campylobacter jejuni* kalibrációs görbéje húsminta tartalmú Ringer oldatban

A *C. jejuni* baromfi mintákból történő kimutatásához egy qPCR alapú protokollt alkalmaztam és ezzel párhuzamosan a hagyományos mikrobiológiai vizsgálatokat is elvégeztem.

Negyven minta elemzésére került sor, amelyek az olaszországi Piemont Megyében lévő bevásárlóközpontokból származtak. A minta jellege hűtött darabolt baromfi, amelyet előzetesen csomagoltak és 4 °C-on tároltak az üzletekben. A mintavétel időpontjában (t=0) számmeghatározást, majd t=6, t=24 és t=48 időpontokban a mintákból kivont DNS felhasználásával elvégeztem a qPCR vizsgálatot. Ezzel egy időben hagyományos mikrobiológiai elemzést is végeztem t=0, t=6, t=24 és t=48 időpontokban.. A t=0 időpontban mennyiségi meghatározást mellett minőségi elemzést is végeztem. A négy dúsítóval végzett vizsgálati eredményeket az 48. táblázatban foglaltam össze. A táblázatban szereplő értékek a pozitív minták számát jelentik qPCR módszerrel szelektív dúsítást követően.

48. táblázat : 40 kereskedelemről származó minta eredményei dúsítás után qPCR vizsgálattal négy *Campylobacter* dúsítóból

Mintavétel időpontja			
Dúsító oldatok	t=6	t=24	t=48
Bolton	11	7	16
Bolton vérrel kiegészítve	10	15	19
Preston	13	8	12
Preston vérrel kiegészítve	12	6	16

A közvetlen mintából történt vizsgálatoknál, $t=0$ időpontban, qPCR módszerrel a 40 mintából 7 minta bizonyult feltételesen pozitívnak, rávilágítva ezzel a *C. jejuni* jelenlétére. A szám-meghatározáshoz használt kalibrációs görbéről leolvasott értékek mind a 7 minta esetén 10 és 100 tke/g közötti eredményt adtak. Ez arra enged következtetni, hogy vagy az elhalt sejtek DNS-ének jelenlétét érzékeltük a $t=0$ időpontban, vagy okozhatja az, hogy a *C. jejuni* stresszelt és / vagy a sérült sejtek nem képesek alkalmazkodni és szaporodni csupán hosszabb idő elteltével a használt szelektív dúsító oldat által biztosított szelektív környezetben. Megfigyelhető, hogy már 6 órás dúsítást követően a pozitív minták száma 7-ről átlagosan 10 körüli értékre emelkedett. A legtöbb pozitív eredményt a Preston dúsítónál figyeltem meg. 24 óra elteltével a Bolton vérrel kiegészített dúsító oldat kivételével minden dúsítóban lecsökkent a jelet adó minták száma, majd a 48 óra elteltével újra megemelkedett. Ezt a jelenséget Habib és munkatársai (2008; 2011) is tapasztalták Bolton dúsító alkalmazása során. Lehetséges, hogy ilyen körülmények között a versengő mikrobiota háttérbe szorítja a *C. jejuni* növekedését és megakadályozza annak DNS- amplifikációját. Folyamatos emelkedés volt megfigyelhető a Bolton vérrel kiegészített dúsítónál, ahol 19 minta tartalmazott *C. jejuni* törzset. A vér adalékot tartalmazó dúsítók hatékonyabbnak bizonyultak, mint az adalék mentesek, ezt Williams és munkatársai (2009) is bizonyították csirke felületi minták vizsgálatakor vérrel kiegészített Bolton dúsító alkalmazásakor.

A 40 vizsgált mintából 29 mutatott jellegzetesen *Campylobacter spp.* telepeket $t=0$ időpontban, a mennyiségi meghatározáskor 10 és 100 tke/g közötti értékeket kaptam. A telepszámok mCCDA és Brilliant Campy Count agar összehasonlításakor jól korreláltak három mintától eltekintve, amelyek esetében csupán az mCCDA agaron volt megfigyelhető a telepképződés. A jellegzetes telepeket tartalmazó minták száma a dúsítási idő előrehaladtával növekedett. Az összes mintavételi pontban feltételezetten pozitív *Campylobacter spp.* telepeket izoláltam és mPCR módszerrel azonosítottam. Az izolátumok száma összesen 480 darab volt. A 40 természetesen fertőzött minta eredményei dúsítás után tenyésztéses vizsgálattal négy *Campylobacter* dúsítóból a 49. táblázat tartalmazza. A táblázatban szereplő értékek a jellegzetes *Campylobacter spp.* telepeket mutató feltételesen pozitív minták számát jelzik a négy dúsító oldatban.

49. táblázat : 40 kereskedeleméből származó minta eredményei dúsítás után tenyésztés vizsgálatával négy *Campylobacter* dúsítóból. A zárójelben található számértékek az mCCDA agarról izolált, mPCR módszerrel történő identifikáláskor kapott *Campylobacter* spp. –ként azonosított minták számát jelentik.

Dúsító oldat	T=6	T=24	T=48
Bolton	7 (0)	22 (0)	28 (0)
Bolton+vér	3 (0)	22 (2)	25 (0)
Preston	8 (0)	9 (0)	14 (0)
Preston+vér	4 (0)	9 (0)	16 (0)

Összesen 7 telep a 480 izolátumból adott pozitív PCR jelet, ezek közül 5 dúsítás nélküli izolátum (3 Brilliant Campy Count és 2 pedig mCCDA agarról) és kettő órás 24 órás vérrel kiegészített Bolton dúsítóból szélesztett mCCDA agarról azonosított izolátum. A 7 közül hármat *C. jejuni*-ként, a többit *Campylobacter* spp. –ként azonosítottam. Ezen adatok alapján 4 mintáról bizonyosodott be t=0 időpontban és 2 mintáról 24 órás dúsítás után (55. táblázat), hogy *Campylobacter* spp. pozitív. A hagyományos és qPCR módszerrel kapott eredmények az összehasonlítás során nem mutattak jó egyezést. A minták közel 50%-a qPCR módszerrel *Campylobacter jejuni* pozitívak, amit a tenyésztési módszer nem bizonyított. A tenyésztési módszerrel nagy számú minta mutatott jellegzetes telepeket, habár ezeket a molekuláris elven működő azonosításra használt mPCR módszer nem támasztotta alá. A számmeghatározásra használt hagyományos tenyésztési módszerek közül a kromogén szubsztrát tartalmú Brilliant Campy Count Agar alkalmasabbnak bizonyult az mCCDA agarral szemben, amelyen a telepek világos-szürke színűek és morfológiailag sokfélék lehetnek. A tipikus és atipikus telepek elkülönítése is meglehetősen nehézkes. Jasson és munkatársai (2009) megállapították, hogy a kiterjedt-spektrumú β -laktamáz termelő *E. coli* a *Campylobacter* spp.-hez hasonló telepeket képez az mCCDA agaron, ami szintén megnehezíti az izolátumok elkülönítését.

Ebben a vizsgálatban a Brilliant Campy Count Agart kizárólag direkt számmeghatározásra használtam. A dúsított minták vizsgálatához mCCDA agart alkalmaztam, ezért a 480 telep legnagyobb részét erről a táptalajról izoláltam. A dúsítás után használt qPCR eljárás nagy százalékban és megbízhatóan mutatta ki a *Campylobacter jejuni* jelenlétét a kereskedelemből származó csirke mintákból, míg ezeket a hagyományos elemző módszerek nem teszik lehetővé. A tenyésztéses vizsgálati módszerek információvesztéset okoznak, mert ugyan a *Campylobacter* spp. kimutatására megfelelnek, de a leggyakrabban problémát okozó patogén *Campylobacter jejuni* faj kimutatására nem alkalmazható.

5.6. Vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra

A laboratóriumban korábban 24 órás teljes baromfi vizsgálatokat validáltunk TEMPO (Automatizált MPN Módszer) *E. coli*, mikrobaszám valamint *S. aureus* vizsgálatára.

Ennek a komplex 24 órás baromfi vizsgáló rendszernek a részeként kerestük a rendelkezésünkre álló szalmonella vizsgálati módszerek közül a legalkalmasabbat, amely gyorsan és megbízhatóan eredményt tud biztosítani a nyers baromfi terméket előállítók számára. Ebből a célból 141 csirke minta vizsgálatát végeztük el TaqMan *Salmonella enterica* kit (ABI), BAX System (DuPont) és VIDAS ICS2-SLM (BioMerieux) módszerekkel.

A 141 mintának 66 %-a bizonyult a referencia illetve gyorsmódszerekkel *Salmonella* pozitívnak, és 34 %-a negatívnak. Az általunk használt kétféle real-time PCR gyorsvizsgálati módszer szabványossal történő összehasonlító vizsgálata az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján a relatív érzékenység, pontosság és specifikusság alapján történt.

Az eredményeket a 10.2. mellékletben található *M7-M10. táblázat* tartalmazza. A vizsgálati paramétereket az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján határoztam meg (*50. táblázat*).

50. táblázat: Vizsgálati paraméterek meghatározása MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján

	Relatív pontosság	Relatív specifikusság	Relatív érzékenység
VIDAS ICS2+SLM	100%	100%	100%
Taqman Real-time PCR	99%	98%	100%
Bax Real-time PCR	100%	100%	100%

Egyetlen minta esetében a szabványos vizsgálati módszerrel nem volt kimutatható *Salmonella*, a Taqman Real-time PCR viszont igazolta annak jelenlétét. (Ennek oka lehet: a kísérő mikrobióta zavaró hatása a szabványos módszer esetén, és/vagy nagy számú holt *Salmonella* sejtek a felületen.)

A módszer összehasonlítások mellett a minták havi lebontású elemzésére is sor került. (51. táblázat)

A márciusi hónap vizsgálati szempontból csak fél hónapot ölelt fel, így ezt figyelmen kívül hagyva az őszi hónapok voltak a legmagasabbak *Salmonella* pozitivitás szempontjából.

51. táblázat: Baromfi minták *Salmonella* vizsgálati eredményei havi bontásban

Hónapok	Minta-szám	Pozitív ISO mód-szerrel	Negatív ISO módszer-rel	Pozitív %	Negatív %
március	9	8	1	88,88	11,12
április	17	7	10	41,17	58,83
május	16	11	5	68,75	31,25
június	16	9	7	56,25	43,75
július	18	10	8	55,55	44,45
augusztus	15	10	5	66,66	33,34
szeptember	17	14	3	82,35	17,65
október	17	13	4	76,47	23,53
november	17	13	4	76,47	23,53

A három alkalmazott módszer eredménye között nincs szignifikáns különbség *salmonella* vizsgálatok tekintetében, viszont a legrövidebb idő alatt az ABI Taqman real –time PCR módszerrel kaptunk eredményt.

Ajánlott *Salmonella* vizsgálati módszer baromfi esetén a TaqMan *Salmonella* vizsgálat, amely alkalmas 24 órán belüli eredményközlésre, amellyel lehetővé válik, hogy a baromfira előírt határértékeknek való megfelelés valamennyi paraméterét (*Salmonella*, *S. aureus*, *E. coli*, mikrobaszám) 24 óra elteltével előre jelezzük.

Ezzel a módszerfejlesztés olyan szintet ért el, hogy már nem elképzelhetetlen a baromfi termékek 24 órás teljes körű mikrobiológiai eredmény közlése és a rutin laboratóriumok megbízhatóan tudják kiszolgálni az ügyfeleket.

6. EREDMÉNYEK ÉRTÉKELÉSE, KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

6.1. Kórokozók vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal

6.1.1. *Salmonella* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal

Perez és munkatársai (2003) szintén összehasonlították több kereskedelemben kapható kromogén tartalmú tápagart (Harlequin *Salmonella*, Compass *Salmonella* és SM2 Agar) klinikai minták (széklet minták) felhasználásával. A legmagasabb relatív érzékenységet, 98,4%-ot az SM2 táptalaj esetén tapasztaltak. A Harlequin *Salmonella* Agar relatív érzékenysége 93,8%, míg a Compass *Salmonella* Agaré 89,1% volt. A relatív specifikusság a SM2 és Harlequin *Salmonella* Agar esetén 91% és Compass *Salmonella* Agar esetén pedig 96% volt széklet minták esetén. Az általam mért eredmények érzékenység és specifikusság tekintetében nagyobb százalékos értékeket mutattak, ezt valószínűleg a klinikai mintákban jelen lévő versengő mikrobióta nagy száma és sokszínűsége okozhatta. A Perez és munkatársai (2003) által legalkalmasabbnak talált COMPASS *Salmonella* Agar nálunk is teljes egyezést mutatott specifikusság, érzékenység és pontosság tekintetében a referencia módszerrel. Eredményeim alapján az MSZ EN ISO 6579 szabvány szerinti második táptalajnak mindhárom táptalaj megfelelő.

6.1.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal

Korábban Becker és munkatársai (2006) 310 késztermék minta (füstölt lazac, saláta, nyers és főttkolbász) vizsgálatát végezték el ALOA és RAPID'*L.mono* Agar párhuzamos alkalmazásával. Vizsgálataik eredményeként nem tapasztaltak hamis pozitív eredményeket, viszont egy esetben kolbász minták vizsgálatakor hamis negatív eredményt detektáltak az ALOA Agaron. Ez a szabványos módszer hibáira irányította a figyelmet. Az általam végzett vizsgálatok során nem tapasztaltam hamis negatív eredményeket. Az összehasonlító elemzéseim azt mutatták, hogy *Listeria monocytogenes* vizsgálatakor a kromogén szubsztrátot tartalmazó tápagarok MSZ EN ISO 16140 szabványban szereplő paraméterei a referencia módszerhez viszonyítva 100% -ban megegyeztek, így valamennyit második táptalajnak javaslom. A RAPID '*L. mono* Agar szelektívebb, könnyebben értékelhető, de a költsége ennek a táptalajnak a legnagyobb.

6.1.3. *E.coli* O157 vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajjal

Az *E.coli* O157 vizsgálatokor gyakran nehézséget okozott a szabványban meghatározott táptalajon a vizuális értékelés. A tipikus *E.coli* O157 telepek színe nem egyértelmű ezzel megnő a hamis pozitív telepek detektálásának esélye.

Az irodalomban Manafi és Kremsmaier (2001) is beszámolt hasonló esetről. Vizsgálataim során ugyan nem tapasztaltam hamis pozitív illetve negatív eredményeket, viszont az említett szerzőpáros vizsgálatai 53,3%-ban hibás pozitív és 5,9 %-os hamis negatív eredményt mutattak. Ezek az adatok arra irányítják a figyelmet, hogy a hagyományos vizsgálati módszerek specifikussága nem kielégítő. Mivel ez a mikroba nem fedi le a verotoxin termelő és főleg nem a HUS *E. coli* csoportot, erre a területre a műszeres vizsgálatokat javaslom.

6.2. Kórokozók vizsgálata immunológiai módszerekkel

6.2.1. *Salmonella* vizsgálata VIDAS módszerrel

Walker és munkatársai (2001) tejüzemben környezeti minták vizsgálatánál alkalmazták a hagyományos és VIDAS SLM módszert. Mata és munkatársai (2012) sajt minták összehasonlítását végezték VIDAS SLM és hagyományos módszerrel. A VIDAS SLM és hagyományos tenyésztési módszer összehasonlításakor jó egyezést tapasztaltak. Más szerzőkkel (Reiter et al., 2010) egyetértésben elmondható, hogy a VIDAS SLM módszer előnye a hagyományos tenyésztési módszerekkel szemben a gyorsaság mellett a kevés számú hamis pozitív eredmény detektálása. Korsak és munkatársai (2004) elvégezték hozzánk hasonlóan a VIDAS ICS2-SLM és VIDAS SLM módszerek összehasonlítását és ennek eredményeként azt tapasztalták, hogy amíg a VIDAS SLM 91,2%, a VIDAS ICS2-SLM csupán 81,5% egyezést mutatott a referencia módszerrel. Az általam végzett vizsgálatokból is az derült ki, hogy a VIDAS SLM alkalmasabb a *Salmonella* fajok kimutatására, mint a VIDAS ICS2-SLM. Ennek oka lehet, hogy a rövid ideig tartó M-levesben történő dúsítás során a *Salmonella*-k nem tudnak kellő mértékben elszaporodni. Ha az M-levesben nem érjük el a kimutatáshoz szükséges $5 \cdot 10^5$ - 10^6 sejt/ml sejtsűrűséget a VIDAS ICS2-SLM módszerrel negatív eredményt kapunk. Ez az alternatív gyors eljárás sikeresen alkalmazható a baromfi vágóhidak élelmiszerbiztonsági ellenőrzésére.

10. MELLÉKLET

10.1. IRODALOMJEGYZEK

Abdulraouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1999–2006.

Acheson, D., Allos, B. M. (2001) Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases* 32 (8): 1201-1206. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/319760>

Anon, (2006) Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157: H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, *The Journal of the American Medical Association* 296: 2195–2196. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.296.18.2195>

Arguedas-Villa, C., Stephan, R., Tasara, T. (2010) Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiology* 27(5): 653–660. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.009>

Aznar, R., Solis, I. (2006) PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1(2): 115-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-006-0019-0>

Bacon, R.T., Ransom, J.R., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K. E., Smith, G. C. (2003) Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 4123-4128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.7.4123-4128.2003>

Bailey, J.S., Cosby, D.E. (2003) Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. *Journal of Food Protection* 66:2138–2140.

Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G. D. W., Holzapfel, W. H. (2006) Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology* 109(25): 127–131. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.030>

Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (2002) Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry* 48(8):1178-1185.

Bickley, J. et al. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22:153–158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb01131.x>

BioMerieux Vidas Instrument User's Manual Fiches Protocoles VIDAS® Pathogènes Ref : 99762 Version B 12/2005.

Borucki, M. K., Reynolds, J., Gay, C. C., McElwain, K. L., Kim, S. H., Knowles, D. P. Hu, J. (2004) Dairy Farm Reservoir of *Listeria monocytogenes* Sporadic and Epidemic Strains *Journal of Food Protection* 11: 2368-2626.

Boyd, B., Lingwood, C. (1989) Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 51: 207-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000185286>

Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F. (1973) Related vibrio in stools. *Journal of Pediatrics* 82: 493-495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80131-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80131-3)

Butzler, J. P., J. Oosterom. (1991) *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12: 1-8. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90043-o](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90043-o)

Centers for Disease Control and Prevention. (1993) Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42: 258-263.

Cheung, P.-Y., Kwok, K.K., Kam, K.M. (2007) Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test, and a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. *Journal of Applied Microbiology* 103: 219–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03210.x>

Corry, J.E.L. and Atabay, H.I. (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 90: 96–114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x>

Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J. (1972) Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 125: 390-392. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/125.4.390>

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 406–410. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00658.x>

Denny, J., Bhat, M., Eckmann, K. (2008) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease* 5:321-328.

Dezső, P., Nagy, J. (2005) A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények* 111(4): 153-158.

Dijk, S.V. Bruins, M.J.Gijs J.H. and Ruijs, M. (2009) Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* 47(2): 456-458.

EFSA (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection – Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2006, *EFSA Journal*, 100: 1-86.

EFSA (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 *EFSA Journal*, 9(3):2090-2468.

EFSA (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597-3039.

EFSA (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4):3129-3379.

Élelmiszerbiztonsági Szemelvények (2012) 6/2012.

(http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/eki/kozerdeku_anyagok)

Elizaquivel, P., Aznar, R. (2008) Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection* 71: 2110–2114.

Eriksson, E., Aspan, A., (2007) Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3: 21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-3-21>

Ethelberg, S., Sorensen, G., Kristensen, B., Christensen, K., Krusell, L., Hempel-Jorgensen, A., Perge, A., Nielsen, E. M. (2007) Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiology and Infection* 135(6): 900-907. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268807008047>

Faber, J. M., Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiological Reviews* 55(3): 476–511.

FAO/WHO. 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in Chicken Meat: Meeting Report, MRA Series 19.

Focke, F., Haase, I., Fischer, M. (2011) DNA-Based Identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 513–520. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf103702s>

Frye, D. M., Zweig, R., Sturgeon, J., , Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L., Mascola, L. (2002) An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria*. *Clinical Infectious Diseases* 35 (8):943-949.

Greig, J. D., Todd, E. C., Bartleson, C. A., Michaels, B. S. (2007). Outbreaks where food

workers have been implicated in spread of foodborne disease, part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection* 70:1752-1761.

Griffin, P.M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 739–761. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL.(ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y.

Habib, I., Uyttendaele, M., and De Zutter, L. (2011) Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiology* 28: 1117-1123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.001>

Habib, I., Samper, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D., and De Zutter, L. (2008). Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Applied and Environmental Microbiology* 74(17): 5483-5489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00161-08>

Hayden, K.J., Rizzo, D., Tse, J., Garbelotto, M. (2004) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94: 1075-1083. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1075>

Hendriksen R. S. (2003) A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization Laboratory Protocols Level 4 Training Course Isolation and identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157.

Hyeon, J.Y., Park, J.H., Chon, J.W., Wee, S.H., Moon, J.S., Kim, Y.J., Seo, K.H. (2012) Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for *Salmonella* detection in highly contaminated chicken carcasses. *Poultry Science* 91(5):1222-1226. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01936>

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, Simultaneous, R. (1992) Amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10: 413-417. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0492-413>

Holbrook, R. (2000) Detection of microorganisms in foods – Principles of culture methods. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The microbiological safety and quality of food* Chapter 62: 1761-1790. Aspen Publishers, USA.

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276–7280.

Hsin-Yi, C., Chou, C.C. (2001) Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. Coli* O157: H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology* 70: 189–195.

Hussein, H.S., Bollinger, L.M. (2005) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science* 71: 676–689.

Indu, M.N., Hatha, A.A.M., Abirohsh, C., Harssha, U., Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south –Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:153-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.012>

Ingham, S. C., Tautorius C. L. (1991) Survival of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and indicator bacteria on cooked uncured turkey loaf stored under vacuum at 3°C. *Journal of Food Safety* 11(4): 285–292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00059.x>

Innis, M.A., Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Chapter 1. pp. 3-12. *Academic Press, Inc.*, San Diego, California.

Isaacs, S., Aramini, J., Ciebin, B., Farrar, J.A., Ahmed, R., Middleton, D., Chandran, A.U., Harris, L.J., Howes, M., Chan, E., Pichette, A.S., Campbell, K., Gupta, A., Lior, L.Y., Pearce, M., Clark, C., Rodgers, F., Jamieson, F., Brophy, I., Ellis, A. (2005) An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Food Protection* 68: 191-198.

Jackson M. P, Neill RJ, O'Brien A. D, Holmes R. K, Newland J. W. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters* 44: 109-114. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90210-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(87)90210-2)

Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele M. (2011) Detection of low numbers of healthy and sublethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *International Journal of Food Microbiology* 28: 488-491. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.031>

Jasson, V., Samperis, I., Botteldoorn, N., Lopez-Galvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J., and Uyttendaele, M. (2009) Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology* 135: 248-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.007>

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. (1983) Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1 (8314-5): 76–76. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91616-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91616-1)

Karmali, M., Steele, B. T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stool. *Lancet* i: 619-620. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6)

Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 151: 775–782. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/151.5.775>

Kasza Gyula, Szeitzné Szabó Mária, Mészáros László, Oravecz Márton, Zoltai Anna, Vásárhelyi Adrienn, Cseh Júlia, Hidi Edit, Horváth Zsuzsa, Süth Miklós, Laczay Péter (2011) Élelmiszer-eredetű megbetegedések Magyarországon, EU-tagságunk tükrében. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 133:(6) 368-375.

Kathariou, S.(2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65(11): 1811-1829.

Keith, M. (1997) Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. *Journal of Food Protection* 60: 682–685.

Kim, J., Lim, J., Lee, C. (2013) Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>

Korsak, N., Degeye, J.N., Etienne, G., China, B., Daube, G. (2004) Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *Journal of Food Protection* 67(10): 2158-2164.

Koyuncu, S., Gunnar Andersson, M., Häggblom, P. (2010) Accuracy and Sensitivity of Commercial PCR-Based Methods for Detection of *Salmonella enterica* in Feed. *Applied and Environmental Microbiology* 76(9): 2815-2822. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02714-09>

Leclercq A., Lambert B., Pierard D., Mahillon J. (2001) Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1161-1164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.3.1161-1164.2001>

Lequin, R. (2005) "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clinical Chemistry* 51 (12): 2415-2418. DOI: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

Li, J., Smith, N. H., Nelson, K., Crichton, P.B., Old, D. C., Whittam, T. S., Selander, R. K. (1993). Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *Journal of Medical Microbiology* 38: 129-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-38-2-129>

Lockley, A. K., Bardsley, R.G. (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology* 11: 67-77. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(00\)00049-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(00)00049-2)

Mag, T. (2009) Humán megbetegedéseket okozó *Escherichia coli* törzsek patogenetikai jellemzése. Semmelweis Egyetem, Budapest. *Doktori értekezés* pp.18-19.

Mag, T., Nógrády, N., Herpay, M., Tóth, I., Rozgonyi, F. (2010) Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 29(2):249-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0836-z>

Maráz, A., Marin, F., Cava, R. (2006) Microbial analysis of food. In: Luning, P.A., Devlieghere, F., Verhé, R. (eds.) Safety in the agri-food chain. Chapter 11: 471-524. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands.

Manafi, M., and Kremsmaier, B. (2001) Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International Journal of Food Microbiology* 30: 257-262. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00610-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00610-9)

Mata, G. M. S. C.; Vanetti, M. C. D. (2012) Comparison of conventional and rapid methods for *Salmonella* detection in artisanal Minas cheese. *Journal of Food Research* 1(3):178-193., DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n3p178>

Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M L. (2013) Different assembly of acid and salt tolerance response in two dairy *Listeria monocytogenes* wild strains. *Archives of Microbiology* 195(5): 339-348. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-013-0878-6>

Mohr, J., Pollex G. (1998) Agglutinating monoclonal antibodies in diagnosis of salmonellosis. *Biotest Bulletin* 6: 75-83.

Morrison, D.M., Tyrrell, D.L., Jewell, L.D. (1986) Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *American Journal of Clinical Pathology* 86(1):108-12.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51: 263-273. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>

Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, H.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29: 407-439. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/path.1700290409>

Nadeau, E., Messier, S. & Quessy, S. (2002) Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection* 65: 73-78.

Narang, N., Fratamico, P. M., Tillman, G., Pupedis, K., Cray, W.C. Jr. (2009) Performance comparison of a fliC(h7) real-time PCR assay with an H7 latex agglutination test for confirmation of the H type of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 72: 2195-2197.

Neill, M. A., Agosti, J., Rosen, H. (1985) Hemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult hemolytic uremic syndrome. *Arch Intern Med.* 145 (12): 2215-2217. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.145.12.2215>

Ogunjimi, A. A., Choudary, P. V. (1999) Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23(3): 213-220. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244\(98\)00138-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244(98)00138-2)

Perez, J.M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y., Freydière, A.M. (2003) Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1130-1134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.3.1130-1134.2003>

Pless, P., Reissbrodt, R. (1995) Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture. *International Journal of Food Microbiology* 27(2-3): 147-159. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00160-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00160-8)

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3(1): 18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>

Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L. (2008) Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. 329 *International Journal of Food Microbiology* 121: 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>

Rantsiou, K., Lamberti, Cocolin, L. (2010) Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology* 141. Suppl 1:S75-S79. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.002>

Reiter, M. G., López, C., Jordano, R., Medina, L.M. (2010) Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses. *Food Analytical Methods* 3 : 253–260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9129-5>

Richard, C., Drider, D., Fliss, I., Denery, S., Prevost, H. (2004) Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 248-254. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.1.248-254.2004>

Riley, R., Guilleminault, C., Herran, J., Powell, N. (1983) Cephalometric analyses and flow-volume loops in obstructive sleep apnea patients. *Sleep* 6: 303-311.

Rohonczy, K., Fodor, A., Tabajdiné, P. V., Mohácsiné, F. C. (2007) Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló korszerű gyorsmódszerek összehasonlító vizsgálatai. *Hungalimentaria 2007 Konferencia Budapest 2007. október 25-26. Összefoglalók 18 p.*

Scheutz, F., Moller Nielsen, E., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, Nataro, R. J. P., Caprioli, A. (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May. *Euro Surveill.* 2011;16(24):pii=19889.

Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889>

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., A., and Teixeira, P. (2011) *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2, 200. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>

Skirrow, M.B. (1977) *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *British Medical Journal* 2:9-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.6078.9>

Smigic, N., Rajkovic, A., Antal, E., Medic, H., Lipincka, B., Uyttendaele, M., Devlieghere,

F.(2009) Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with Lactic Acid, Neutralized Electrolyzed Oxidizing Water and Chlorine Dioxide Followed by Growth Under Sub-optimal Conditions of Temperature, pH and Modified Atmosphere. *FOOD MICROBIOLOGY* 26(6): 629-637. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.010>

Sréterné Lancz, Zs., Frankovicsné Adrián, E., Fekete, A., & Kissné Fias, K.(2008) Állati eredetű élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága Magyarországon. *ÉLELMISZERVIZSGÁLATI KÖZLEMÉNYEK* Ksz. 54:78-89.

Sréterné Lancz Zs. (2011) A zoonotikus kórokozók elleni védekezés aktuális kérdései a baromfi-ágazatban - helyzetkép, várható jogszabályi változások. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest. 2011. április 19-20. Összefoglalók*, .25-27 p.

Starbuck, M.A.B., Hill, P.J., Stewart, G.S.A.B. (1992) Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). *Letters in Applied Microbiology* 15: 248-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1992.tb00775.x>

Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., Schoder, D. (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 106(2):651-659. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>

Sváb., J. (1973) Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági kiadó, Budapest.

Szeitzné Szabó, M. (szerk.) (2008) Élelmiszer-biztonsági helyzetelemzés és kockázatelemzés. Agroinform Kiadó, Budapest.

Tabajdiné, P.V. (2003) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. MÉTE 2003. november 19.

Tabajdiné, P.V., Rohonczy, K., Zoller, L. (2009) Patogén mikroorganizmusok kimutatása rekombináns fág fehérjékkel. Hungalimentaria 2009 Konferencia, Budapest 2009. április 22-23. *Összefoglalók* pp. 33.

Tabajdiné P.V.(2001) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. *Magyar Zoonózis Társaság 2001. évi kiadványa*. pp. 121-140.

Tauxe, Robert V. (1997) Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases Journal* 3(4):425-434. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0304.970403>

Temelli,S., Eyigor, A., Anar, S. (2012) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in red meat and meat products determined by VIDAS ECPT and LightCycler PCR. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36: 305-310.

Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., Debevere, J. (2003) Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology* 37(5) 386-391. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01415.x>

Valiente Moro, C., Desloire, S., Vernozzy-Rozand, C., Chauve, C., Zenner, L. (2007) Comparison of the VIDAS[®] system, FTA[®] filter-based PCR and culture on SM ID for detecting *Salmonella* in *Dermanyssus gallinae*. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (4): 431-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02119.x>

Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den, B.W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. (2008) Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology* 130: 285-297. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.027>

Vernozzy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., BoutrandLoei, S., Meyrand, A., Richard, Y. (1998) Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection* 61: 917-920.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V. (2008) Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection* 71: 356-364.

Walker, R. L., Kinde, H., Anderson, R. J., Brown, A. E. (2001). Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using more swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. *International Journal of Food Microbiology* 67: 123-129. DOI:

[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00427-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00427-5)

Walker, S. J., Archer, P., Banks J. G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. 68(2): 157–162.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x>

Wauters, G., Boel, A., Voorn, G.P., Verhaegen, J., Meunier, F., Janssens, M., Verbist, L. (1995) Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 33(4): 845-849.

Wernars K, Heuvelman CJ, Chakrabarty T, Notermans SHW (1991) Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 70:121-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04437.x>

Williams, L.K., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R., and Humphrey, T.J. (2009). Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *International Journal of Food Microbiology* 130: 131-134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.018>

Zoller, L., Mráz, B., Fodor, A., Tabajdiné, P. V. (2011) Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok jelentősége a mikrobiológiai gyakorlatba. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest*. 2011. április 19-20. Poszter

Törvények, rendeletek, szabványok

4/1998. (XI.11.) EüM. rendelet - *Az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről*

2073/2005/EK RENDELET (2005. november 15.) - *Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól*

MSZ EN ISO 16654:2001 .Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az *Escherichia coli* O 157 kimutatására (ISO 16654:2001)

MSZ EN ISO 16140-1:2004. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A választható módszerek validálásának protokollja (ISO 16140 :2003)

6.2.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálata VIDAS LMO2 módszerrel

Aznar és Solís (2006) 225 természetesen fertőződött élelmiszer mintát vizsgált hagyományos és VIDAS LMO2 módszerrel. Az eredmények összehasonlításakor a tenyésztéses és alternatív módszer egyenlő érzékenységi adatokat kaptak. Ezek az eredmények a mi laboratóriumunkban is 100% -os egyezést mutattak egyetértésben a Reiter és munkatársai (2010) által mért adatokkal. Mindemellett hamis negatív eredményeket egyik munkacsoport sem tapasztalt, ami élelmiszerbiztonsági szempontból nagyon jelentős. Az eredmények alapján ezt a módszert vezettük be laboratóriumunkba rutin vizsgálatok céljára.

6.2.3. *E.coli* O157 vizsgálata VIDAS UP módszerrel

Temelli és munkatársai (2012) marhahús mintákat vizsgáltak VIDAS UP módszerrel. Nyers marha húsok szűrő vizsgálatát végezték el egy vágóhídon és meglepően magas 10% pozitívitást tapasztaltak. Ezekről a megerősítő vizsgálatokat követően kiderült, hogy nem H7 szerocsoportba taroztak. Vernozy-Rozand és munkatársai (1998) 0.12%-os előfordulásról számoltak be élelmiszerminták vizsgálatakor. Vizsgálataim során a természetesen fertőződött környezeti és húsmintákban nem mértem pozitív *E.coli* O157 eredményeket. Mivel a korábbi tanulmányok értékei jelentős eltéréseket mutatnak, valószínűleg a minták, a mintavétel (típusa, helye, kezdeti bakteriális fertőzöttség foka), a környezeti tényezők, a szezonális és a kimutatási módszerek különbségéből adódhatnak. Az alacsony előfordulás ellenére a mikrobacsoport monitorozása javasolt, mivel a mortalitása nagy.

6.3. Kórokozók vizsgálata molekuláris módszerekkel

6.3.1. *Salmonella* vizsgálata real-time PCR módszerrel

A real-time PCR *Salmonella* kimutatására irányuló módszerek szabványos tenyésztéses módszerrel történő összehasonlítása során a „gold standard” módszer az irodalmi adatokkal (Elizaquivel et al., 2008; Eriksson és Aspan., 2007; Valiente et al., 2007) egyetértésben a legtöbb esetben kevesebb *Samonella* pozitív eredményt mutatott.

Ennek oka valószínűleg a holt *Salmonella* sejtek detektálásának köszönhető. Ez a jelenség a nyers, marinált hús, környezeti, és takarmány mintáknál volt jelentős. A fűszerek antibakteriális hatása miatt vagy az élelmiszeripari feldolgozó műveletek során a szalmonellák egy része sérül, vagy teljesen elpusztul (Indu et al., 2006).

A megvizsgált takarmány minták jellege okot adhat a hamis pozitív minták detektálásának, hiszen ezek a takarmányok háziállatoknak (macska, kutya, papagáj) készültek élelmiszeripari nyesedék húsokból, amelyeket a feldolgozási művelet során magas hőmérsékleten hőkezelték. Az életképes szalmonellák ezen a hőmérsékleten elpusztulnak, viszont a holt sejtek nagy számban jelenlehetnek a mintákban. A környezeti mintáknál az üzem legkülönbözőbb területein végeztünk tamponos mintavételt takarítás után. Ebben az esetben az élő *Salmonella* sejteket a vegyszeres kezelés ugyan elpusztította, viszont a holt sejtek DNS-ét a real-time PCR készülékkel kimutattam. A holt sejtek kimutatása következtetni enged a nyersanyagok feldolgozás előtti higiéniai állapotára. Eredményeink alapján a rutin takarmány vizsgálatokra a BAX rendszert állítottuk be.

Tapasztalataim szerint baromfi minták vizsgálatakor a BAX rendszer a TaqMan *Salmonella enterica* Kit-tel szemben kevesebb hamis *Salmonella* pozitív mintát mért, ennek oka lehet, hogy BAX rendszer vizsgálati protokolljában szerepel egy utódúsítási lépés, amellyel a holt sejtek detektálása minimálisra csökkenthető. Ennek ára ugyanakkor a hosszabb kimutatási idő.

6.3.2. *E. coli* O157 real-time PCR

Narang és munkatársai (2009) 125 mesterségesen fertőzött minta összehasonlító vizsgálatát végezték el hagyományos és real-time PCR-rel. A szerzőcsoport a real-time PCR módszer eredményeit tekintve 100%-os egyezést mutatott a hagyományos módszerrel. Az általam elemzett rutin és mesterségesen fertőzött minta sorozatok eredményeinek összehasonlításakor én is hasonló egyezést tapasztaltam az ISO szabványos eljárással. A hagyományos eljárásokkal kimutathatatlan, szaporodni képtelen, de a mintában jelen lévő *E. coli* O157:H7 szerotípus kimutatására a real-time PCR a tenyésztéses módszernél alkalmasabb. Különösen javasolt e módszer bevezetése a hagyományos módszer bizonytalansága és a patogén *E. coli* csoportok vizsgálata iránti megnövekedett igény miatt. 2013-tól az Európai Unió Rendelete is ezt a módszert javasolja.

6.4. A három különböző elven működő eljárás összehasonlítása

A szabványos eljárások rendkívül anyag, munka és időigényes eljárások, amelyek nem elégítik ki a globalizáció okozta tömegtermelés igényeit.

1. A kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajok specifikációja megfelelő, vizuális értékelésük egyszerűbb a hagyományos módszereknél és gyors eredményt adnak. Hátrányuk, hogy esetenként megtevesztik az enzimes keresztreakciók miatt az értékelést végző mikrobiológust és nélkülözhetetlen a szélesztési eljárás, ami munkaigényes, a vizsgálati időt pedig csak mérsékelten csökkentik. Hyeon és munkatársai (2012) szintén hasonló eredményre jutottak csirke minták *Salmonella* vizsgálatakor. Ezt a megállapítást Stessl és munkatársainak (2009) vizsgálati eredményei is alátámasztják, akik hat kromogén szubsztátot tartalmazó *Listeria monocytogenes* kimutatására alkalmas táptalajt hasonlítottak össze.
2. A VIDAS technológia gyors, automatizált eljárás és a miniVIDAS készülék egy időben két féle mikroorganizmus kimutatására is alkalmas. Teljes egyetértésben Keith (1997), Uyttendaele és munkatársainak (2003) eredményeivel elmondható, hogy a VIDAS módszerek alkalmasabbak gyors eredmények közlésére a szabványos tenyésztési eljárásnál. Hátránya, hogy a dúsítási lépést úgy kell irányítani, hogy a készülék mérőcellája legalább $5 \cdot 10^5$ sejt kimutatandó patogén mikroorganizmust tartalmazzon. Ha ezt a sejtsűrűséget a dúsítás során nem érjük el, hamis negatív eredményt kaphatunk. Nagyszámú mintát feldolgozó laboratóriumokban a vizsgáló kapacitása sem elegendő.
3. A real-time PCR vizsgálatok előnye, hogy kimutatási határa alacsony, a korábban említett alternatív módszerek közül ez végezhető el a legrövidebb idő alatt. Hátránya, hogy a mintában lévő élő és holt sejteket nem lehet elválasztani, ezért hamis pozitív eredmények fordulhatnak elő. Az ABI módszer egy órán belül eredményt ad, viszont gyakrabban figyelhető meg hamis pozitív eredmény és inhibíció. A BAX rendszer esetében kevesebb a hamis pozitív eredmény valószínűsége az utódúsítási lépés miatt, viszont a vizsgálati idő (4 óra) és az utódúsítás miatt az egész vizsgálati folyamat jóval (8 órával) időigényesebb. Mindkét módszerre igaz, hogy hamis negatív eredményt nem kaptunk velük, ami élelmiszerbiztonsági szempontból megnyugtató.

A BAX rendszer olyan minták vizsgálatára alkalmas, ahol a minta jellege nagy mértékű szennyeződésre, vagy inhibíció lehetőségére utal, illetve ahol a nagyobb hamis pozitivitás és az inhibíció kizárása nagyobb gazdasági érdek, mint a 8 órával rövidebb vizsgálati idő. Amennyiben nagyobb számú holt sejt előfordulása és inhibíciós veszély nem várható, a leggyorsabb eredmény TaqMan *Salmonella enterica* Kit (ABI) alkalmazásával nyerhető. Koyuncu és munkatársai (2010) is hasonló következtetésre jutottak TaqMan és BAX módszerek alkalmazásakor mesterségesen fertőzött szemes takarmányok vizsgálata esetén.

4. Az általam bemutatott alternatív módszerek gyorsabbak a hagyományos vizsgálati eljárásoknál, megbízható eredményeket adnak a termelési folyamatban, és késztermék vizsgálatok esetén is. A patogének kimutatásakor egy sejtet kell kimutatnunk 25 g vagy 25 ml élelmiszer mátrixból megbízhatóan a lehető legrövidebb idő alatt (24-48 óra). Az eredmények azt mutatták, hogy a felhasznált, kereskedelmi forgalomban kapható kimutatási módszerek közül nagy biztonsággal lehet választani megfelelő érzékenységű, pontosságú és specifikus módszert, amennyiben a mintavételi tervet (minta-szám és gyakoriság), a vizsgálatra szánt időt, a technológiai folyamatokat és a mátrixok módszerre gyakorolt hatását ismerjük. A megbízható módszerek között természetesen az automatizálás, adattárolás, adatelemzés lehetősége, a műszerek javításának gyorsasága, a fejlesztések, módosítások, újítások gyors bevezetése és végül, de nem utolsónak a vizsgálati költség a végső meghatározó. A műszeres vizsgálatokat magas beszerzési és olcsó üzemeltetési költség jellemzi, ezért ezek csak teljes kihasználás mellett gazdaságosak. A műszert nem igénylő megoldások anyagköltsége magasabb.

6.5. Az élelmiszer mátrix hatásának elemzése a különböző vizsgálati módszerekre

Az MSZ EN ISO 16140 szabványa alapján meghatározott paraméterek eltéréseinek okait kutattuk.

A vizsgálataim azt mutatták, hogy az alternatív gyors módszerekkel végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei relatív pontosság, specifitás és érzékenység tekintetében eltérnek.

Az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján meghatározott paramétereket összehasonlítottam a nemzetközi validáló testületek adataival. Ezek alapján arra a következtetésre jutottam, hogy a validáló testületek által vizsgált 4-6 féle mátrix nem mindig fedi le a rutin laboratóriumba érkező termékek körét.

Ilyen esetet tapasztaltam a VIDAS LMO2 módszernél, ahol az összehasonlítás során kiderült, hogy a gyorsfagyasztott tészta termékekre velem ellentétben eddig még nem végezték el *L. monocytogenes* –re a validáláshoz szükséges teljesítmény jellemzők meghatározását.

A TaqMan Real –time PCR *Salmonella enterica* Kit nincs validálva az általam vizsgált mátrixok közül kakaó és csokoládé alapú termékekre és fűszeresen előkészített, marinált nyershús mátrixokra.

A TaqMan Real –time PCR *Salmonella* módszerrel a fűszerezett húsok, csokoládé, takarmány, környezeti minták, önocianint és antocianint tartalmazó gyümölcsök esetén részleges, vagy teljes inhibíciót tapasztaltam. Az általam számolt relatív megbízhatóság, specifitás, és érzékenység adatok eltéréseiből megállapítható, hogy az előbb említett termékek esetén erős mátrixhatás figyelhető meg. Korábban más kutatócsoportok szintén inhibíciót figyeltek meg tej minták (Starbuck et al., 1996; Bickley et al., 1996), lágy sajt minták (Wernars et al., 1991), fűszerek (Focke et al., 2011), polifenolokat tartalmazó gyümölcslevek (Ogunjimi et al., 1999) és csokoládé minták (Jasson et al., 2011) PCR módszerrel történt vizsgálatokor.

A mátrix hatás kiküszöbölésére nyers darálthúsból készült vagy nagy vízaktivitású termékek esetén 6-8 óránál rövidebb elődúsítást és ezt követően egy utódúsítási lépést javaslok a nagy számú kísérő mikrobióta gátló hatása miatt. A mikrobiológiai minták előkészítésére vonatkozó MSZ EN ISO 6887-4 szabvány fűszer mintáknál 5 g/l káliumszulfít adagolását vagy egy tízszeres hígítás utáni elődúsítást említ, amely fűszerezett termékek esetén is jó megoldást nyújthat az inhibíció elkerülésére az elődúsítás megfelelő vezetése mellett. Ha a minta jellegeből adódóan holt sejtek jelenlétére kell számítani (például állati takarmány vagy környezeti minták), feltétlenül szükségesnek tartom egy utódúsítási lépés beillesztését a vizsgálati protokollba. Az önocianint és antocianint tartalmazó termékek vizsgálatánál inhibíció elkerülése érdekében az elődúsítást követően a DNS kivonás előkészítő lépéseként érdemes szűrőt tartalmazó centrifuga csövet, ICS lépést vagy immunmágneses szeparálást alkalmazni. Kakaót tartalmazó termékek esetén a szalmonellákra gyakorolt gátló hatás csökkenését sovány tejben történő elődúsítással kompenzáljuk, a várhatóan nagyobb számban előforduló kísérő mikrobiótát pedig brillantzöld oldat hozzáadásával szorítsuk vissza.

6.6. Dúsítások vezetésének optimalizálása

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. Az elődúsítás célja a sérült sejtek reszuszitációja, ami döntően függ az elődúsító összetételétől és a vizsgálandó élelmiszertől.

A dúsítások vezetésének optimalizálása, a minimális sejtszám meghatározása elengedhetetlen az alternatív vizsgálati módszerek fejlesztésekor.

A *Campylobacter* vizsgálatoknál négy szelektív dúsítót hasonlítottam össze, melyek közül a vérrel kiegészített Bolton dúsító bizonyult a legalkalmasabbnak a négy alkalmazott szelektív dúsító közül.

6.7. Vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra

Vizsgálataink alapján a TaqMan *Salmonella enterica* real-time PCR Kit (ABI) bizonyult a leggyorsabbnak a baromfi termékek vizsgálatakor alkalmazott VIDAS ICS2-SLM és BAX módszerrel szemben. Így az ajánlott *Salmonella* vizsgálati módszer baromfi esetén a TaqMan *Salmonella* vizsgálat, amely alkalmas 24 órán belüli eredményközlésre és amellyel lehetővé válik, hogy a baromfira előírt határértékeknek való megfelelés valamennyi paraméterét (*Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli*, mikroba) 24 óra elteltével jelezzük.

7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

1. Meghatároztam az egyes patogének kimutatására alkalmas módszerek teljesítmény jellemzőit az MSZ EN ISO 16140 szabványa alapján (relatív pontosság, relatív specifikusság és relatív érzékenység). A rutin vizsgálatoknál nagyon fontos a lehető legrövidebb idő alatt kiadott megbízható eredmény. A nemzetközi validáló testületek bizonyos élelmiszer mátrixokra validálnak, de ezek nem ölelik fel minden élelmiszer fajtát, amelyek egy rutin laboratóriumban előfordulnak. Az adott módszer teljesítmény jellemzőit már validált módszerek mellett a hiányzó mátrixok esetében is meghatároztam.
2. Mátrix hatás elemzést végeztem és megállapítottam azokat a tényezőket, amelyek akadályozzák az általam használt alternatív mikrobiológiai módszerekkel vizsgált patogének biztonságos kimutathatóságát. Vizsgálataim azt mutatták, hogy az alternatív gyors módszerekkel végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei relatív pontosság és specifitás adatok tekintetében mátrixonként eltérést mutatnak. Ennek okát keresve megállapítottam, a fűszerezett húsok, csokoládé, takarmány, környezeti minták, önocianint és antocianint tartalmazó gyümölcsök befolyásolják a patogének real-time PCR gyorsmódszerekkel történő biztonságos kimutatását. A gyors módszereknél igazolt mátrix hatások mellett fény derült a standard módszer hibáira is. A hagyományos módszerrel is mérhető hamis negatív eredmény, ennek oka az elődúsítás nem megfelelő vezetése és/vagy a kísérő mikrobióta zavaró hatása volt. Javaslatot tettem a mátrix hatás kiküszöbölésére.
3. Meghatároztam az alternatív vizsgálati módszerek kimutatási határát, amelyet alapul véve optimalizáltam a dúsítási eljárásokat. Dolgozatomban egy *kampilobakter* példán keresztül mutattam be a dúsítások vezetésének korlátait. A szelektív dúsítók egyes összetevői gátolják a *Campylobacter spp.* szaporodását, ezért összehasonlítottam *Campylobacter spp.* dúsítására alkalmas négy szelektív dúsító oldatot. A kapott eredmények alapján a qPCR vizsgálatoknál a vérrel kiegészített Bolton dúsító bizonyult legtöbb esetben pozitívnak.

4. Megállapítottam, hogy a qPCR módszer alkalmasabb *Campylobacter* fajok kimutatására. A tenyésztéses vizsgálati módszerek információ veszteséget okoznak, mert ugyan a *Campylobacter* spp. kimutatására megfelelnek, de a leggyakrabban problémát okozó patogén *Campylobacter jejuni* faj elkülönítésére nem alkalmazható. Az alkalmazott qPCR módszerrel a *Campylobacter* spp. és *Campylobacter jejuni* faj egy időben kimutatható.
5. Vizsgálataim alapján a TaqMan *Salmonella enterica* real –time PCR Kit (ABI) bizonyult a leggyorsabbnak a baromfi termékek vizsgálatakor alkalmazott VIDAS ICS2-SLM és BAX módszerrel szemben. Így az ajánlott *Salmonella* vizsgálati módszer baromfi esetén a TaqMan *Salmonella* vizsgálat, amely alkalmas 24 órán belüli eredményközlésre, amellyel lehetővé válik, hogy a baromfira előírt határértékeknek való megfelelés valamennyi paraméterét (*Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli*, mikrobaszám) 24 óra elteltével jelezzük. Vizsgálataimmal alátámasztottam, hogy a friss baromfi hússok mikrobiológiai állapota 24 órán belül megállapítható az alkalmazott korszerű, gyors mikrobiológiai eljárásokkal, lehetővé téve a forgalomba kerülés előtti gyors minősítést.

8. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt évek élelmiszer botrányai az élelmiszer-biztonság kérdéskörére irányították a figyelmet. Az időigényes, hagyományos tenyésztési eljárásokkal a patogének kimutatási időtartama akár 5 vagy annál több napot is igénybe vehet. Kórokozók kimutatására az elmúlt időkben igen sokféle eljárást próbáltak kifejleszteni a szabványos, hosszú és költséges munkafolyamatok rövidítésére.

Célul tűztem ki az élelmiszer-biztonsági szempontból fontos, leggyakrabban előforduló, megbetegedést okozó baktériumok/fajok élelmiszerekből történő kimutatására szolgáló korszerű módszerek összehasonlító elemzését, és az ISO 16140 szabvány szerinti értékelését abból a célból, hogy a laboratóriumi felhasználásuk biztonságát igazoljam. A megvalósítás lépései: az egyes módszerek teljesítmény jellemzőinek meghatározása, az élelmiszermátrix hatásának elemzése a különböző vizsgálati módszerekre, dúsítások vezetésének optimalizálása és vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra.

Munkám során a rendelkezésemre álló korszerű gyorsmódszereket és szabványos módszereket használtam *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 és termotróf *Campylobacter* spp. élelmiszer eredetű megbetegedést okozó baktériumok kimutatására. Az alkalmazott alternatív mikrobiológiai diagnosztikai módszerek a következők voltak:

- Új korszerű differenciáló agarok (Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok: Harlequin *Salmonella* ABC, SM2 ID, Compass *Salmonella*, Harlequin *Listeria* Agar, RAPID'*L.mono*, Compass *Listeria* Agar, Harlequin™ SMAC-BCIG, Brilliance Campy Count Agar).

- Immunológiai vizsgálati módszerek (VIDAS ICS2-SLM, VIDAS LMO2, VIDAS UP *E.coli* O157:H7).

- Molekuláris mikrobiológiai vizsgálati módszerek (real –time PCR TaqMan *Salmonella enterica* Detection Kit-et (ABI), BAX® System PCR Assay (DuPont Qualicon) és egy *Campylobacter* kimutatására és számának meghatározására fejlesztett qPCR módszer).

Elvégeztem a négy leggyakrabban előforduló élelmiszer eredetű kórokozó (*Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 és *Campylobacter jejuni*) kimutatására szolgáló alternatív gyorsmódszerek (kromogén szubsztrát tartalmú agar, VIDAS, real – time PCR) és hagyományos módszerek összehasonlító vizsgálatait. Meghatároztam az egyes patogének kimutatására alkalmas módszerek teljesítmény jellemzőit az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján (relatív pontosság, relatív specifikusság és relatív érzékenység). A nemzetközi validáló testü-

letek eredményeivel való összehasonlítás során megállapítottam, hogy a validálásokhoz alkalmazott élelmiszer mátrixok nem ölelnek fel minden élelmiszer fajtát, amelyek egy rutin laboratóriumban előfordulnak. Az adott módszer teljesítmény jellemzőit ezekről eltérő mátrixok esetében is meghatároztam.

Mátrix hatás elemzést végeztem és megállapítottam azokat a tényezőket, amelyek akadályozzák az általam használt alternatív mikrobiológiai módszerekkel vizsgált patogének biztonságos kimutathatóságát. Vizsgálataim azt mutatták, hogy az alternatív gyors módszerekkel végzett vizsgálatok összehasonlító eredményei relatív pontosság és specifitás adatok tekintetében mátrixonként eltérést mutatnak. Ennek okát keresve megállapítottam, hogy a fűszerezett húsok, csokoládé, takarmány, környezeti minták, önocianint és antocianint tartalmazó gyümölcsök befolyásolják a patogének real-time PCR gyorsmódszerekkel történő biztonságos kimutatását. A gyors módszereknél igazolt mátrix hatások mellett fény derült a standard módszer hibáira is. A hagyományos módszerrel is mérhető hamis negatív eredmény, ennek oka az elődúsítás nem megfelelő vezetése és/vagy a kísérő mikrobióta zavaró hatása volt.

Meghatároztam az alternatív vizsgálati módszerek kimutatási határát, amelyet alapul véve optimalizáltam a dúsítási eljárásokat. Dolgozatomban egy *Campylobacter* példán keresztül mutattam be a dúsítások vezetésének korlátait. A szelektív dúsítók egyes összetevői gátolják a *Campylobacter* spp. szaporodását, ezért összehasonlítottam *Campylobacter* spp. dúsítására alkalmas négy szelektív dúsító oldatot. A kapott eredmények alapján a qPCR vizsgálatoknál a vérrel kiegészített Bolton dúsító bizonyult legtöbb esetben pozitívnak.

Megállapítottam, hogy a qPCR módszer alkalmasabb *Campylobacter* fajok kimutatására. A tenyésztéses vizsgálati módszerek információ veszteséget okoznak, mert ugyan a *Campylobacter* spp. kimutatására megfelelnek, de a leggyakrabban problémát okozó patogén *Campylobacter jejuni* faj elkülönítésére nem alkalmazható. Az alkalmazott qPCR módszerrel a *Campylobacter* spp. és *Campylobacter jejuni* faj egy időben kimutatható. Kísérletet tettem a mintákból qPCR módszerrel történő mennyiségi meghatározásra is.

Vizsgálataim alapján a TaqMan *Salmonella enterica* real-time PCR Kit (ABI) bizonyult a leggyorsabbnak a baromfi termékek vizsgálatokor alkalmazott VIDAS ICS2-SLM és BAX módszerrel szemben. Így az ajánlott *Salmonella* vizsgálati módszer baromfi esetén a TaqMan *Salmonella* vizsgálat, amely alkalmas 24 órán belüli eredményközlésre, amellyel lehetővé vált, hogy a baromfira előírt határértékeknek való megfelelés valamennyi paraméterét (*Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli*, mikrobaszám) 24 óra elteltével jelezzük.

Vizsgálataimmal alátámasztottam, hogy a friss baromfi húsok mikrobiológiai állapota 24 órán belül megállapítható az alkalmazott korszerű, gyors mikrobiológiai eljárásokkal, lehetővé téve a forgalomba kerülés előtti gyors minősítést.

A három különböző elven működő eljárást összehasonlítva megállapítható:

- A kromogén szubsztátot tartalmazó táptalajok specifikitása megfelelő, vizuális értékelésük egyszerűbb a hagyományos módszereknél és gyors eredményt adnak. Hátrányuk, hogy esetenként megtévesztik az enzimes keresztreakciók miatt az értékelést végző mikrobiológust.
- A VIDAS technológia gyors, automatizált eljárás és egy időben két féle mikroorganizmus kimutatására is alkalmas. Hátránya, hogy ha a dúsítóban a 10^6 /ml sejtsűrűséget nem érjük el, hamis negatív eredményt kaphatunk, továbbá vizsgáló kapacitása limitált.
- A real-time PCR vizsgálatok előnye, hogy kimutatási határa alacsony, a vizsgálati idő a leg-rövidebb. Az ABI real-time PCR módszer hátránya, hogy a mintában lévő holt sejtek is kimutathatók, így gyakrabban kapunk hamis pozitív eredményt, továbbá igen gyakori az élelmiszer mátrix okozta inhibíció.

A BAX rendszer esetében kevesebb a hamis pozitív eredmény valószínűsége az utódúsítási lépés miatt, viszont időigényesebb. A BAX rendszer olyan minták vizsgálatára alkalmas, ahol a minta jellege nagy mértékű szennyeződésre, vagy inhibíció lehetőségére utal, illetve ahol a nagyobb hamis pozitivitás és az inhibíció kizárása nagyobb gazdasági érdek, mint a 8 órával rövidebb vizsgálati idő. Amennyiben nagyobb számú holt sejt előfordulása és inhibíciós veszély nem várható, a leggyorsabb eredmény TaqMan *Salmonella enterica* Kit (ABI) alkalmazásával nyerhető. Mindkét módszerre igaz, hogy hamis negatív eredményt nem kaptunk velük, ami élelmiszerbiztonsági szempontból megnyugtató.

A megbízható módszerek között természetesen az automatizálás, adattárolás, adatelemzés lehetősége, a műszerek javításának gyorsasága, a fejlesztések, módosítások, újítások gyors bevezetése és végül, de nem utolsó sorban a vizsgálati költség a végső meghatározó. A műszeres vizsgálatokat magas beszerzési és olcsó üzemeltetési költség jellemzi, ezért ezek csak teljes kihasználás mellett gazdaságosak. A műszert nem igénylő megoldások anyagköltsége a magasabb.

A nagyszámú vizsgálati eredmény alapján megállapítható, hogy a felhasznált, kereskedelmi forgalomban kapható kimutatási módszerek közül nagy biztonsággal lehet választani megfelelő érzékenységű, pontosságú és specifikus módszert, amennyiben a mintavételi tervet (minta-szám és gyakoriság), a vizsgálatra szánt időt, a technológiai folyamatokat és a mátrixok módszerre gyakorolt hatását ismerjük.

9. SUMMARY

The past few years' food scandals brought attention to food safety issues. Traditional test methods demand five or more days. Several methods were developed for reducing the standard, time-consuming and costly protocols for detection of pathogens.

The aim of my work was a comparative analysis of new methods for detection of foodborne pathogenic bacteria / species. The evaluation was based on MSZ EN ISO 16140 standard in order to prove the safety of laboratory use. Steps of realization: determination of performance characteristics of each method, analysis of the impact of food matrices on different testing methods, optimization of enrichment strategy and selecting of testing method, taking the detection time into consideration primarily.

Advanced rapid and standard methods were used to detect foodborne pathogenic bacteria: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 and thermophilic *Campylobacter*. In this thesis, the applied alternative microbiological diagnostic methods can be divided into three groups:

- New, advanced differential agar media (Media containing chromogenic substrates: Harlequin *Salmonella* ABC, SM2 ID, Compass *Salmonella*, Harlequin *Listeria* (Ottaviani Aogosti), Ra-pid¹ Mono, Compass *Listeria* Agar, HarlequinTM SMAC-BCIG, Brilliance Campy Count Agar)
- Immunological test methods (VIDAS ICS2-SLM, VIDAS LMO2, VIDAS UP *E. coli* O157:H7)
- Molecular microbiological test methods (real-time PCR TaqMan *Salmonella enterica* Detection Kit (ABI), BAX® System PCR Assay (DuPont Qualicon) and a qPCR method developed for detection and enumeration of *Campylobacter*).

Comparative study was carried out for standard and alternative methods for detection of the four most common foodborne pathogens: *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 and thermophilic *Campylobacter*. Performance characteristics of methods detecting foodborne pathogens were determined in accordance with MSZ EN ISO 16140 standard (relative accuracy, relative specificity and relative sensitivity).

Food matrices applied for the validation by the international validation bodies do not cover all food varieties which occur in a routine laboratory. I determined performance characteristics of methods for other matrices as well.

Matrix effect analysis was carried out and I found the factors which inhibit the safe detection of pathogens analysed by alternative methods. My results showed differences in case of relative accuracy, relative specificity by the alternative detection methods. In conclusion spiced meat, chocolate, pet foods, environmental (hygienic) samples, anthocyanin or onocyanin containing fruits and vegetables influence the safe detection of pathogens by real-time PCR. Besides the proved matrix effect in case of rapid methods I found defaults of standard methods as well. The reason of the fals negative results is the not proper enrichment method and/or the interfering effect of competitive microbiota.

I determined the detection limit of alternative detection methods, by which I optimized the enrichment protocol. In this work I introduced the limits of enrichment strategies with a *Campylobacter* spp. example. The multiplication of *Campylobacter* spp. is inhibited by some ingredients of selective enrichment broths. Therefore, I compared the efficiency of four selective enrichment broths. Based on the obtained results by qPCR method, the Bolton enrichment broth supplemented with blood was the most performant.

I found that the qPCR method is more suitable than culture methods for detection of *Campylobacter* spp. The culture methods cause loss of information because they are suitable for detection of *Campylobacter* spp. but not for identification of *Campylobacter jejuni*. With the applied qPCR method both *Campylobacter* spp. and *Campylobacter jejuni* can be detected at the same time. In this study quantitative analyses were tested by qPCR method as well.

Based on my results the TaqMan *Salmonella enterica* real-time PCR Kit (ABI) turned out to be the fastest compared to VIDAS ICS2-SLM and BAX methods by analysing poultry samples.

Therefore, the recommended *Salmonella* detection method in case of poultry is the TaqMan *Salmonella* method, which is appropriate for results communication within 24 hours.

This enables to give results for all parameters (*Salmonella* spp., *S. aureus*, *E. coli*, total mesophilic aerobic count) laid down in the regulation for poultry samples. In conclusion the microbiological state of fresh poultry meat can be determined within 24 hours by the applied rapid methods allowing rapid qualification before circulation to the market.

By comparing the three different methods it can be established, that:

- The specificity of chromogenic substrate containing agar is satisfactory, the visual evaluation is easier than in case of traditional methods and it gives rapid results. There are disadvantages that sometimes mislead the microbiologists with enzymatic crossreactivity.
- The VIDAS technology is rapid and automatized method and it is capable to detect two different microorganisms in the same time. The disadvantage is that when the density of microorganism in the enrichment broth is less than 10^6 / ml, false negative results may be obtained, and testing capacity is limited.
- The advantages of real-time PCR are that the detection limit is low and the detection time is shorter. The disadvantage of ABI real-time PCR is that dead cells can be detected as well, therefore we obtain false positive results and furthermore, the inhibition caused by food matrix is frequent.

In case of BAX system the probability of false positive results is less because of post-enrichment step, but requires more time. The BAX system is applicable for samples which are highly contaminated or inhibition is possible. Furthermore, it is suitable where it is important to eliminate the false positives and inhibition effect than reduction of detection time by 8 hours. If greater number of dead cells and inhibition are not expected to occur, the fastest results are obtained by using the TaqMan *Salmonella enterica* Kit (ABI). With both methods we did not obtain false negative results what is reassuring from a food safety viewpoint. The final determination aspect in case of reliable methods are automatization, data storage, opportunity of data analysis, improvement of service enhancement speed, modifications, rapid introducing of innovations and, last but not least the cost of the test. The instrumental methods are characterized by high operating costs and low-cost sourcing, these are economic only under full utilization. The material cost is higher for those solutions which do not require equipments. Based on the large number of test results, it is established that among already used, commercially available methods specific method can surely be chosen with appropriate sensitivity, accuracy if we know the sampling plan (sample number and frequency), the time of analysis, the impact of technological process and the effect of the matrix on methods.

10. MELLÉKLET

10.1. IRODALOMJEGYZEK

Abdulraouf, U.M., Beuchat, L.R., Ammar, M.S. (1993) Survival and growth of *Escherichia coli* O157:H7 on salad vegetables. *Applied and Environmental Microbiology* 59: 1999–2006.

Acheson, D., Allos, B. M. (2001) Campylobacter jejuni Infections: Update on Emerging Issues and Trends. *Clinical Infectious Diseases* 32 (8): 1201-1206. DOI: <http://dx.doi.org/10.1086/319760>

Anon, (2006) Ongoing multistate outbreak of *Escherichia coli* serotype O157: H7 infections associated with consumption of fresh spinach – United States, *The Journal of the American Medical Association* 296: 2195–2196. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/jama.296.18.2195>

Arguedas-Villa, C., Stephan, R., Tasara, T. (2010) Evaluation of cold growth and related gene transcription responses associated with *Listeria monocytogenes* strains of different origins. *Food Microbiology* 27(5): 653–660. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2010.02.009>

Aznar, R., Solis, I. (2006) PCR detection of *Listeria monocytogenes* in different food products compared with the mini-VIDAS LMO system and the standard procedure ISO 11290-1. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* 1(2): 115-120. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00003-006-0019-0>

Bacon, R.T., Ransom, J.R., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K. E., Smith, G. C. (2003) Thermal inactivation of susceptible and multiantimicrobial resistant *Salmonella* strains grown in the absence or presence of glucose. *Applied and Environmental Microbiology* 69(7): 4123-4128. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.69.7.4123-4128.2003>

Bailey, J.S., Cosby, D.E. (2003) Detection of *Salmonella* from chicken rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR system. *Journal of Food Protection* 66:2138–2140.

Becker, B., Schuler, S., Lohneis, M., Sabrowski, A., Curtis, G. D. W., Holzapfel, W. H. (2006) Comparison of two chromogenic media for the detection of *Listeria monocytogenes* with the plating media recommended by EN/DIN 11290-1. *International Journal of Food Microbiology* 109(25): 127–131. DOI:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.01.030>

Bernard, P.S., Wittwer, C.T. (2002) Real-Time PCR Technology for Cancer Diagnostics. *Clinical Chemistry* 48(8):1178-1185.

Bickley, J. et al. (1996) Polymerase chain reaction (PCR) detection of *Listeria monocytogenes* in diluted milk and reversal of PCR inhibition caused by calcium ions. *Letters in Applied Microbiology* 22:153–158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1996.tb01131.x>

BioMerieux Vidas Instrument User's Manual Fiches Protocoles VIDAS® Pathogènes Ref : 99762 Version B 12/2005.

Borucki, M. K., Reynolds, J., Gay, C. C., McElwain, K. L., Kim, S. H., Knowles, D. P. Hu, J. (2004) Dairy Farm Reservoir of *Listeria monocytogenes* Sporadic and Epidemic Strains *Journal of Food Protection* 11: 2368-2626.

Boyd, B., Lingwood, C. (1989) Verotoxin receptor glycolipid in human renal tissue. *Nephron* 51: 207-210. DOI: <http://dx.doi.org/10.1159/000185286>

Butzler, J.P., Dekeyser, P., Detrain, M., Dehaen, F. (1973) Related vibrio in stools. *Journal of Pediatrics* 82: 493-495. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476\(73\)80131-3](http://dx.doi.org/10.1016/s0022-3476(73)80131-3)

Butzler, J. P., J. Oosterom. (1991) *Campylobacter*: pathogenicity and significance in foods. *International Journal of Food Microbiology* 12: 1-8. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(91\)90043-o](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(91)90043-o)

Centers for Disease Control and Prevention. (1993) Update: Multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers-Western United States, 1992-1993. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 42: 258-263.

Cheung, P.-Y., Kwok, K.K., Kam, K.M. (2007) Application of BAX system, Tecra Unique™ *Salmonella* test, and a conventional culture method for the detection of *Salmonella* in ready-to-eat and raw foods. *Journal of Applied Microbiology* 103: 219–227. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2006.03210.x>

Corry, J.E.L. and Atabay, H.I. (2001) Poultry as a source of *Campylobacter* and related organisms. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 90: 96–114. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01358.x>

Dekeyser, P., Gossuin-Detrain, M., Butzler, J.P., Sternon, J. (1972) Acute enteritis due to related vibrio: first positive stool cultures. *The Journal of Infectious Diseases* 125: 390-392. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/125.4.390>

Denis, M., Soumet, C., Rivoal, K., Ermel, G., Blivet, D., Salvat, G. (1999) Development of a m-PCR assay for simultaneous identification of *Campylobacter jejuni* and *C. coli*. *Letters in Applied Microbiology* 29: 406–410. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765X.1999.00658.x>

Denny, J., Bhat, M., Eckmann, K. (2008) Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 associated with raw milk consumption in the Pacific Northwest. *Foodborne Pathogens and Disease* 5:321-328.

Dezső, P., Nagy, J. (2005) A polimeráz láncreakció (PCR) és gyógyszerkutatási alkalmazásai. *Magyar Kémiai Folyóirat - Összefoglaló közlemények* 111(4): 153-158.

Dijk, S.V. Bruins, M.J.Gijs J.H. and Ruijs, M. (2009) Evaluation and implementation of a chromogenic agar medium for *Salmonella* detection in stool in routine laboratory diagnostics. *Journal of Clinical Microbiology* 47(2): 456-458.

EFSA (2007) Report of the Task Force on Zoonoses Data Collection – Manual for Reporting on Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Food-borne Outbreaks in the framework of Directive 2003/99/EC and on some other pathogenic microbiological agents for information derived from the reporting year 2006, *EFSA Journal*, 100: 1-86.

EFSA (2011) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009 *EFSA Journal*, 9(3):2090-2468.

EFSA (2012) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal*, 10(3):2597-3039.

EFSA (2013) The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal*, 11(4):3129-3379.

Élelmiszerbiztonsági Szemelvények (2012) 6/2012.

(http://www.nebih.gov.hu/szakteruletek/szakteruletek/eki/kozerdeku_anyagok)

Elizaquivel, P., Aznar, R. (2008) Comparison of four commercial DNA extraction kits for PCR detection of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157:H7, and *Staphylococcus aureus* in fresh, minimally processed vegetables. *Journal of Food Protection* 71: 2110–2114.

Eriksson, E., Aspan, A., (2007) Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry. *BMC Veterinary Research* 3: 21. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1746-6148-3-21>

Ethelberg, S., Sorensen, G., Kristensen, B., Christensen, K., Krusell, L., Hempel-Jorgensen, A., Perge, A., Nielsen, E. M. (2007) Outbreak with multi-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 linked to carpaccio, Denmark, 2005. *Epidemiology and Infection* 135(6): 900-907. DOI: <http://dx.doi.org/10.1017/s0950268807008047>

Faber, J. M., Peterkin, P. I. (1991) *Listeria monocytogenes*, a food-born pathogen. *Microbiological Reviews* 55(3): 476–511.

FAO/WHO. 2009. *Salmonella* and *Campylobacter* in Chicken Meat: Meeting Report, MRA Series 19.

Focke, F., Haase, I., Fischer, M. (2011) DNA-Based Identification of Spices: DNA Isolation, Whole Genome Amplification, and Polymerase Chain Reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59: 513–520. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf103702s>

Frye, D. M., Zweig, R., Sturgeon, J., , Tormey, M., LeCavalier, M., Lee, I., Lawani, L., Mascola, L. (2002) An Outbreak of Febrile Gastroenteritis Associated with Delicatessen Meat Contaminated with *Listeria*. *Clinical Infectious Diseases* 35 (8):943-949.

Greig, J. D., Todd, E. C., Bartleson, C. A., Michaels, B. S. (2007). Outbreaks where food

workers have been implicated in spread of foodborne disease, part 1. Description of the problem, methods, and agents involved. *Journal of Food Protection* 70:1752-1761.

Griffin, P.M. (1995) *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, p. 739–761. In Blaser MJ, Smith PD, Ravdin JI, Greenberg HB, Guerrant RL.(ed.), *Infections of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York, N.Y.

Habib, I., Uyttendaele, M., and De Zutter, L. (2011) Evaluation of ISO 10272:2006 standard versus alternative enrichment and plating combinations for enumeration and detection of *Campylobacter* in chicken meat. *Food Microbiology* 28: 1117-1123. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2011.03.001>

Habib, I., Samper, I., Uyttendaele, M., Berkvens, D., and De Zutter, L. (2008). Baseline data from a Belgium-wide survey of *Campylobacter* species contamination in chicken meat preparations and considerations for a reliable monitoring program. *Applied and Environmental Microbiology* 74(17): 5483-5489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.00161-08>

Hayden, K.J., Rizzo, D., Tse, J., Garbelotto, M. (2004) Detection and quantification of *Phytophthora ramorum* from California forests using a real-time polymerase chain reaction assay. *Phytopathology* 94: 1075-1083. DOI: <http://dx.doi.org/10.1094/phyto.2004.94.10.1075>

Hendriksen R. S. (2003) A global *Salmonella* surveillance and laboratory support project of the World Health Organization Laboratory Protocols Level 4 Training Course Isolation and identification of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157.

Hyeon, J.Y., Park, J.H., Chon, J.W., Wee, S.H., Moon, J.S., Kim, Y.J., Seo, K.H. (2012) Evaluation of selective enrichment broths and chromogenic media for *Salmonella* detection in highly contaminated chicken carcasses. *Poultry Science* 91(5):1222-1226. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2011-01936>

Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P.S., and Griffith, Simultaneous, R. (1992) Amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)* 10: 413-417. DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt0492-413>

Holbrook, R. (2000) Detection of microorganisms in foods – Principles of culture methods. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W. (eds.) *The microbiological safety and quality of food* Chapter 62: 1761-1790. Aspen Publishers, USA.

Holland, P. M.; Abramson, R. D.; Watson, R.; Gelfand, D. H. (1991). "Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase". *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (16): 7276–7280.

Hsin-Yi, C., Chou, C.C. (2001) Acid adaptation and temperature effect on the survival of *E. Coli* O157: H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *International Journal of Food Microbiology* 70: 189–195.

Hussein, H.S., Bollinger, L.M. (2005) Prevalence of shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef. *Meat Science* 71: 676–689.

Indu, M.N., Hatha, A.A.M., Abirohsh, C., Harssha, U., Vivekanandan, G. (2006). Antimicrobial activity of some of the south –Indian spices against serotypes of *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* and *Aeromonas hydrophila*. *Brazilian Journal of Microbiology* 37:153-158. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meatsci.2005.05.012>

Ingham, S. C., Tautorius C. L. (1991) Survival of *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes* and indicator bacteria on cooked uncured turkey loaf stored under vacuum at 3°C. *Journal of Food Safety* 11(4): 285–292. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1745-4565.1991.tb00059.x>

Innis, M.A., Gelfand, D.H. (1990). Optimization of PCRs. In: Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J. (eds.) *PCR protocols: A guide to methods and applications*. Chapter 1. pp. 3-12. *Academic Press, Inc.*, San Diego, California.

Isaacs, S., Aramini, J., Ciebin, B., Farrar, J.A., Ahmed, R., Middleton, D., Chandran, A.U., Harris, L.J., Howes, M., Chan, E., Pichette, A.S., Campbell, K., Gupta, A., Lior, L.Y., Pearce, M., Clark, C., Rodgers, F., Jamieson, F., Brophy, I., Ellis, A. (2005) An International Outbreak of Salmonellosis Associated with Raw Almonds Contaminated with a Rare Phage Type of *Salmonella* Enteritidis. *Journal of Food Protection* 68: 191-198.

Jackson M. P, Neill RJ, O'Brien A. D, Holmes R. K, Newland J. W. (1987) Nucleotide sequence analysis and comparison of the structural genes for Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II encoded by bacteriophages from *Escherichia coli* 933. *FEMS Microbiology Letters* 44: 109-114. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097\(87\)90210-2](http://dx.doi.org/10.1016/0378-1097(87)90210-2)

Jasson, V., Baert, L., Uyttendaele M. (2011) Detection of low numbers of healthy and sublethally injured *Salmonella enterica* in chocolate. *International Journal of Food Microbiology* 28: 488-491. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.01.031>

Jasson, V., Samperis, I., Botteldoorn, N., Lopez-Galvez, F., Baert, L., Denayer, S., Rajkovic, A., Habib, I., De Zutter, L., Debevere, J., and Uyttendaele, M. (2009) Characterization of *Escherichia coli* from raw poultry in Belgium and impact on the detection of *Campylobacter jejuni* using Bolton broth. *International Journal of Food Microbiology* 135: 248-253. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.09.007>

Johnson WM, Lior H, Bezanson GS. (1983) Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. *Lancet* 1 (8314-5): 76–76. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91616-1](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91616-1)

Karmali, M., Steele, B. T., Petric, M. and Lim, C. (1983) Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stool. *Lancet* i: 619-620. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(83\)91795-6](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(83)91795-6)

Karmali, M. A., Petric, M., Lim, C., Fleming, P. C., Arbus, G. S. & Lior, H. (1985). The association between idiopathic hemolytic uremic syndrome and infection by Verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases* 151: 775–782. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/151.5.775>

Kasza Gyula, Szeitzné Szabó Mária, Mészáros László, Oravecz Márton, Zoltai Anna, Vásárhelyi Adrienn, Cseh Júlia, Hidi Edit, Horváth Zsuzsa, Süth Miklós, Laczay Péter (2011) Élelmiszer-eredetű megbetegedések Magyarországon, EU-tagságunk tükrében. *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 133:(6) 368-375.

Kathariou, S.(2002) *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. *Journal of Food Protection* 65(11): 1811-1829.

Keith, M. (1997) Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of salmonellae in foods. *Journal of Food Protection* 60: 682–685.

Kim, J., Lim, J., Lee, C. (2013) Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: Applications and considerations. *Biotechnology Advances* DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.05.010>

Korsak, N., Degeye, J.N., Etienne, G., China, B., Daube, G. (2004) Comparison of four different methods for *Salmonella* detection in fecal samples of porcine origin. *Journal of Food Protection* 67(10): 2158-2164.

Koyuncu, S., Gunnar Andersson, M., Häggblom, P. (2010) Accuracy and Sensitivity of Commercial PCR-Based Methods for Detection of *Salmonella enterica* in Feed. *Applied and Environmental Microbiology* 76(9): 2815-2822. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.02714-09>

Leclercq A., Lambert B., Pierard D., Mahillon J. (2001) Particular biochemical profiles for enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates on the ID 32E system. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 1161-1164. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.39.3.1161-1164.2001>

Lequin, R. (2005) "Enzyme immunoassay (EIA)/enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)". *Clinical Chemistry* 51 (12): 2415-2418. DOI: <http://dx.doi.org/10.1373/clinchem.2005.051532>

Li, J., Smith, N. H., Nelson, K., Crichton, P.B., Old, D. C., Whittam, T. S., Selander, R. K. (1993). Evolutionary origin and radiation of the avian-adapted non-motile salmonellae. *Journal of Medical Microbiology* 38: 129-139. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/00222615-38-2-129>

Lockley, A. K., Bardsley, R.G. (2000) DNA-based methods for food authentication. *Trends in Food Science and Technology* 11: 67-77. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244\(00\)00049-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0924-2244(00)00049-2)

Mag, T. (2009) Humán megbetegedéseket okozó *Escherichia coli* törzsek patogenetikai jellemzése. Semmelweis Egyetem, Budapest. *Doktori értekezés* pp.18-19.

Mag, T., Nógrády, N., Herpay, M., Tóth, I., Rozgonyi, F. (2010) Characterization of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Hungary over a 7-year period. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 29(2):249-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10096-009-0836-z>

Maráz, A., Marin, F., Cava, R. (2006) Microbial analysis of food. In: Luning, P.A., Devlieghere, F., Verhé, R. (eds.) Safety in the agri-food chain. Chapter 11: 471-524. *Wageningen Academic Publishers*, The Netherlands.

Manafi, M., and Kremsmaier, B. (2001) Comparative evaluation of different chromogenic/fluorogenic media for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International Journal of Food Microbiology* 30: 257-262. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00610-9](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00610-9)

Mata, G. M. S. C.; Vanetti, M. C. D. (2012) Comparison of conventional and rapid methods for *Salmonella* detection in artisanal Minas cheese. *Journal of Food Research* 1(3):178-193., DOI: <http://dx.doi.org/10.5539/jfr.v1n3p178>

Melo, J., Andrew, P. W., Faleiro, M L. (2013) Different assembly of acid and salt tolerance response in two dairy *Listeria monocytogenes* wild strains. *Archives of Microbiology* 195(5): 339-348. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00203-013-0878-6>

Mohr, J., Pollex G. (1998) Agglutinating monoclonal antibodies in diagnosis of salmonellosis. *Biotest Bulletin* 6: 75-83.

Morrison, D.M., Tyrrell, D.L., Jewell, L.D. (1986) Colonic biopsy in verotoxin-induced hemorrhagic colitis and thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *American Journal of Clinical Pathology* 86(1):108-12.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. and Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA *in vitro*: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 51: 263-273. DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/sqb.1986.051.01.032>

Murray, E.G.D., Webb, R.A., Swann, H.B.R. (1926) A disease of rabbits characterized by a large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *The Journal of Pathology and Bacteriology* 29: 407-439. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/path.1700290409>

Nadeau, E., Messier, S. & Quessy, S. (2002) Prevalence and comparison of genetic profiles of *Campylobacter* strains isolated from poultry and sporadic cases of campylobacteriosis in humans. *Journal of Food Protection* 65: 73-78.

Narang, N., Fratafico, P. M., Tillman, G., Pupedis, K., Cray, W.C. Jr. (2009) Performance comparison of a fliC(h7) real-time PCR assay with an H7 latex agglutination test for confirmation of the H type of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection* 72: 2195-2197.

Neill, M. A., Agosti, J., Rosen, H. (1985) Hemorrhagic colitis with *Escherichia coli* O157:H7 preceding adult hemolytic uremic syndrome. *Arch Intern Med.* 145 (12): 2215-2217. DOI: <http://dx.doi.org/10.1001/archinte.145.12.2215>

Ogunjimi, A. A., Choudary, P. V. (1999) Adsorption of endogenous polyphenols relieves the inhibition by fruit juices and fresh produce of immuno-PCR detection of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 23(3): 213-220. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244\(98\)00138-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0928-8244(98)00138-2)

Perez, J.M., Cavalli, P., Roure, C., Renac, R., Gille, Y., Freydière, A.M. (2003) Comparison of four chromogenic media and Hektoen agar for detection and presumptive identification of *Salmonella* strains in human stools. *Journal of Clinical Microbiology* 41: 1130-1134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.41.3.1130-1134.2003>

Pless, P., Reissbrodt, R. (1995) Improvement of *Salmonella* detection on motility enrichment media by ferrioxamine E-supplementation of pre-enrichment culture. *International Journal of Food Microbiology* 27(2-3): 147-159. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605\(94\)00160-8](http://dx.doi.org/10.1016/0168-1605(94)00160-8)

Ponchel, F., Toomes, C., Bransfield, K., Leong, F.T., Douglas, S.H., Field, S.L., Bell, S.M., Combaret, V., Puisieux, A., Mighell, A.J., Robinson, P.A., Inglehearn, C.F., Isaacs, J.D., Markham, A.F. (2003) Real-time PCR based on SYBR-Green I fluorescence: An alternative to the TaqMan assay for a relative quantification of gene rearrangements, gene amplifications and micro gene deletions. *BMC Biotechnology* 3(1): 18. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6750-3-18>

Rantsiou, K., Alessandria, V., Urso, R., Dolci, P., Cocolin, L. (2008) Detection, quantification and vitality of *Listeria monocytogenes* in food as determined by quantitative PCR. *International Journal of Food Microbiology* 121: 99-105. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.11.006>

Rantsiou, K., Lamberti, Cocolin, L. (2010) Survey of *Campylobacter jejuni* in retail chicken meat products by application of a quantitative PCR protocol. *International Journal of Food Microbiology* 141. Suppl 1:S75-S79. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.002>

Reiter, M. G., López, C., Jordano, R., Medina, L.M. (2010) Comparative study of alternative methods for food safety control in poultry slaughterhouses. *Food Analytical Methods* 3 : 253–260. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-010-9129-5>

Richard, C., Drider, D., Fliss, I., Denery, S., Prevost, H. (2004) Generation and utilization of polyclonal antibodies to a synthetic C-terminal amino acid fragment of divercin V41, a class IIa bacteriocin. *Applied and Environmental Microbiology* 70(1): 248-254. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/aem.70.1.248-254.2004>

Riley, R., Guilleminault, C., Herran, J., Powell, N. (1983) Cephalometric analyses and flow-volume loops in obstructive sleep apnea patients. *Sleep* 6: 303-311.

Rohonczy, K., Fodor, A., Tabajdiné, P. V., Mohácsiné, F. C. (2007) Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló korszerű gyorsmódszerek összehasonlító vizsgálatai. *Hungalimentaria 2007 Konferencia Budapest 2007. október 25-26. Összefoglalók 18 p.*

Scheutz, F., Moller Nielsen, E., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, Nataro, R. J. P., Caprioli, A. (2011) Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May. *Euro Surveill.* 2011;16(24):pii=19889.

Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19889>

Silva, J., Leite, D., Fernandes, M., Mena, C., Gibbs, P., A., and Teixeira, P. (2011) *Campylobacter* spp. as a Foodborne Pathogen: A Review. *Front Microbiol* 2, 200. DOI: <http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2011.00200>

Skirrow, M.B. (1977) *Campylobacter enteritis*: a "new" disease. *British Medical Journal* 2:9-11. DOI: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.2.6078.9>

Smigic, N., Rajkovic, A., Antal, E., Medic, H., Lipincka, B., Uyttendaele, M., Devlieghere,

F.(2009) Treatment of *Escherichia coli* O157:H7 with Lactic Acid, Neutralized Electrolyzed Oxidizing Water and Chlorine Dioxide Followed by Growth Under Sub-optimal Conditions of Temperature, pH and Modified Atmosphere. *FOOD MICROBIOLOGY* 26(6): 629-637. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2009.04.010>

Sréterné Lancz, Zs., Frankovicsné Adrián, E., Fekete, A., & Kissné Fias, K.(2008) Állati eredetű élelmiszerek mikrobiológiai biztonsága Magyarországon. *ÉLELMISZERVIZSGÁLATI KÖZLEMÉNYEK* Ksz. 54:78-89.

Sréterné Lancz Zs. (2011) A zoonotikus kórokozók elleni védekezés aktuális kérdései a baromfi-ágazatban - helyzetkép, várható jogszabályi változások. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest. 2011. április 19-20. Összefoglalók*, .25-27 p.

Starbuck, M.A.B., Hill, P.J., Stewart, G.S.A.B. (1992) Ultra sensitive detection of *Listeria monocytogenes* in milk by the polymerase chain reaction (PCR). *Letters in Applied Microbiology* 15: 248-252. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765x.1992.tb00775.x>

Stessl, B., Luf, W., Wagner, M., Schoder, D. (2009) Performance testing of six chromogenic ALOA-type media for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology* 106(2):651-659. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.04039.x>

Sváb., J. (1973) Biometriai módszerek a kutatásban. Mezőgazdasági kiadó, Budapest.

Szeitzné Szabó, M. (szerk.) (2008) Élelmiszer-biztonsági helyzetelemzés és kockázatelemzés. Agroinform Kiadó, Budapest.

Tabajdiné, P.V. (2003) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. MÉTE 2003. november 19.

Tabajdiné, P.V., Rohonczy, K., Zoller, L. (2009) Patogén mikroorganizmusok kimutatása rekombináns fág fehérjékkel. Hungalimentaria 2009 Konferencia, Budapest 2009. április 22-23. *Összefoglalók* pp. 33.

Tabajdiné P.V.(2001) Korszerű *Salmonella* kimutatási módszerek tapasztalatai az élelmiszerellenőrzésben. *Magyar Zoonózis Társaság 2001. évi kiadványa*. pp. 121-140.

Tauxe, Robert V. (1997) Emerging Foodborne Diseases: An Evolving Public Health Challenge. *Emerging Infectious Diseases Journal* 3(4):425-434. DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid0304.970403>

Temelli,S., Eyigor, A., Anar, S. (2012) Prevalence of *Escherichia coli* O157 in red meat and meat products determined by VIDAS ECPT and LightCycler PCR. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.* 36: 305-310.

Uyttendaele, M., Vanwildemeersch, K., Debevere, J. (2003) Evaluation of real-time PCR vs automated ELISA and a conventional culture method using a semi-solid medium for detection of *Salmonella*. *Letters in Applied Microbiology* 37(5) 386-391. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1472-765x.2003.01415.x>

Valiente Moro, C., Desloire, S., Vernozzy-Rozand, C., Chauve, C., Zenner, L. (2007) Comparison of the VIDAS[®] system, FTA[®] filter-based PCR and culture on SM ID for detecting *Salmonella* in *Dermanyssus gallinae*. *Letters in Applied Microbiology*. 44 (4): 431-436. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02119.x>

Van Deun, K., Pasmans, F., Ducatelle, R., Flahou, B., Vissenberg, K., Martel, A., Van den, B.W., Van Immerseel, F., Haesebrouck, F. (2008) Colonization strategy of *Campylobacter jejuni* results in persistent infection of the chicken gut. *Veterinary Microbiology* 130: 285-297. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetmic.2007.11.027>

Vernozzy-Rozand, C., Mazuy, C., Ray-Gueniot, S., BoutrandLoei, S., Meyrand, A., Richard, Y. (1998) Evaluation of the VIDAS methodology for detection of *Escherichia coli* O157 in food samples. *Journal of Food Protection* 61: 917-920.

Vojdani, J.D., Beuchat, L.R., Tauxe, R.V. (2008) Juice-associated outbreaks of human illness in the United States, 1995 through 2005. *Journal of Food Protection* 71: 356-364.

Walker, R. L., Kinde, H., Anderson, R. J., Brown, A. E. (2001). Comparison of VIDAS enzyme-linked fluorescent immunoassay using more swab sampling and conventional culture method for *Salmonella* detection in bulk tank milk and in-line milk filters in California dairies. *International Journal of Food Microbiology* 67: 123-129. DOI:

[http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(01\)00427-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(01)00427-5)

Walker, S. J., Archer, P., Banks J. G. (1990) Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. *Journal of Applied Bacteriology*. 68(2): 157–162.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1990.tb02561.x>

Wauters, G., Boel, A., Voorn, G.P., Verhaegen, J., Meunier, F., Janssens, M., Verbist, L. (1995) Evaluation of a new identification system, Crystal Enteric/Non-Fermenter, for gram-negative bacilli. *Journal of Clinical Microbiology* 33(4): 845-849.

Wernars K, Heuvelman CJ, Chakrabarty T, Notermans SHW (1991) Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogenes* in soft cheese. *Journal of Applied Bacteriology* 70:121-126. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2672.1991.tb04437.x>

Williams, L.K., Jorgensen, F., Grogono-Thomas, R., and Humphrey, T.J. (2009). Enrichment culture for the isolation of *Campylobacter* spp: effects of incubation conditions and the inclusion of blood in selective broths. *International Journal of Food Microbiology* 130: 131-134. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.01.018>

Zoller, L., Mráz, B., Fodor, A., Tabajdiné, P. V. (2011) Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajok jelentősége a mikrobiológiai gyakorlatba. *Hungalimentaria 2011 Konferencia Budapest*. 2011. április 19-20. Poszter

Törvények, rendeletek, szabványok

4/1998. (XI.11.) EüM. rendelet - *Az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről*

2073/2005/EK RENDELET (2005. november 15.) - *Az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól*

MSZ EN ISO 16654:2001 .Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer az *Escherichia coli* O 157 kimutatására (ISO 16654:2001)

MSZ EN ISO 16140-1:2004. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A választható módszerek validálásának protokollja (ISO 16140 :2003)

MSZ EN ISO 11290-1:1996/A1:2005. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiai vizsgálata. Horizontális módszer a *Listeria monocytogenes* kimutatására és számlálására. 1. rész: Kimutatási módszer. 1. módosítás: Az izoláló táptalaj és a hemolízisvizsgálat változtatása, valamint a precizitási adatok megadása (ISO 11290-1:1996/AM1:2004)

MSZ EN ISO 6579:2006 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a szalmonellafajok kimutatására (ISO 6579:2002)

MSZ EN ISO 10272-1:2006. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a *Campylobacter* spp. kimutatására és számlálására. 1. rész: Kimutatási módszer (ISO 10272-1:2006)

MSZ EN ISO 11290-2:2012. Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiai vizsgálata. Horizontális módszer a *Listeria monocytogenes* kimutatására és számlálására. 2. rész: Számlálási módszer (ISO 11290-2:1998)

MSZ EN ISO 6887-4:2012 Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A vizsgálati minták, az alapszuszenzió és a decimális hígítások elkészítése mikrobiológiai vizsgálathoz. 4. rész: A tejtől és tejtermékektől, a hústól és hústermékektől, valamint a haltól és haltermékektől különböző termékek előkészítésének specifikus szabályai (ISO 6887-4:2003).

209/2013/EU RENDELET (2013. március 11.) – *A 2073/2005/EK rendeletnek a csírák mikrobiológiai kritériumai és a vágott baromfitestekre és friss baromfihúsra vonatkozó mintavételi szabályok tekintetében történő módosításáról.*

Internetes hivatkozások

http://epa.oszk.hu/00300/00398/00466/pdf/epinfo_EPA00398_2011_44.pdf

Letöltési idő: 2012. december 11.

http://193.225.82.27/fileadmin/media/AOK/11_12_I_AOK_kotelezo_adatok.pdf

Letöltési idő: 2012. december 11.

<http://www.nphl.org/EscherichiacoliO157-Fey.pdf.pdf>

Letöltési idő: 2012. augusztus 17.

<http://www.labm.com/products/harlequin-salmonella-abc-medium/>

Letöltési idő: 2012. augusztus 17.

<http://www.labm.com/products/harlequin-listeria-chromogenic-agar/>

Letöltési idő: 2012. augusztus 17.

<http://www.labm.com/products/harlequin-smac-bcig/>

Letöltési idő: 2012. augusztus 17.

<http://www.biomerieux-usa.com/upload/chromID-Salmonella-Detection-Technical-Sheet2.pdf>

Letöltési idő: 2012. augusztus 17.

[http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/8AF14C118957DEB2C12574C90031DBBD/\\$file/TDS_BM066_v6.pdf](http://www.solabia.com/solabia/produitsDiagnostic.nsf/0/8AF14C118957DEB2C12574C90031DBBD/$file/TDS_BM066_v6.pdf)

Letöltési idő: 2012. október 30.

<http://www.noackgroup.com/Live/publish/templates/Resources/1/MDART/BKRBM%20123%2008/Leaflet%20Compass%20Listeria%20Agar%202009.pdf>

Letöltési idő: 2012. október 30.

http://www.oxid.com/UK/blue/prod_detail/prod_detail.asp?pr=PO1185&org=43&sec=1&c=UK&lang=EN

Letöltési idő: 2012. október 30.

http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/fsd/literature/355-5294_356-3694_RLTechSheet_V8_121806_US.pdf

Letöltési idő: 2012. november 17.

<http://www.hungalimentaria.hu/Default.aspx?tabid=165>

Letöltési idő : 2013. július 21.

10.2. MELLÉKLET

Listeria monocytogenes mesterségesen fertőzött minták- KROMOGÉNES

M1. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és negatív kontroll minták eredményei kromogén szubsztrátot tartalmazó agar módszerrel (1. sorozat)

	Minták száma	Pozitív minta COMPASS <i>Listeria</i> módszerrel	Pozitív minta HARLEQUIN <i>L.</i> módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta COMPASS <i>Listeria</i> módszerrel	Negatív minta HARLEQUIN <i>L.</i> módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	5	4	4	4	1	1	1
Gy. f. zöldségek	5	4	4	4	1	1	1
Gy.f. tészta	5	4	4	4	1	1	1
Gy.f. sonka	5	4	4	4	1	1	1
Tej	5	4	4	4	1	1	1
Saláták	5	4	4	4	1	1	1
Összes	30	24	24	24	6	6	6

M2. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és negatív kontroll minták eredményei kromogén szubsztrátot tartalmazó agar módszerrel (2. sorozat)

	Minták száma	Pozitív minta COMPASS <i>Listeria</i> módszerrel	Pozitív minta HARLEQUIN <i>L.</i> módszerrel	Pozitív minta Rapid'L <i>mono</i> módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta COMPASS <i>Listeria</i> módszerrel	Negatív minta HARLEQUIN <i>L.</i> módszerrel	Negatív minta Rapid'L <i>mono</i> módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	5	4	4	4	4	1	1	1	1
Tej	5	4	4	4	4	1	1	1	1
Saláták	5	4	4	4	4	1	1	1	1
Összes	15	12	12	12	12	3	3	3	3

Salmonella mesterségesen fertőzött minták- VIDAS SLM

M3. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és a negatív kontroll minta eredményei VIDAS SLM és ISO módszerrel

	Minták száma	Pozitív minta VIDAS SLM módszerrel	Pozitív minta ISO módszerrel	Negatív minta VIDAS SLM módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	9	8	8	1	1
Felvágott	9	8	8	1	1
Tejtermék	9	8	8	1	1
Saláták	9	8	8	1	1
Összes	36	32	32	4	4

***Salmonella* mesterségesen fertőzött minták- VIDAS ICS2+SLM**

M4. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és a negatív kontroll minta eredményei VIDAS ICS2+SLM és ISO módszerrel

	Minták száma	Pozitív minta VIDAS ICS2+SLM módszerrel	Pozitív minta ISO módszer- rel	Negatív min- ta VIDAS ICS2+SLM módszerrel	Negatív minta ISO módszerrel
Darálthús	9	8	8	1	1
Felvágott	9	8	8	1	1
Tejtermék	9	8	8	1	1
Saláták	9	8	8	1	1
Összes	36	32	32	4	4

***Listeria monocytogenes* mesterségesen fertőzött minták- VIDAS LMO2**

M5. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és negatív kontroll minták eredményei VIDAS LMO2 módszerrel (1. sorozat)

	Minták száma	Pozitív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Pozitív minta ISO mód- szerrel	Negatív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Negatív minta ISO mód- szerrel
Darálthús	5	4	4	1	1
Gy. f. zöldségek	5	4	4	1	1
Gy.f. tészta	5	4	4	1	1
Gy.f. sonka	5	4	4	1	1
Tej	5	4	4	1	1
Saláták	5	4	4	1	1
Összes	30	24	24	6	6

M6. táblázat: Mesterségesen fertőzött minták és negatív kontroll minták eredményei VIDAS LMO2 módszerrel (2. sorozat)

	Minták száma	Pozitív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Pozitív minta ISO mód- szerrel	Negatív minta VIDAS LMO2 módszerrel	Negatív minta ISO mód- szerrel
Darálthús	5	4	4	1	1
Tej	5	4	4	1	1
Saláták	5	4	4	1	1
Összes	15	12	12	3	3

M7. táblázat: Vizsgált csirke terméktípusok *Salmonella* fertőzöttsége tenyésztési módszerrel vizsgálva

Termék	Darab	Pozitív	Negatív	Pozitív %	Negatív %
nyak	14	10	4	71,43	28,57
mellfilé	18	14	4	77,78	22,22
felsőcomb filé	6	4	2	66,66	33,34
zúza	6	3	3	50	50
far-hát	7	4	3	57,14	42,86
máj szívvel	3	2	1	66,66	33,34
felsőcomb	11	7	4	63,63	36,37
comb	16	9	7	56,25	43,75
mell	13	8	5	61,54	38,46
máj	17	11	6	64,70	35,30
zsig. csirke	9	6	3	66,66	33,34
grill	3	2	1	66,66	33,34
szárny	12	9	3	75	25
alsócomb	5	3	2	60	40
csirke	1	1	0	100	0
Összes	141	93	48	-	-
Pozitív és negatív minták aránya	-	66%	34%	-	-

M8. táblázat: *Salmonella* kimutatása baromfi mintákból MSZ EN ISO 6579: 2006 szabvány szerint, VIDAS ICS2-SLM módszerrel

		ISO Mód- szer	VIDAS ICS2-SLM			
Minta típusa	Minta száma	Pozitív	VIDAS ICS2- SLM +	VIDAS ICS2- SLM -	Hamis pozitív	Hamis nega- tív
Csirke nyak	14	10	10	4	0	0
Csirke mell	18	14	14	4	0	0
Csirke mell filé	6	4	4	2	0	0
Csirke zúza	6	3	3	3	0	0
Csirke far-hát	7	4	4	3	0	0
Csirke máj szívvel	3	2	2	1	0	0
Csirke alsócomb 4	11	7	7	4	0	0
Csirke comb	16	9	9	7	0	0
Csirke mell	13	8	8	5	0	0
Csirke máj	17	11	11	6	0	0
Zsigerelt csirke	9	6	6	3	0	0
Grill csirke	3	2	2	1	0	0
Csirke szárny	12	9	9	3	0	0
Csirke alsócomb 2	5	3	3	2	0	0
Egész csirke	1	1	1	0	0	0
Összes	141	93	93	48	0	0

M9. táblázat: *Salmonella* kimutatása baromfi mintákból MSZ EN ISO 6579: 2006 szabvány szerint, TaqMan real-time PCR módszerrel

		ISO Mód- szer	TaqMan real-time PCR			
Minta típusa	Minta száma	Pozitív	PCR +	PCR -	Hamis pozitív	Hamis s negatív
Csirke nyak	14	10	10	4	0	0
Csirke mell	18	14	14	4	0	0
Csirke mell filé	6	4	4	2	0	0
Csirke zúza	6	3	3	3	0	0
Csirke far-hát	7	4	4	3	0	0
Csirke máj szívvel	3	2	2	1	0	0
Csirke alsócomb 4	11	7	7	4	0	0
Csirke comb	16	9	9	7	0	0
Csirke mell	13	8	8	5	0	0
Csirke máj	17	11	11	5	1	0
Zsigerelt csirke	9	6	6	3	0	0
Grill csirke	3	2	2	1	0	0
Csirke szárny	12	9	9	3	0	0
Csirke alsócomb 2	5	3	3	2	0	0
Egész csirke	1	1	1	0	0	0
Összes	141	93	93	47	1	0

M10. táblázat: *Salmonella* kimutatása baromfi mintákból MSZ EN ISO 6579: 2006 szabvány szerint, Bax real-time PCR módszerrel

		ISO Módszer	BAX real-time PCR			
Minta típusa	Minta száma	Pozitív	PCR +	PCR -	Hamis pozitív	Hamis negatív
Csirke nyak	14	10	10	4	0	0
Csirke mell	18	14	14	4	0	0
Csirke mell filé	6	4	4	2	0	0
Csirke zúza	6	3	3	3	0	0
Csirke far-hát	7	4	4	3	0	0
Csirke máj szívvel	3	2	2	1	0	0
Csirke alsócomb 4	11	7	7	4	0	0
Csirke comb	16	9	9	7	0	0
Csirke mell	13	8	8	5	0	0
Csirke máj	17	11	11	6	0	0
Zsigerelt csirke	9	6	6	3	0	0
Grill csirke	3	2	2	1	0	0
Csirke szárny	12	9	9	3	0	0
Csirke alsócomb 2	5	3	3	2	0	0
Egész csirke	1	1	1	0	0	0
Összes	141	93	93	48	0	0

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom Tabajdiné dr. Pintér Veronikának, hogy a labormunkához a feltételeket biztosította és tapasztalataival segítette a dolgozat elkészülését és Mohácsiné dr. Farkas Csillának, hogy észrevételeivel munkámat támogatta.

Köszönöm az egykori FoodMicro Kft., ma WESSLING HUNGARY Kft. Élelmiszervizsgáló Mikrobiológia Laboratórium valamennyi dolgozójának, különösen Némethyné Hupcsik Kornéliának, Gáti Andrásnénak (sz.:Róka Éva), Batek Évának, akik mindig kedvesen, segítőkészen álltak rendelkezésemre, valamint Hermann Zsolt, Zoller Linda, és Fodor Andrea kollégáimnak, akik szorgalmasan segédkeztek minden új vizsgálat beállításában.

Hálás vagyok Mráz Baláznak és Antal Eszternek az angol fordításban nyújtott támogatásáért. Köszönöm Dr. Maráz Annának és Dr. Belák Ágnesnek a FEMS Ösztöndíj pályázathoz nyújtott segítségét.

Szeretnék továbbá köszönetet mondani a Torinói Egyetem D.I.V.A.P.R.A., Fac. of Agriculture, mikrobiológiai laboratóriumában dolgozóknak, különösen Dr. Luca Cocolin-nak és Dr. Kalliopi Rantsiou-nak, az inspiráló környezetért és a molekuláris munkákban nyújtott értékes segítségért.

Hálával tartozom szüleimnek, és az egész családomnak, akik mindent megtettek, hogy tanulhassak, inspiráltak, mellettem álltak és hittek a munkám sikerében.

Végül, de nem utolsó sorban, nem tudok eléggé hálás lenni férjemnek, aki türelemmel viselte a dolgozat elkészülését, és mindvégig támogatott. (Je suis tres reconnaissante pour mon mari, qui m'a patiemment soutenu. Merci.)