

Budapesti Corvinus Egyetem
Élelmiszertudományi Kar
Mikrobiológiai és Biotechnológiai Tanszék



PATOGÉN MIKROORGANIZMUSOK KIMUTATÁSÁRA SZOLGÁLÓ GYORS
MÓDSZEREK ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Rohonczy Kata

Doktori értekezés tézisei

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

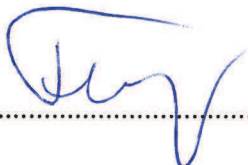
Témavezető: Mohácsiné Dr. Farkas Csilla, PhD

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

1. BEVEZETÉS

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 fejlesztettek ki a szabványos, hosszú és költséges munkafolyamatok rövidítésére.

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 végeznek az MSZ EN ISO 16140 szabványa szerint.

2. CÉLKITŰZÉSEK

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 élelmiszer mátrix hatásának elemzése a különböző vizsgálati módszerekre.
4. Dúsítások vezetésének optimalizálása.
5. Vizsgálati módszer kiválasztás, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

Vizsgálati anyagok:

Munkám során mesterségesen fertőzött és természetes (rutin mintákból válogatott) mintákat használtam. A vizsgálatokhoz felhasznált mikroorganizmusok a FoodMicro Kft. Mikrobiológiai Laboratóriumának és a Torinói Egyetem törzsgyűjteményből származtak.

Salmonella vizsgálatoknál a korszerű új differenciáló táptalajok és immunológiai módszerek esetén összesen 85 természetesen fertőződött és 36 mesterségesen fertőzött mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez. A mesterségesen fertőzött mintákhoz teszt törzseket alkalmaztam. A felhasznált élelmiszer mátrixok darálthús, felvágott, tejtermék és saláták voltak.

A real-time PCR módszerrel végzett vizsgálatok esetén nyers hús, felvágott, csokoládé, fűszer, környezeti minta, takarmány mátrixokat vizsgáltam. Real-time PCR vizsgálatok esetén 1445 darab rutin laboratóriumi mintát vizsgáltam meg, a mátrixok nyers hús, felvágott, csokoládé, fűszer, környezeti minta, takarmány (házi kedvencek számára) minták voltak.

Listeria monocytogenes vizsgálatoknál a korszerű új differenciáló táptalajok és immunológiai módszerek esetén összesen 147 természetesen fertőződött és termékcsopontonként 4 db mesterségesen fertőzött és 1 db kontroll mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez. A vizsgálati mátrixok darálthús, saláta, tej, gyorsfagyasztott zöldségek, gyorsfagyasztott sonka, gyorsfagyasztott tészta voltak.

E. coli O157 vizsgálatoknál immunológiai módszerek és real-time PCR módszer esetén összesen 47 üzemi területen vett higiéniai mintát és 3 mesterségesen fertőzött darálthús mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez.

Campylobacter vizsgálatoknál hagyományos és qPCR módszer esetén összesen 40 db kereskedelemből származó, hűtött, darabolt baromfi mintát használtam a kísérletek elvégzéséhez. A minták vizsgálatát t=0, t=6, t=24 és t=48 óra elteltével végeztem el. A négy dúsítóban és a Ringer oldatban meghatároztam kalibrációs görbéket.

Vizsgálati módszerek:

Vizsgálataimhoz 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 (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 testületek eredményeivel való összehasonlítás során megállapítottam, hogy a validálásokhoz alkalmazott élelmiszer mátrixok nem ölelik fel minden élelmiszer fajtát, amelyek egy rutin laboratóriumban előfordulnak. Az adott módszer teljesítmény jellemzőit ezektől eltérő mátrixok esetében is meghatároztam.

4. EREDMÉNYEK ÉS KÖVETKEZTETÉSEK

4.1. Kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal végzett vizsgálatok eredményei

4.1.1. *Salmonella* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal

A COMPASS *Salmonella* és az SM2 táptalajokon mért relatív pontosság, relatív specifitás és relatív érzékenység értékek 100% -os egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A HARLEQUIN *Salmonella* táptalajon kapott eredmények 100%-os relatív érzékenységet a 99,2%-os relatív pontosságot és 98,6%-os relatív specifitást mutatnak a referencia módszer eredményeivel összehasonlítva. 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 (97%), relatív specifitás (96,9%) és relatív érzékenység (97,1%) 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.

4.1.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal

A Harlequin™ *Listeria*, COMPASS *Listeria* és a RAPID'L.Mono™ táptalajjal végzett vizsgálatok esetén nem tapasztaltam sem hamis pozitív sem hamis negatív eredményeket. Vizsgálataim alapján megállapítható, hogy a Harlequin™ *Listeria*, COMPASS *Listeria* és a RAPID'L.Mono™ táptalajokkal mért eredmények 100%-os egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. A COMPASS *Listeria* Agarra vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság (97,3%), relatív specifitás (98,9%) és relatív érzékenység (95,6%) tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak. A RAPID'L.Mono™ Agarra vonatkozóan az AFNOR nemzetközi validálási adatok relatív pontosság (98,6%), relatív specifitás (97,9%) és relatív érzékenység (99,2%) tekintetében szintén alacsonyabb értékeket mutatnak.

4.2. Immunológiai módszerrel végzett vizsgálatok eredményei

4.2.1. *Salmonella* vizsgálata VIDAS módszerrel

Megállapítható, hogy a VIDAS SLM, és VIDAS ICS2+SLM módszerekkel mért eredmények 100% egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel.

A VIDAS ICS2+SLM módszerrel 99,2% relatív pontosság, 98,6% relatív specifitás és 100% relatív érzékenység értékeket kaptam. 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 (97,4%) és relatív érzékenység (95,5%) tekintetében alacsonyabb, relatív specifitás (99,4%) tekintetében magasabb értékeket mutatnak.

4.2.2. *Listeria monocytogenes* vizsgálata VIDAS módszerrel

A VIDAS LMO2 módszerrel mért eredmények 100%-os 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 (97,6%), relatív specifitás (98,3%) és relatív érzékenység (96,7%) tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak.

4.2.3. *E. coli* O157 vizsgálata VIDAS módszerrel

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 (98,4%), relatív specifitás (96,9%) és relatív érzékenység (97,4%) tekintetében alacsonyabb értékeket mutatnak.

4.3. Molekuláris vizsgálati módszerek

4.3.1. *Salmonella* vizsgálata real-time PCR módszerrel (ABI)

Vizsgálataim apján 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 esetében 2 mintánál 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.

4.3.2. *E. coli* O157 vizsgálata real-time PCR módszerrel (ABI)

A real-time PCR módszerrel mért eredmények 100%-os egyezést mutatnak a referencia módszer eredményeivel. Az *E. coli* O157 real-time PCR-rel végzett vizsgálatok nem tapasztaltam sem hamis pozitív, sem hamis negatív eredményeket.

4.4. Mátrix hatás elemzés

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.

4.5. Dúsítások vezetésének optimalizálása

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.

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 alkalmazhatók. Az alkalmazott qPCR módszerrel a *Campylobacter* spp. és *Campylobacter jejuni* faj egy időben kimutatható. Kísérletet tettem a mintákból qPCR módszerrel történő mennyiségi meghatározásra is.

4.6. Vizsgálati módszer kiválasztása, különös tekintettel a vizsgálati időtartamra

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 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 megtevesztik 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 legrövidebb. 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 pozitívítás 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.

5. JAVASLATOK

***Salmonella* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal:**

Eredményeim alapján az MSZ EN ISO 6579 szabvány szerinti második választható táptalajnak mindhárom (COMPASS *Salmonella*, SM2 és HARLEQUIN *Salmonella* Agar) táptalaj megfelelően használható.

***Listeria monocytogenes* vizsgálata kromogén szubsztrát tartalmú táptalajokkal:**

Az összehasonlító elemzéseim azt mutatták, hogy *Listeria monocytogenes* vizsgálatokor a kromogén szubsztrátot tartalmazó táptalajok MSZ EN ISO 16140 szabványban szereplő paraméterei a referencia módszerhez viszonyítva 100% -ban megegyeztek, így valamennyit javaslom második táptalajnak. A RAPID 'L. Mono Agar szelektívebb, könnyebben értékelhető, de a költsége ennek a táptalajnak a legnagyobb.

***Salmonella* vizsgálata VIDAS 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 élelmiszer-biztonsági ellenőrzésére.

***Listeria monocytogenes* vizsgálata VIDAS módszerrel:**

Hamis negatív eredményeket nem tapasztaltunk, ami élelmiszerbiztonsági szempontból nagyon jelentős. Az eredmények alapján ezt a módszert vezettük be laboratóriumunkba rutin vizsgálatok céljára.

***E. coli* O157 vizsgálata VIDAS módszerrel:**

Vizsgálataim során a természetesen fertőződött környezeti és húsmintákban nem mértem pozitív *E. coli* O157 eredményeket. Az irodalmi adatokkal összhangban az MSZ EN ISO 16140 szabvány alapján meghatározott teljesítmény jellemző 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 adódóan. Az alacsony előfordulás ellenére a mikrobacsoport monitorozása javasolt, mivel a mortalitása nagy.

***Salmonella* vizsgálata real-time PCR módszerrel:**

A szabványos „gold standard” módszerrel összehasonlítva a real-time PCR módszerrel több *Samonella* pozitív eredményt kaptam.

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.

A takarmány és higiéniai minták jellege is okot adhat a hamis pozitív minták detektálására. Az életképes szalmonellák magas hőmérsékleten vagy vegyszeres kezeléshatására ugyan elpusztulnak, viszont a holt sejtek nagy számban jelen lehetnek a mintákban. 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.

***E. coli* O157 vizsgálata real-time PCR módszerrel**

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.

A nagyszámú vizsgálati eredmény alapján megállapítható, hogy a felhasznált, kereskedelmi forgalomban kapható kimutatási módszerek közül nagy biztonsággal lehet választani megfelelő érzékenységgű, pontosságú és specifikus módszert, amennyiben a mintavételi tervet (mintaszám és gyakoriság), a vizsgálatra szánt időt, a technológiai folyamatokat és a mátrixok módszerre gyakorolt hatását ismerjük.

6. 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 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 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 húсок mikrobiológiai állapota 24 órán belül megállapítható az alkalmazott korszerű, gyors mikrobiológiai eljárásokkal, lehetővé téve a forgalomba kerülés előtti gyors minősítést.

7. PUBLIKÁCIÓS LISTA

Impakt faktoros folyóirat cikkek:

1. **Rohonczy, K.**, Zoller, L., Hermann, Zs, Fodor, A., Mráz, B., Tabajdi-Pintér, V. (2013) Coparison of automated ELISA and two different real-time PCR techniques for *Salmonella* detection in poultry samples. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, (in press) IF: 0.79
2. **Rohonczy, K.**, Rantsiou, K., Cocolin, L. (2013) Modified enrichment strategies coupled with molecular and conventional methods to detect and quantify *Campylobacter jejuni* in chicken meat from the market. *Journal of Food Safety*, 33(4): 497-502. IF: 0.72

Konferencia kiadványok, magyar nyelvű összefoglaló:

1. **Rohonczy K.**, Mohácsiné Farkas C., Kiskó G., Taczman-Brückner, A., Farkas Á. (2005) Impedimetriás elven alapuló gyors módszer kifejlesztése zöldségeken előforduló *L. monocytogenes* kimutatására. *HUNGALIMENTARIA 2005*. 2005. április 19-20., Debrecen.
2. Fodor A., **Rohonczy K.**, Tabajdiné Pintér V. (2006) E. coli vizsgálatának összehasonlító elemzése, különös tekintettel az EU mikrobiológiai kritériumokra. *EOQ 2006*. 2006. március 29-30., Debrecen.
3. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V. (2006) Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló korszerű gyorsmódszerek összehasonlító vizsgálatai. *EOQ 2006*. 2006. március 29-30., Debrecen.
4. Tabajdiné Pintér V., **Rohonczy K.** (2006) Gyors mikrobiológiai vizsgálatok jelentősége az ivóvíz vizsgálatok területén. *Ökotech Mavíz Szakmai Nap*, 2006. október 1., Budapest.
5. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V., Mohácsiné Farkas Cs. (2007) Patogén mikroorganizmusok kimutatására szolgáló korszerű gyorsmódszerek összehasonlító vizsgálatai. *HUNGALIMENTARIA 2007*. 2007. október 25-26., Budapest.
6. Fodor A., **Rohonczy K.**, Tabajdiné Pintér V. (2007) Egységesítési feladatok az élelmiszer-mikrobiológiai gyakorlatban *HUNGALIMENTARIA 2007*. 2007. október 25-26., Budapest.

7. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V., Zoller L. (2008) Patogén mikroorganizmusok vizsgálata molekuláris biológiai módszerekkel *EOQ 2008*. 2008. április 24-25., Tihany.
8. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V., Zoller L. (2008) Húsipari termékek biztonságos eltarthatósági idejének meghatározása. *EOQ 2008*. 2008. április 24-25., Tihany.
9. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V., Zoller L. (2009) Real time PCR módszerrel végzett patogén vizsgálatok tapasztalati. *HUNGALIMENTARIA 2009*. 2009. április 22-23., Budapest.
10. **Rohonczy K.**, Fodor A., Tabajdiné Pintér V., Zoller L. (2009) Húsipari termékek minőségmegőrzési időtartamának validálása az EU ajánlás tükrében. *HUNGALIMENTARIA 2009*. 2009. április 22-23., Budapest.
11. Tabajdiné Pintér V., **Rohonczy K.**, Zoller L. (2010) Patogén mikroorganizmusok kimutatása rekombináns fágfehérjékkel. *HUNGALIMENTARIA 2009*. 2009. április 22-23., Budapest.
12. Zoller L., **Rohonczy K.**, Tabajdiné Pintér V. (2010) Patogén mikroorganizmusok Real-Time PCR módszerrel történő kimutatása során szerzett tapasztalatok *Wessling szakmai nap*. 2010. április 16., Budapest.
13. Zoller L., **Rohonczy K.**, Tabajdiné Pintér V. (2010) Patogén mikroorganizmusok Real-Time PCR módszerrel történő kimutatása során szerzett tapasztalatok. *Élelmiszer mikrobiológia szeminárium*. 2010. június. 17., Budapest.

Nemzetközi konferencia összefoglaló:

1. Mohácsi-Farkas Cs., Kiskó G., **Rohonczy K.**, Taczman-Brückner, A. (2004): Detection of *Listeria monocytogenes* by impedimetric method from raw vegetables. *2nd Central European Congress on Food*. 2004. április 26-28., Budapest. Hungary.

2. Kiskó G., Mohács- Farkas Cs., **Rohonczy K.**, Taczman-Brückner, A. (2004): Detection of *Listeria monocytogenes* by impedimetric method from raw vegetables and fruit. 2nd Central European Congress on Food. 26-28 April 2004, Budapest, Hungary.
3. Mohácsi-Farkas Cs., Kiskó G., Taczman-Brückner, A., **Rohonczy K.** (2004): Impedimetric detection of *Listeria monocytogenes* from vegetable and fruit products. The International ICFMH Symposium Foodmicro 2004. 12-16th September 2004, Portoroz, Slovenia.
4. Zoller, L, **Rohonczy, K**, Mráz, B, Tabajdiné Pintér, V. (2012) Comparison of applicability rapid methods for *Salmonella* detection in poultry meat. The IAFP's European Symposium on Food Safety 2012. 21-23 May Warsaw, Poland

Hazai K+F Pályázat:

1. Baromfi húskok *Salmonella* szennyezettségének elemzése, gyors mikrobiológiai módszer fejlesztése (Innovációs Fejlesztési Program 2009)
2. Húsüzemi környezetben előforduló *Listeria monocytogenes* okozta kockázat elemzése (Innovációs Fejlesztési Program 2007)
3. Darabolt sajtok biztonságos eltarthatósági idejének meghatározása (Innovációs Fejlesztési Program 2007)
4. Húsipari termékek biztonságos eltarthatósági idejének meghatározása (Innovációs Fejlesztési Program 2008)
5. Húsüzemi környezetben előforduló *E. coli* O157 okozta kockázat elemzése (Innovációs Fejlesztési Program 2009)