

# Gyors mikrobiológiai kimutató eszközök

Az élelmiszerekben előforduló mikrobák kimutatása hosszú múltra tekint vissza. Számos, napjainkban is használt mikrobiológiai vizsgálati módszer több mint százéves múltra tekint vissza.

Az élelmiszerek mikrobiológiai ellenőrzésének két alapvető feladata az élelmiszer-biztonsági és a technológiai-higiéniai kritériumoknak való megfelelés biztosítása. A probléma fontosságát jelzi, hogy a fejlett országokban évente a lakosság kb. 30%-a szenved valamilyen élelmiszer-eredetű megbetegedésben.

Az élelmiszerekben lévő mikrobiológiai veszélyek az élelmiszer-eredetű megbetegedések egyik fő forrását jelentik. Az élelmiszerek nem tartalmazhatnak mikroorganizmusokat, azok által termelt toxinokat vagy anyagcseretermékeket olyan mennyiségben, amely elfogadhatatlan mértékű kockázatot jelent az ember egészségére.

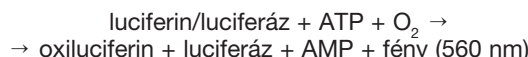
A hagyományos, tenyésztésen alapuló kimutatói módszerek az élelmiszerekben jelenlévő élő baktériumsejtek izolálásához és számának meghatározásához specifikus, mikrobiológiai tápközegeket igényelnek. A hagyományos módszerek azonban időigényesek (mikroorganizmustól függően általában 1-4 nap), így az eredmények gyakran csak több napos inkubálást követően értékelhetők, mivel a mikroorganizmusoknak szemmel látható telepeket kell kialakítaniuk a táptalajon. A módszertani fejlesztések ezért évtizedek óta az alternatív és gyors eljárások irányába haladnak, amelyek segítségével lehetőség nyílik a romlást okozó és patogén mikroorganizmusok gyors kimutatására, azonosítására és számuk pontos meghatározására.

Napjainkban, az élelmiszertételek gyors minősítése, az átmeneti tárolás időszükségletének csökkentése, és a HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points – Veszélyelemzés Kritikus Szabályozási Pontok) hatékony működtetése is feltétlenül igényli a mikrobiológiai kiértékelés gyorsítását, automatizálását, lehetőség szerint költségcsökkentéssel együtt. A gyorsesztesztet önellenőrzés céljából, elsősorban a polgári életben az élelmiszer-előállító üzemek részére fejlesztették ki.

## ATP BIOLUMINESZCENCIA MÉRÉS

Az ATP-luminometria egy olyan gyors biokémiai módszer, amely a szentjánosbogár fénykibocsátásában is működő luciferin-luciferáz enzimrendszert alkalmazza [2]. Az eljárás

lényege, hogy a vizsgált mintához luciferáz enzimet adnak, az enzim reakcióba lép az élő szervezetek (mikroorganizmusok, állati sejtek) energiatároló komponensével (az ATP-vel) és világítani kezd.



A reakcióhoz szükség van ATP-re és a luciferin-luciferáz enzim szubsztrát rendszerre. A reakció során átmenetileg oxiluciferin-luciferáz-AMP komplex (összetétel) képződik, amely gyorsan bomlik, és az oxiluciferin a felszabaduló energiát foton formájában adja le.

Összefoglalva: az enzimes reakció hatására a jelen lévő ATP fénykibocsátás mellett reagál. A folyamat során keletkező fényt egy készülék, az ún. luminométer érzékeli és méri. Minél nagyobb a fényintenzitás, annál nagyobb az ATP-tartalom és annál nagyobb a szennyeződés mértéke [5].

A módszert széles körben használják élelmiszeripari nyersanyagok (hal, hús, tej), késztermékek (italipar, tejipar), valamint víz vizsgálatára; leggyakrabban azonban a felületek higiéniai ellenőrzésére, ahol néhány perc alatt megoldható a tisztítás-fertőtlenítés hatásfokának kontrollja. Felületek vizsgálatának esetében, adott üzemi környezetben a módszer gyorsan, jó becslést ad a szennyezettség mértékére, így a valós idejű monitorozás értékes eszköze.

Az élelmiszer nyersanyagok, mint a növényi és állati szövetek ATP-ben gazdagok, amely lassabban és nem teljesen bomlik le a sejtek szétesése során. Ezért mikrobiológiai szennyezettség meghatározásakor a mikroba sejtek hatékony elválasztása, valamint a nem-mikroba sejtek eltávolítása fontos a vizsgálat elvégzése előtt. A módszert sikeresen alkalmazták friss húsok és tejek minőségének ellenőrzéséhez, starterkultúrák aktivitásának méréséhez, valamint UHT élelmiszerek sterilizálásának ellenőrzéséhez. A módszer továbbfejlesztésével (antitest-alapú biolumineszcencia, fág-alapú biolumineszcencia eljárás) lehetőség nyílt egyes patogének kimutatására is.

## GYORSTESZTEK HASZNÁLATA A MAGYAR HONVÉDSÉGBEN

A Magyar Honvédség Logisztikai Központ 2018-ban a Bentley Magyarország Kft. által forgalmazott MicroSnap mikrobiológiai gyorsesztesztet beszerzése mellett döntött (1. ábra). A mikrobiológiai gyorseszteszt használata az élelmiszerek

**ÖSSZEFOGLALÁS:** A Magyar Honvédség Logisztikai Központ Átvételi Osztálya (továbbiakban: MH LK TI ÁO) bevezette a gyors mikrobiológiai kimutató eszközök használatát. Mivel a hagyományos laboratóriumi körülmények között végzett vizsgálatok időigényesek, ezért igény mutatkozott arra, hogy a mikrobák kimutatására szolgáló mikrobiológiai módszereket jelentősen gyorsabb vizsgálati eljárásokkal váltsuk fel.

**KULCSSZAVAK:** biolumineszcencia, gyorseszteszt, luminométer, mikrobák, összcscsára

**ABSTRACT:** The Department of Acceptance of the Hungarian Defense Forces Logistics Center (hereinafter: MH LK TI ÁO) in many cases works with rapid microbiological detection tools. Since tests under conventional laboratory conditions are time consuming, there has been a need to replace microbiological methods for microorganism detection with significantly faster techniques.

**KEY WORDS:** bioluminescence, rapid test, luminometer, microorganisms, total germ

\* ORCID: 0000-0003-3499-5846

\*\* Ómagy, MH LK TI ÁO. ORCID: 0000-0002-0279-5172



1. ábra. Mikrobiológiai gyors tesztek, vizsgálati eszközök

minőségének ellenőrzésében egy új képesség. Bevezetésük azért vált szükségessé, mert általuk az élelmiszerek minősége könnyen, kényelmesen és gyorsan megállapítható.

A gyors mikrobiológiai tesztek rövidebb időn belül (6-7 óra) adnak eredményt az élelmiszerek minőségére vonatkozóan, mint a hagyományos laboratóriumi technikákkal elvégzett vizsgálatok. Használatuk egyszerű; hordozható, olyan tesztrendszer, amely a beszállítók ellenőrzésére biztosít lehetőséget a minőségbiztosítási folyamatokban. A MH LK TI ÁO a vizsgálatok gyorsasága miatt ezt a vizsgálatot rendszeresíti az ellátási rendszerbe. A hagyományos módszerekkel történő összevethetőség miatt a Szent István Egyetem Mikrobiológiai Tanszékének munkatársai összehasonlító laborvizsgálatokat végeztek a hagyományos labor kimutatási módszerekkel. A 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről és a 2073/2005 EK rendelet az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól alapján kidolgozták azokat a határértékeket, amelyekkel az élelmiszer minták kiértékelhetők (1. táblázat) és elvégezték a szakállomány betanítását [6-7].

Az Átvételi Osztály a szállítói szerződésekben foglaltaknak megfelelően munkája során az élelmiszertermékek gyártóinál, illetve beszállítóinál gyártásközi ellenőrzést

szennyeződésekre, különösen a fekáli szennyezés jelzését tekintve, indikátor szereppel bír és számuk meghatározása az élelmiszer-mikrobiológiai laboratóriumok egyik leggyakoribb feladata [1]. Az élelmiszerekre meghatározott mikrobiológiai kritériumok egy része is erre a családra vonatkozik.

Az Enterobacteriaceae családba tartozó *Escherichia* fajok többsége az emberi és állati bélcsatornában él. Az *Escherichia coli* az ember vastagbélének természetes lakója, fontos szimbiótának tekinthető, azonban bizonyos szerotípusok fertőző betegségeket okoznak.

A MicroSnap termékek egy biolumineszcencián (fénykibocsátással járó kémiai reakció) alapuló gyors eljárás összes baktériumszám kimutatására és megszámlálására alkalmasak. Ezek a tesztek kevesebb,

hajt végre és a szerződésben szereplő termékekből minőségi vizsgálatok céljára mintavételt végez. A kivett termékmintákat független akkreditált laboratóriumban bevizsgálhatja. A hosszabb laborvizsgálati eredmények kiadásának idejét lerövidíthetik a gyors mikrobiológiai tesztek alkalmazásával, ami gyanú esetén nem zárja ki a megerősítő hagyományos laborvizsgálati kiértékelést.

## A MEGLÉVŐ GYORSTESZTEK TÍPUSAI

### MICROSnap COLIFORM *ESCHERICHIA COLI* (RÖVIDEN: *E. COLI*) BAKTÉRIUMOK KIMUTATÁSÁRA

Az Enterobacteriaceae család képviselői széles körben elterjedtek, jelen vannak a talajban, a vízben, a növényekben és az állati, illetve az emberi bélcsatornában. Ezért jelenlétük az ilyen jellegű



2. ábra. *Escherichia coli* + Coliform dúsító, és mérőcső

1. táblázat. Élelmiszerek mikrobiológiai megfelelőségének vizsgálata ATP méréssel hús- és húskészítmények esetében

Fsz.	Termék megnevezése	Besorolás a 4/1998. EüM sz. rendelet alapján	Vizsgálat/határérték	ATP határérték RLU
1.	Előhűtött egész sertéskaraj (csont nélküli)	II./1.1.	Mikrobaszám ( $M = 10^7$ ) <i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^2$ )	< 100 < 35
2.	Előhűtött sertéslapocka (csonttal)	II./1.1.	Mikrobaszám ( $M = 10^7$ ) <i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^2$ )	< 100 < 35
3.	Sertésvirsli juhbélben	II./1.3.	<i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^3$ )	< 180
4.	Sertéspárizsi	II./1.3.	<i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^3$ )	< 180
5.	Nyári turista felvágott	II./1.3.	<i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^3$ )	< 180
6.	Olasz felvágott	II./1.3.	<i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^3$ )	< 180
7.	Lángolt kolbász	II./1.3.	<i>E. coli</i> ( $M = 5 \times 10^3$ )	< 180

mint 8 óra alatt képesek kimutatni kóliformokat és *Escherichia coli* baktériumokat. A teszt egy táptalajt tartalmazó dúsító mintavevő tamponból áll, amely a baktérium által termelt biomarkereket (mérhető biológiai jelzőanyag) egy hordozható luminométerrel képes mérni. Első lépésként a mintát inkubáljuk a táptalajban, hogy a baktériumok száma növekedjen. Ahogy nő a baktériumok száma, úgy egyre több enzim (béta-galaktozidáz és béta-glükoronidáz) termelődik, amelyek szükségesek a biolumineszcens vizsgálathoz. A dúsított mintaoldat egy részét áttesszük a mérőeszközbe, aktiváljuk, majd előírt ideig tovább inkubáljuk. Ez idő alatt a specifikus szubsztrát reakcióba lép az enzimekkel és fényt bocsát ki, ami a luminométerrel mérhető. Az eredmények relatív fényegység (RLU – Relative Light Unit) mértékegységben jelennek meg.

A tesztek használhatók felületek, termékminták, víz és más szűrhető folyadékok vizsgálatához.

### MICROSNAP TOTAL – ÖSSZESÍRÁSZÁM KIMUTATÁSÁRA

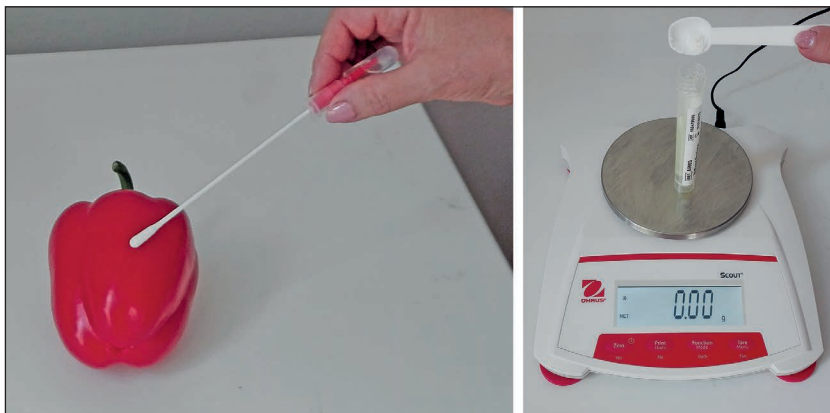
A MicroSnap EB (Enterobacteriaceae) egy biolumineszcencián alapuló gyors eljárás az összes baktériumszám kimutatására és megszámlálására; egy mintából 7 óra alatt ad eredményt. Hasonló elven működik, mint a MicroSnap Coliform és *Escherichia coli* baktériumok kimutatására használatos eszköz. A MicroSnap Total egy szabadalmaztatott táptalajt tartalmazó dúsító mintavevő tamponból (Enrichment Swab Device) és a bioluminogén reagenst tartalmazó mérőeszközből (Detection Device) áll, amely a baktérium által termelt biomarkereket hordozható luminométerrel képes mérni. A kétlépéses eljárás, a baktériumok növekedését megkönnyítendő egy rövid inkubációs szakasszal indul, majd a második lépést a megszámlálásuk jelenti. Az inkubálási idő alatt a táptalajban növekszik a baktériumok száma. Minél nagyobb a baktériumok száma a mintában, annál magasabb a biomarker koncentráció és annál magasabb a kibocsátott fény. A dúsított mintaoldat egy részét áttesszük a mérőeszközbe (Detection Device), aktiváljuk, összekeverjük és megmérjük a luminométerrel. A fénykibocsátás egyenesen arányos a jelen lévő baktériumok koncentrációjával. Az eredmény relatív fényegység (RLU) értékben jelenik meg.

A MicroSnap Total felületek, termékminták, víz és más szűrhető folyadékok vizsgálatához egyaránt felhasználható.

Felületi mintavétel javasolt:

- tökehúsok (sertéskaraj, lapocka);
- baromfi termékek (csirkemell, csirkecomb, csirke farhát);
- zöldség, gyümölcs (uborka, paradicsom, burgonya);

3. ábra. Felületi mintavétel (bal oldal), mérést igénylő mintavétel (jobb oldal)



- gyorsfagyasztott termékek (szilvás derelye, nudli, csirkezu) esetében.

Mérést igénylő termékminta vizsgálata javasolt:

- feldolgozott hústermék (virslis, párizsi, felvágott, kolbász);
- tejtermékek (túrórúd, tehéntúró, joghurt, kefir, krémtúró, sajt) baromfi és baromfitermék (baromfi kenőmájas, aszpikos pulykacomb, pulykasonka);
- gyorsfagyasztott termékek (gyorsfagyasztott zöldségek, keverékek);
- cukrászati termékek (sütemények, gesztenyepüré) esetében.

A mikrobiológiai gyorsesztek tárolása 2-8 °C között történik, minőségmegőrzési ideje 12 hónap. A MicroSnap eszközöket kidobás előtt fertőtleníteni szükséges autoklávbán, vagy áztatással 20%-os fertőtlenítő oldatban 1 órán keresztül. Csak ez után lehet a tesztek kidobni a kommunális hulladék közé.

### BERENDEZÉSEK/MÉRŐESZKÖZÖK

#### LUMINOMÉTER

Az ATP tesztek kiértékeléséhez használatos. A luminométeren beállíthatók a vizsgált terméktípusok, beprogramozhatók a hozzájuk tartozó küszöbértékek, illetve a felhasználó személy neve. A bekapcsolást követően a műszer 15 másodpercig önkalibrálást végez, akklimatizálódik a környezeti hőmérséklethez és páratartalomhoz.

Bizonyos termékek nagy mennyiségben gátlják a biolumineszcenciás reakciót. A láthatóan szennyezett felületekről vett minta gátlhatja a reakciót, ezért ezeket a felületeket célszerű elkerülni. Miután megtörtént a mintavéte-



4. ábra. Luminométer

lezés, a mintavevő tamponokat legfeljebb 4 órán át lehet tárolni az aktiválás előtt. Aktiválást követően 60 másodperc áll rendelkezésre az eredmény leolvasására. A vizsgálat eredménye 15 másodpercen belül megjelenik/leolvasható.

A luminométer memóriájában (2000 teszt elmentésére alkalmas) tárolt vizsgálati eredmények a SureTrend adat-elemző szoftver használatával számítógépre tölthetők. A szoftver a luminométerhez mellékelt CD-n található.





5. ábra. Mini inkubátor

#### MINI INKUBÁTOR

Az inkubátor a baktériumok növekedéséhez szükséges hőmérsékletet biztosítja a megfelelő ideig. 6-12 teszthez használható, digitális kijelzővel rendelkezik, kevesebb, mint 15 perc alatt felfűt a maximális hőmérsékletre, beépített időzítője van. Az inkubátorhoz adapter is tartozik gépkocsiban történő használathoz, amely – a gyors eredmények elérése érdekében – lehetővé teszi a menet közbeni inkubálást.

#### HORDOZHATÓ MÉRLEG

Az élelmiszer termékek beméréséhez használható. Mérés-tartománya 220 g, adatterről vagy elemekről működik.

#### ESCHERICHIA COLI + COLIFORM DÚSÍTÓ, ÉS MÉRŐCSÖVEK, ÖSSZCSÍRA-DÚSÍTÓ ÉS MÉRŐCSÖVEK, ADAPTER (INVERTER) GÉPKOCSIBAN TÖRTÉNŐ HASZNÁLATHOZ



6. ábra. Összcsíra-dúsító és mérőcső (bal oldalon), inverter autós használathoz (jobb oldalon)

#### ÖSSZEGRZÉS

Az élelmiszerekben lévő mikrobiológiai veszélyek az élelmiszer-eredetű megbetegedések egyik fő forrását jelentik. Hagyományos laboratóriumi körülmények között, mikroorganizmustól függően, azonosítással együtt általában 1-4 nap a standard módszer időigénye.



7. ábra. Hordozható mérleg

A meglehetősen hosszú vizsgálati idő miatt igény mutatkozott arra, hogy a szakemberek a mikrobák kimutatására szolgáló hagyományos élősejtszám-meghatározási módszereket gyorsabb vizsgálati eljárásokkal váltsák fel.

A mikrobiológiai gyors tesztek bevezetése a honvédelmi szervezeteknél gyorsabb minőség-ellenőrzésre ad lehetőséget az élelmiszerek esetében. Az új műszerekkel és eszközökkel (pl. az inkubátor autóban való működtetésével) az elvégzett vizsgálatokról még aznap eredmény közölhető. Ez lehetővé teszi, hogy a bevizsgált élelmiszerekről rövid időn belül kijelenthető legyen, hogy – a bevizsgált paramétereket tekintve – biztonsággal elfogyaszthatók.

A korszerű, a Magyar Honvédségben is használatos mérőeszközökkel a kimutatható patogén baktériumok köre bővíthető, illetve akár allergén anyagok jelenléte is vizsgálható.

#### IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Blood, Ruth M., and G.D.W. Curtis. "Chapter 10 Media for 'total' Enterobacteriaceae, Coliforms and Escherichia Coli." *Progress in Industrial Microbiology* (1995): 163–185. [https://doi.org/10.1016/s0079-6352\(05\)80012-8](https://doi.org/10.1016/s0079-6352(05)80012-8);
- [2] Deák Tibor, Kiskó Gabriella, Maráz Anna, Mohácsiné Farkas Csilla. *Élelmiszer-mikrobiológia*, Bp.: Mezőgazda Kiadó, 2006.;
- [3] Dr. Belák Ágnes, Dr. Kiskó Gabriella, Dr. Kovács Mónika, Dr. Maráz Anna, Mohácsiné dr. Farkas Csilla, Dr. Pomázi Andrea: *Gyors és molekuláris biológiai módszerek alkalmazása élelmiszerek mikrobiológiai vizsgálatára – Gyakorlati kézikönyv*, Nemzeti Tankönyvkiadó, 2011.;
- [4] Dr. Erdősi Orsolya: *Gyors mikrobiológiai módszerek fejlesztése és alkalmazása élelmiszer- és környezet-higiéniai vizsgálatokban*, PhD értekezés, 2014 Letöltve: 2019.07.17. [http://www.huvea.hu/bitstream/handle/10832/1130/PhD\\_Erdosi\\_Orsolya.pdf](http://www.huvea.hu/bitstream/handle/10832/1130/PhD_Erdosi_Orsolya.pdf);
- [5] Stannard C. J. „ATP Estimation.” in *Rapid Methods in Food Microbiology*, ed. Adams, M. R. and Hope, Elsevier, 1989.;
- [6] 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről;
- [7] 2073/2005 (11.15) EK rendelet az élelmiszerek mikrobiológiai kritériumairól.