

Élelmiszerekből MALDI-TOF-MS technikával izolált MRSA

MRSA Isolated from food products using MALDI-TOF-MS technique



**A magyar fogyasztók aflatoxin
M1-expozíciójának becslése**

**Laktáció és a tejminőség összefüggése
tejelő teheneknél**

**Serratia sp. kimutatása tejből
PCR-technikával**

**Almák és körték mechanikai kifáradási
mutatóinak mérése**

*Estimation of aflatoxin M1 exposition on Hun-
garian consumers • Relationship between lacta-
tion and quality of milk at dairy cows • Detection
of Serratia sp. from milk using PCR technique •
Investigation of mechanical fatigue index in
apples and pears*



TARTALOM – CONTENTS

Élelmiszerekből izolált staphylococcus fajok antibiotikum rezisztencia vizsgálata (HORVÁTH Brigitta, PELES Ferenc, GASPARIK Judit, POCKLÁN Edit, SIPOS Rita, ERŐS Ágnes, PETRÓCZKI Flóra Mária, SZŰCS Kata Dorina, ALBERT Ervin, MICSINAI Adrienn)	3361
<i>Investigation of the antibiotic resistance of staphylococcus species isolated from foods (Brigitta HORVÁTH, Ferenc PELES, Judit GASPARIK, Edit POCKLÁN, Rita SIPOS, Ágnes ERŐS, Flóra Mária PETRÓCZKI, Kata Dorina SZŰCS, Ervin ALBERT, Adrienn MICSINAI)</i>	3372
A magyar fogyasztók krónikus aflatoxin M1 expozíciója (KEREKES Kata, CSORBA Szilveszter, AMBRUS Árpád)	3383
<i>Chronic aflatoxin M1 exposure of Hungarian consumers (Kata KEREKES, Szilveszter CSORBA, Árpád AMBRUS)</i>	3402
A laktációs szám és a laktáció stádium hatása a tejmennyiségre, a nyers tehéntej összetételére és mikrobiológiai tulajdonságaira egy hazai tehenészeti telepen (PETRÓCZKI Flóra Mária, BÉRI Béla, PELES Ferenc)	3421
<i>The effect of lactation number and lactation stage on milk yield, on the composition and on the microbiological properties of raw cow milk in a Hungarian dairy farm (Flóra Mária PETRÓCZKI, Béla BÉRI, Ferenc PELES)</i>	3431
Serratia fajok jellemzése, valamint serratia marcescens kvalitatív kimutatása nyers és pasztörözött tejből polimeráz láncreakción alapuló vizsgálati módszerrel (KORCZ Evelin, VARGA László, KERÉNYI Zoltán)	3441
<i>Characterization of serratia species and qualitative detection of serratia marcescens in raw and pasteurized milk by an analytical method based on the polymerase chain reaction (Evelin KORCZ, László VARGA, Zoltán KERÉNYI)</i>	3453
Golden Delicious almák és Packham körték mechanikai kifáradási mutatóinak összehasonlítása (FARKAS Csaba, FENYVESI László, PETRÓCZKI Károly)	3465
<i>Comparison of the mechanical fatigue indices of Golden Delicious apples and Packham pears (Csaba FARKAS, László FENYVESI, Károly PETRÓCZKI)</i>	3479
Nemzeti szabványosítási hírek (SZALAY Anna)	3493
<i>Review of national standardization (Anna SZALAY)</i>	3495
Szerzőink	3497
<i>Authors</i>	3497
Támogató partnerek	3499
<i>Supporting partners</i>	3499

ISSN 0422-9576

OPEN



ACCESS

Tudományos folyóiratunk tartalma 2021-től szabadon hozzáférhető a www.eviko.hu honlapon.

The content of our scientific journal will be freely available on the website www.eviko.hu from 2021.



Kedves Olvasóink!

Az ÉVIK megújult honlapjának második kötetét, egyben a tudományos szakfolyóiratunk 67. évfolyama 2. számát tesszük közzé. Őszintén szólva bíztam benne, hogy mire az ÉVIK kiadási rendszerét teljesen digitalizálni tudjuk, talán megszabadulunk az emberiséget szorongató koronavírusról. Öröndetes, hogy hazánkban a lakosság több, mint 54%-a felvett valamilyen vakcinát. Talán a nyár beköszöntével feltűnik a COVID-alagút vége, Tóth Árpád szavaival élve „...és felpiheg sohajtva / A fájó ősanagy: immár a kínnak vége! / S reszketve megnyílik egy lótosz szűzi ajka, / S kileng a boldog légbé a hősín szárnyu Béke¹.”

A kórházhigiénés gyakorlatban évről-évre növekvő veszélyt jelent az intézetekben alkalmazott antibiotikumokkal szemben ellenálló *Staphylococcus* törzsek elszaporodása, gyakran életveszélyes fertőzéseket okozva a kórházakban ápoltságok között. Kötetünk vezető anyagában **Horváth Brigitta és kutatócsoportja** a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) élelmiszerekben való megjelenéséről és műszeres analitikai eszközökkel

való kimutatásáról értekeznek. Munkájuk során sikerült egy MALDI-TOF-MS technikán alapuló módszert kidolgozniuk, amely alkalmasnak bizonyult néhány MRSA-törzs élelmiszerekből való kimutatására.

Kerekes Kata és munkatársai kéziratában az élelmiszerláncban megjelenő aflatoxin M1 expozíciós jellemzőit vizsgálták valós mérési eredményeken alapuló determinisztikus modellek segítségével. Megállapították, hogy a tejipari termékek fogyasztása révén a magyar társadalomban az 1-3 éves gyermekek aflatoxin M1-kitétsége a legnagyobb. A téma aktualitását növeli, hogy egy konferencián elhangzottak szerint a COVID időszakában az élelmiszeripari termékek területén a kávéféleségek mellett a sajtféleségek és a tejföl fogyasztása nőtt meg a legnagyobb mértékben².

Petróczki Flóra és munkacsoportja a tehének laktációs ciklusai és a termelt tej kémiai és mikrobiológiai minősége közötti összefüggéseket kutatta. Cikkükben megállapították, hogy a tejhozam és a tej kémiai összetevői és a szomatikus sejszámok szignifikánsan változnak az állatok különböző laktációs ciklusában. A tej mikrobiológiai minőségének jellemzői a laktációk sorozatában nem mutattak szignifikáns különbségeket.

Korcz Evelin és munkatársai a nozokómiális fertőzések egyik patogén mikroorganizmusa, a *Serratia* fajok tejben való kimutatásának módszerét dolgozták ki. Kéziratukban hangsúlyozzák, hogy a *Serratia* fajok kimutatására nem álltak rendelkezésre jól alkalmazható, megbízható, hagyományos mikrobiológiai vizsgálati módszerek. Munkájuk során PCR-technikát használtak a tej rózsaszínes elváltozását okozó *Serratia* fajok kimutatására.

Farkas Csaba és kutatótársai egy, az élelmiszergazdaság és élelmiszer-biztonság határmezsgyéjét érintő kérdéssel foglalkoztak. Reológiai kísérleteik során azt vizsgálták, hogy egy alma- és egy körtefajta gyümölcssei miként viselik a szedés, szállítás, feldolgozás során fellépő fizikai torzító erőket. Az ismételt fizikai behatásnak kitétt gyümölcsök ugyanis a rájuk ható erő nagyságától, a kitétség frekvenciájától (pl. szállítás közbeni rázkódás) és annak időtartamától függően deformálódhatnak, sérülhetnek, s végül a természetes folyamatokhoz képest rövidebb időn belül romlásnak is indulhatnak.

Az ÉVIK Szerkesztősége továbbra is várja a szakfolyóirat szellemiségébe illeszkedő kéziratokat az Impreszumban feltüntetett e-mail címekre. Kérjük, hogy munkáik írásos anyagában tüntessék fel valamennyi szerző tudományos fokozatát, e-mail címét, telefonszámát és ORCID-azonosítóját is. Együttműködésüket előre is köszönjük. Olvasóinknak hasznos olvasást, és a közelgő nyárra kellemes kikapcsolódást kívánunk!

Dr. Szigeti Tamás János
főszerkesztő

¹ Tóth Árpád: *Elégia egy rekettyebokorhoz*

² Pádár Kata: *Vitaminok és étrend-kiegészítők: kereskedelmi trendek és a fogyasztók preferenciái. NielsenIQ. MÉKISZ Konferencia Zoom online 2021.05.20.*



Dear Readers,

We are publishing the second volume of the renewed website of ÉVIK, as well as the second issue of Volume 67 of our scientific journal. To tell you the truth, I hoped that by the time we can fully digitize the publishing system of ÉVIK, we could be rid of the coronavirus that is afflicting humanity. It is a fact to be rejoiced over that in Hungary, more than 54% of the population has already been vaccinated. Hopefully, with the arrival of summer, we will see the light at the end of the COVID tunnel. In the words of Árpád Tóth „... and gasping with a sigh / The aching ancient matter: at last, the long misery is over! / And the lotus' virgin lips trembling open / In the joyous air sways the wing of snow-white Peace with power¹.”

In hospital hygiene practice, there is a growing threat from year to year of the proliferation of *Staphylococcus* strains resistant to the antibiotics used in the institutions, often causing life-threatening infections among hospitalized patients. In the leading material of our volume, **Brigitta Horváth and her research group** discuss the appearance of methicillin-resistant

Staphylococcus aureus (MRSA) in foods and its detection by instrumental analytical tools. In the course of their work, they were able to develop a method based on the MALDI-TOF-MS technique, which proved to be suitable for the detection of some MRSA strains in foods.

In the manuscript of **Kata Kerekes et al.**, exposure characteristics of aflatoxin M1, appearing in the food chain, were investigated using deterministic models based on real measurement results. They found that, in Hungarian society, the aflatoxin M1 exposure of children aged 1 to 3 is the highest, through the consumption of dairy products. The relevance of the topic is enhanced by the fact that, according to a speech given at a conference, in the COVID period, in addition to coffee, the consumption of cheese and sour cream increased the most among food products².

Flóra Petróczki and her research group studied the correlations between the lactation cycles of cows and the chemical and microbiological quality of the milk produced. In their article, they found that milk yield, the chemical components of milk and the somatic cell counts vary significantly in the different lactation cycles of the animals. There have been no significant differences in the microbiological quality of milk during the series of lactations.

Evelin Korcz et al. developed a method for the detection of *Serratia* species, one of the pathogenic microorganisms responsible for nosocomial infections, in milk. Their manuscript emphasizes that there are no easy to use, reliable, traditional microbiological test methods for the detection of *Serratia* species. In the course of their work, the PCR technique was used to detect *Serratia* species that cause pink discoloration of milk samples.

Csaba Farkas and his colleagues focused on an issue concerning the area between food economy and food safety. In the course of their rheological experiments, they examined how the fruits of an apple and a pear variety withstand the physical distorting forces that occur during harvesting, transport and processing. Fruits that are subjected to repeated physical impact can be deformed, damaged and eventually spoiled in a shorter time than natural processes would cause them to, depending on the magnitude of the force acting on them, the frequency of the exposure (e.g., vibration during transport) and its duration.

The Editorial Board of ÉVIK continue to encourage potential authors to submit manuscripts that fit the spirit of the journal to the e-mail addresses indicated in the imprint. Please include the academic degree, e-mail address, phone number and ORCID ID of each author in your written material. Thank you in advance for your cooperation. We wish our Readers useful reading and pleasant relaxation for the upcoming summer:

Dr. Tamás János Szigeti
editor-in-chief

¹ Árpád Tóth: *Elegy to a gorse bush* (translated by T. Szigeti)

² Kata Pádár: *Vitamins and dietary supplements: commercial trends and the preferences of consumers.* NielsenIQ. MÉKISZ Conference Zoom online 20.05.2021.

HORVÁTH Brigitta^{a*}, PELES Ferenc^a, GASPARIKNÉ REICHARDT Judit^d,
POCKLÁN Edit^d, SIPOS Rita^b, ERŐS Ágnes^b, PETRÓCZKI Flóra Mária^a,
SZÚCS Kata Dorina^c, ALBERT Ervin^e, MICSINAI Adrienn^d

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2021/2-1-HUN>

Érkezett: 2021. február – Elfogadva: 2021. április

Élelmiszerekből izolált staphylococcus fajok antibiotikum rezisztencia vizsgálata

Kulcsszavak: élelmiszer, Staphylococcus, antibiotikum rezisztencia, MALDI-TOF-MS, baktérium identifikálás, élelmiszerbiztonság, humán patogén, nozokómiás fertőzés

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A meticillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek élelmiszerláncban előforduló jelenlétét számos tanulmány igazolta az Európai Unióban, azonban Magyarországon kevés adat áll rendelkezésünkre ezzel kapcsolatban. Jelen vizsgálat célja az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztenciájának vizsgálata klasszikus mikrobiológiai, molekuláris biológiai módszerekkel és MALDI-TOF-MS technikával, továbbá az antibiotikum rezisztens törzsek multilokus szekvencia tipizálása (MLST). A vizsgálat során 47 koaguláz-pozitív (CPS) és 30 koaguláz-negatív *Staphylococcus* (CNS) izolátumot gyűjtöttünk. A MALDI-TOF-MS vizsgálat során minden CPS izolátum (n=47) *S. aureus* fajnak bizonyult, míg a CNS törzsek esetében 8 különböző fajt azonosítottunk. Két *S. aureus* törzs esetében állapítottunk meg meticillin-rezisztenciát, amelyek közül az egyik izolátum eddig még nem ismert szekvencia típusba, míg a másik MRSA törzs az ST398 típusba tartozott, amely a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek leggyakoribb típusa az EU/EGT területén.

(Az „MRSA” rövidítést köznapi szóhasználatban, de esetenként a szakirodalomban is gyakran a „multirezisztens *Staphylococcus aureus*” megjelölésére használják. A szerzők kéziratában - helyesen a meticillin-rezisztens kórokozót jelölik így. A Szerk.)

^a Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet

^b BIOMI Kft.

^c Pázmány Péter Katolikus Egyetem

^d WESSLING Hungary Kft.

^e Állatorvostudományi Egyetem

* Levelező szerző: horvath.brigitta920108@gmail.com

HORVÁTH Brigitta

PELES Ferenc Dr.

GASPARIKNÉ REICHARDT Judit Dr.

POCKLÁN Edit

SIPOS Rita Dr.

ERŐS Ágnes

PETRÓCZKI Flóra Mária

SZÚCS Kata Dorina

ALBERT Ervin

MICSINAI Adrienn Dr.

horvath.brigitta920108@gmail.com

pelesf@agr.unideb.hu

reichardt.judit@wessling.hu

pocklan.edit@wessling.hu

sipos.rita@biomi.hu

eros.agnes@biomi.hu

petroczki.flora@agr.unideb.hu

szucs.katad@gmail.com

albert.ervin@univet.hu

micsinai.adrienn@wessling.hu

<https://orcid.org/0000-0002-7861-0824>

<https://orcid.org/0000-0002-9226-3777>

<https://orcid.org/0000-0003-3000-6158>

<https://orcid.org/0000-0001-8942-0674>

<https://orcid.org/0000-0002-1770-769X>

<https://orcid.org/0000-0001-7258-615X>

<https://orcid.org/0000-0001-9878-4656>

<https://orcid.org/0000-0002-8728-3714>

<https://orcid.org/0000-0002-2244-7538>

<https://orcid.org/0000-0001-5745-4589>

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Az antibiotikum rezisztens mikroorganizmusok által okozott nozokómiai fertőzések – a szerk.) száma minden országban növekedést mutat, ezáltal egyre nagyobb kihívás elé állítva az egészségügyi ellátórendszert [1, 2]. A helyzetet tovább súlyosbítja az a tény, hogy az antibiotikum rezisztens *Staphylococcus* fajok már nem csak a közösségekben és az egészségügyben, hanem az intenzív állattartásban, ezáltal az élelmiszerláncban is megjelentek [3].

A *Staphylococcus* fajokban az antibiotikum rezisztenciával és virulenciával kapcsolatos gének a mobilis genetikai elemekben (MGE) találhatóak, mint például a kromoszóma kazettákban, patogénitási szigeteken, plazmidokban vagy transzpozonokban [4]. A methicillinnel szembeni rezisztenciáért a *mecA* gén felelős: a gén egy módosított penicillin-kötő fehérjét kódol, amely csökkenti a legtöbb béta-laktám antibiotikum, így a penicillin és a methicillin kötődési affinitását. A *mecA* gén a *Staphylococcus* kromoszóma kazettán (SSC*mec*) található, amely egy MGE csoport és csak a *Staphylococcus* fajokban található meg [5]. A *mecA* gén *Staphylococcus* fajok közötti átvitelének mechanizmusa nem ismert, azonban bizonyítékok támasztják alá a horizontális géntranszferet a koaguláz-pozitív és koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok között [6].

A methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek élelmiszerláncban előforduló jelenlétéről már több tanulmány beszámolt. Szerzőik egy része állati eredetű élelmiszermintákból, másik része pedig nyers húsmintákból (sertés, hal, baromfi) izolált törzsek vizsgálatát végezte el. Hollandiában 2009-ben 2217 különböző élelmiszermintát vizsgáltak meg, amelynek a 12%-a MRSA törzsnek bizonyult [7], míg egy dániai vizsgálat során 153 sertéshúsmintának a 4,6%-a, az importált 173 sertéshúsmintának pedig a 7,5%-a volt fertőzött MRSA törzssel [8]. Németországban nyers tejből, sertéshúsból, pulykahúsból és brojler csirkehúsból is azonosítottak MRSA törzseket [9]. Magyarországon egy tehenészeti telep 595 egyedi tejmintájából 27 db MRSA izolátumot azonosítottak [10], egy másik vizsgálatban 42 telep 626 *S. aureus* izolátuma közül csak 4 törzs bizonyult methicillin rezisztensnek [11]. Ezeket túl azonban más élelmiszerkategóriákból származó és fogyasztásra kész élelmiszerekből eddig nem vizsgálták az MRSA jelenlétét. A törzsek molekuláris tipizálási eredményei rámutattak arra, hogy az MRSA számos típusa jelen van az élelmiszerláncban a különböző országokban [12], azonban a leggyakrabban a CC398-as típus fordult elő, amely az EU és az EGT területén a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek 85%-át teszi ki [13, 14, 7,15].

A további methicillin-rezisztens *Staphylococcus* (MRS) fajok előfordulását az élelmiszerekben azonban már kevesebb tanulmány vizsgálta. Nigériában 255 tradicionális ételből származó izolátumból 13 *Staphylococcus* faj (*S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*) mutatott methicillin-rezisztenciát [16]. Egy Lengyelországban végzett tanulmány során 58 készételből izolált törzsből 33 *Staphylococcus* törzs (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*) mutatott rezisztenciát legalább egy fajta antibiotikummal szemben [17].

Az Európai Unióban az élelmiszerekből és haszonállatokból izolált *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztenciájának ellenőrzése jelenleg önkéntes, ezért 2016-ban csak Németország, Svájc, Dánia és Spanyolország jelentett ezzel kapcsolatos információt. Az MRSA előfordulási gyakorisága országonként eltérő volt, ám az összehasonlítás során figyelembe kell venni, hogy a vizsgálatokat eltérő állatfajokból, húsból és húskészítményekből izolált törzseken végezték el [18]. A humán fertőzések kis hányada vezethető vissza a CC398-as típusú MRSA törzsekre és azok is legfőképp szakmai expozíciókra korlátozódnak, mint az állatgyógyászat és az intenzív állattartás. Ennek ellenére a CC398-as típusú MRSA törzsekben kimutatható virulencia faktorok lehetővé teszik a magas patogenitást, így a folyamatos revízió mind az állatokban, mind az élelmiszerekben elengedhetetlen [19]. A felügyelet szükségességét az egyéb *Staphylococcus* fajok antibiotikum rezisztenciájának esetleges fennállása is indokolja, amely lehetőséget nyújt a rezisztencia terjedésére, és veszélyt jelent a fogyasztók egészségére.

A sikeres felügyeleti rendszer elengedhetetlen feltétele, hogy egy egységes, gazdasági szempontból is elfogadható, gyors és megbízható módszer álljon rendelkezésre a mikroorganizmusok faji szintű azonosításában és antibiotikum rezisztencia meghatározásában, amelynek ígéretes alappillére lehet a fehérje azonosításon alapuló (peptide mass fingerprint) mátrix-asszisztált lézer deszorpciós, ionizációs, repülési idő mérésén alapuló tömegspektrometria (MALDI-TOF-MS). A 2000-es évek kezdetén számos tanulmány számolt be olyan specifikus fragment ionokról, amelyek lehetővé teszik az antibiotikum rezisztens *Staphylococcus* törzsek gyors azonosítását. A legtöbbet vizsgált biomarker a 2414 m/z értékű fragment ion volt, amelynek megjelenése a tömegspektrumban az MRSA törzsekre jellemző *psm-mec* expressziójával korrelál [20]. A detektáláshoz és diszkriminációhoz a 2414 m/z értékű fragment ion alkalmazhatóságát több tanulmány is igazolta [21, 22].

Az MRSA törzsek biomarkereinek vizsgálatán kívül más tanulmányok további *Staphylococcus* fajok methicillin-rezisztencia specifikus fragment ion csúcsait elemezték. Egy korábbi cikkben két specifikus fragment ion-értéket határoztak meg: a 7239 m/z értékű ion fragment-csúcsot, amely a methicillin-rezisztens *S. epidermidis* és a 9674 m/z fragment-ion csúcsot, amely a methicillin-rezisztens *S. haemolyticus* biomarkere [23].

Saját kísérleteink célja az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsek methicillin rezisztenciájának vizsgálata klasszikus mikrobiológiai, molekuláris biológiai módszerekkel és MALDI-TOF-MS technikával, továbbá az antibiotikum rezisztens törzsek multilokus szekvencia tipizálása volt (MLST) a törzsek epidemiológiai vizsgálata céljából.

3. Vizsgálati anyag és módszer

3.1. Gyűjtött izolátumok és tenyésztési körülmények

A WESSLING Hungary Kft. Mikrobiológiai laboratóriumában a 2019. augusztus és 2020. szeptember közötti időszakban az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabvány előírásai alapján izolált 77 *Staphylococcus* izolátumot vizsgáltunk. Az izolátumokat 37 °C-on, 24±1 órán keresztül Baird-Parker (Biokar, Franciaország) szelektív táptalajon tenyésztettük és a *Staphylococcus*okra jellemző kolóniákat Columbia véres agarra (Neogen, UK) oltottuk át (37 °C, 24±1 óra). A tenyésztés során 47 törzs mutatott pozitív koaguláz reakciót, míg 30 izolátum koaguláz-negatívnak bizonyult, amelyet latex agglutinációs gyorstesztel (PASTOREX™ STAPH-PLUS) is igazoltunk. Az izolátumokat nyers húsból, húskészítményekből és fogyasztásra készételekből gyűjtöttük: baromfi (n=14), marha (n=5), sertés (n=42), vad (n=1), hal (n=1), tejtermék (n=3), készételek (n=3), zöldségek (n=2) és szárzészta (n=6).

3.2. Izolátumok azonosítása MALDI-TOF-MS technikával

A gyűjtött 77 izolátum azonosítását Bruker Microflex LT MALDI-TOF tömegspektrométerrel és a MALDI BioTyper 3.1 (Bruker Daltonics) szoftverrel végeztük el. Hangyasavas szuszpendálási protokollt alkalmaztunk, amely során Columbia véres agarról egy önálló telepet vettünk fel egy steril kacs segítségével, majd 40 µl hangyasavban szuszpendáltunk el. A szuszpenzióhoz 40 µl acetonitrilt adtunk, amelyből a lemez egyik pozíciójára 1 µl-t cseppentettünk fel. A csepp beszáradását követően a mintákra 1 µl α-HCCA (10 mg/ml α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) mátrix oldatot vittünk fel és a mintát ismét hagytuk beszáradni. Valamennyi minta esetében 6 párhuzamos mérést végeztünk.

Az izolátumok azonosítása során MALDI Biotyper 3.1 szoftvert alkalmaztunk, amely a kapott tömegspektrumokat az adatbázisában szereplő referencia tömegspektrumokhoz hasonlítja és egy megfelelési faktort (score) számít ki. 2,300 – 3,000 log score érték esetén az azonosság igen valószínű. Ekkora log score érték esetén a faj azonosítottnak tekinthető. Amennyiben 2,000 – 2,299 közötti log score értéket kapunk, az azonosság kisebb, így ez esetben csak a mikroorganizmus nemzetsége tekinthető azonosítottnak. 1,700 – 1,999 log score érték között a nemzetség (genus) azonosítása sem tekinthető megfelelően biztosnak. Ha az értékelő szoftver 0,000 – 1,699 közötti log score értéket ad meg, az azonosítást sikertelennek kell tekinteni. A vizsgálatba bevont koaguláz-pozitív *Staphylococcus* törzsek azonosítását korábban végeztük el [24].

3.3. Antibiotikum érzékenységi vizsgálat

3.3.1. Methicillin-rezisztencia specifikus csúcsok vizsgálata MALDI-TOF-MS módszerrel

A kapott tömegspektrumokat a flexAnalysis 3.4 szoftverbe (Bruker Daltonics) exportáltuk és elvégeztük a tömegspektrumok manuális elemzését és összehasonlítását. A tömegspektrumok simítását a Savitzky–Golay szűrővel, az alapvonal korrekcióját pedig a TopHat algoritmussal végeztük el. Az elemzés során a methicillin-rezisztencia (MR) specifikus fragment ionok jelenlétét vizsgáltuk (1. táblázat).

1. táblázat. A vizsgálatban tesztelt methicillin-rezisztencia (MR) specifikus csúcsok

Faj	MR specifikus fragment ion	Irodalmi hivatkozás
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[20]
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[22]
<i>S. aureus</i>	2414 m/z	[21]
<i>S. epidermidis</i>	7239 m/z	[23]
<i>S. haemolyticus</i>	9674 m/z	[23]

3.3.2. Korongdiffúziós módszer

A törzsek antibiotikum-rezisztenciájának vizsgálata során a CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) által meghatározott előírásoknak (2019) megfelelően jártunk el [25]. A 0,5 McFarland egységnyi baktérium-szuszpenziót Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK) felületére szélesztettük, majd a táptalaj felületére helyeztük a Cefoxitin 30 µg korongokat. A törzseket 37 °C-on, 18 órán át inkubáltuk. Az MRSA törzsek esetében a feltisztulási zóna referencia tartománya 6-19 mm volt, míg *mecA* negatív fajoknál 20-32 mm.

3.3.3. Szelektív differenciáló agar

Az antibiotikum rezisztencia vizsgálatok során továbbá a CHROMagar MRSAII szelektív differenciáló táptalajt (BD, UK) alkalmaztunk, amely a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* fajok kimutatására szolgál. Az izolátumokat 37 °C-on 24-48 órán keresztül inkubáltuk aerob körülmények között. MRSA baktériumnak tekintettük azokat a törzseket, amelyek morfológiailag *Staphylococcus*okhoz hasonló mályvaszínű telepeket képeztek. A korongdiffúziós (Cefoxitin 30 µg) módszert és az MRSA CHROMagar vizsgálatot minden élelmiszerből izolált törzs (n=77) esetében kétszer ismételtük meg. A vizsgálatok során pozitív kontrollként az ATCC 33591 referencia MRSA törzset, negatív kontrollként pedig az ATCC 29213 MSSA törzset használtuk.

3.3.4. *mecA* génkomplex

A *mecA* gén kimutatásának vizsgálatát a Dán Nemzeti Élelmiszertudományi Intézet (National Food Institute – NFI) 2012-ben kiadott protokollja alapján végeztük el [26]. A vizsgálat során pozitív kontrollként az ATCC 43300 MRSA törzset, míg negatív kontrollként az ATCC 29213 MSSA törzset használtuk. A baktériumokból genomi DNS-t izoláltunk, majd a *mecA* génszakaszt PCR segítségével felszaporítottuk. Az alkalmazott primereket a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. A *mecA* gén felszaporításához alkalmazott primerek

Primer név	Primer szekvencia
<i>mecA</i> _fwd	5'- GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'
<i>mecA</i> _rev	5'- AACGATTGTGACACGATAGCC-3'

3.4. A methicillin-rezisztens *Staphylococcus* törzsek MLST vizsgálata

THOMAS és munkatársai [27] tanulmánya alapján a baktériumokból genomi DNS-t izoláltunk, majd a 7 db *Staphylococcus aureus* fajra specifikus génszakaszt PCR segítségével felszaporítottuk (**3. táblázat**). Meghatároztuk a megtisztított PCR termékek nukleotid sorrendjét majd a szekvencia adatokat *BioNumerics* 7.6 szoftverben értékeltük.

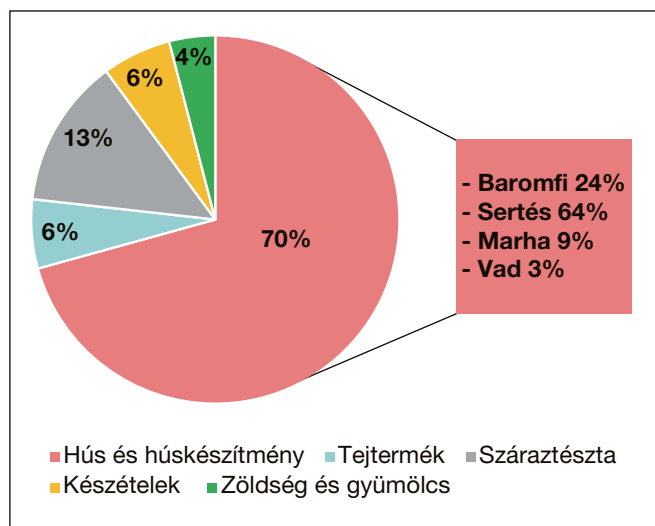
3. táblázat. MLST módszer során alkalmazott gének és a felszaporításukhoz használt primerek adatai

Gén	Primer	Primer DNS szekvenciája (5'-3')
Karbamát kináz (<i>arcC</i>)	<i>arc</i> up_1	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC
	<i>arc</i> dn_2	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG
Sikiminsav dehidrogenáz (<i>aroE</i>)	<i>aro</i> up_3	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC
	<i>aro</i> dn_4	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC
Glicerol kináz (<i>glpF</i>)	<i>glp</i> up_5	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C
	<i>glp</i> dn_6	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC
Guanilát kináz (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> up_7	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC
	<i>gmk</i> dn_8	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA
Foszfát acetiltranszferáz (<i>pta</i>)	<i>pta</i> up_9	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG
	<i>pta</i> dn_10	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA
Triózfoszfát izomeráz (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> up_11	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA
	<i>tpi</i> dn_12	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC
Acetil-koenzim-A acetiltranszferáz (<i>yqiL</i>)	<i>yqi</i> up_13	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC
	<i>yqi</i> dn_14	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC

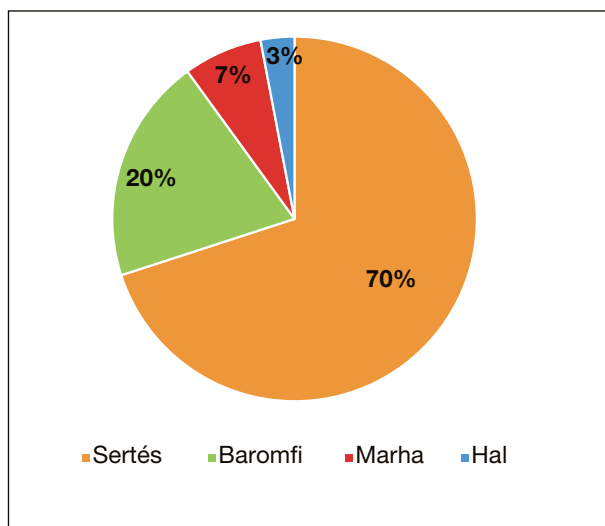
4. Eredmények

4.1. Az izolált törzsek azonosítási eredményei

A MALDI-TOF-MS vizsgálat során minden koaguláz-pozitív *Staphylococcus* (CPS) törzs (n=47) *S. aureus* fajnak bizonyult (**4. és 6. táblázat**). A koaguláz-negatív *Staphylococcus* (CNS) törzsek esetében pedig 8 különböző fajt (*S. xylosus*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. piscifermentans*, *S. haemolyticus*) azonosítottunk (**4. és 7. táblázat**). A CNS (n=30) izolátumok 30%-a *S. warneri* fajnak, míg 23%-a *S. pasteurii* fajnak bizonyult. A *S. aureus* törzsek 70%-át, míg a CNS törzsek mindegyikét hús és húskészítményekből izoláltuk (**1. és 2. ábra**). A *S. aureus* törzsek esetében a hús és húskészítmények 64%-a, míg a CNS törzsek 70%-a sertésből származott. A hús és húskészítményeken belül, a baromfiból és marhából származó izolátumok megoszlása közel azonos volt.



1. ábra. A *S. aureus* törzsek megoszlása élelmiszercsoportonként



2. ábra. A CNS törzsek megoszlása élelmiszercsoportonként

Az izolátumok átlag azonosítási log score értékeit és azok szórását a **4. táblázat** foglalja össze. A *S. aureus* izolátumok átlag azonosítási log score értéke meghaladta a 2,400-et. A legalacsonyabb log score érték 2,304 volt, azonban még ebben az esetben is biztonságosnak tekinthető az azonosítás. A CNS izolátumok vizsgálata során, minden fajt 2,300 log score érték felett azonosítottunk és a szórás egyik esetben sem haladta meg a 0,1 értéket.

4. táblázat. Azonosított koaguláz-pozitív és -negatív *Staphylococcus* fajok azonosítási log score értékei

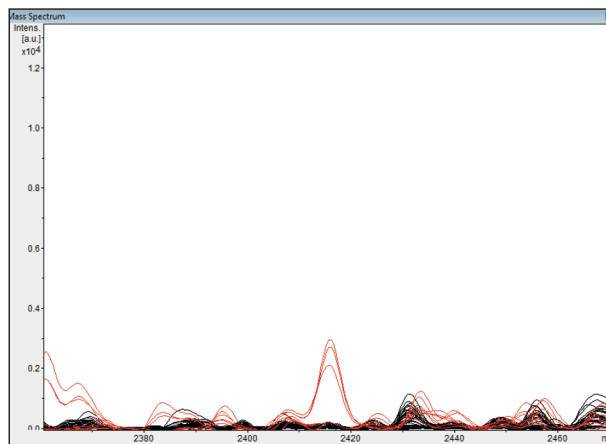
Faj	Azonosítási log score érték átlaga	Legalacsonyabb log score érték	Legmagasabb log score érték	Log score értékek szórása
<i>S. aureus</i> (n=47)	2,415	2,304	2,571	0,072
<i>S. xylosus</i> (n=1)	2,412	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	2,406	2,395	2,415	0,010
<i>S. pasteurii</i> (n=7)	2,387	2,325	2,462	0,050
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	2,348	2,304	2,396	0,038
<i>S. warneri</i> (n=9)	2,365	2,324	2,406	0,028
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	2,372	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	2,353	2,307	2,413	0,054
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	2,318	-	-	-

4.2. A MALDI-TOF-MS technikával meghatározott methicillin-rezisztencia eredményei

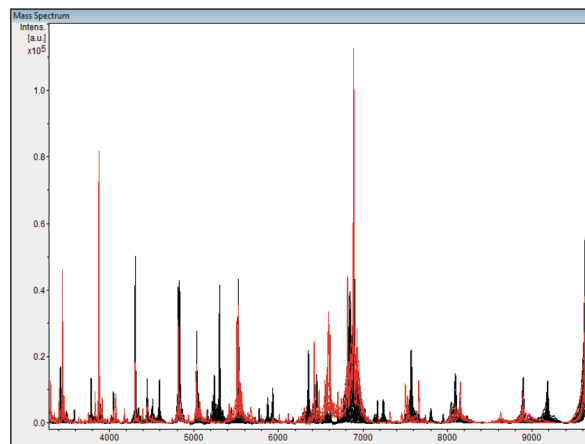
Az izolátumokból nyert tömegspektrumok elemzése során 3 antibiotikum-rezisztencia specifikus csúcsot vizsgáltunk meg. A 2414 m/z csúcs a *mecA* gén egyik fehérjeterméke [28], ezért ennek a csúcsnak a jelenlétét illetve hiányát minden törzs esetében megvizsgáltuk. A 7239 m/z csúcs detektálhatóságát csak a *S. epidermidis* fajokban, míg a 9674 m/z csúcs jelenlétét/hiányát csak a *S. haemolyticus* fajokban vizsgáltuk a csúcsok fajspecifitása miatt.

A 2414 m/z csúcsot a 77 izolátum közül, két *S. aureus* törzsben detektáltuk, amelyek közül az egyik libamájból (SA-17) a másik sertés tarjából (SA-47) származik. A további 75 izolátum esetében ez a csúcs még alacsony intenzitással sem jelent meg (5. táblázat). Az elemzés során a methicillin-rezisztensnek bizonyult két *S. aureus* törzset pirossal, míg a többi, methicillin-rezisztencia specifikus csúcsot nem tartalmazó *S. aureus* törzsek tömegspektrumait feketével jelöltük (3. és 4. ábra).

A 7239 m/z egyik *S. epidermidis* törzsben (n=4) sem volt detektálható és a 9674 m/z csúcs a 4 *S. haemolyticus* faj egyikében sem jelent meg.



3. ábra. A 2414 m/z átmenet tömegspektruma



4. ábra. A 47 Staphylococcus törzs tömegspektruma

5. táblázat. Specifikus ion fragment-értékek előfordulási gyakorisága az élelmiszerekből izolált *Staphylococcus* törzsekben

Faj	Specifikus ion fragment-értékek előfordulási gyakorisága		
	2414 m/z	7239 m/z	9674 m/z
<i>S. aureus</i> (n=47)	4,3%	-	-
<i>S. xylosus</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	-	-	-
<i>S. pasteurii</i> (n=7)	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. warneri</i> (n=9)	-	-	-
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	-	-	-

4.3. A korongdiffúziós módszer és az MRSA CHROMagar szelektív differenciáló agar eredményei

A 77 törzs vizsgálata során 75 törzs esetében a feltisztulási zóna átmérője 23-29 mm közé esett. Egy libamájból izolált törzs (SA-17) feltisztulási zónája 9 mm, egy sertés tarjából izolált törzs (SA-47) feltisztulási zónája pedig 17 mm átmérőjű volt és ugyanezen törzsek mályvaszínű telepeket képeztek az MRSA CHROMagar szelektív differenciáló táptalajon is (6. és 7. táblázat).

6. táblázat. Az élelmiszerekből azonosított *S. aureus* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	log score érték	Azonosítás eredménye	Feltisztulási zóna (mm)	MRSA Chromagar	<i>mecA</i> gén
Tejtermék	SA-1	Trappista sajt	2,458	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-10	Trappista sajt	2,440	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-18	Tejes desszert	2,513	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Szárzészta	SA-2	Szárzészta	2,476	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-49	Szárzészta	2,308	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-7	Szárzészta	2,304	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-21	Szárzészta	2,486	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-22	Szárzészta	2,448	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-11	Szárzészta	2,429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Hús	SA-12	Csirkecomb	2,465	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-13	Csirkecomb	2,345	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-16	Pácolt csirke	2,332	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-44	Egész kacs	2,401	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-17	Libamáj	2,447	<i>S. aureus</i>	9	+	+
	SA-20	Kacsatál	2,432	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-28	Kacs comb	2,353	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-29	Kacs tepertő	2,571	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-4	Császár szalonna	2,319	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-31	Bacon	2,546	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-5	Kolbász	2,477	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-6	Karaj	2,366	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-32	Karaj	2,466	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-25	Kolbász	2,429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-33	Karaj	2,329	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-24	Lapocka	2,343	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-34	Karaj	2,350	<i>S. aureus</i>	29	-	-
	SA-9	Lapocka	2,425	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-35	Lapocka	2,500	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-36	Lapocka	2,387	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-37	Lapocka	2,429	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-15	Tepertő	2,342	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-38	Sütnivaló kolbász	2,474	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-02	Lapocka	2,383	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-01	Kolbász	2,395	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-39	Csülök	2,562	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-40	Csülök	2,516	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-41	Fej	2,403	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-47	Tarja	2,354	<i>S. aureus</i>	17	+	+
	SA-3	Marhahús	2,333	<i>S. aureus</i>	29	-	-
	SA-8	Marhahús	2,484	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-48	Belsőség	2,362	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-42	Nyúlhús	2,371	<i>S. aureus</i>	24	-	-

Készételek	SA-43	Hamburger hús	2,382	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-50	Grill csirke	2,305	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-45	Csokoládé	2,339	<i>S. aureus</i>	23	-	-
Zöldségek	SA-46	Friss saláta mix	2,525	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-27	Sárgarépa pástétom	2,421	<i>S. aureus</i>	25	-	-

7. táblázat. Az élelmiszerekből azonosított koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzsek antibiotikum rezisztencia vizsgálatok eredményei

Élelmiszer kategória	Azonosító	Élelmiszer megnevezése	log score érték	Azonosítás eredménye	Feltisztulási zóna (mm) (cefoxitin)	MRSA Chromagar
Baromfi	061SH	Tojás	2,384	<i>S. haemolyticus</i>	24	-
	062SH	Tojás	2,307	<i>S. haemolyticus</i>	26	-
	178SE	Csirkemell	2,340	<i>S. epidermidis</i>	26	-
	392SP	Kacsa tepertő	2,318	<i>S. piscifermentans</i>	26	-
	473SE	Tojáskrém	2,353	<i>S. epidermidis</i>	25	-
	529SW	Pástétom	2,324	<i>S. warneri</i>	26	-
Sertés	573SX	Tepertőkrém	2,412	<i>S. xyloso</i>	24	-
	377SS	Sertésstarja	2,395	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	378SS	Sertésstarja	2,408	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	051SP	Sertéslapocka	2,354	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	527SE	Darált hús	2,304	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	052SP	Sertéslapocka	2,462	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	528SE	Darált hús	2,396	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	530SW	Darált hús	2,364	<i>S. warneri</i>	24	-
	426SW	Sertéslapocka	2,348	<i>S. warneri</i>	24	-
	868SS	Sertésstarja	2,415	<i>S. saprophyticus</i>	28	-
	911SW	Darált hús	2,371	<i>S. warneri</i>	24	-
	393SW	Sertéslapocka	2,403	<i>S. warneri</i>	24	-
	427SW	Sertésstarja	2,362	<i>S. warneri</i>	23	-
	976SP	Sertéslapocka	2,325	<i>S. pasteurii</i>	24	-
	050SP	Sertéslapocka	2,397	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	051SP	Sertésstarja	2,392	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	052SW	Sertésstarja	2,334	<i>S. warneri</i>	26	-
	472SP	Darált hús	2,341	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	065SW	Sertéskaraj	2,375	<i>S. warneri</i>	23	-
	510SH	Tepertőkrém	2,413	<i>S. haemolyticus</i>	26	-
512SH	Sertésstarja	2,309	<i>S. haemolyticus</i>	24	-	
Marha	435SW	Marhahúspogácsa	2,406	<i>S. warneri</i>	24	-
	434SC	Marha nyak	2,372	<i>S. chromogenes</i>	28	-
Hal	979SP	pontyszelet	2,436	<i>S. pasteurii</i>	24	-

4.4. *mecA* gén kimutatás eredményei

A MALDI-TOF-MS vizsgálatok, a korongdiffúziós módszer és az MRSA szelektív, differenciáló táptalaj eredményei alapján kiderült, hogy a libamájából és sertés tarjából izolált *S. aureus* törzsek (SA-17, SA-47) methicillin-rezisztenciát hordoznak, amelyet a két törzsben kimutatható, a PBP2a szintéziséért felelős *mecA* gén erősített meg (6. táblázat).

4.5. Az MRSA törzsek MLST típusa

A vizsgálat során elvégeztük a két MRSA törzs MLST tipizálását is, amely során a PubMLST honlapon (<https://pubmlst.org/saureus/>) elérhető adatbázisban szereplő adatokat használtuk. A BioNumerics 7.6 szoftver a

két MRSA törzs közül csak a sertés tarjából izolált törzs esetében tudta hozzárendelni a szekvencia típust. A libamájából izolált törzs egy eddig még nem ismert szekvencia típusba, míg a sertés tarjából izolált törzs a 398-as szekvencia típusba tartozott (**8. táblázat**).

8. táblázat. Az élelmiszerekből izolált MRSA törzsek MLST típusa

Élelmiszer megnevezése	Azonosító	Faj	„Repeat succession” kód	MLST típus
Sertésstarja	SA-47	<i>S. aureus</i>	08-16-02-25-34-24-25	ST398
Libamáj	SA-17	<i>S. aureus</i>	09-02-16-34-17-34-16-34	Ismeretlen

5. Összefoglalás és következtetés

A vizsgálat során különböző élelmiszer mátrixokból 77 *Staphylococcus* izolátumot gyűjtöttünk az MSZ EN ISO 6888-1:2008 szabványban leírt módszerek alapján. A szabvány ugyan lehetővé teszi a koaguláz-pozitív és koaguláz-negatív *Staphylococcus* fajok elkülönítését, azonban a faji identifikálást nem, amely a fajok eltérő virulencia faktorai és patogenitása szempontjából számottevő. Az élelmiszerekből izolált 47 koaguláz-pozitív és 30 koaguláz-negatív *Staphylococcus* törzs azonosítását MALDI-TOF-MS technikával végeztük el, magas azonosítási log score értékekkel. Emellett a kapott tömegspektrumok elemzésével, korábbi tanulmányokban meghatározott methicillin-rezisztencia specifikus ion fragment-értékek alapján két *S. aureus* törzs esetében methicillin-rezisztenciát állapítottunk meg, amelyet korongdiffúziós módszerrel, szelektív differenciálós agarral és a *mecA* gén kimutatásával igazoltunk. A specifikus ion fragment értékeknek köszönhetően jelentősen csökkenthető a diagnosztikai idő, amely gazdasági és terápiás szempontból sem elhanyagolható. Azt azonban figyelembe kell vennünk, hogy az MRSA törzsek nagy variabilitásának köszönhetően ezeknek az ion fragment értékeknek a szenzitivitása és specifitása nem 100%-os, így megerősítő vizsgálatok elvégzése szükséges.

Az élelmiszerekből izolált két MRSA törzsnek elvégeztük a multilókusz szekvencia tipizálását (MLST), a törzsek epidemiológiai vizsgálata céljából. A sertésarjból származó izolátum az ST398 típusba tartozott, amely a mezőgazdasági haszonállatokból izolált MRSA törzsek leggyakoribb típusa az EU/EGT területén. Figyelembe véve azonban az ST398-as típusú törzsek specifikus gazdaszervezet adaptációs képességeit, miszerint azok nem csak sertésekben, hanem más állatfajokban és a humán szervezetben is képesek megtapadni, a kontamináció és a fertőződés számos módon létrejöhet az élelmiszer-feldolgozás technológiai lépései során is.

Tekintve, hogy az élelmiszerekből izolált 47 *S. aureus* törzs közül 2 törzs is methicillin-rezisztensnek bizonyult, e tény igazolja a globálisan növekvő antibiotikum-rezisztencia okozta veszélyeket, ezáltal a helyzet súlyosságát és aktualitását is jelzi.

6. Köszönetnyilvánítás

A tanulmány a WESSLING Hungary Kft., a BIOMI Kft. és az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-19-3-III kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának szakmai támogatásával készült.

7. Irodalom

- [1] Böröcz, K. (2001): A magyarországi nosocomialis MRSA járványok tapasztalatai (1993-2000). Epidemiológiai Információs Hetilap. 8. (10-11).
- [2] Böröcz, K. (2005): Az Országos tisztifőorvos állásfoglalása a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek által okozott, egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések megelőzésükről és terjedésük megakadályozásáról. Epidemiológiai Információs Hetilap. 12. (5).
- [3] Jungwhan, C., Kidon, S., Saeed, K. (2017): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Food-Producing and Companion Animals and Food Products. *Frontiers in Staphylococcus aureus*. Intechopen.
- [4] Lim, D., Strynadka, N. C. J. (2002): Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*. 9 (11), pp. 870-876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
- [5] Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K. (1999): Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43 (6), pp. 1449-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1449>

- [6] Wielders, C. L., Vriens, M. R., Brisse, S., De Graaf-Miltenburg, L. A., Troelstra, A., Fleer, A., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A. C. (2001): In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet*. 26; 357 (9269), pp. 1674-1675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04832-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04832-7)
- [7] Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L. H., Witte, W., Deurenberg, R. H., Voss, A., Becker, K., Friedrich, A. W. (2009): Prevalence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Among Pigs on German Farms and Import of Livestock-Related MRSA Into Hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 28 (11), pp. 1375-1382. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0795-4>
- [8] Agersø, Y., Hasman, H., Cavaco, L. M., Pedersen, K., Aarestrup, F. M. (2012): Study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*. 157 (1-2), pp. 246-250. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.023>
- [9] Argudín, M. A., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A. (2011): Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (9), pp. 3052-3060 <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-10>
- [10] Juhász-Kaszanyitzky, E., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A., Van Der, A., Graaf-Van Bloois, L. (2007): MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (4), pp. 630-632. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>
- [11] Albert, E., Sipos, R., Jánosi, Sz., Kovács, P., Kenéz, Á., Micsinai, A., Noszály, Zs., Biksi, I. (2020): Occurrence and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*. 68 (3) pp. 236-241. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00040>
- [12] Wendlandt, S., Schwarz, S., Silley, P. (2013): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? *Annual Review of Food Science and Technology*. 4, pp. 117-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182653>
- [13] Bosch, T., Verkade, E., Van Luit, M., Landman, F., Kluytmans, J., Schouls, L. M. (2015): Transmission and persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians and their household members. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (1), pp. 124-129. <https://doi.org/10.1128/AEM.02803-14>
- [14] Fluit, A.C. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (8), pp. 735-744. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x>
- [15] Verkade, E., Van Benthem, B., Den Bergh, M. K., Van Cleef, B., Van Rijen, M., Bosch, T., Kluytmans, J. (2013): Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in livestock veterinarians: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*. 57 (2), pp. 11-17. <https://doi.org/10.1093/cid/cit228>
- [16] Fowoyo, P. T. - Ogunbanwo, S. T. (2017): Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from Nigerian traditional fermented foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16 (4), pp. 2-7. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0181-5>
- [17] Chaje, W., Zadernowska, A. C.-W., Nalepa, B., Sierpinska, M., - Łaniewska-Trokenheim, L. (2015): Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.001>
- [18] European Food Safety Authority - EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA journal*. 16 (2), pp. 5182. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- [19] Aires-De-Sousa, M. (2016): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, pp. 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>

- [20] Josten, M., Dischinger, J., Szekat, C., Reif, M., Al-Sabti, N., Sahl, H. G., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I, Bierbaum, G. (2014): Identification of Agr-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Harboring the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>
- [21] Alksne, L., Makarova, S., Avsejenko, J., Cibrovskā, A., Trofimova, J., Valciņa, O. (2020): Determination of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and Staphylococcus epidermidis by MALDI-TOF-MS in clinical isolates from Latvia. *Clinical Mass Spectrometry*. 16, pp. 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.03.001>
- [22] Pranada, A. B. - Bienia, M. - Kostrzewa, M. (2016): Optimization and Evaluation of MRSA Detection by Peak Analysis of MALDI-TOF Mass Spectra, in DGHM 2016 https://www.msac1.org/view_abstract/MSACL_2017_EU.php?id=305 Hozzáférés: 2021.01.08.
- [23] Manukumar, H. M., Umesha, S. (2017): MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus. *Scientific Reports*. 7, 11414 pp. 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11597-z>
- [24] Horvath, B., Peles, F., Szél, A., Sipos, R., Erős, Á., Albert, E., Micsinai, A. (2020): Molecular typing of foodborne coagulase-positive Staphylococcus isolates identified by MALDI-TOF-MS. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science*. 49 (3), pp. 307-313. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.3.9>
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2019): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100- S18. Wayne, PA, USA: CLSI.
- [26] National Food Institute - NFI (2012): protocol for pcr amplification of meca, mecc (mecalga251), spa and pvl recommended by the eurl-ar 2st version. https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf Hozzáférés: 2021.02.03.
- [27] Thomas, J. C., Vargas, M. R., Miragaia, M., Peacock, S. J., Archer, G. L., Enright, M. (2007): Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for Staphylococcus epidermidis. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (2), pp. 616-619. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-06>
- [28] Josten, M., Dischinger, J., Szekat, C., Reif, M., Al-Sabti, N., Sahl, H. G., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I, Bierbaum, G. (2014): Identification of Agr-Positive Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Harboring the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>

Brigitta HORVÁTH^{a*}, Ferenc PELES^a, Judit GASPARIK REICHARDT^d, Edit POCKLÁN^d, Rita SIPOS^b, Ágnes ERŐS^b, Flóra Mária PETRÓCZKI^a, Kata Dorina SZÚCS^c, Ervin ALBERT^e, Adrienn MICSINAI^d

DOI: <https://doi.org/10.52091/EVIK-2021/2-1-ENG>

Received: February 2021 – Accepted: April 2021

Investigation of the antibiotic resistance of staphylococcus species isolated from foods

Keywords: food, Staphylococcus, antibiotic resistance, MALDI-TOF- MS, bacterial identification, food safety, human pathogen, nosocomial infection

1. SUMMARY

The presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in the food chain has been confirmed by several studies in the European Union, but there are only limited data available in Hungary. The objective of the present study was to investigate the antibiotic resistance of Staphylococcus strains isolated from foods, using classical microbiological, molecular biological methods and the MALDI-TOF-MS technique, as well as the multi-locus sequence typing (MLST) of antibiotic resistant strains. During the study, 47 coagulase-positive (CPS) and 30 coagulase-negative (CNS) Staphylococcus isolates were collected. In the course of the MALDI-TOF-MS investigations, all CPS isolates (n=47) were found to be *S. aureus* species, while 8 different species were identified in the case of the CNS strains. Methicillin resistance was confirmed in two *S. aureus* strains, one of which had a sequence type not yet known, while the other MRSA strain was type ST398, which is the most common type of MRSA strain isolated from farm animals in the EU/EEA.

(The abbreviation “MRSA” is often used in common parlance, but occasionally in the literature to denote “multidrug-resistant Staphylococcus aureus”. In the authors’ manuscript - the methicillin-resistant pathogen is correctly designated as such. Ed.)

^a University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management

^b BIOMI Kft.

^c Pázmány Péter Catholic University

^d WESSLING Hungary Kft.

^e University of Veterinary Medicine

* Corresponding author: horvath.brigitta920108@gmail.com

Brigitta HORVÁTH

Ferenc PELES Dr.

Judit GASPARIKNÉ REICHARDT Dr.

Edit POCKLÁN

Rita SIPOS Dr.

Ágnes ERŐS

Flóra Mária PETRÓCZKI

Kata Dorina SZÚCS

Ervin ALBERT

Adrienn MICSINAI Dr.

horvath.brigitta920108@gmail.com

pelesf@agr.unideb.hu

reichardt.judit@wessling.hu

pocklan.edit@wessling.hu

sipos.rita@biomi.hu

eros.agnes@biomi.hu

petroczki.flora@agr.unideb.hu

szucs.katad@gmail.com

albert.ervin@univet.hu

micsinai.adrienn@wessling.hu

<https://orcid.org/0000-0002-7861-0824>

<https://orcid.org/0000-0002-9226-3777>

<https://orcid.org/0000-0003-3000-6158>

<https://orcid.org/0000-0001-8942-0674>

<https://orcid.org/0000-0002-1770-769X>

<https://orcid.org/0000-0001-7258-615X>

<https://orcid.org/0000-0001-9878-4656>

<https://orcid.org/0000-0002-8728-3714>

<https://orcid.org/0000-0002-2244-7538>

<https://orcid.org/0000-0001-5745-4589>

2. Introduction and literature review

The number of nosocomial infections caused by antibiotic-resistant microorganisms has been increasing in all countries, thus posing a greater and greater challenge to the health care system [1, 2]. The situation is further exacerbated by the fact that antibiotic-resistant *Staphylococcus* species have already appeared not only in communities and health care, but also in intensive animal husbandry and thus in the food chain [3].

In *Staphylococcus* species, genes associated with antibiotic resistance and virulence are found in the mobile genetic elements (MGE), such as chromosome cassettes, pathogenicity islands, plasmids or transposons [4]. The *mecA* gene is responsible for methicillin resistance: the gene encodes a modified penicillin-binding protein that reduces the binding affinity of most beta-lactam antibiotics, such as penicillin and methicillin. The *mecA* gene is located on the *Staphylococcus* chromosome cassette (SSC*mec*), which is a group of MGE found only in *Staphylococcus* species [5]. The transfer mechanism of the *mecA* gene between *Staphylococcus* species is unknown, however, evidence supports horizontal gene transfer between coagulase-positive and coagulase-negative *Staphylococcus* species [6].

The presence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains in the food chain has already been reported in several studies. Some of their authors examined strains isolated from food samples of animal origin, others investigated strains isolated from raw meat samples (pig, fish, poultry). In the Netherlands in 2009, 2,217 different food samples were analyzed, 12% of which contained MRSA strains [7], while in a Danish study 4.6% of 153 pork samples and 7.5% of imported pork samples were infected with MRSA strains [8]. MRSA strains have also been identified in Germany in raw milk, pork, turkey and broiler chicken [9]. In Hungary, 27 MRSA isolates were identified in the 595 individual milk samples of a dairy farm [10], while in another study only 4 strains out of the 626 *S. aureus* isolates of 42 farms proved to be methicillin-resistant [11]. However, beyond these examples, the presence of MRSA in foods from other categories and ready-to-eat foods has not been investigated so far. Molecular typing results of the strains have shown that many types of MRSA are present in the food chain in different countries [12], but the most common type is CC398, accounting for 85% of the MRSA strains isolated from farm animals in the EU and the EEA [13, 14, 7, 15].

The presence of additional methicillin-resistant *Staphylococcus* (MRS) species in foods has been investigated by fewer studies. In Nigeria, 13 *Staphylococcus* species (*S. xylosus*, *S. epidermidis*, *S. simulans*) showed methicillin resistance out of 255 isolates from traditional foods [16]. In a study in Poland, out of 58 strains isolated from ready-to-eat foods, 33 *Staphylococcus* strains (*S. epidermidis*, *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. hycus*, *S. lentus*, *S. saprophyticus*) showed resistance to at least one type of antibiotic [17].

In the European Union, testing for antibiotic resistance in *Staphylococcus* strains isolated from foods and farm animals is currently voluntary, so in 2016 only Germany, Switzerland, Denmark and Spain reported information related to this topic. The incidence of MRSA varied from country to country, but in the case of a comparison it should be taken into account that the studies were performed on strains isolated from different animal species, meats and meat products [18]. A small proportion of human infections can be traced back to MRSA strains of the CC398 type, and they are also mainly limited to occupational exposures, such as veterinary medicine and intensive animal husbandry. Nevertheless, the virulence factors detectable in CC398-type MRSA strains allow for high pathogenicity, so continuous revision is essential both in animals and in foods [19]. The need for surveillance is also justified by the possible presence of antibiotic resistance of other *Staphylococcus* species, which allows for the spread of resistance and poses a risk to consumer health.

A prerequisite for a successful surveillance system is the availability of a uniform, economically acceptable, rapid and reliable method for the species-level identification of the microorganisms and the determination of antibiotic resistance, a promising cornerstone of which could be matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) based on peptide identification. In the early 2000s, several studies reported specific fragment ions that allow rapid identification of antibiotic-resistant *Staphylococcus* strains. The most often studied biomarker was the fragment ion with an *m/z* value of 2,414, the appearance of which in the mass spectrum correlates with the expression of *psm-mec*, characteristic of MRSA strains [20]. The applicability of the 2,414 *m/z* fragment ion for detection and discrimination has been demonstrated in several studies [21, 22].

In addition to the studies of the biomarkers of MRSA strains, methicillin resistance-specific fragment ion peaks of other *Staphylococcus* species have been analyzed in other studies. In an earlier article, two specific fragment ion values were determined: the ion fragment peak with an *m/z* value of 7,239, which is a biomarker of methicillin-resistant *S. epidermidis*, and the fragment ion peak with an *m/z* value of 9,674, which is the biomarker of methicillin-resistant *S. haemolyticus* [23].

The objective of our own experiments was to investigate the methicillin resistance of *Staphylococcus* strains isolated from foods using classical microbiological, molecular biological methods and the MALDI-TOF-MS technique, as well as the multi-locus sequence typing (MLST) of antibiotic-resistant strains for the epidemiological study of the strains.

3. Materials and methods

3.1. The isolates collected and culture conditions

77 *Staphylococcus* isolates, isolated according to the requirements of standard MSZ EN ISO 6888-1:2008, were analyzed in the Microbiological Laboratory of WESSLING Hungary Kft. in the period between August 2019 and September 2020. The isolates were grown on a Baird-Parker (Biokar, France) selective culture medium at 37 °C for 24±1 hour and colonies characteristic of *Staphylococci* were inoculated onto Columbia blood agar (Neogen, UK) (37 °C, 24±1 hours). In the course of culturing, 47 strains showed a positive coagulase reaction, while 30 isolates proved to be coagulase-negative, which was also confirmed by a latex agglutination rapid test (PASTOREX™ STAPH-PLUS). Isolates were collected from raw meat, meat products and ready-to-eat foods: poultry (n=14), beef (n=5), pork (n=42), game (n=1), fish (n=1), dairy product (n=3), ready-to-eat foods (n=3), vegetables (n=2) and dry pasta (n=6).

3.2. Identification of the isolates using the MALDI-TOF-MS technique

The 77 isolates collected were identified using a Bruker Microflex LT MALDI-TOF mass spectrometer and the MALDI BioTyper 3.1 (Bruker Daltonics) software. A formic acid suspension protocol was used in which a single colony was collected from the Columbia blood agar using a sterile loop, and then it was suspended in 40 µl formic acid. To the suspension was added 40 µl of acetonitrile, 1 µl of which was applied to one of the positions of the plate. After the solvent evaporated, 1 µl of α-HCCA (10 mg/ml α-Cyano-4-hydroxycinnamic acid) matrix solution was applied and the solvent was allowed to evaporate once more. 6 parallel measurements were performed for each sample.

To identify the isolates, the MALDI Biotyper 3.1 software was used, which compares the mass spectra obtained with the reference mass spectra in its database and calculates a compliance factor (score). In case of a log score value of 2.300 – 3.000, identity is highly probable. At a log score value this high, the species is considered to be identified. If the log score value is between 2.000 and 2.299, the identity is less certain, so in this case only the genus of the microorganism can be considered identified. When the log score value is between 1.700 and 1.999, even the identification of the genus cannot be considered sufficiently certain. If a log score value between 0.000 and 1.699 is returned by the evaluation software, identification should be considered unsuccessful. Identification of the coagulase-positive *Staphylococcus* strains included in the study was carried out earlier [24].

3.3. Antibiotic susceptibility testing

3.3.1. Investigation of the methicillin resistance specific peaks by the MALDI-TOF-MS method

The mass spectra obtained were exported to the flexAnalysis 3.4 software (Bruker Daltonics) and manual analysis and comparison of the mass spectra was performed. Smoothing of the mass spectra was carried out with the Savitzky–Golay filter, while baseline correction was performed using the TopHat algorithm. During the analysis the presence of methicillin resistant-specific fragment ion values was examined (**Table 1**).

Table 1. Methicillin resistance (MR) specific peaks analyzed in this study

Species	MR specific fragment ion	Literature reference
<i>S. aureus</i>	m/z 2.414	[20]
<i>S. aureus</i>	m/z 2.414	[22]
<i>S. aureus</i>	m/z 2.414	[21]
<i>S. epidermidis</i>	m/z 7.239	[23]
<i>S. haemolyticus</i>	m/z 9.674	[23]

3.3.2. Disk diffusion method

When examining the antibiotic resistance of the strains, the guidelines of the CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019) were followed [25]. A bacterial suspension equivalent to 0.5 McFarland unit was applied to the surface of a Mueller-Hinton agar (Oxoid, UK), and then Cefoxitin 30 µg disks were placed on the surface of the medium. The strains were incubated at 37 °C for 18 hours. In the case of MRSA strains, the reference range of the clearance zone was 6-19 mm, while for *mecA* negative species it was 20-32 mm.

3.3.3. Selective differentiation agar

In addition to the above, CHROMagar MRSAII selective differentiation medium (BD, UK) was used for the detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* species in the antibiotic resistance assays. Isolates were incubated at 37 °C for 24 – 48 hours under aerobic conditions. Strains that formed mauve colonies, morphologically similar to those of *Staphylococci*, were considered MRSA bacteria. The disk diffusion method (Cefoxitin 30 µg) and the MRSA CHROMagar assay were repeated twice for each strain isolated from a food (n=77). During the study, the reference MRSA strain ATCC 33591 was used as a positive control and the MRSA strain ATCC 29213 was used as a negative control.

3.3.4. *mecA* gene complex

Detection of the *mecA* gene was performed according to the protocol of the Danish National Food Institute (NFI), published in 2012 [26]. During the study, MRSA strain ATCC 43300 was used as a positive control and MRSA strain ATCC 29213 was used as a negative control. Genomic DNA was isolated from the bacteria and the *mecA* gene sequence was amplified using PCR. The primers used are listed in **Table 2**.

Table 2. Primers used for the amplification of the *mecA* gene

Primer name	Primer sequence
mecA_fwd	5'- GGGATCATAGCGTCATTATTC-3'
mecA_rev	5'- AACGATTGTGACACGATAGCC-3'

3.4. MLST study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains

According to the study of Thomas et al. [27], genomic DNA was isolated from the bacteria, and then the gene sequences specific for the 7 *Staphylococcus aureus* species were amplified using PCR (**Table 3**). The nucleotide sequences of the purified PCR products were determined and the sequence data were evaluated in the *BioNumerics 7.6* software.

Table 3. Genes used in the MLST method and data of the primers used in their amplification

Gene	Primer	Primer DNA sequence (5'-3')
Carbamate kinase (<i>arcC</i>)	<i>arc</i> up_1	TTG ATT CAC CAG CGC GTA TTG TC
	<i>arc</i> dn_2	AGG TAT CTG CTT CAA TCA GCG
Shikimic acid dehydrogenase (<i>aroE</i>)	<i>aro</i> up_3	ATC GGA AAT CCT ATT TCA CAT TC
	<i>aro</i> dn_4	GGT GTT GTA TTA ATA ACG ATA TC
Glycerol kinase (<i>glpF</i>)	<i>glp</i> up_5	CTA GGA ACT GCA ATC TTA ATC C
	<i>glp</i> dn_6	TGG TAA AAT CGC ATG TCC AAT TC
Guanylate kinase (<i>gmk</i>)	<i>gmk</i> up_7	ATC GTT TTA TCG GGA CCA TC
	<i>gmk</i> dn_8	TCA TTA ACT ACA ACG TAA TCG TA
Phosphate acetyltransferase (<i>pta</i>)	<i>pta</i> up_9	GTT AAA ATC GTA TTA CCT GAA GG
	<i>pta</i> dn_10	GAC CCT TTT GTT GAA AAG CTT AA
Triose phosphate isomerase (<i>tpi</i>)	<i>tpi</i> up_11	TCG TTC ATT CTG AAC GTC GTG AA
	<i>tpi</i> dn_12	TTT GCA CCT TCT AAC AAT TGT AC
Acetyl coenzyme A acetyltransferase (<i>yqiL</i>)	<i>yqi</i> up_13	CAG CAT ACA GGA CAC CTA TTG GC
	<i>yqi</i> dn_14	CGT TGA GGA ATC GAT ACT GGA AC

4. Results

4.1. Identification results of the isolated strains

In the MALDI-TOF-MS study, all coagulase-positive *Staphylococcus* (CPS) strains (n=47) were found to be *S. aureus* species (**Tables 4 and 6**). In the case of coagulase-negative *Staphylococcus* (CNS) strains, 8 different species (*S. xyloso*, *S. saprophyticus*, *S. pasteurii*, *S. epidermidis*, *S. warneri*, *S. chromogenes*, *S. piscifermentans*, *S. haemolyticus*) were identified (**Tables 4 and 7**). 30% of the CNS isolates (n=30) were found to be *S. warneri* species, while 23% were found to be *S. pasteurii* species. 70% of the *S. aureus* strains and all of the CNS strains were isolated from meat and meat products (**Figures 1 and 2**). In the case of *S. aureus* strains, 64% of the meats and meat products came from pigs, while this was true for 70% of the CNS strains. Within meat and meat products, the distribution of isolates coming from poultry and beef was nearly the same.

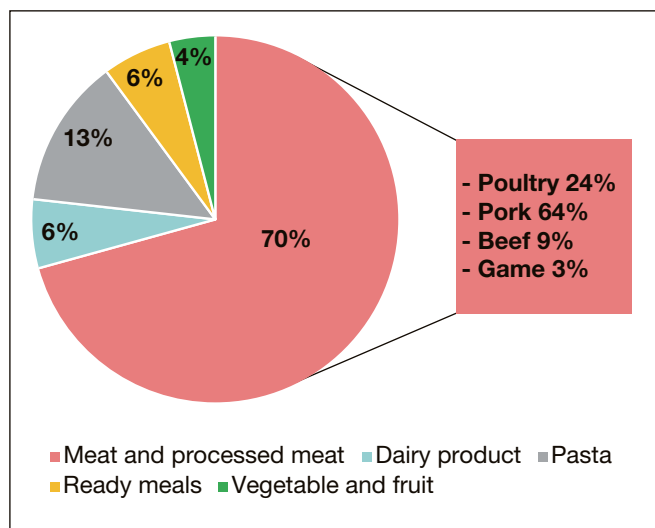


Figure 1. Food types tested

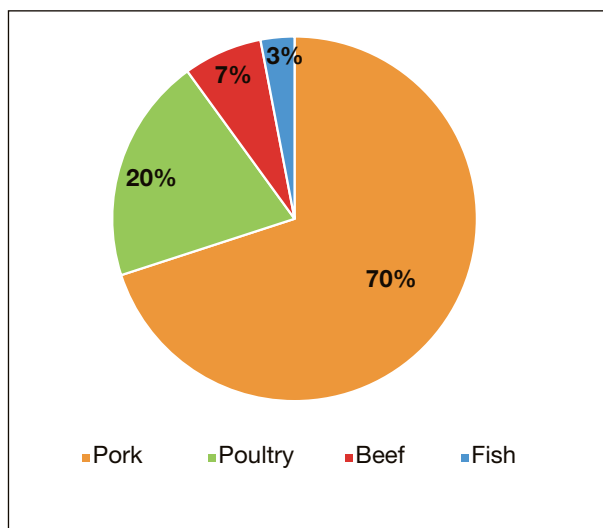


Figure 2. Raw materials of meats and meat products

The mean identification log score values of the isolates and their standard deviations are summarized in **Table 4**. The mean identification log score value of *S. aureus* isolates exceeded 2.400. The lowest log score value was 2.304, and even in this case, identification can be considered safe. When examining CNS isolates, each species was identified with a log score value above 2.300 and the standard deviation did not exceed 0.1 in any of the cases.

Table 4. Identification log score values of the identified coagulase-positive and -negative *Staphylococcus* species

Species	Mean identification log score value	Lowest log score value	Highest log score value	Standard deviation of log score values
<i>S. aureus</i> (n=47)	2.415	2.304	2.571	0.072
<i>S. xyloso</i> (n=1)	2.412	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	2.406	2.395	2.415	0.010
<i>S. pasteurii</i> (n=7)	2.387	2.325	2.462	0.050
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	2.348	2.304	2.396	0.038
<i>S. warneri</i> (n=9)	2.365	2.324	2.406	0.028
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	2.372	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	2.353	2.307	2.413	0.054
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	2.318	-	-	-

4.2. Methicillin resistance results determined by the MALDI-TOF-MS technique

In the analysis of the mass spectra obtained from the isolates, 3 antibiotic resistance-specific peaks were examined. The m/z 2,414 peak is a protein product of the *mecA* gene [28], so the presence or absence of this peak was examined for all strains. The detectability of the m/z 7,239 peak was examined only in *S. epidermidis* species, while the presence/absence of the m/z 9,674 peak was examined only in *S. haemolyticus* species due to the species specificity of the peaks.

The m/z 2,414 peak was detected in two *S. aureus* strains out of 77 isolates, one of which came from goose liver (SA-17), while the other came from pork butt (SA-47). For the additional 75 isolates, this peak did not appear even at a low intensity (**Table 5**). In the analysis, mass spectra of the two *S. aureus* strains that proved to be methicillin-resistant were marked in red, while the mass spectra of the other *S. aureus* strains that did not have a methicillin resistance-specific peak were marked in black (**Figures 3 and 4**).

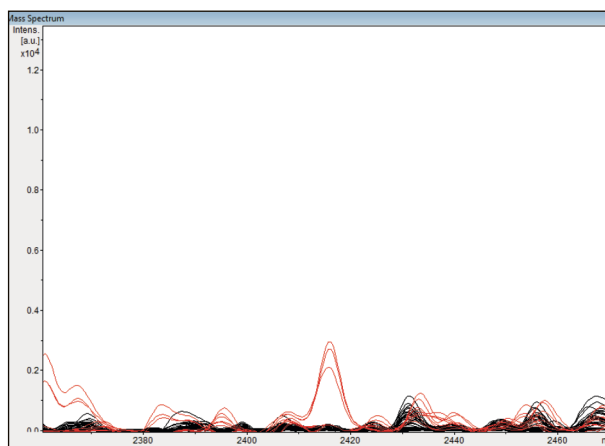


Figure 3. Mass spectrum of the m/z 2,414 transition

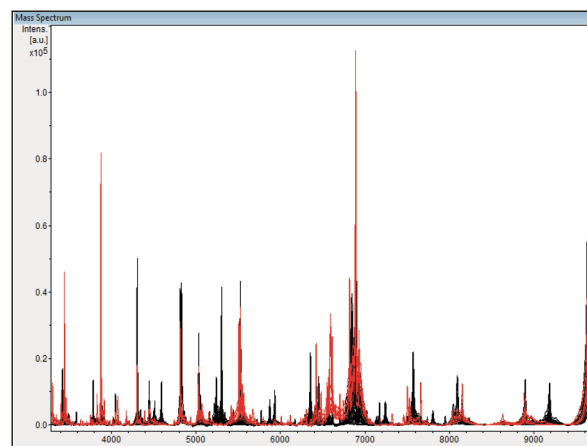


Figure 4. Mass spectra of the 47 *Staphylococcus* strains

Table 5. Frequency of specific ion fragment values in *Staphylococcus* strains isolated from foods

Species	Frequency of specific ion fragment values		
	m/z 2,414	m/z 7,239	m/z 9,674
<i>S. aureus</i> (n=47)	4,3%	-	-
<i>S. xyloso</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. saprophyticus</i> (n=3)	-	-	-
<i>S. pasteur</i> (n=7)	-	-	-
<i>S. epidermidis</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. warner</i> (n=9)	-	-	-
<i>S. chromogenes</i> (n=1)	-	-	-
<i>S. haemolyticus</i> (n=4)	-	-	-
<i>S. piscifermentans</i> (n=1)	-	-	-

The m/z 7,239 peak could not be detected in any of the *S. epidermidis* strains (n=4), while the m/z 9,674 peak did not appear in any of the 4 *S. haemolyticus* species.

4.3. Results of the disk diffusion method and the MRSA CHROMagar selective differentiation agar

In the study of the 77 strains, the diameter of the clearance zone ranged from 23 to 29 mm in the case of 75 strains. The strain isolated from goose liver (SA-17) had a clearance zone with a diameter of 9 mm, while the strain isolated from pork butt (SA-47) had a clearance zone with a diameter of 17 mm, and the same strains also formed mauve-colored colonies on the MRSA CHROMagar selective differentiation medium (**Tables 6 and 7**).

Table 6 Antibiotic resistance test results of the *S. aureus* strains identified in foods

Food category	ID	Food	log score value	Identification result	Clearance zone (mm)	MRSA Chromagar	<i>mecA</i> gene
Dairy product	SA-1	Trappista cheese	2.458	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-10	Trappista cheese	2.440	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-18	Milk dessert	2.513	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Dry pasta	SA-2	Dry pasta	2.476	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-49	Dry pasta	2.308	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-7	Dry pasta	2.304	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-21	Dry pasta	2.486	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-22	Dry pasta	2.448	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-11	Dry pasta	2.429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
Meat	SA-12	Chicken legs	2.465	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-13	Chicken legs	2.345	<i>S. aureus</i>	27	-	-
	SA-16	Marinated chicken	2.332	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-44	Whole duck	2.401	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-17	Goose liver	2.447	<i>S. aureus</i>	9	+	+
	SA-20	Duck plate	2.432	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-28	Duck leg	2.353	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-29	Duck crackling	2.571	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-4	Bacon	2.319	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-31	Bacon	2.546	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-5	Sausage	2.477	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-6	Pork tenderloin	2.366	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-32	Pork tenderloin	2.466	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-25	Sausage	2.429	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-33	Pork tenderloin	2.329	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-24	Pork shoulder	2.343	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-34	Pork tenderloin	2.350	<i>S. aureus</i>	29	-	-
	SA-9	Pork shoulder	2.425	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-35	Pork shoulder	2.500	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-36	Pork shoulder	2.387	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-37	Pork shoulder	2.429	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-15	Crackling	2.342	<i>S. aureus</i>	25	-	-
	SA-38	Sausage to bake	2.474	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-02	Pork shoulder	2.383	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-01	Sausage	2.395	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-39	Pork knuckle	2.562	<i>S. aureus</i>	24	-	-
	SA-40	Pork knuckle	2.516	<i>S. aureus</i>	26	-	-
	SA-41	Head	2.403	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-47	Pork butt	2.354	<i>S. aureus</i>	17	+	+
	SA-3	Beef	2.333	<i>S. aureus</i>	29	-	-
SA-8	Beef	2.484	<i>S. aureus</i>	25	-	-	
SA-48	Guts	2.362	<i>S. aureus</i>	28	-	-	
SA-42	Rabbit meat	2.371	<i>S. aureus</i>	24	-	-	

Ready-to-eat foods	SA-43	Hamburger meat	2.382	<i>S. aureus</i>	23	-	-
	SA-50	Grilled chicken	2.305	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-45	Chocolate	2.339	<i>S. aureus</i>	23	-	-
Vegetables	SA-46	Fresh salad mix	2.525	<i>S. aureus</i>	28	-	-
	SA-27	Carrot paté	2.421	<i>S. aureus</i>	25	-	-

Table 7. Antibiotic resistance test results of the coagulase-negative *Staphylococcus* strains identified in foods

Food category	ID	Food	log score value	Identification result	Clearance zone (mm) (cefoxitin)	MRSA Chromagar
Poultry	061SH	Egg	2.384	<i>S. haemolyticus</i>	24	-
	062SH	Egg	2.307	<i>S. haemolyticus</i>	26	-
	178SE	Chicken breast	2.340	<i>S. epidermidis</i>	26	-
	392SP	Duck crackling	2.318	<i>S. piscifermentans</i>	26	-
	473SE	Egg cream	2.353	<i>S. epidermidis</i>	25	-
	529SW	Paté	2.324	<i>S. warneri</i>	26	-
Pork	573SX	Crackling paté	2.412	<i>S. xyloso</i>	24	-
	377SS	Pork butt	2.395	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	378SS	Pork butt	2.408	<i>S. saprophyticus</i>	24	-
	051SP	Pork shoulder	2.354	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	527SE	Ground meat	2.304	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	052SP	Pork shoulder	2.462	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	528SE	Ground meat	2.396	<i>S. epidermidis</i>	23	-
	530SW	Ground meat	2.364	<i>S. warneri</i>	24	-
	426SW	Pork shoulder	2.348	<i>S. warneri</i>	24	-
	868SS	Pork butt	2.415	<i>S. saprophyticus</i>	28	-
	911SW	Ground meat	2.371	<i>S. warneri</i>	24	-
	393SW	Pork shoulder	2.403	<i>S. warneri</i>	24	-
	427SW	Pork butt	2.362	<i>S. warneri</i>	23	-
	976SP	Pork shoulder	2.325	<i>S. pasteurii</i>	24	-
	050SP	Pork shoulder	2.397	<i>S. pasteurii</i>	26	-
	051SP	Pork butt	2.392	<i>S. pasteurii</i>	25	-
	052SW	Pork butt	2.334	<i>S. warneri</i>	26	-
	472SP	Ground meat	2.341	<i>S. pasteurii</i>	26	-
065SW	Pork tenderloin	2.375	<i>S. warneri</i>	23	-	
510SH	Crackling paté	2.413	<i>S. haemolyticus</i>	26	-	
512SH	Pork butt	2.309	<i>S. haemolyticus</i>	24	-	
Beef	435SW	Beef patty	2.406	<i>S. warneri</i>	24	-
	434SC	Beef neck	2.372	<i>S. chromogenes</i>	28	-
Fish	979SP	Carp slices	2.436	<i>S. pasteurii</i>	24	-

4.4. *mecA* gene detection results

Based on the results of the MALDI-TOF-MS analyses, the disk diffusion method and the MRSA selective differentiation medium, it was found that the *S. aureus* strains isolated from goose liver and pork butt (SA-17, SA-47) carry methicillin resistance, and this was confirmed by the *mecA* gene responsible for PBP2a synthesis, which could also be detected in the two strains (Table 6).

4.5. MLST types of the MRSA strains

MLST typing of the two MRSA strains was also performed during the study, using data available on the PubMLST website (<https://pubmlst.org/saureus/>). Of the two MRSA strains, the BioNumerics 7.6 software

could only assign the sequence type in the case of the strain isolated from pork butt. The strain isolated from goose liver belonged to a sequence type not yet known, while the strain isolated from pork butt belonged to sequence type 398 (**Table 8**).

Table 8. MLST types of the MRSA strains isolated from foods

Food	ID	Species	„Repeat succession” code	MLST type
Pork butt	SA-47	<i>S. aureus</i>	08-16-02-25-34-24-25	ST398
Goose liver	SA-17	<i>S. aureus</i>	09-02-16-34-17-34-16-34	Unknown

5. Summary and conclusions

During the study, 77 *Staphylococcus* isolates were collected from various food matrices according to the methods described in standard MSZ EN ISO 6888-1:2008. Although the standard allows the separation of coagulase-positive and coagulase-negative *Staphylococcus* species, it does not allow species identification, which is significant because of the different virulence factors and pathogenicities of the species. Identification of the 47 coagulase positive and 30 coagulase-negative *Staphylococcus* strains isolated from foods was performed using the MALDI-TOF-MS technique, with high identification log score values. In addition, by analyzing the mass spectra obtained and based on methicillin resistant-specific ion fragment values determined in previous studies, methicillin resistance was found in two *S. aureus* strains, which was confirmed by the disk diffusion method, selective differentiation agar and the detection of the *mecA* gene. Thanks to the specific ion fragment values, the diagnostic time can be significantly reduced, which is not negligible from economic and therapeutic points of view. However, it should be taken into consideration that due to the high variability of MRSA strains, the sensitivity and specificity of these ion fragment values are not 100%, so confirmatory studies are required.

Multi-locus sequence typing (MLST) of the two MRSA strains isolated from foods was also carried out for the epidemiological study of the strains. The isolate coming from pork belonged to type ST398, which is the most common type of MRSA strain isolated from farm animals in the EU/EEA. However, taking into account the specific host adaptation capabilities of type ST398 strains, which allow them to adhere not only to pigs, but also to other animal species and the human body, contamination and infection may occur in a number of ways during the technological steps in food processing.

Given that 2 of the 47 *S. aureus* strains isolated from foods proved to be methicillin-resistant, this fact confirms the dangers posed by globally increasing antibiotic resistance, thus indicating the severity and urgency of the situation.

6. Acknowledgment

This study was carried out with the professional support of WESSLING Hungary Kft., BIOMI Kft. and the New National Excellence Program of the Ministry for Innovation and Technology, code no. ÚNKP-19-3-III.

7. References

- [1] Böröcz, K. (2001): A magyarországi nosocomialis MRSA járványok tapasztalatai (1993-2000). *Epidemiológiai Információs Hetilap*. 8. (10-11).
- [2] Böröcz, K. (2005): Az Országos tisztifőorvos állásfoglalása a methicillin-rezisztens *Staphylococcus aureus* (MRSA) törzsek által okozott, egészségügyi ellátással összefüggő fertőzések megelőzésükről és terjedésük megakadályozásáról. *Epidemiológiai Információs Hetilap*. 12. (5).
- [3] Jungwhan, C., Kidon, S., Saeed, K. (2017): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Food-Producing and Companion Animals and Food Products. *Frontiers in Staphylococcus aureus*. Intechopen.
- [4] Lim, D., Strynadka, N. C. J. (2002): Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Structural Biology*. 9 (11), pp. 870-876. <https://doi.org/10.1038/nsb858>
- [5] Ito, T., Katayama, Y., Hiramatsu, K. (1999): Cloning and nucleotide sequence determination of the entire *mec* DNA of pre-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* N315. *Antimicrob Agents Chemother*. 43 (6), pp. 1449-58. <https://doi.org/10.1128/AAC.43.6.1449>

- [6] Wielders, C. L., Vriens, M. R., Brisse, S., De Graaf-Miltenburg, L. A., Troelstra, A., Fleer, A., Schmitz, F. J., Verhoef, J., Fluit, A. C. (2001): In-vivo transfer of *mecA* DNA to *Staphylococcus aureus* [corrected]. *Lancet*. 26; 357 (9269), pp. 1674-1675. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04832-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04832-7)
- [7] Köck, R., Harlizius, J., Bressan, N., Laerberg, R., Wieler, L. H., Witte, W., Deurenberg, R. H., Voss, A., Becker, K., Friedrich, A. W. (2009): Prevalence and Molecular Characteristics of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (MRSA) Among Pigs on German Farms and Import of Livestock-Related MRSA Into Hospitals. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 28 (11), pp. 1375-1382. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0795-4>
- [8] Agersø, Y., Hasman, H., Cavaco, L. M., Pedersen, K., Aarestrup, F. M. (2012): Study of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Danish pigs at slaughter and in imported retail meat reveals a novel MRSA type in slaughter pigs. *Veterinary Microbiology*. 157 (1-2), pp. 246-250. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.12.023>
- [9] Argudín, M. A., Tenhagen, B. A., Fetsch, A., Sachsenröder, J., Käsbohrer, A. (2011): Virulence and resistance determinants of German *Staphylococcus aureus* ST398 isolates from nonhuman sources. *Applied and Environmental Microbiology*. 77 (9), pp. 3052-3060 <https://doi.org/10.1128/AEM.02260-10>
- [10] Juhász-Kaszanyitzky, E., Jánosi, S., Somogyi, P., Dán, A., Van Der, A., Graaf-Van Bloois, L. (2007): MRSA transmission between cows and humans. *Emerging Infectious Diseases*. 13 (4), pp. 630-632. <https://doi.org/10.3201/eid1304.060833>
- [11] Albert, E., Sipos, R., Jánosi, Sz., Kovács, P., Kenéz, Á., Micsinai, A., Noszály, Zs., Biksi, I. (2020): Occurrence and characterisation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from bovine milk in Hungary. *Acta Veterinaria Hungarica*. 68 (3) pp. 236-241. <https://doi.org/10.1556/004.2020.00040>
- [12] Wendlandt, S., Schwarz, S., Silley, P. (2013): Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: A Food-Borne Pathogen? *Annual Review of Food Science and Technology*. 4, pp. 117-139. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182653>
- [13] Bosch, T., Verkade, E., Van Luit, M., Landman, F., Kluytmans, J., Schouls, L. M. (2015): Transmission and persistence of livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among veterinarians and their household members. *Applied and Environmental Microbiology*. 81 (1), pp. 124-129. <https://doi.org/10.1128/AEM.02803-14>
- [14] Fluit, A.C. (2012): Livestock-associated *Staphylococcus aureus*. *Clinical Microbiology and Infection*. 18 (8), pp. 735-744. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2012.03846.x>
- [15] Verkade, E., Van Benthem, B., Den Bergh, M. K., Van Cleef, B., Van Rijen, M., Bosch, T., Kluytmans, J. (2013): Dynamics and determinants of *Staphylococcus aureus* carriage in livestock veterinarians: a prospective cohort study. *Clinical Infectious Diseases*. 57 (2), pp. 11-17. <https://doi.org/10.1093/cid/cit228>
- [16] Fowoyo, P. T. - Ogunbanwo, S. T. (2017): Antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from Nigerian traditional fermented foods. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 16 (4), pp. 2-7. <https://doi.org/10.1186/s12941-017-0181-5>
- [17] Chaje, W., Zadernowska, A. C.-W., Nalepa, B., Sierpiska, M., - Łaniewska-Trokenheim, L. (2015): Coagulase-negative staphylococci (CoNS) isolated from ready-to-eat food of animal origin e Phenotypic and genotypic antibiotic resistance. *Food Microbiology*, 46, pp. 222-226. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2014.08.001>
- [18] European Food Safety Authority - EFSA (2018): The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA journal*. 16 (2), pp. 5182. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5182>
- [19] Aires-De-Sousa, M. (2016): Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among animals: current overview. *Clinical Microbiology and Infection*. 23, pp. 373-380. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.11.002>

- [20] Josten, M., Dischinger, J., Szekat, C., Reif, M., Al-Sabti, N., Sahl, H. G., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I, Bierbaum, G. (2014): Identification of Agr-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Harboring the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>
- [21] Alksne, L., Makarova, S., Avsejenko, J., Cibrovskā, A., Trofimova, J., Valciņa, O. (2020): Determination of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* by MALDI-TOF-MS in clinical isolates from Latvia. *Clinical Mass Spectrometry*. 16, pp. 33-39. <https://doi.org/10.1016/j.clinms.2020.03.001>
- [22] Pranada, A. B. - Bienia, M. - Kostrzewa, M. (2016): Optimization and Evaluation of MRSA Detection by Peak Analysis of MALDI-TOF Mass Spectra, in DGHM 2016 https://www.msac1.org/view_abstract/MSACL_2017_EU.php?id=305 Hozzáféré: 2021.01.08.
- [23] Manukumar, H. M., Umesha, S. (2017): MALDI-TOF-MS based identification and molecular characterization of food associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Scientific Reports*. 7, 11414 pp. 1-16. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-11597-z>
- [24] Horvath, B., Peles, F., Szél, A., Sipos, R., Erős, Á., Albert, E., Micsinai, A. (2020): Molecular typing of foodborne coagulase-positive *Staphylococcus* isolates identified by MALDI-TOF-MS. *Acta Alimentaria, An International Journal of Food Science*. 49 (3), pp. 307-313. <https://doi.org/10.1556/066.2020.49.3.9>
- [25] Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI (2019): Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Eighteenth Informational Supplement M100- S18. Wayne, PA, USA: CLSI.
- [26] National Food Institute - NFI (2012): protocol for pcr amplification of meca, mecc (mecalga251), spa and pvl recommended by the eurl-ar 2st version. https://www.eurl-ar.eu/CustomData/Files/Folders/21-protocols/279_pcr-spa-pvl-meca-mecc-sept12.pdf (Acquired: 2021.02.03.)
- [27] Thomas, J. C., Vargas, M. R., Miragaia, M., Peacock, S. J., Archer, G. L., Enright, M. (2007): Improved Multilocus Sequence Typing Scheme for *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Clinical Microbiology*. 45 (2), pp. 616-619. <https://doi.org/10.1128/JCM.01934-06>
- [28] Josten, M., Dischinger, J., Szekat, C., Reif, M., Al-Sabti, N., Sahl, H. G., Parcina, M., Bekeredjian-Ding, I, Bierbaum, G. (2014): Identification of Agr-Positive Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* Harboring the Class A Mec Complex by MALDI-TOF Mass Spectrometry. *International Journal of Medical Microbiology*. 304 (8), pp. 1018-1023. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2014.07.005>

A magyar fogyasztók krónikus aflatoxin M1 expozíciója

Kulcsszavak: determinisztikus expozícióbecslés, krónikus aflatoxin M1 expozíció, veszélyeztetett fogyasztói csoportok, karcinogén hatás, májrák kialakulásának veszélye

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A takarmányok mikotoxin szennyezettsége megjelenik az élelmiszerláncban. Az aflatoxinok az állatok szervezetében metabolizálódnak és metabolitjuk, az aflatoxin M1 (AFM1) – amely az aflatoxin B1-hez (AFB1) hasonlóan, de annál tízszer kisebb mértékben genotoxikus és rákkeltő – megjelenik a tejben, a májban, valamint a tojásban is. Ezek közül a legjelentősebb élelmiszerbiztonsági kockázatot a tej AFM1 szennyezése jelenti. Cikkünkben bemutatjuk a magyar fogyasztók tej és tejtermékek AFM1 szennyezése alapján determinisztikus módszerrel számított expozícióbecslését. Az eredmények azt jelzik, hogy a három évnél fiatalabb gyermekek kitettsége egyértelműen egészségügyi kockázatot jelent, a 3-6 éves korcsoport expozíciója pedig határeset. Az idősebb korcsoportok ng/testtömeg kg-ban kifejezett expozíciója a növekvő testtömeg következtében közvetlen egészségügyi kockázatot nem jelent. Hangsúlyozzuk azonban, hogy a rákkeltő vegyületek jelenlétét minden korcsoportban a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani. Ennek érdekében a tej üzemi ellenőrzésének rendeleti módosítását javasoljuk.

¹ Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Rendszerszervezési és Felügyeleti Igazgatóság

² Állatorvostudományi Egyetem, Digitális Élelmiszerlánc Oktatási, Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Intézet

³ Debreceni Egyetem, Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola

2. Bevezetés

A mikotoxin-szennyezéssel foglalkozó előző közleményünkben bemutattuk a hazai élelmiszerek és takarmányok mikotoxin-szennyezettségét, azok eltűrhető maximális koncentrációjának jogi szabályozását, a mintavételi eljárások korlátait és elemeztük a jelenlegi hazai gyakorlat tapasztalatait [1]. A 2009-ben végrehajtott élelmiszerfogyasztási felmérés adatait és a 2010-2018 időszakból rendelkezésünkre álló mérési eredményeket felhasználva becsültük a magyar fogyasztók expozícióját DON és aflatoxin M1 vonatkozásában. Előzetes becsléseink alapján megállapítottuk, hogy a fogyasztók egy részénél az aflatoxin M1 és a DON expozíciója az élelmiszerek szennyezésének évenként változó szintje miatt időszakonként meghaladhatja a toxikológiai referencia-értékeket, és ez humánegészségügyi kockázatot jelenthet.

Jelen közleményünkben bemutatjuk az újabb analitikai mérési eredmények és a 2018-2019 folyamán az Európában egységesen alkalmazott metodikával végrehajtott, magyar élelmiszerfogyasztási felmérés adatainak felhasználásával, determinisztikus módszerrel elvégzett számításaink eredményét, amely a különböző fogyasztói korcsoportok krónikus AFM1 expozíciójáról ad információt.

A mikotoxintermelő gombáknak a globális felmelegedés következtében várható terjedése, az általuk termelt toxinok okozta élelmiszer és takarmány szennyezettségi szintek növekedése, a nekik tulajdonítható egészségügyi problémák és gazdasági károk intenzív kutatómunkát indukáltak. Az eredményeket ismertető nagyszámú közleményt a rendszeresen közreadott összefoglaló cikkek kutatási területenként teszik könnyebben áttekinthetővé, mint például a mikotoxint termelő *Aspergillus* fajok kölcsönhatása a talaj mikroorganizmusaival [2], a mikotoxin expozíció humán fiziológiai hatásai [3], biokontroll technológiák alkalmazása az aflatoxin szennyezés csökkentésére, a silókészítési technológia és mikrobióta hatása az aflatoxin szennyezésre [4], a mikotoxin-szennyezés forrásai, előfordulása, szabályozása [5, 6], detektálási módszerei [7]. A *Frontiers in Microbiology* folyóirat 22 legújabb kutatási eredményt, összefoglalót tartalmazó különdíját könyv formájában is megjelentette [8].

A fenti kiadványokra való tekintettel alábbiakban csak a közleményünk célkitűzéséhez szorosan tartozó szakirodalmi közleményeket foglaljuk össze.

2.1. Az aflatoxinok előfordulása

A nyers mezőgazdasági termékekben (elsősorban földimogyoró, kukorica, rizs, diófélék, füge, fűszerek, szárított gyümölcsök), takarmányokban előforduló aflatoxinok és egyéb mikotoxinok bekerülnek az élelmiszerláncba és detektálhatók tejben [9, 10, 11, 12], tojásban, húspan, belsőségeiben [6, 13]. Aflatoxikolt detektáltak broiler és tojó tyúkok májában, veséjében és húspanban [14, 15]. Az AFB1-nek a takarmányban lévő koncentrációjához viszonyítva a tyúkok májában, tojássárgájában és a tojásfehérjében >5700-, >4600-, >3800-szoros koncentrációkat mértek [16].

A takarmányból a tejbe jutó AFM1 koncentrációja az állatok AFB1 ($\mu\text{g}/\text{tkg}$) kitétségén túlmenően számos tényezőtől függ, mint például a tehén egészségi állapota, tejhozama, a laktációs időszak stb. [17]. A nagy tejhozamú egyedek esetén az átviteli arány nagyobb [18]. A szakirodalomban számos vizsgálat eredményét közölték, amelyek szerint az átviteli arány kerekítve 0,35-6% között változott. Juhokban alacsonyabb (0,08%-0,33%) átviteli arányt tapasztaltak [19].

Az aflatoxin májba, húspanba és tojásba történő átvitele kapcsán kevesebb kutatási eredmény áll rendelkezésre, azonban ezek a tejhez képest jelentősen kisebb átviteli arányról számolnak be, így továbbra is a tej tekinthető az állati eredetű élelmiszerek között a legjelentősebb aflatoxin-forrásnak [4, 20].

Az AFB1-gyel szennyezett élelmiszer fogyasztásakor a tehéntejhez hasonló mértékben kerül AFM1 az anyatejbe is [21, 22, 23, 24, 25, 26]. A tehéntej alapú tápszerrel, tejjalokkal táplált csecsemők és kisgyermekek szintén AFM1-expozíciónak lehetnek kitéve. Az európai felmérések eredményei jóval alacsonyabb expozíciós szintet jeleznek, mint az afrikai és az ázsiai publikációk [27].

Mint minden mikotoxin esetében, az aflatoxinoknál is megfigyelhető, hogy szintjük jelentős éves ingadozást mutat a gombák növekedését és a toxintermelést befolyásoló időjárási viszonyoktól függően [28].

Az EFSA a legutóbbi kockázatbecsléséhez [29] a tagországok által 2013 után jelentett aflatoxin M1 mérési eredményeket használta fel. Néhány fontosabb élelmiszer-kategóriára vonatkozó statisztikai adatot a **1. táblázatban** foglaltunk össze.

1. táblázat. AFM1 átlag és 95. percentilis koncentráció értékek az EFSA 2013-2020-as tagországi adatai alapján.

Élelmiszer kategória	N (db)	% LCD	Átlag LB (µg/kg)	Átlag UB (µg/kg)	P95 LB (µg/kg)	P95 UB (µg/kg)
Tej	6020	76	0,018	0,031	0,087	0,087
Sűrített tej/Tejpor	168	81	0,037	0,044	0,018	0,087
Tejszín	114	96	0,000	0,009	0,000	0,020
Fermentált tejkészítmények	96	94	0,052	0,069	1,00	1,00
Sajtok	359	53	0,097	0,107	0,415	0,415
Csecsemő tápszer	354	90	0,060	0,071	1,00	1,00
Egyéb	85	53	0,124	0,204	1,00	1,00

Megjegyzés:

N: mérési eredmények száma; % LCD (left censored data): kimutatási/mérési határ alatti eredmények aránya; P95: 95. percentilis; LB: lower bound - a legkisebb koncentrációval történő behelyettesítés eredménye; UB: upper bound - a legnagyobb koncentráció értékkel történő behelyettesítés eredménye; Egyéb: csecsemőknek és kisgyermekeknek szánt élelmiszerek.

2.2. Az aflatoxinok egészségügyi hatásai

Az aflatoxinok (különösképpen az AFB1, az AFG1 és az AFM1) valamennyi kísérleti állatfajban, például halak, kacsák, egerek, patkányok, majmok esetében rendkívül erős karcinogén, vese- és májkárosító, genotoxikus, fejlődési rendellenességet okozó, szaporodási képességet csökkentő, immunszuppresszív és idegrendszeri károsító vegyületnek bizonyultak [30]. Egy a közelmúltban közölt vizsgálat kimutatta, hogy a patogén gombák spórái a különböző madarak szervezetében súlyos, fatális fertőzést okoznak [31].

Az AFB1 nagy mennyiségben – mind emberek, mind állatok esetében – gyors lefolyású, akut mérgezést is okozhat, amely során a kialakuló súlyos májelégtelenség akár halálhoz is vezethet, ennek humán kockázata azonban a fejlett országokban elhanyagolható. Az aflatoxinok közül az aflatoxin B1 a legerősebb rákkeltő, genotoxikus vegyület, ez fordul elő leggyakrabban élelmiszerekben és takarmányokban. Legtöbbször hepatocelluláris karcinómát (HCC) okoz, ezért az IARC az AFB1-et az emberekre nézve rákkeltő, 1. csoportba sorolta. A tejelő tehének AFB1-gyel szennyezett takarmány fogyasztását követően annak hidroximetabolitját, az aflatoxin M1-et választják ki a tejbe, amely szintén karcinogén vegyület, bár toxicitása körülbelül egytizede az AFB1-ének [32, 33].

Az aflatoxinok gyorsan és nagy arányban szívódnak fel a vékonybélben, majd a májba kerülve, az ott található citokróm P450 enzimrendszer katalizálja az aflatoxin metabolizmusát. Az AFB1, AFG1 és az AFM1 olyan reaktív elektrofil epoxiddá alakul, amely kovalensen képes kötődni mind a DNS-hez, mind a fehérjékhez. Ugyanakkor a glutation-S-transzferázok (GST) az AFB1 8,9-exo epoxiddal olyan konjugációs kapcsolatot képesek kialakítani, amely már így nem tud a szervezetben káros reakcióba lépni, és az epén és a vesén keresztül ürül. Az egyének közötti polimorfizmusok nagy variabilitást eredményeznek az enzimatisz folyamatok terén, ezáltal az aflatoxinnal szembeni érzékenység is egyéni eltéréseket mutat [30, 34, 35]. Az aflatoxin metabolitok nagy része optimális esetben pár nap alatt ürül ki a szervezetből, azonban megfigyelték, hogy fehérjéhez kötött formában (például aflatoxin-albumin adduktok esetében) hosszabb távon jelen van a perifériás keringésben, ahol 30-60 napos felezési idővel kell számolni [36].

Az aflatoxinok közvetlenül, illetve közvetve is, a lipid-metabolizmushoz kapcsolódó gének expressziójának megváltoztatásával károsítják a májsejteket. A megnövekedett koleszterin-, triglicerid- és lipoprotein-termelés a hepatociták szétesését okozhatja. A hepatociták pusztulása akut hepatitishez vezethet, amely májelégtelenséget, súlyosabb esetben halált eredményezhet. A hepatitisben szenvedő betegek felborult metabolizmusa következtében alultápláltság alakulhat ki, ez pedig közvetve hozzájárul a hepatociták antioxidáns kapacitásának általános csökkenéséhez, a májszövet regenerálódási képességének elvesztéséhez, végül pedig májelégtelenséghez vezethet [3].

Az EFSA szakértőinek állásfoglalása alapján az aflatoxinok kockázatbecslésének sarkalatos pontja annak értékelése, hogy ezeknek a toxinoknak mekkora szerepük van a májrak kialakulásában. Ebből a szempontból különösen érzékenyek az aflatoxinokra a gyermekek, akiknek kis testtömegük miatt magasabb az egy testtömeg kg-ra jutó élelmiszer bevitel, illetve magasabb a májrak kialakulásának kockázata a hepatitisz B (vagy C) vírussal fertőzött egyének és az idősek esetében. Az olyan területeken élő emberekben, ahol a hepatitisz B vírus (HBV) fertőzés és az aflatoxin expozíció is gyakori, a hepatocelluláris karcinoma-minták (HCC-minták) mutációs (G-T transzformációt) hotspotot mutatnak a p53 gén 249. kodonjánál, amely mutációt az aflatoxin által kiváltott HCC ismertetőjelének tartanak [37]. Ennek valószínűsíthető oka, hogy a máj hepatitisz-fertőzése megváltoztatja az aflatoxinokat méregtelenítő enzimeket kódoló gének expresszióját eredményezi

– például a CYP enzimek indukcióját vagy a GST aktivitásának csökkenését okozza –, ezáltal a szervezet nem képes az aflatoxinok megfelelő mértékű eliminációjára [35]. Az aflatoxinok immunszuppresszív hatása miatt kiemelten veszélyeztetettek a krónikus betegségben szenvedő idős személyek, mert az ő esetükben a sejtszintű javító mechanizmusok hatékonysága rosszabb, így az aflatoxinok eliminációja is alacsonyabb hatékonyságú. Kiemelendő, hogy az aflatoxin átjut a placentán, tehát a várandós nők aflatoxin expozíciója veszélyeztetheti a magzatot is [38].

2.3. A feldolgozás hatása az élelmiszerek aflatoxin tartalmára

Az aflatoxinok közös jellemzője, hogy stabilak, a feldolgozási hatásokkal, hőhatásokkal szemben ellenállóak. Ennek következménye, hogy jelenlétükkel a feldolgozott élelmiszerek esetében is számolni kell. Bizonyos feldolgozási lépések csökkenthetik a termények és a feldolgozott élelmiszerek mikotoxin koncentrációját például válogatás, tisztítás, őrlés, főzés, sütés, olajban sütés, pörkölés, konzerválás, pelyhesítés, lúgos főzés, nixtamalizáció (magháj puhítása fahamu vagy Ca-hidroxid használatával – a szerk.), extrudálás, fermentálás, de nem elegendők ahhoz, hogy az összes szennyeződést eliminálják, ezért kiemelkedően fontos a megelőzés szerepe az élelmiszerlánc legelső pontjain [20]. Az AFM1 szennyezés szempontjából lényeges például a takarmányok AFM1 szennyezettségének csökkentése betakarítás előtti és utáni biotechnikai módszerek, valamint toxinkötők alkalmazásával [4, 17].

A hőkezeléssel járó eljárások közül a hagyományos főzésnek és a sütésnek csekély hatása van a mikotoxin szennyezettségre, míg a magasabb hőmérsékletű tartományban végzett, esetleg száraz hő is alkalmazó módszerek [39] hatékonyabbak. A mikotoxinok bomlását fokozza a cukrok, például a glükóz jelenléte hőkezelés során [40].

A gabonafélék, például a kukorica nedves őrlése során az aflatoxin a következő arányban oszlik meg az őrlési frakciók között: áztató víz: 39-42%, rost: 30-38%, glutén: 13-17%, csíra, 6-10% és keményítő: 1%. Tehát a feldolgozott termékek összes aflatoxin szintje az áztató vízbe jutó hányaddal csökken. A kukorica száraz őrlése után a dara-, a korpa- és a lisztfrakciók az eredeti aflatoxin-mennyiség mindössze 6-10%-át tartalmazzák, a csíra- és a héjfrakciókba jut a legtöbb aflatoxin [20].

A rizs aflatoxin-szennyezése leggyakrabban a helytelen betakarítási, tárolási körülmények során alakul ki. A mikotoxinok elsősorban a rizs héjában és a korparétegben találhatóak. A hántolt barna rizs és a koptatással nyert fehér rizs a koptatás mértékével fokozatosan kisebb mértékben szennyezett [41].

A különböző hőkezelési eljárások, a pasztörizálás, a fagyasztás nincs számottevő hatással a tej, illetve tejtermékek aflatoxin tartalmára [42]. Néhány hőkezelési eljárás AFM1 csökkentő hatása számszerű értékekkel kifejezve: pasztörizálás: 7,6-12,9%-kal, forralás: 14,5-23,9%-kal [43], az UHT-kezelés: 32%-kal csökkenti a tej AFM1-szennyezettségét [44].

A tej vagy más folyékony halmazállapotú termékek AFM1 tartalmának csökkentésére különböző fizikai és kémiai eljárásokat alkalmaztak jó hatásfokkal: mikrohullámú sugárzás (52%) [43], membránszűrés (81%) [45], bioszűrés (81%) [46] centrifugálás és szűrés kombinációja (83%) [45], ózonos kezelés [47], adszorbensek használata (85-90%) [48, 49].

Intenzív kutatómunka folyik a mikroorganizmusok felhasználásával kapcsolatban. Biztató eredményt kaptak AFM1 szennyezettségének csökkentésére tejben *Saccharomyces cerevisiae* (90-93%) [50], *S. cerevisiae* + *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *B. lactis* (100%) [49], különböző élesztőgombák keveréke (65-69%) [51], hőkezelt *L. plantarum* (94,5%) [44], *L. bulgaricus* (58%) [52] és joghurtban *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* és *L. plantarium* törzsek [53] alkalmazásával. Élő mikrobák használata esetén megoldásra vár, hogy miként küszöbölhető ki az organoleptikus tulajdonságok kedvezőtlen megváltozása, amennyiben nem a hagyományos kultúrákat használják, és milyen módon távolítható el a termékből a kialakult tejsavbaktérium-AFM1 komplex [44].

3. A fogyasztók expozíciójának becsléséhez felhasznált adatok

Az expozíciót (g/ttkg vagy ng/ttkg) a fogyasztott élelmiszer (g/ttkg) és a benne mért szennyezőanyag koncentrációk (ng/kg) szorzata adja. A determinisztikus módszernél az átlagos (medián), esetenként egy felső percentilis (95,0; 97,5) értékeket szorozzuk össze. A számítás pontszerű becslést ad egy-egy konkrét értéket eredményezve [54, 55]. Finomabb becslést adnak a probabilitásztikus módszerek [56, 57], amelyeknél a bemenő adatok eloszlását vesszük figyelembe és így az expozícióra is egy eloszlást kapunk. Körültekintést érdemel a kimutatási határ (LOQ) alatti vizsgálati eredmények értékelése. Amennyiben az LOQ alatti minták aránya 50-80% közé esik, a „maximum likelihood becslés” (maximum likelihood estimate, MLE) adja a legjobb eredményt [58].

Bármelyik módszerrel történjen is a becslés, mindenképpen fontos számba venni az egyes számítási lépések bizonytalanságát, azok mértékét és ezek összesített hatásának tükrében értékelni a kapott eredményeket [59]. A számított bizonytalansági intervallum egy bizonyos konfidenciaszinttel, vagyis adott bizonyossággal

valószínűsíthető módon magában foglalja a valós értékeket [60]. A fogyasztó szervezetébe jutó szennyező-anyag-mennyiséget (EDI) a toxikológiai referencia érték(ek)hez hasonlítva állapítjuk meg a várható egészségügyi kockázat mértékét.

Mind a rövid, mind a hosszú távú expozícióbecslésnél érdemes megvizsgálni az adott élelmiszer-szennyező kombináció fogyasztásának szempontjából különösen érintett fogyasztói csoportokat, azon belül pedig összehasonlítani az átlagos fogyasztók és a „nagy fogyasztók” expozícióját [61].

3.1. Referencia értékek a kitettség értékeléséhez

A referencia érték a szennyező specifikus tulajdonságai szerint lehet a megengedhető napi bevitel (ADI, Acceptable Daily Intake), ideiglenesen tolerálható heti vagy havi bevitel (PTW/MI, Provisionally Tolerable Weekly/Monthly Intake), vagy akut referencia dózis (ARfD, Acute Reference Dose). Élelmiszerszennyezők esetén a referencia érték általában a tolerálható napi bevitel (TDI, tolerable daily intake). A küszöbérték (BMD, benchmark dose) az a legkisebb dózis nagyság, amelyet az illesztett dózis-hatás görbéből becsülnek, és amelyen egy előre kiválasztott hatásszint (ez a benchmark response – BMR) megfigyelhető, ami általában 5 vagy 10%-os emelkedést vagy csökkenést jelent a kontroll csoporthoz képest. A BMD alsó konfidencia értéke a BMDL [62]. Az aflatoxinok esetében az expozíciós tőrészhatár (MoE, Margin of Exposure) elemzése használatos a kockázat jellemzésére, mivel nem állapítható meg TDI vagy más toxikológiai referencia érték. Ilyen esetben a BMDL bizonytalansági faktorról módosított értékét viszonyítjuk a becsült kitettséghez. A szennyezőnek tulajdonítható kockázat a kitettség mértékének egyéb referencia értékhez viszonyított arányával is kifejezhető, ez a veszélyességi hányados (HQ, Hazard Quotient), vagy a veszélyességi index (HI, Hazard Index), amely ugyanazon célszervre vagy szervrendszerre ható anyagok veszélyességi hányadosainak összege. Általában kumulatív becsléseknél alkalmazzák [63].

Az EFSA a 4 µg/ttkg/nap BMDL₁₀ érték használatát javasolja viszonyítási pontnak az AFM1 kockázat jellemzéshez [29]. A kapott eredmények 10 000 alatt számítanak aggályosnak, a 10 000 vagy annál nagyobb MoE közegészségügyi szempontból csekély kockázatra utal.

Az AFM1 kockázatának jellemzésére, a veszélyességi index (HI) számításához a Kuiper-Goodmann által javasolt biztonságos dózis is alkalmazható (0,2 ng/ttkg/nap), amely az állatok 50%-ánál tumort okozó dózis és egy 50 000-es biztonsági faktor hányadosa [64].

A JECFA 2018-as számításai szerint [20] napi 1 ng/ttkg AFB1 bevitel esetén a májrák-kialakulás valószínűsége átlagosan 0,269 évente. 100 000 személyre vonatkoztatva a becslés 95%-os konfidencia intervallumának felső határa pedig 0,562/100 000 fő/év HBsAg+ (hepatitis B felszíni antigénre nézve pozitív) egyéneknél. HBsAg- (hepatitis B felszíni antigén-negatív) egyéneknél az átlag érték 0,017 rákos megbetegedés/év/100 000 fő, a becslés 95%-os konfidencia intervallumának felső határa 0,049/100 000 fő/év. Az AFM1-re vonatkozó becsült átlag értékek ennél egy nagyságrenddel alacsonyabbak: 0,027/100 000 fő HBsAg-pozitív, illetve 0,002/100 000 fő ng/ttkg/nap HBsAg-negatív egyének esetén [20].

A JECFA az aflatoxin expozícióval összefüggő hepatocelluláris carcinoma (HCC) kockázatát az **1. egyenlet** felhasználásával becsülte meg:

$$R_i = [(P_{HBV+} \times HBV+) + (P_{HBV-} \times (1-HBV+))] \times AF \text{ bevitel (1)},$$

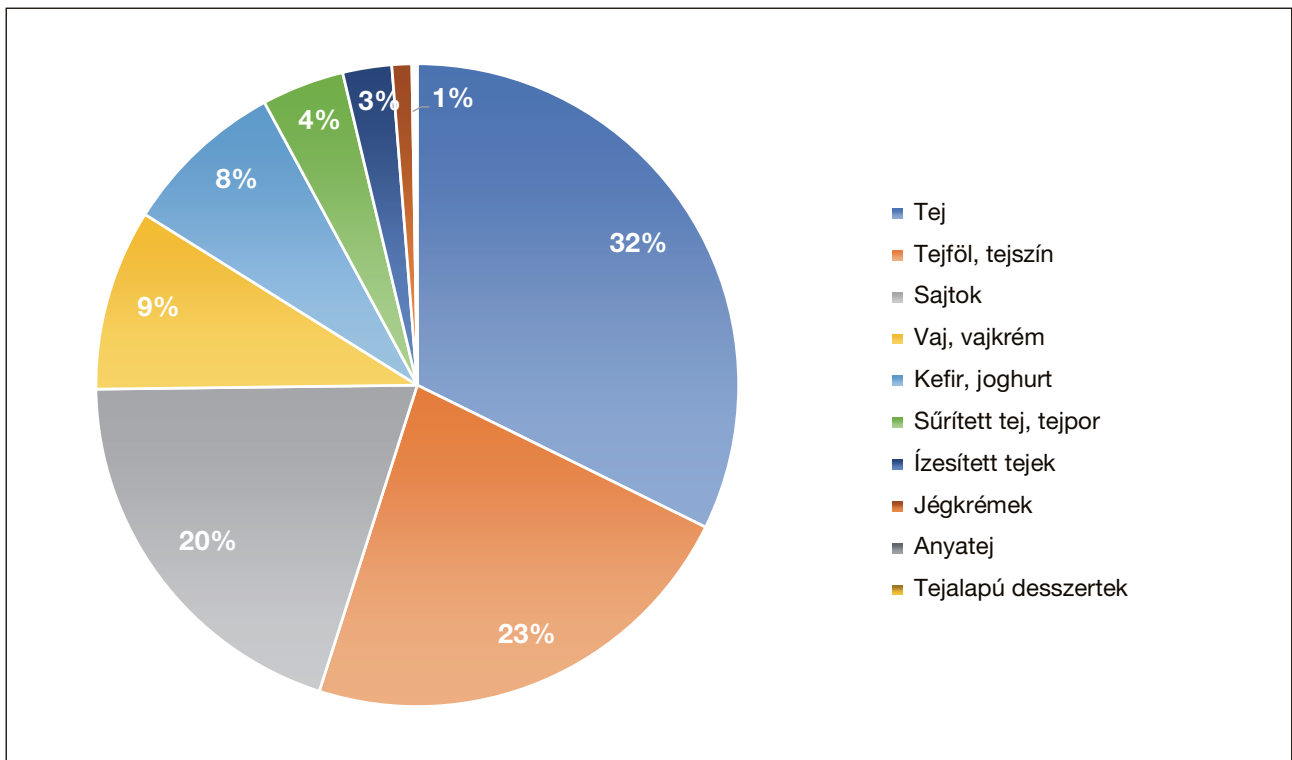
ahol R_i az i régióra vonatkozó HCC kockázat, $HBV+$ a vizsgált populációban a krónikus hepatitis B prevalenciája és P_{HBV+} a májrák kialakulásának a populáció e hányadára vonatkozó valószínűsége, P_{HBV-} pedig a populáció fennmaradó részében a májrák kialakulásának a valószínűsége.

3.2. Élelmiszerfogyasztási adatok

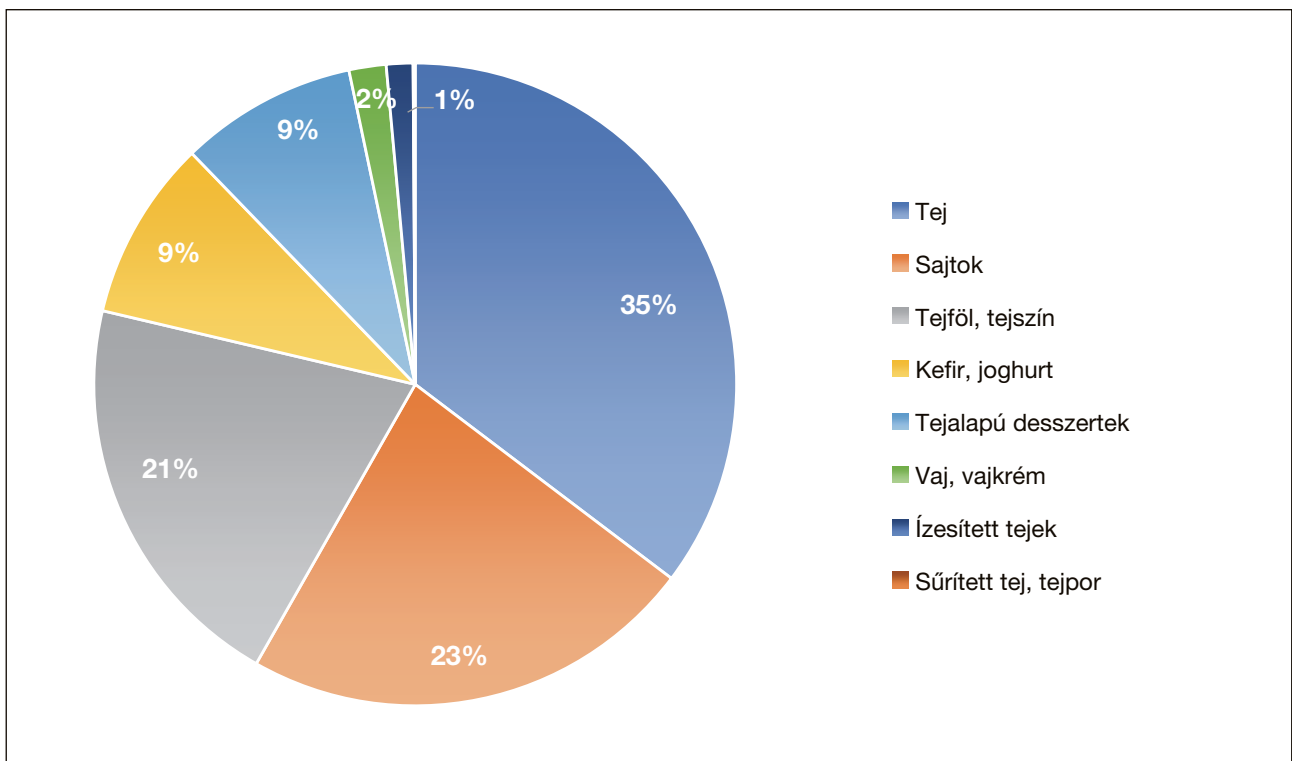
A számításokat két, 10 év különbséggel készült országos, reprezentatív élelmiszerfogyasztási felmérés adataival végeztük. A 2009. évi három napos felmérés során 4992 személy esetében összesen 14 976 fogyasztási nap – dietetikusok által feldolgozott és nyersanyagra lebontott – élelmiszerfogyasztási adatait szolgáltatja az élelmiszerfogyasztási szokások jellemzéséhez [65]. A tej és tejtermék fogyasztási napok arányát az **1. ábra** mutatja.

A 2009-es felmérés 14 976 fogyasztási napjából a tej-, tejföl-, tejszín-, sajt-, kefir- vagy joghurtfogyasztás gyakorisága [%] rendre 75,2, 52,8, 46,3, és 19,1 volt.

A 2018-2020-as felmérés az EFSA egész Európára kiterjedő EU MENU, avagy „Mi van terítéken Európában?” projektjének keretében az ajánlott, egységes módszertannak megfelelően valósult meg [66, 67]. A résztvevő személyeket a KSH *Háztartási költségvetési- és életkörülmények* adatfelvételben résztvevő háztartásokból választották ki. A program során 2657, 1 és 74 év közötti személy két fogyasztási napját rögzítették dietetikusok segítségével. Az 5314 fogyasztási napon a tej-, tejföl-, tejszín-, sajt-, kefir- vagy joghurtfogyasztás gyakorisága [%] 96,8, 54, 60,6 és 24 volt. A tej és tejtermék fogyasztási napok arányát a **2. ábra** mutatja.



1. ábra. A 2009-es felmérésben a tej és tejtermék fogyasztási napok aránya élelmiszercsoportonként



2. ábra. 2018-2020-as felmérésben a tej és tejtermék fogyasztási napok aránya élelmiszercsoportonként

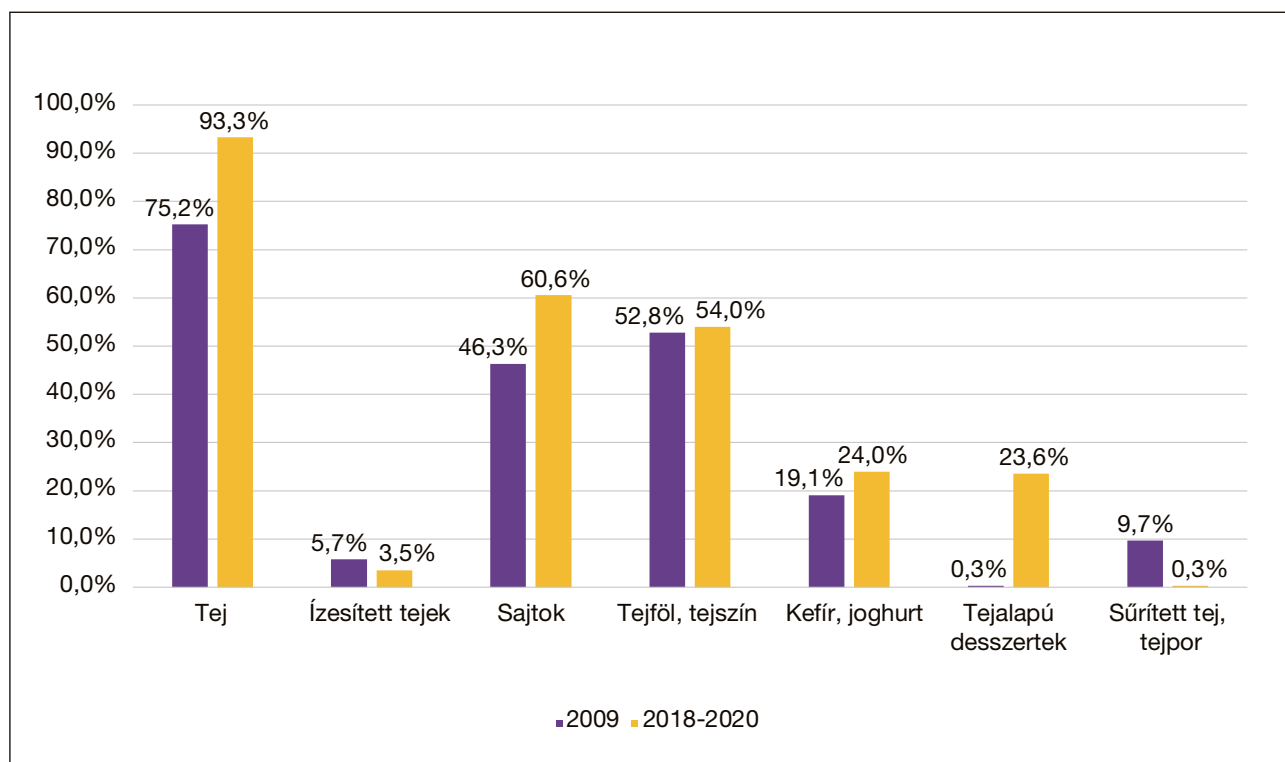
A fogyasztók korcsoportonkénti megoszlását a **2. táblázat** tartalmazza.

2. táblázat. A 2009-es és a 2018-2020-as élelmiszerfogyasztási felmérés korcsoportjai és a tejterméket fogyasztók száma és aránya korcsoportonként

Korcsoport	Kor (év)	Fogyasztók 2009 (fő)	Tejtermék fogyasztók 2009		Fogyasztók 2018-2020 (fő)	Tejtermék fogyasztók 2018-2020	
			fő	%		fő	%
Csecsemők	0,0-0,9	26	-	-	0	0	0
Tipegők	1,0-2,9	90	90	100	535	482	90
Gyermekek	3,0-9,9	324	324	100	537	536	100
Serdülőök	10,0-17,9	494	487	98	528	525	99
Felnőttek	18,0-64,9	3360	3297	98	529	515	97
Idősek	65,0-	698	691	99	527	509	96
Összesen		4966	4889	98	2654	2567	97

A tej és a különböző tejtermékek fogyasztási gyakoriságának változását a 2009-es és a 2018-2020-as élelmiszerfogyasztási felmérések tej és tejtermék fogyasztási napjainak segítségével hasonlítottuk össze. A különböző élelmiszerek fogyasztási napjainak számát az adott felmérés összes fogyasztási napjához viszonyítottuk (**3. ábra**). Az ábra a vizsgált felmérési időszakokban a különböző élelmiszerek fogyasztásának előfordulási gyakoriságát jellemzi. A vizsgált élelmiszerkategóriák közül a tej és a tejalapú desszertek fogyasztási gyakorisága több mint 20%-kal nőtt. A sajtok fogyasztási gyakorisága 14%-os emelkedést mutatott. A savanyított tejtermékek (kefir, joghurt, tejföl), a tejszín és az ízesített tejek fogyasztási gyakorisága közel állandó maradt (előbbiekké kissé nőttek, utóbbiak némileg csökkentek). A sűrített tej és tejpor fogyasztási gyakorisága jelentősen csökkent. Összességében megállapítható, hogy a tej és tejtermékek fogyasztási gyakorisága az elmúlt 10 év alatt kissé emelkedett.

A fogyasztási gyakoriságok 10 év alatt bekövetkező változásából kiindulva az aflatoxin expozíció növekedésére lehetne számítani, azonban ezt a hatást a fogyasztási mennyiségek változása ellensúlyozta. A feldolgozási és a feldúsulási faktorok medián értékével számított, tej ekvivalensben kifejezett átlagos fogyasztási mennyiség 2009-ben még 310,7 g/nap volt, ez az érték 2018-2020-ban 295,3 g/napra csökkent.



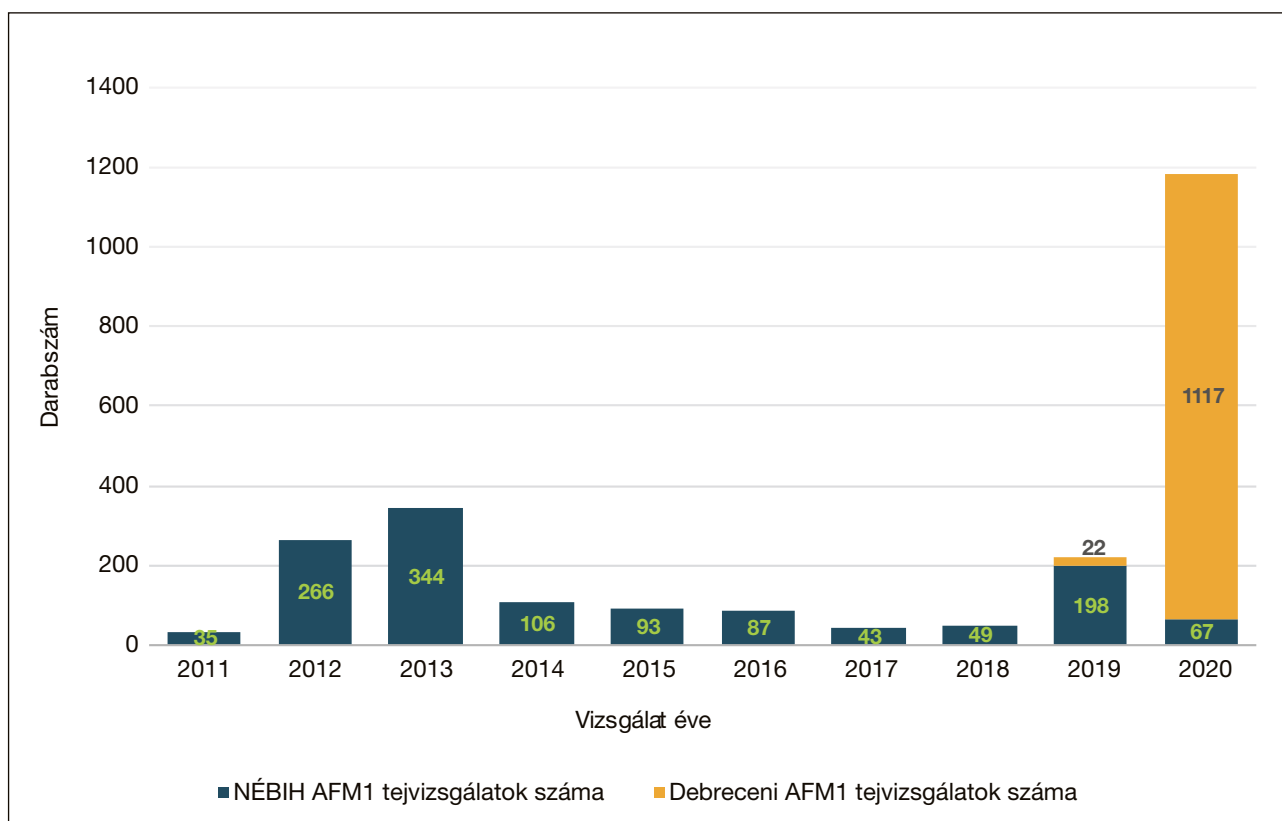
3. ábra. A fogyasztási napok aránya az összes fogyasztási naphoz viszonyítva; A különböző élelmiszercsoportok fogyasztási gyakoriságának változása a 2009-es és a 2018-2020-as élelmiszerfogyasztási felmérés eredményei alapján

A feldolgozott tejtermékekben az AFM1 koncentrációkra nagyon kevés adat állt rendelkezésre, ezért a savanyított tejtermékekre (például kefir, joghurt, tejföl), valamint a különböző sajtokra (kemény, félkemény, lágy és feldolgozott sajtok, friss sajtok) vonatkozó AFM1 feldolgozási és feldúsulási faktorok adatbázisát a legfrissebb szakirodalmi adatok alapján összeállítottuk és ezen termékek fogyasztott mennyiségeinek tej ekvivalensével számítottuk a fogyasztók expozícióját.

3.3. Aflatoxin koncentráció adatok

Az AFM1 vizsgálati adatok részben a NÉBIH 2011-2020 közötti országos monitoring felméréséből származnak (1288 db). A minták 40%-a tartalmazott mérhető mennyiségű AFM1-et. A mérések zömét tejtermelő gazdaságok és magántermelők termékéből, kis arányban pedig boltokban kapható elegytejből vett mintákból, ELISA és HPLC módszerrel végezték. A nagyszámú LOQ alatti (60%) szennyezést mutató tételek mellett az átlaghoz viszonyítva nagyon magas szennyezettségű tételek is előfordultak. A 100 ng/kg feletti értékek rendre: 110, 122, 141, 149, 150, 190, 238, 240, 252, 260, 292, 376, 513, 740 és 860 ng/kg. Az eredmények realitását nem volt módunk ellenőrizni, de nem láttunk okot a kihagyásukra sem, ezért a teljes adatsort felhasználtuk a további számításainkban. További 1177 minta vizsgálatára a Debreceni Egyetem és a NÉBIH „A magyar fogyasztók rövid és hosszútávú aflatoxin terhelésének meghatározása a tejtermékláncban és a kockázatkezelő intézkedések megalapozása” című közös projektjének keretében 2021 januárjáig került sor. Az utóbbi esetben a projektben közreműködő 9 tehenészeti telepről származó tejet a tejipari vállalat munkatársai által közvetlenül a szállító tankerből vett mintákban, 2019-2021 között, a Debreceni Egyetem Műszerközpont laboratóriuma ELISA módszerrel vizsgálta. A 20 ng/kg „cselekvési szintet” meghaladó mintákban a pontos AFM1 koncentrációt a NÉBIH laboratóriumában HPLC vizsgálattal erősítették meg. Az LOQ fölötti minták száma 672 (57,1%). A 20 ng/kg koncentrációt meghaladó minták esetén a tejtermelő gazdaságot értesítették, javasolva a megfelelő megelőző intézkedések megtételét. Ezen beavatkozás eredményeként sikerült a tej szennyezésének emelkedését megállítani és a termelt tej AFM1 szennyezését az 50 ng/kg szint alatt tartani. A részletes eredményekről a projekt zárójelentésében számolunk be.

A vizsgált tejminták számát évenkénti bontásban a **4. ábra** mutatja.



4. ábra. A NÉBIH országos felmérésből és a közös projektben résztvevő tejtermelő gazdaságokból származó minták éves vizsgálati száma

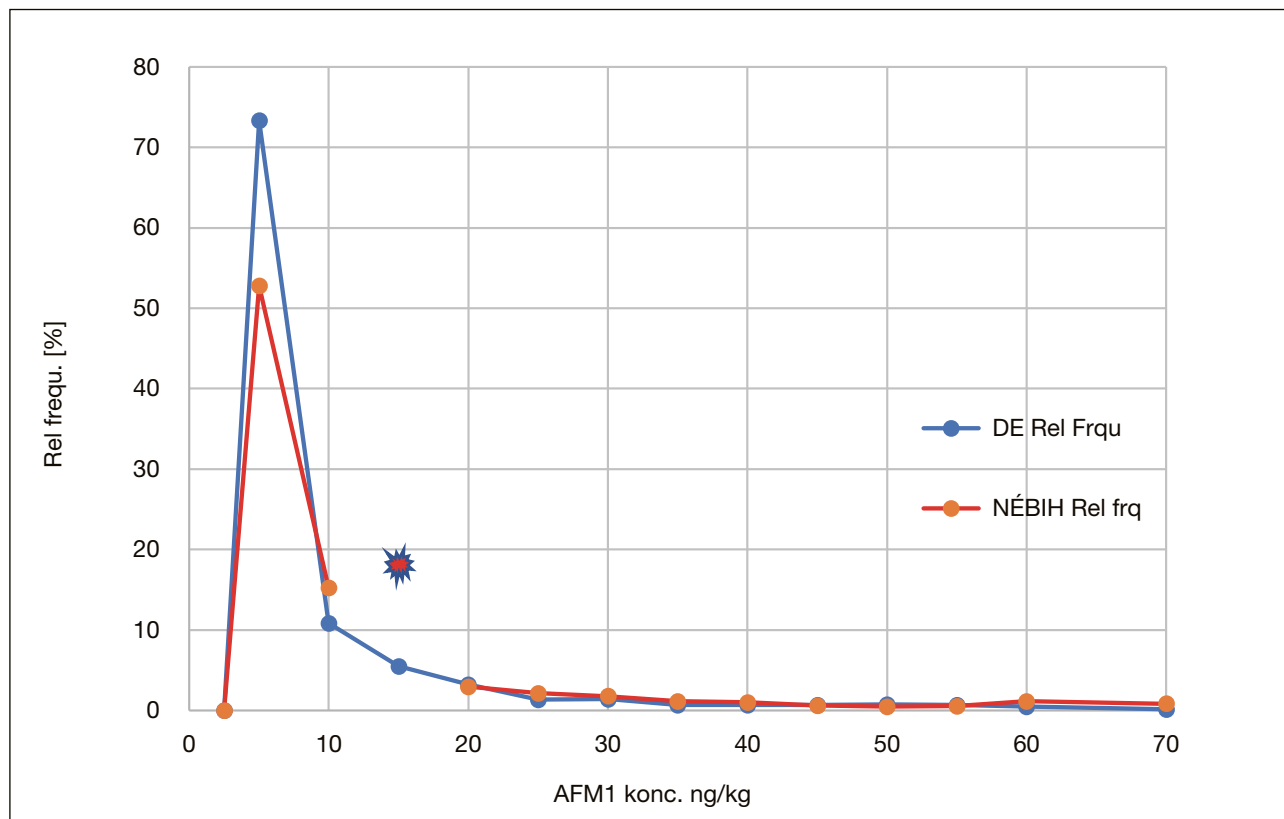
A becslésünk finomítására, a nagyarányú LOQ alatti értékek kompenzálására a szokásos LOQ, LOQ=0 és LOQ/2 közelítések helyett a koncentráció adatok LOQ alatti értékeit a mérési eredmények számával megegyező elemű, eloszlás segítségével generált adatok értékével is figyelembe vettük. Az LOQ feletti mérési eredményekre az R statisztikai szoftver maximum likelihood becslést alkalmazó GAMLSS és GAMLSS. dist csomagjainak használatával különböző eloszlásokat illesztettünk, majd az illeszkedés jóságát leíró paraméterek (AIC – Akaike’s Information Criterion, BIC – Bayesian Information Criterion és teljes eltérés – Global Deviance) segítségével kiválasztottuk az optimális illesztést adó eloszlásokat. Az illesztések megfelelőségét az adatokból készített hisztogram és a kapott eloszlás vizuális összevetésével, valamint az eltérések normalitás vizsgálatával és Q-Q plot segítségével is kiértékeljük. A két legjobban illeszkedő eloszlás a két paraméteres lognormális (6. ábra) és a négy paraméterrel jellemezhető Box-Cox t-eloszlás (BCT) (7. ábra) volt, amely alkalmas az aflatoxinokhoz hasonló, pozitív vagy negatív torzulást mutató, lassan lecsengő, folyamatos eloszlással jellemezhető adatok modellezésére [68, 69]. Az expozíció számításokat az LOQ=5 feltételezéssel generált lognormál eloszlással végeztük. A kiválasztott eloszlásokat ezt követően a teljes AFM1 adatsorra illesztettük, a kiértékelést újra elvégeztük. Tekintve, hogy az illesztés jóságát leíró paraméterekben pozitív változást figyeltünk meg, a választott eloszlásokat elfogadhatónak ítéltük.

Az AFM1 vizsgálati eredmények és az illesztett eloszlás leíró statisztikáit a 3. táblázat foglalja össze.

3. táblázat. A számításokhoz felhasznált AFM1 vizsgálati eredmények (ng/kg) leíró statisztikája

	DE	NÉBIH	Összes	LogLOQ5
Darab	1177	1176	2465	2465
Minimum	2,90	3,00	2,90	0,50
P0,05	2,90	3,00	2,90	1,60
Medián	3,17	7,00	4,19	3,80
Átlag	6,96	15,3	10,9	9,66
P=0,975	42,0	68,5	56,0	55,4
Maximum	71,0	860	860	860

A NÉBIH és a DEE vizsgálati eredményeinek relatív gyakorisági eloszlását az 5. ábra mutatja.



5. ábra. A NÉBIH ellenőrzési programjában és a DE-NÉBIH együttműködés keretében vett tejminták AFM1 szennyezésének relatív gyakorisági eloszlása

A 10-15 ng/kg tartományba eső NÉBIH mérési eredmények kiugró értékének (kék keretes piros csillaggal jelölve) kivételével az AFM1 koncentrációk gyakorisága az LOQ-70 ng/kg tartományban a két méréssorozatban nagyon hasonló és indokolja a mérési eredmények együttes értékelését. A 70 ng/kg koncentráció feletti AFM1-et tartalmazó minták relatív gyakorisága a NÉBIH vizsgálatainál <0,5%.

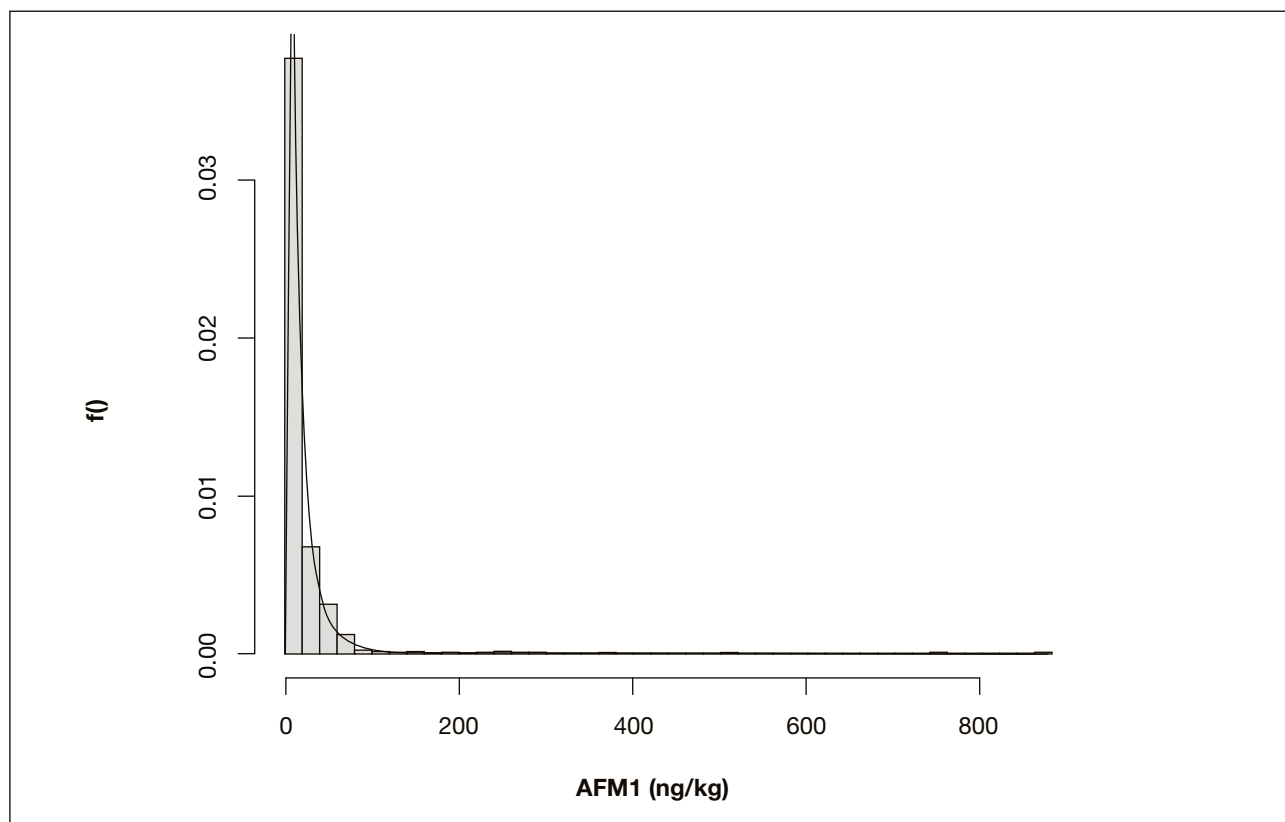
Az aflatoxinok kockázatbecslése szempontjából limitáló tényező a szennyező adatok hiánya volt. Az EFSA ajánlása [29] alapján ki kell zárni azokat az élelmiszer kategóriákat, amelyek esetében a pozitív minták száma nem haladja meg a 25-öt, vagy a meghatározási határ alatti minták aránya nagyobb, mint 80%. Az AFM1 eredmények tekintetében csak a tejvizsgálatok feleltek meg ennek a kritériumnak (**4. táblázat**), a feldolgozott tejtermékek vizsgálatának száma igen csekélynek bizonyult.

4. táblázat. A vizsgált minták száma és az >LOQ értékek %-os aránya

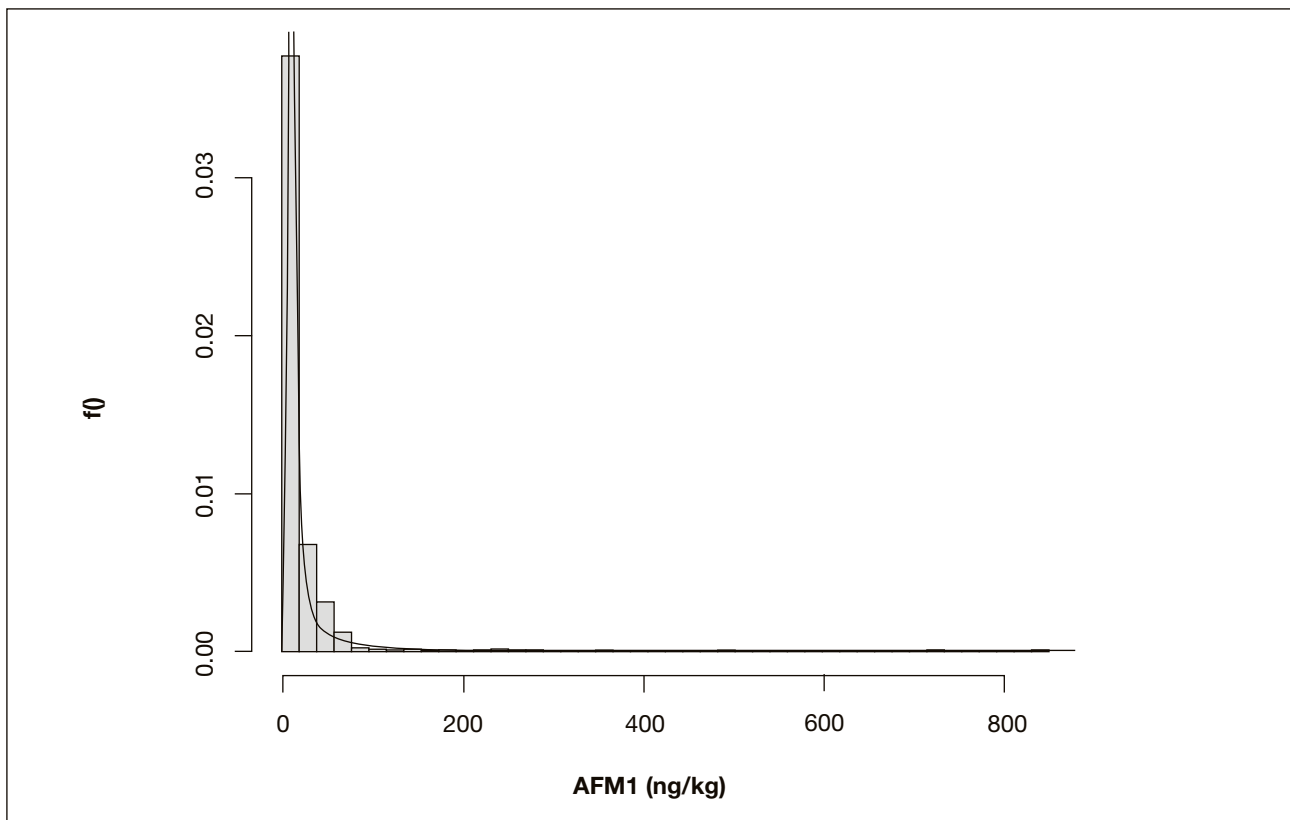
	Tehéntej	Egyéb tej	Tápszer ¹	Sajt, túró	Joghurt, kefir	Egyéb ²
Mintaszám	1288	61	193	30	28	12
>LOQ [%]	25	16,4	0	6,7	0	0

¹: Tápszer: csecsemőtápszer és egyéb kisgyermek élelmiszer

²: Tejalapú élelmiszer



6. ábra. A tejben mért LOQ feletti AFM1 koncentráció eredményekre illesztett lognormális eloszlás



7. ábra. A tejben mért LOQ feletti AFM1 koncentráció eredményekre illesztett Box-Cox t-eloszlás

4. A fogyasztók expozíciója

Az élelmiszerfogyasztási adatok esetében a hosszútávú becsléshez ajánlott OIM (Observed Individual Means, megfigyelt egyéni átlag) módszert alkalmaztuk. Először valamennyi tej és tejtermék fogyasztási adatot átszámítottuk tej ekvivalensre, az adott élelmiszerkategóriára jellemző dúsulási és feldolgozási faktorok segítségével (2. és 3. egyenlet).

Az e_1, \dots, e_j élelmiszerek g/ttkg-ban kifejezett bevitel (B) adott (n) fogyasztási napon, tej ekvivalensben kifejezve:

$$B_n = \frac{\sum_{e=1}^j (m_e \times F_e)}{ttkg_n} \quad (2),$$

ahol

m_e = a fogyasztott e élelmiszer tömege (g) n_i fogyasztási napon,

F az e élelmiszere vonatkozó feldolgozási (például dúsulási) faktor,

$ttkg$ az adott fogyasztási naphoz tartozó személy testtömege,

$$F = \frac{C_{AFM1e}}{C_{AFM1tej}} \quad (3),$$

ahol az e élelmiszer készítéséhez felhasznált tejben a feldolgozott élelmiszerben az AFM1 koncentráció.

Az F_e a kísérletekben kapott min., med., max. eredményekből számított érték.

A g/ttkg/napban kifejezett fogyasztott mennyiségeket megszorozva az illesztett eloszlásfüggvények értékeiből számított átlag AFM1 koncentrációval (ng/kg), megkaptuk az egyes fogyasztási napokra vonatkozó expozícióértékeket (ng/kg ttkg/nap). A fogyasztásban résztvevő személyek – a 2018-2020-as felmérés esetében 2, a 2009-es felmérés esetében 3 – fogyasztási napjaihoz tartozó beviteli értékeket átlagoltuk. Az eredményeket fogyasztói korcsoportonként összesítettük és mindkét élelmiszerfogyasztási felmérés adataival kiszámoltuk a fogyasztók expozícióját.

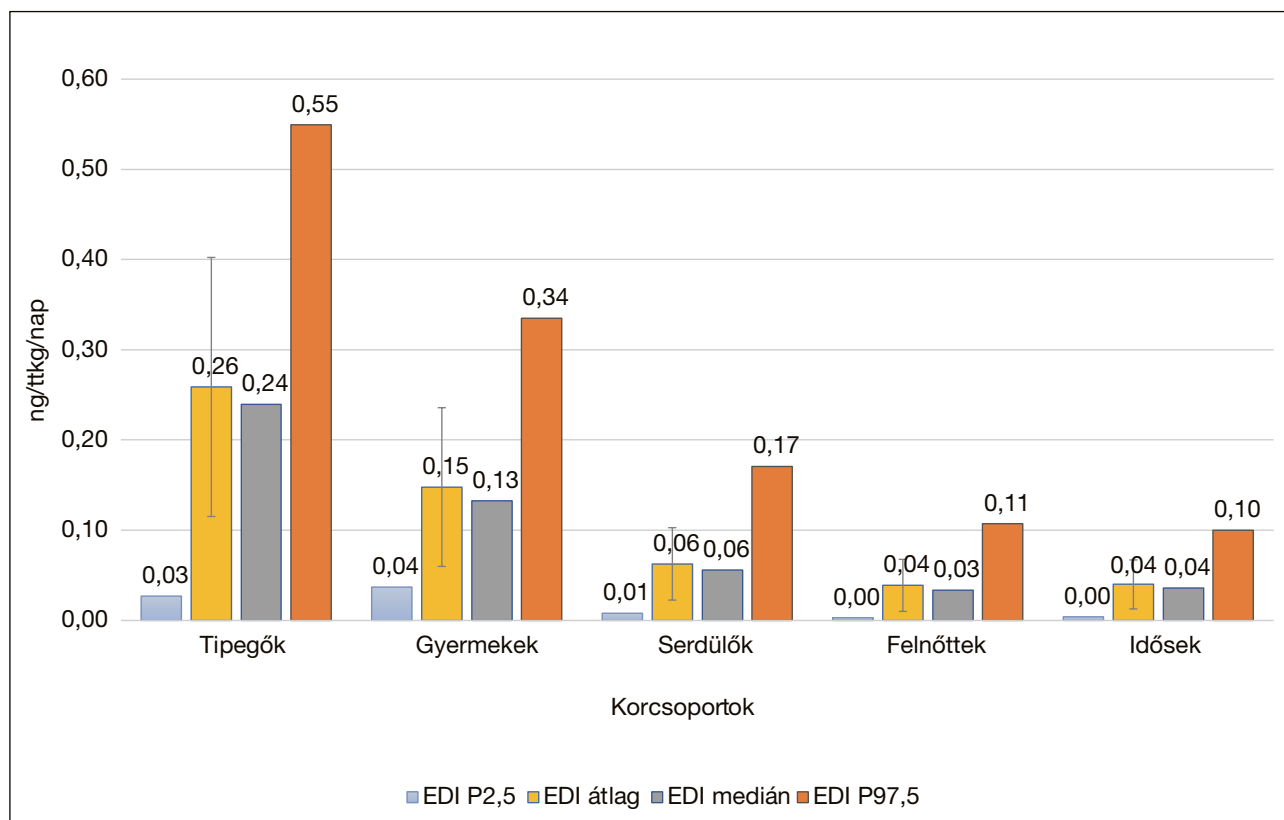
Először a feldolgozási faktorok minimum (F_{\min}), medián (F_{med}), maximum (F_{\max}) értékeinek hatását vizsgáltuk az expozícióbecslés eredményére. A számítást az illetékt lognormális AFM1 átlag adatokkal, valamint 2018-2020-as felmérés átlagos ($EDI_{\text{átl}}$) és 97,5. percentilis ($EDI_{0,975}$) tejfogyasztási értékeivel végeztük. Az eredményeket az **5. táblázatban** foglaltuk össze. A táblázat a determinisztikus módszerrel számított átlag és 97,5. percentilis eredmények közötti különbségeket szemlélteti a 2018-2020-as (EU MENU) felmérés alapján.

5. táblázat. A különböző korcsoportok becsült napi együttes tej és tejtermék fogyasztása a tejtermékek feldolgozási faktorainak a függvényében

	Típegők	Gyerekek	Serdülők	Felnőttek	Idősek
$EDI_{\text{átlag}} (F_{\min})$	0,16	0,12	0,05	0,03	0,03
$EDI_{\text{átlag}} (F_{\text{med}})$	0,19	0,14	0,06	0,04	0,03
$EDI_{\text{átlag}} (F_{\max})$	0,21	0,15	0,07	0,04	0,03
$EDI_{0,975} (F_{\min})$	0,54	0,36	0,14	0,10	0,08
$EDI_{0,975} (F_{\text{med}})$	0,55	0,39	0,15	0,11	0,09
$EDI_{0,975} (F_{\max})$	0,56	0,40	0,16	0,12	0,10

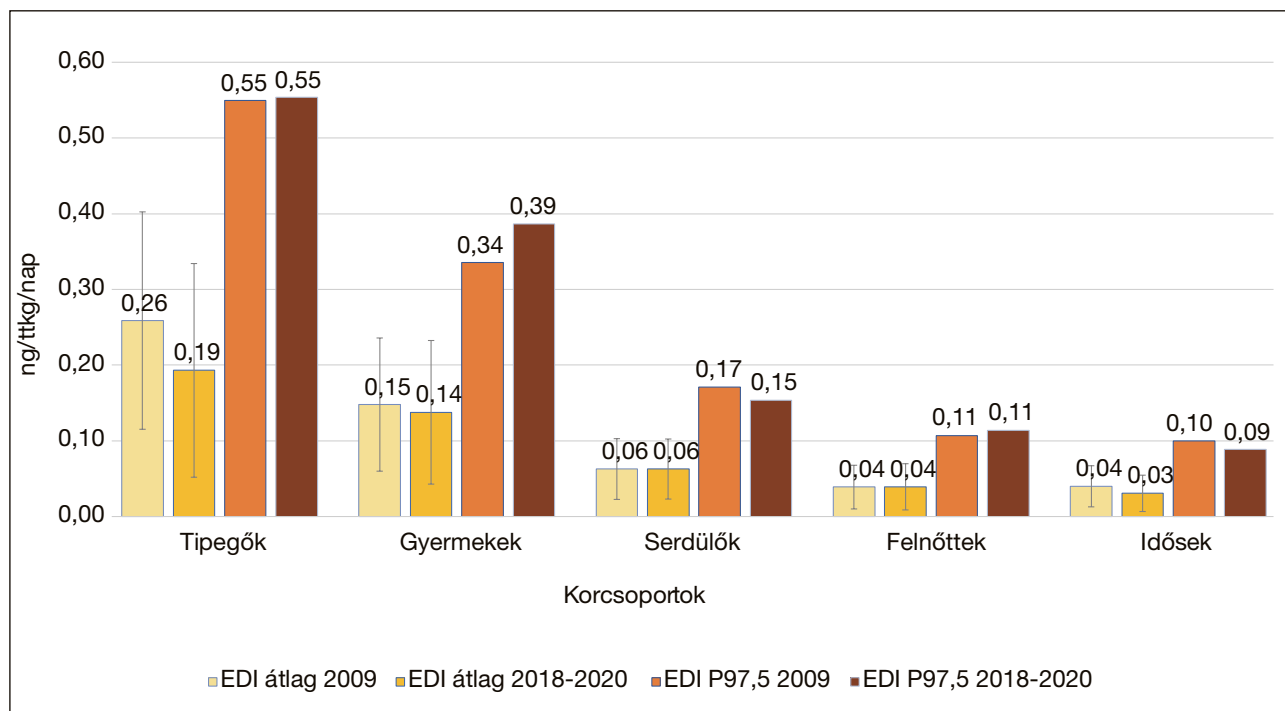
A feldolgozási faktorok minimum-medián-maximum értékeinek figyelembevétele nem befolyásolta számottevően az eredményeket. Szignifikáns különbség csak a típegők korcsoportjának átlag értékeinél, a minimum és medián faktorok esetében adódott, ezért a továbbiakban a különböző expozícióbecslési eredmények bemutatásához a feldolgozási és feldúsulási faktorok mediánjával számolt értékeket használjuk.

A különböző korcsoportok expozícióját a 2009-es élelmiszerfogyasztási felmérés P0,05, átlag, medián és P0,975 percentilis becsült napi beviteli értékek (EDI), a medián feldolgozási faktorok és az AFM1 koncentráció adatok átlaga alapján számítottuk. A különböző fogyasztói korcsoportok expozícióját a számított EDI alapján hasonlítottuk össze (**8. ábra**).



8. ábra. Becsült napi beviteli értékek (ng/ttkg/nap), determinisztikus becslés; Különböző korcsoportok P0,025, átlag, medián és P0,95 EDI értékeinek összehasonlítása a 2009-es fogyasztási adatok alapján

A 2018-2020-as felmérés korcsoportjainak becsült napi beviteli értékei a 2009-es adatokhoz hasonló tendenciát mutatnak (9. ábra).



9. ábra. Becsült napi beviteli értékek (ng/ttkg/nap), determinisztikus becslés;
A különböző korcsoportok P0,025, átlag, medián és P0,95 EDI értékeinek összehasonlítása
a 2009 és 2018-2020-as fogyasztási adatok alapján

Mind az átlag, mind a 97,5. percentilis becsült napi beviteli értékeket összehasonlítva azt láthatjuk, hogy az egyes korcsoportok expozíciója az elmúlt 10 évben többnyire állandónak bizonyult. Szembetűnő különbség csak a tipegők korcsoportjának átlagértékei és a gyermekek korcsoportjának 97,5. percentilis értékei között figyelhető meg, de a különbségek nem szignifikánsak. A 2009-es felmérés tipegők korcsoportjának elemszáma nagyon alacsony (90 fő) a 2018-2020-as felméréshez (482 fő) viszonyítva. A kisebb elemszámmal számított értékek nagyobb bizonytalansággal terheltek.

4.1. A fogyasztói expozíció értékelése

A kapott expozíció értékek alapján a magyar lakosság kockázatának értékelésére az expozíciós túrérték (Margin of Exposure, MoE) megközelítést (**3. egyenlet**), a veszélyességi indexet (hazard index, HI) (**4. egyenlet**), valamint a AFM1 bevitelnek tulajdonítható májrák-előfordulás valószínűségének növekedését alkalmaztuk. A MoE módszerhez az AFM1-re vonatkozó BMDL₁₀=4 µg/ttkg/nap értéket vettük figyelembe:

$$MoE = \frac{BMDL_{10}}{EDI} \quad (4).$$

A fogyasztók expozíciója akkor tekinthető kockázatosnak, ha a MoE értéke <10.000. A 2018-2020 élelmiszerfogyasztási felmérés fogyasztási adataiból determinisztikus becsléssel számított kitétségi értékek MoE értékeit a **6. táblázat** mutatja.

6. táblázat. Az átlagos és nagy fogyasztók (97,5. percentilis) MoE értékei korcsoportonként

	Tipegők	Gyermekek	Serdülők	Felnőttek	Idősek
MoE EDI átlag	20722	29056	63779	101949	130605
MoE EDI P0,975	7179	10353	26059	35082	45182

Az egészségügyi kockázatot kifejező határ (10 000) alatt csak a tipegők, és gyermekek „nagy fogyasztói” (97,5 percentilis) korcsoportjai érik el, illetve közelítik. A többi korcsoport esetében ezzel a kockázatjellemzési metodikával nem állapítható meg jelentős kockázat.

A veszélyességi index számítására a Kuiper-Goodmann által javasolt [59] biztonságos dózist alkalmaztuk (0,2 ng/ttkg):

$$HI = \frac{EDI \text{ (ng ttkg}^{-1}\text{)}}{0,2 \text{ ng ttkg}^{-1}} \quad (5).$$

A veszélyességi index (HI) számítása esetében a kockázat mértéke az EDI értékekkel egyenesen arányos és 1 vagy annál nagyobb értékek esetén minősül aggályosnak. Példaként a 2018-2020-as élelmiszerfogyasztási felmérés fogyasztási adataival végzett determinisztikus becslések eredményeit korcsoportonként a **7. táblázat** tartalmazza.

7. táblázat. A különböző korcsoportok EDI értékeiből számított veszélyességi indexek (HI)

	Tipegők	Gyermekek	Serülők	Felnőttek	Idősek
HI Átlag	1,0	0,7	0,3	0,2	0,2
HI P0,975	2,8	1,9	0,8	0,6	0,4

Megjegyzés: Az egészségügyi kockázatot jelentő HI értékeket félkövér számok jelzik

A korcsoportok becsült napi beviteli értékeinek átlagából és 97,5. percentilis értékeiből számított HI értékek azt mutatják, hogy a serülők, a felnőttek és az idősek korcsoportjának kitétségből adódó kockázat nem minősül aggályosnak. Azonban a tipegők és gyermekek esetében a 97,5. percentilis értékek (nagy fogyasztók) esetében az expozíció jelentősen meghaladja a biztonságosnak tekinthető szintet. A fenti eredmények közül az egyik legfontosabb a tipegők átlagos bevitelét jellemző 1-es HI érték, mivel ez arra enged következtetni, hogy ennek a korosztálynak a jelentős hányada egészségügyi szempontból aggályos mértékű AFM1 expozíciónak van kitéve.

A májrák aflatoxin expozícióval összefüggő incidenciáját, 0,7%-os magyar hepatitis B prevalenciát [70] feltételezve az 1-es egyenlettel számítottuk. A számításokat a májrák-kialakulás valószínűségének az átlagos és a felső 95%-os konfidencia értékével is elvégeztük:

$$\text{Átlag } R_{Mo} = [(0,0269 \times 0,007) + (0,0017 \times 0,993)] \times EDI,$$

$$CI_{,95} R_{Mo} = [(0,0562 \times 0,007) + (0,0049 \times 0,993)] \times EDI.$$

A 2018-2020 élelmiszerfogyasztási felmérés fogyasztási adataiból determinisztikus (DET) becsléssel számított AFM1 expozíció értékek átlag és 97,5. percentilis eredményeiből származtatott, aflatoxin kitétségnek tulajdonítható májrák incidencia (HCCi) értékeket (megbetegedés/100 000 fő/év) korcsoportonként a **8. táblázatban** foglaltuk össze.

8. táblázat. Májrák incidencia EDI függvényében korcsoportonként

	Tipegők	Gyermekek	Serülők	Felnőttek	Idősek
R (EDI átlag)	0,00036	0,00026	0,00012	0,000074	0,000057
R (EDI átlag, CI0.95)	0,0010	0,00072	0,00033	0,00021	0,00016
R (EDI 0.975)	0,00083	0,00062	0,00025	0,00018	0,00014
R (EDI 0.975, CI0.95)	0,0023	0,0017	0,00069	0,00050	0,00039

A HCC kialakulásának kockázatát az aflatoxin-kitétség a krónikus hepatitis B előfordulása mellett a sokszorosára növeli. Mivel a hepatitis B prevalenciája Magyarországon (és általánosságban Európában) alacsony, az aflatoxin indukált HCCi növekedése sem mutat magas értékeket. Ugyan a becsült májrák incidenciák számszerű értéke nagyon alacsonynak bizonyult, a **8. táblázat** egymáshoz viszonyított értékei ebben az esetben is megmutatják a tipegők és a gyermekek „nagy fogyasztóinak” kiemelt kockázatát a többi korcsoporthoz viszonyítva.

5. Helyzetértékelés, javaslatok

A determinisztikus módszerrel számított AFM1 krónikus expozíció különböző referenciaértékekhez viszonyítva egybehangzóan azt jelzi, hogy a vizsgált korcsoportokban az 1-3 éves gyermekek kitétsége a legmagasabb. Legalacsonyabb kitétségi értékek a legidősebb korcsoportok esetében figyelhetők meg. Adathiány miatt nem lehetett a <1 éves csecsemők expozícióját vizsgálni. Az összefüggés azonban nem közvetlenül a kor és a beviteli mennyiségek, hanem az idősödő korcsoportok (jellemzően növekvő) testtömegében megfigyelhető változás és a bevitt mennyiségek között van.

Tekintve, hogy az aflatoxinok toxicitása elsődlegesen a fejlődő szervezeteknél jelent egészségügyi kockázatot, különös figyelmet kell fordítani az expozíciójuk csökkentésére, lehető legalacsonyabb szinten tartására. Hangsúlyozzuk azonban, hogy a rákkeltő vegyületek jelenlétét minden korcsoportban a lehető legalacsonyabb szinten kell tartani.

A szervezetet nem csak az anyatej és egyéb tej vagy tej alapú készítmény AFM1 szennyezése terheli, hanem az egyéb élelmiszerekkel bevitt, az AFM1-nél közel 10-szer toxikusabb AFB1 is. Mivel a hatásmechanizmusuk azonos, az aflatoxinok és az AFM1 hatása összeadódik. Ezért figyelni kell az élelmiszereink minőségére, a felbontott csomagolású termékek tárolási körülményeire. A dohos szagú, penésznyomokat mutató termékeket fogyasztani még főzés, sütés után sem szabad. Az éves monitoring vizsgálatok során mért, a jogszabályban eltűrhető maximális szintet 10-15-ször meghaladó szennyezettségű tejek is forgalomba kerülnek. Különösen veszélyeztetett csoportba tartoznak azok a személyek, akik rendszeresen olyan, azonos forrásból származó tejet fogyasztanak, ahol az állatokat aflatoxinnal szennyezett takarmánnyal etetik.

A mai napig nincs olyan rutinszerűen és ipari szinten, nagy tételben alkalmazott eljárás, amellyel megbízhatóan és tökéletesen lehet eliminálni az élelmiszerek aflatoxin tartalmát, ezért a hangsúly továbbra is a szennyeződés megelőzésén van. Ez egy komplex, az élelmiszerlánc valamennyi szereplőjének közreműködését igénylő feladat, amely a jó mezőgazdasági gyakorlatok alkalmazásával, a termőföldek megfelelő előkészítésével és kezelésével kezdődik. Ezt követi a penészgombáknak ellenálló hibridek kiválasztása, a termények aratása, szállítása és tárolása során tett intézkedések sora, amelyek megakadályozhatják a penészgombák elszaporodását (megfelelő hőmérsékleti és nedvességi szintek beállítása, a termények átválogatása, hántolása, fizikai kezelése). Nem utolsó sorban a takarmányozásra szánt gabonák, szilázs vagy más feldolgozott takarmány-készítmények megfelelő tárolása, kezelése és aflatoxin tartalmának ellenőrzése, szükség szerint fizikai, kémiai vagy biológiai detoxifikálása [4].

A prevenció sikeressége, a tejszállítmányok megfelelősége a tejtermelő tehenészeti telepek és a tejtermelő üzemek szintjén is ellenőrizhető. A nyers tej aflatoxin M1 tartalmának detektálására kidolgozott mintavételi terv és korai előrejelzési rendszer segítségével, az Olaszországban már a gyakorlatban bevált 20 ng/kg cselekvési küszöb alkalmazásával hatékonyan előre lehet jelezni a szennyeződés mértékének emelkedését. A tejtermelő gazdaság a jelzés alapján a helyi körülményeknek megfelelő módon, például a takarmányösszetétel módosításával, toxinkötők alkalmazásával megelőzheti a jogszabályban meghatározott, eltűrhető maximális (50 ng/kg) AFM1 koncentráció elérését. Ezáltal csökkenthető a szennyezett tejtételek felhasználása az elsődleges és másodlagos tejfeldolgozásban és ez következképpen csökkentené a fogyasztók expozícióját [1, 10, 71].

Fel kell hívni a figyelmet arra is, hogy az 50 ng/kg AFM1 koncentráció jelzésére beállított ELISA kitek a detektálás bizonytalanságából adódóan a $\leq 65-70$ ng/kg szennyezettségű tej tételt még az esetek 50%-ban megfelelőnek minősíthetik.

Az AFM1 expozíciónak leginkább kitett és egyúttal a legérzékenyebb csecsemők és kisgyerekek, de a teljes lakosság egészségvédelme érdekében javasoljuk a tejüzemek ellenőrzésének rendeleti módosítását úgy, hogy a beszállított tej ≥ 20 ng/kg AFM1 szennyezettsége esetén a tejüzem köteles értesíteni a tejtermelő gazdaságot valamint a NÉBIH-et, és a továbbiakban a gazdaságból beszállított tej szennyezettségének napi ellenőrzésével figyelemmel kísérni a szennyezés csökkentésére tett tejgazdasági intézkedés hatékonyságát.

Javasoljuk továbbá a tejgazdaságok önellenőrzésénél a jelzési küszöböt a 20 ng/kg-os értékre beállítani a jelenlegi 50 ng/kg helyett. Mind a tejüzemi, mind a termelői ellenőrzéshez rendelkezésre állnak az AFM1-t 5-10 ng/kg koncentrációban detektáló ELISA kitek, tehát az új jelzési küszöb előírásának metodikai akadálya nincs.

6. Köszönetnyilvánítás

A szerzők köszönetüket fejezik ki Sali Juditnak és Csizmadia Katalinnak a NÉBIH 2018-2020-as fogyasztási felmérése vonatkozó adatainak az átadásáért, a DE Műszerközpont, valamint a NÉBIH munkatársainak a tejminták AFM1 analitikai vizsgálatainak elvégzéséért, Nagy Attilának és Miklós Gabriellának, a NÉBIH munkatársainak hasznos megjegyzéseikért, a DE-NÉBIH projektben közreműködő Béri Bélának, valamint az Alföldi Tej és a tejtermelő gazdaságok vezetőinek és munkatársainak az együttműködésért.

Kutatási programunkat 2018-1.2.1-NKP-2018-00002 (AA, KK) jelzéssel a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs alap támogatta a 2018-1.2.1-NKP alapítványi rendszerben.

7. Irodalom

- [1] Ambrus Á., Szenczi-Cseh, J., Griff, T., Kerekes K., Miklós G., Szigeti, T., Vásárhelyi, A. (2020): Élelmiszereink mikotoxin és növényvédőszer-maradék szennyezettiségének élelmiszerbiztonsági megítélése 2. rész Mikotoxinok; Food safety assessment of the mycotoxin and pesticide residue contamination of our foods, Part 2. Mycotoxins. *Journal of food Investigation*, **LXVI** (2) pp. 2923-2949.
- [2] Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Győri, Z., & Pusztahelyi, T. (2020): The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota. *Frontiers in Microbiology*, Vol. **10** 2908. doi:10.3389/fmicb.2019.02921
- [3] Ráduly, Z., Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., & Csernoch, L. (2020): Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Frontiers in Microbiology* **10**. doi:10.3389/fmicb.2019.02908
- [4] Peles, F., Sipos, P., Kovács, S., Győri, Z., Pócsi, I., Pusztahelyi, T. (2021): Biological Control and Mitigation of Aflatoxin Contamination in Commodities. *Toxins* **13** (104). <https://doi.org/10.3390/toxins13020104>
- [5] Mahato, D.K., Lee, K.E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K.N., Kumar, P., Kang, S.G. (2019): Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front. Microbiol.* Vol. **10** (2266) doi: 10.3389/fmicb.2019.02266
- [6] Filazi, A., Tansel, U. (2019): Occurrence of Aflatoxins in Food (2013): in Mehdi Razzaghi, Abyaneh (Szerk.), *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. doi:10.5772/51031
- [7] Mikló, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Józwiak, Á., Bartók, T. (2020): Detection of Aflatoxins in Different matrices and Food-Chain Positions. *Front. Microbiol* **11** (1916) doi: 10.3389/fmicb.2020.01916
- [8] Pócsi, I., Giacometti, F., Ambrus, Á. and Logrieco, A.F. (2020): Editorial: Aspergillus-Derived Mycotoxins in the Feed and Food Chain. *Front. Microbiol* **11** (606108). doi: 10.3389/fmicb.2020.606108
- [9] Martinez-Miranda, M. M., Rosero-Moreano, M., and Taborada-Ocampo, G. (2019): Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control* **98** pp. 359–366. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.046
- [10] Serraino, A., Bonilauri, P., Kerekes, K., Farkas, Z., Giacometti, F., Canever, A., Zambrini, A.V., Ambrus, Á. (2019): Occurrence of Aflatoxin M1 in raw milk marketed in Italy: Exposure Assessment and Risk Characterization. *Front. Microbiol.* **10** (2516) doi: 10.3389/fmicb.2019.02516
- [11] Udovicki, B., Ilija Djekic, I., Eleni P., Kalogianni, E.P., Rajkovic, A. (2019): Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin m1 intake through consumption of milk and yoghurt by student population in Serbia and Greece. *Toxins* **11** (4) pp. 205-216. <https://doi.org/10.3390/toxins11040205>
- [12] Peles, F., Sipos, P., Győri, Z., Pfliegler, W.P., Giacometti, F., Serraino, A., Pagliuca, G., Gazzotti, T., Pócsi, I. (2019): Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. *Front. Microbiol.* **10** (2861) doi: 10.3389/fmicb.2019.02861
- [13] Campagnollo, F. B., Ganev, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F., Sant'Ana, A. S. (2016): The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control* **68** pp. 310-329. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.007
- [14] Wolzak, A., Pearson, A. M., Coleman, T. H. (1986): Aflatoxin carry-over and clearance from tissues of laying hens. *Food and Chemical Toxicology* **24** pp. 37-41. doi: 10.1016/0278-6915(86)90262-0
- [15] Hussain, Z., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M. K., Mahmood, S., Asi, M. R. (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. *Food and Chemical Toxicology* **48** pp. 3304-3307. doi: 10.1016/j.fct.2010.08.016
- [16] Bintvihok, A., Thiengnin, S., Doi, K., & Kumagai, S. (2002): Residues of Aflatoxins in the Liver, Muscle and Eggs of Domestic Fowls. *Journal of Veterinary Medical Science* **64** (11) pp. 1037–1039. doi:10.1292/jvms.64.1037
- [17] Moran, C. A., Kettunen, H., Yiannikouris, A., Ojanperä, S., Pennala, E., Helander, I. M., & Apajalahti, J. (2013): A dairy cow model to assess aflatoxin transmission from feed into milk – Evaluating efficacy of the mycotoxin binder Mycosorb®. *Journal of Applied Animal Nutrition*, 2. doi:10.1017/jan.2013.12
- [18] Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J., Shlosberg, A. (2013): Carry-Over of Aflatoxin B1 to Aflatoxin M1 in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late-Lactation. *Toxins* **5**(1), pp. 173–183. doi:10.3390/toxins5010173

- [19] Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G. (2005): Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *J. Dairy Sci.* **88** (9) pp. 3063–3069. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8
- [20] JECFA (2018): Aflatoxins. In: Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *FAO JECFA Monographs*, pp. 3-280. SBN (PDF) 978-92-4-069847-5
- [21] Fakhri, Y., Ghorbani, R., Taghavi, M., Keramati, H., Amanidaz, N., Moradi, B., Nazari, S.H., Shariatifar, N., Khaneghah, A.M. (2019): Concentration and Prevalence of Aflatoxin M1 in Human Breast Milk in Iran: Systematic Review, Meta-Analysis, and Carcinogenic Risk Assessment: A Review. *Journal of Food Protection* **82** (5) pp. 785–795. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-367
- [22] Fakhri, Y., Rahmani, J., Oliveira, C.A.F., Franco, L.T., Corassin, C.H., Saba, S., Rafique, J., Khaneghah, A.M. (2019): Aflatoxin M1 in human breast milk: a global systematic review, metaanalysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation). *Trends in Food Science & Technology* **88** (5) pp. 333-342. doi:10.1016/j.tifs.2019.03.013
- [23] Radonić, J. R., Kocić Tanackov, S. D., Mihajlović, I. J., Grujić, Z. S., Vojinović Miloradov, M. B., Škrinjar, M. M., & Turk Sekulić, M. M. (2017): Occurrence of aflatoxin M1 in human milk samples in Vojvodina, Serbia: Estimation of average daily intake by babies. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **52** (1) pp. 59-63. doi: 10.1080/03601234.2016.1229454
- [24] Kunter, I., Hürer, N., Gülcan, H. O., Öztürk, B., Dogan, I., Sahin, G. (2017): Assessment of Aflatoxin M1 and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. *Biol Trace Elem Res.* **175** pp. 42-49. doi:10.1007/s12011-016-0750-z
- [25] Valitutti, F., De Santis, B., Trovato, C.M., Montuori, M., Gatti, S., Oliva, S., Brera, C., Catassi, C. (2018): Assessment of Mycotoxin Exposure in Breastfeeding Mothers with Celiac Disease. *Nutrients* **10** (3) doi:10.3390/nu10030336.
- [26] Bogalho, F., Duarte, S., Cardoso, M., Almeida, A., Cabeças, R., Lino, C., Pena, A. (2018): Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants, *Food Control* doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.043
- [27] Csapó, J., Albert, C., Sipos, P. (2020): The aflatoxin content of milk and dairy products as well as breast milk and the possibilities of detoxification. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, **13** pp. 99-117. doi:10.2478/ausal-2020-0006
- [28] Trevisani, M., Farkas, Z., Serraino, A., Zambrini, A. V., Pizzamiglio, V., Giacometti, F. Ambrus, A. (2014): Analysis of industry-generated data. Part 1: a baseline for the development of a tool to assist the milk industry in designing sampling plans for controlling aflatoxin M1 in milk. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **31** (7) pp. 1246-1256. doi: 10.1080/19440049.2014.925587
- [29] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2020): Scientific opinion - Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal* **18** (e06040) pp. 1-112. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6040
- [30] IARC (2012): Aflatoxins. Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*.
- [31] Pascal, A., Risco-Castillo, V., Jouvion, G., Le Barzic, C. and Guillot, J. (2021): Aspergillosis in Wild Birds. *J. Fungi* **7** (3) p. 241; doi:10.3390/jof7030241
- [32] JECFA, (2001): Aflatoxin M1. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper* **74** pp. 1-102.
- [33] WHO (2002): Evaluation of certain mycotoxins in food TRS 906-JECFA 56/8 *WHO technical report series* 906 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42448/WHO_TRS_906.pdf?sequence=1 (Hozzáférés: 2021.01.28.)
- [34] Bedard, L. L., Massey, T. E. (2006): Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, **241** (2) pp. 174-83. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.018
- [35] EFSA (2007): Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain (CONTAM) related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA Journal* **5** 446. doi: 10.2903/j.efsa.2007.446

- [36] Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. & Aggarwal, D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80** pp. 1106-1122. doi:10.1093/ajcn/80.5.1106
- [37] Wang, J. S. & Groopman, J. D. (1999): DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* **424** (1-2) pp. 167-181. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00017-2
- [38] Denning, D. W., Allen, R., Wilkinson, A. P. & Morgan, M. R. (1990): Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis* **11** (6) pp. 1033-1035. doi: 10.1093/carcin/11.6.1033
- [39] Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martin-González, M. F., García, H. S. (2013): Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control* **31** (1) pp. 202-207. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.023
- [40] Bullerman, L. B., Bianchini, A. (2014): Good Food-Processing Techniques: Stability of Mycotoxins in Processed Maize-Based Foods. In: LESLIE, J. F. (Szerk.) *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Inc. p. 92-97 ISBN 978-0-8138-2083-5
- [41] Ali, N. (2019): *Aflatoxins in rice: worldwide occurrence and public health perspectives*. *Toxicology Reports*. doi:10.1016/j.toxrep.2019.11.007
- [42] Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, **47** (5) pp. 984-991. doi: 10.1016/j.fct.2007.10.005.
- [43] Yosef, T. A., Al-Julaifi, M. Z., Salah-El-Dein, W. M., Al-Rizqi, A. M. (2013): Assessment of Aflatoxin M1 Residues in Raw Cow Milk at Al- Riyadh Area with Reference to Some Detoxification Applications. *Life Science Journal - Acta Zhengzhou University Overseas Edition*, **10** pp. 3365-3369.
- [44] Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A. & Faizal, A. R. A. (2015): Aflatoxin M-1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science and Technology*, **46** pp. 110-119. doi: 10.1016/j.tifs.2015.08.005
- [45] Kuharic, Z., Jakopovic, Z., Canak, I., Frece, J., Bosnir, J., Pavlek, Z., Ivesic, M., Markov, K. (2018): Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69** (4) pp. 334-339. doi: 10.2478/aiht-2018-69-3160
- [46] Foroughi, M., Jamab, M. S., Keramat, J. & Foroughi, M. (2018): Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on Perlite Beads for the Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk. *Journal of Food Science* **83** (7) pp. 2008-2013. doi:10.1111/1750-3841.14100
- [47] Mohammadi, H., Mazloomi, S. M., Eskandari, M. H., Aminlari, M., Niakousari, M. (2017): The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. *Ozone: Science & Engineering* **39**(6) pp. 447-453. doi:10.1080/01919512.2017.1329647
- [48] Assaf, J. C., El Houry, A., Atoui, A., Louka, N., Chokr, A. (2018): A novel technique for aflatoxin M1 detoxification using chitin or treated shrimp shells: in vitro effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. *Applied Microbiology & Biotechnology* **102** pp. 6687-6697. doi:10.1007/s00253-018-9124-0
- [49] Womack, E. D., Sparks, D. L., Brown, A. E. (2016): Aflatoxin M-1 in milk and milk products: a short review. *World Mycotoxin Journal* **9** (2) pp. 305-315. doi:10.3920/WMJ2014.1867
- [50] Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. (2013): Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M-1 in UHT skim milk. *Food Control*, **31** (1) pp. 80-83. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.033
- [51] Kamyar, S., Movassaghazani, M. (2017): Reduction of Aflatoxin M1 in Milk Using Kefir Starter. *Iranian Journal of Toxicology* **11** (6) pp. 27-31. doi:10.29252/arakmu.11.6.27
- [52] Rad, M. N., Razavilar, V., Anvar, S. A. A., Akbari-Adergani, B. (2018): Selected bio-physical factors affecting the efficiency of *Bifidobacterium animalis lactis* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* to degrade aflatoxin M-1 in artificially contaminated milk. *Journal of Food Safety*, **38** (4) (e12463) doi:10.1111/jfs.12463
- [53] Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F., Badr, F. H. (2014): Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control* **43** pp. 129-134. doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.002
- [54] Hamilton, D., Murray, B., Ambrus, Á., Baptista, G., Ohlin, B., Kovacicova, J. (1997): Optimum use of available residue data in the estimation of dietary intake of pesticides. *Pure & Applied Chemistry* **69** (6) pp. 1373-1410. doi:/10.1351/pac199769061373

- [55] Zentai, A., Szeitzné Szabó, M., Mihucz, G., Szeli, N., Szabó, A., Kovács, M. (2019): Occurrence and risk assessment of fumonisin B1 and B2 mycotoxins in maize-based food products in Hungary. *Toxins* **11** (12) p. 709. doi: 10.3390/toxins11120709
- [56] Zentai, A., Sali, J., Szabó, I.J., Szeitzné-Szabó, M., Ambrus, Á., Vásárhelyi, A. (2013): Factors affecting the estimated probabilistic acute exposure to captan from apple consumption. *Food Additives & Contaminants: Part A* **30** (5) pp. 833-842. doi:10.1080/19440049.2013.794977
- [57] Zentai, A., Kerekes, K., Szabó, I., Ambrus, Á. (2015): A fogyasztók növényvédőszermaradékokból származó expozíciójának finomítása, 1. rész. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* **LXI** (3) pp. 681-719.
- [58] EFSA (2010): Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal* **8** (3) p. 1557 doi:10.2903/j.efsa.2010.1557
- [59] Szenczi-Cseh, J. & Ambrus, A. (2017): Uncertainty of exposure assessment of consumers to pesticide residues derived from food consumed. *Journal of Environmental Science and Health B*, **52** (9) pp. 658-670. doi: 10.1080/03601234.2017.1331671
- [60] EFSA (2006): Opinion of the Scientific Committee related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. *EFSA Journal* **438** pp. 1-54. doi:https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.438
- [61] Delmaar, C., Heinemeyer, G., Jantunen, M., Schneide, K., Schumann, M. (2020): General Aspects of Exposure Evaluation. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG., pp. 55-155. ISBN 978-3-319-96148-4
- [62] Gürtler, R. (2020): Hazard Assessment and Derivation of Health-Based Guidance Values. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. pp. 253-254. ISBN 978-3-319-96148-4
- [63] Sieke, C. (2020): Principles of Consumer Exposure Assessment for Pesticide Residues. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. pp. 315-322. ISBN 978-3-319-96148-4
- [64] Kuiper-Goodman, T. (1990): Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **68** pp. 1017-1024. doi: 10.1139/y90-155
- [65] Szeitzne Szabo, M., Bíró, L., Bíró, Gy., Sali, J. (2011): Dietary survey in Hungary, 2009. Part I. Macronutrients, alcohol, caffeine, fibre. *Acta Alimentaria* **40** (1) pp. 142-152. doi: 10.1556/AAlim.40.2011.1.16
- [66] Csizmadia, K., Larnsak, L., Pfaff, N., Sali, J., (2020): Hungarian national food consumption survey on adults. *EFSA supporting publication* **17** (12)EN-1981. p. 26.
- [67] Csizmadia, K., Larnsak, L., Pfaff, N., Sali, J. (2020): Hungarian national food consumption survey on toddlers and other children. *EFSA supporting publication* **17** (12)EN-1982. p. 26. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1982
- [68] Ferrari, S.L.P., Fumes, G. (2017): Box-Cox symmetric distributions and applications to nutritional data. *AStA Adv. Stat. Anal.* **101** pp. 321-344. doi:10.1007/s10182-017-0291-6
- [69] Rigby, R.A., Gillian, M. D. S., Heller, Z., De Bastiani, F. (2019): Continuous three parameter distribution on $(0, \infty)$. *Distributions for Modelling Location, Scale and Shape: Using GAMLSS in R*. 1 ed.: Chapman and Hall/CRC. ISBN 9780367278847
- [70] Horváth, G., Gerlei, Zs., Gervain, J., Lengyel, G., Makara, M., Pár, A., Rókus, L., Szalay, F., Tornai, I., Werling, K., Hunyady, B. (2018): Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B and D. National consensus guideline in Hungary from 22 September 2017. *Orvosi Hetilap* **159** (1) pp. 24-37. doi: 10.1556/650.2018.31004
- [71] Kerekes, K., Bonilauri, P., Serraino, A., Giacometti, F., Piva, S., Zambrini, V., Canever, A., Farkas, Z., Ambrus, A. (2016): An effective self-control strategy for the reduction of aflatoxin M1 content in milk and to decrease the exposure of consumers. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **33** (12) pp. 1840-1849. doi: 10.1080/19440049.2016.1241895

Chronic aflatoxin M1 exposure of Hungarian consumers

Keywords: deterministic exposure estimation, chronic aflatoxin M1 exposure, consumer groups at risk, carcinogenic effect, risk of liver cancer

1. SUMMARY

The mycotoxin contamination of foods also appears in the food chain. Aflatoxin is metabolized in animals and its aflatoxin M1 (AFM1) metabolite, which is similarly, but ten times less genotoxic and carcinogenic than aflatoxin B1 (AFB1), is also present in milk, liver and eggs. Of these, the most significant food safety risk is posed by the contamination of milk with AFM1. In our article, the deterministic exposure estimation of Hungarian consumers is presented, based on the AFM1 contamination of milk and dairy products. The results indicate that the exposure of children under three years of age clearly poses a health risk, while the exposure of the 3 to 6 year old age group is borderline. The exposure of older age groups in ng/kg body weight does not pose an immediate health risk due to the increasing body weight. However, it needs to be emphasized that the presence of carcinogenic compounds should be kept to a minimum in all age groups. To this end, we propose an amendment to the regulation regarding the factory inspection of milk.

¹ National Food Chain Safety Office, System Management and Supervision Directorate

² University of Veterinary Medicine, Digital Food Chain Education, Research, Development and Innovation Institute

³ University of Debrecen, Doctoral School of Nutrition and Food Sciences

2. Introduction

In our previous paper on mycotoxin contamination, we presented the mycotoxin contamination of foods and feeds, the legal regulation of their tolerable maximum concentrations, the limitations of sampling procedures, and the experiences of current domestic practice were analyzed [1]. Using the data of the food consumption survey conducted in 2009 and measurement results available from the period 2010–2018, the exposure of Hungarian consumers to DON and aflatoxin M1 was estimated. Based on our preliminary estimates, it was determined that for some consumers, exposure to aflatoxin M1 and DON may exceed the toxicological reference values from time to time due to the yearly variation in food contamination levels, which may pose a risk to human health.

In our present paper, the results of our calculations carried out by a deterministic method and using the latest analytical measurement results and the data of the Hungarian food consumption survey performed in 2018–2019 using the methodology uniformly applied in Europe are presented, which provides information on chronic AFM1 exposure of different consumer age groups.

Intensive research is induced by the expected spread of mycotoxin-producing fungi due to global warming, the increase in food and feed contamination levels caused by the toxins they produce and the health problems and economic damages attributed to them. The large number of reports on the results are made more manageable by research area by the regularly published review articles, such as those on the interaction of mycotoxin-producing *Aspergillus* species with soil microorganisms [2], on human physiological effects of mycotoxin exposure [3], on the application of biocontrol technologies to reduce aflatoxin contamination, on the effect of silage production technology and the microbiota on aflatoxin contamination [4], on the sources, occurrence and regulation of mycotoxin contamination [5, 6] and on its detection methods [7]. A special edition of the journal *Frontiers in Microbiology*, containing 22 of the latest research articles and summaries, has also been published in the form of a book [8].

In view of the above reviews, only literature publications closely related to the objective of our paper are summarized below.

2.1. Occurrence of aflatoxins

Aflatoxins and other mycotoxins that occur in raw agricultural products (mainly peanuts, maize, rice, nuts, figs, spices and dried fruits) and feeds enter the food chain and can be detected in milk [9, 10, 11, 12], eggs, meat and offal [6, 13]. Aflatoxicol has been detected in the liver, kidney and meat of broiler and laying hens [14, 15]. Compared to the concentration of AFB1 in the feed, >5700-, >4600- and >3800-fold concentrations were measured in the livers of hens, in egg yolk and in egg white, respectively [16].

In addition to the exposure of the animals to AFB1 ($\mu\text{g}/\text{kg}$ body weight), the concentration of AFM1 entering the milk from the feed depends on a number of factors, such as the health status of the cow, its milk yield, the lactation period, etc. [17]. The transmission rate is higher in specimens with higher milk yields [18]. The results of several studies have been reported in the literature, according to which the rounded transmission rate varied from 0.35 to 6%. Lower transmission rates (0.08%–0.33%) were observed in sheep [19].

There is less research on the transmission of aflatoxin to the liver, meat and eggs, but these report significantly lower transmission rates compared to milk, making milk still the most significant source of aflatoxin among foods of animal origin [4, 20].

When a food contaminated with AFB1 is consumed, AFM1 is excreted in breast milk to a similar extent as in cow's milk [21, 22, 23, 24, 25, 26]. Infants and young children who are fed formula or milk drinks based on cow's milk may also be exposed to AFM1. The results of European surveys indicate much lower levels than African or Asian publications [27].

As with all mycotoxins, aflatoxins show significant annual fluctuations in their levels depending on the weather conditions affecting fungal growth and toxin production [28].

For its most recent risk assessment [29], EFSA used the results of aflatoxin M1 measurements reported by Member States after 2013. Statistical data for some of the major food categories are summarized in **Table 1**.

Table 1. AFM1 mean and 95th percentile concentration values based on the 2013-2020 Member State data of EFSA.

Food category	N (pc)	% LCD	Mean LB (µg/kg)	Mean UB (µg/kg)	P95 LB (µg/kg)	P95 UB (µg/kg)
Milk	6020	76	0.018	0.031	0.087	0.087
Condensed milk/Milk powder	168	81	0.037	0.044	0.018	0.087
Cream	114	96	0.000	0.009	0.000	0.020
Fermented milk products	96	94	0.052	0.069	1.00	1.00
Cheeses	359	53	0.097	0.107	0.415	0.415
Baby formula	354	90	0.060	0.071	1.00	1.00
Other	85	53	0.124	0.204	1.00	1.00

Comment:

N: number of measurement results; % LCD (left censored data): ratio of results below the detection/quantification limit; P95: 95th percentile; LB: lower bound – result of substitution with the lowest concentration value; UB: upper bound – result of substitution with the highest concentration value; Other: foods for infants and young children.

2.2. Health effects of aflatoxins

Aflatoxins (especially AFB1, AFG1 and AFM1) proved to be extremely potent carcinogenic, kidney and liver damaging, genotoxic, malformative, reproductive capacity decreasing, immunosuppressive and nervous system damaging compounds in all experimental animal species, such as fish, ducks, mice, rats and monkeys [30]. A recently published study showed that the spores of pathogenic fungi cause severe, fatal infections in various birds [31].

High levels of AFB1, both in humans and animals, can cause fast-action, acute poisoning, during which severe hepatic failure can lead to death, however, human risk of this in developed countries is negligible. Of aflatoxins, aflatoxin B1 is the most potent carcinogenic and genotoxic compound, and it is the one most commonly found in foods and feeds. Most often, it causes hepatocellular carcinoma (HCC), which is why AFB1 has been classified as a Group 1 human carcinogen by the IARC. After consumption of feed contaminated with AFB1, its hydroxy metabolite, aflatoxin M1, which is also a carcinogenic compound, although with a toxicity that is about one tenth of that of AFB1, is excreted by dairy cows in milk [32, 33].

Aflatoxins are rapidly and extensively adsorbed in the small intestine and, once in the liver, the metabolism of aflatoxin is catalyzed by the cytochrome P450 enzyme system found there. AFB1, AFG1 and AFM1 are converted to a reactive electrophilic epoxide that is capable of covalently binding to both DNA and proteins. Glutathion S-transferases (GST) are able to form a conjugative link with the 8,9-epoxide of AFB1, which is no longer able to enter harmful reactions in the body, and is excreted through bile and the kidneys. Polymorphisms among individuals result in high variability in enzymatic processes, and thus sensitivity to aflatoxin also varies from individual to individual [30, 34, 35]. In optimal cases, most aflatoxin metabolites are excreted within a few days, however, they have been observed to be present in protein-bound form over a longer period of time (e.g., in the case of aflatoxin-albumin adducts), with a half-life of 30 to 60 days in peripheral circulation [36].

Aflatoxins also damage liver cells directly, as well as indirectly, by altering the expression of genes involved in lipid metabolism. Increased cholesterol, triglyceride and lipoprotein production can cause the disintegration of hepatocytes. Hepatocyte death may lead to acute hepatitis, which can result in liver failure and, in more severe cases death. The disrupted metabolism of hepatitis patients can lead to malnutrition, which indirectly contributes to a general decrease in the antioxidant capacity of hepatocytes, to a loss of liver tissue regeneration capacity and, ultimately, liver failure [3].

Based on the opinion of EFSA experts, a key point in the risk assessment of aflatoxins is the evaluation of the role these toxins play in the development of liver cancer. From this point of view, children are particularly sensitive to aflatoxins, because, due to their low body weight, have a higher intake of food per kg body weight, and the risk of developing liver cancer is also higher in individuals infected with the hepatitis B (or C) virus and in the elderly. In people living in areas where both hepatitis B virus (HBV) infection and aflatoxin exposure are common, hepatocellular carcinoma (HCC) samples show a mutation hotspot (G-T transformation) at codon 249 of the p53 gene, which mutation is considered to be a signature of aflatoxin-induced HCC [37]. The possible reason for this is that hepatitis infection of the liver alters the expression of genes encoding aflatoxin detoxification enzymes, resulting in, for example, the induction of CYP enzymes or a decreased GST activity, thereby preventing the body from adequately eliminating aflatoxins [35]. Due to the immunosuppressive effect of aflatoxins, elderly people with chronic diseases are at particular risk, because in their case the efficiency of cell-level repair mechanisms is inferior, so the elimination of aflatoxins is also less effective. It should be emphasized that aflatoxins are able to cross the placenta, so aflatoxin exposure of pregnant women can also endanger the fetus [38].

2.3. The effect of processing on the aflatoxin content in foods

The common feature of aflatoxins is that they are stable, resistant to processing and heat effects. As a consequence, their presence must also be taken into account in the case of processed foods. Certain processing steps, such as sorting, refining, grinding, cooking, baking, frying in oil, roasting, preservation, flocculating, alkaline cooking, nixtamalisation, extrusion and fermentation, can reduce the concentration of mycotoxins in crops and processed foods, but they are not adequate enough to eliminate all contaminants, so the role of prevention at the very beginning of the food chain is of paramount importance [20]. For example, in terms of AFM1 contamination, it is important to reduce the AFM1 contamination of feeds using pre- and post-harvest biotechnological methods as well as toxin binders [4, 17].

Of heat treatment processes, conventional cooking and baking have little effect on mycotoxin contamination, while methods performed at higher temperatures, or possibly using dry heat [39], are more efficient. The breakdown of mycotoxins is enhanced by the presence of sugars, e.g., glucose, during heat treatment [40].

During the wet milling of cereals, such as corn, aflatoxin is distributed among the milling fractions in the following proportions: soaking water: 39–42%, fiber: 30–38%, gluten: 13–17%, germ, 6–10% and starch: 1%. Thus, the total aflatoxin level in the processed products decreases with the proportion remaining in the soaking water. After the dry milling of corn, the groats, bran and flour fractions contain only 6 to 10% of the original aflatoxin content, with most of the aflatoxin entering the germ and husk fractions [20].

Contamination of rice with aflatoxin most often occurs due to improper harvest and storage conditions. Mycotoxins are found primarily in the rice husk and bran layers. Husked brown rice and white rice obtained by polishing are gradually less contaminated [41].

The various heat treatment processes, pasteurization and freezing do not have a significant effect on the aflatoxin content of milk and dairy products [42]. The reduction effect of some heat treatment processes on AFM1 expressed in numerical values are as follows: pasteurization: 7.6%–12.9%, boiling: 14.5–23.9% [43], UHT treatment: 32% [44].

Different physical and chemical methods have been used with good efficiency to reduce the AFM1 content of milk or other liquid products: microwave irradiation (52%) [43], membrane filtration (81%) [45], biofiltration (81%) [46] combination of centrifugation and filtration (83%) [45], ozone treatment [47], the use of adsorbents (85–90%) [48, 49].

Intensive research is underway on the use of microorganisms. Encouraging results for the reduction of AFM1 contamination in milk have been obtained using *Saccharomyces cerevisiae* (90–93%) [50], *S. cerevisiae* + *L. rhamnosus*, *L. delbrueckii* spp. *bulgaricus*, *B. lactis* (100%) [49], the mixture of different yeasts (65–69%) [51], heat-treated *L. plantarum* (94,5%) [44], *L. bulgaricus* (58%) [52] and in yogurt using *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. plantarium* strains [53]. It remains to be seen how (in the case of using live microbes) changes in organoleptic properties can be eliminated if non-conventional cultures are used, and how the lactic acid bacterium-AFM1 complex formed can be removed from the product [44].

3. Data used to estimate consumer exposure

Exposure (g/kg body weight or ng/kg body weight) is calculated by multiplying the amount of food consumed (g/kg body weight) and the contaminant concentrations measured in it (ng/kg). In the deterministic method, we multiply the mean (median), or sometimes an upper percentile (95.0, 97.5) value. This calculation results in a point estimate giving a specific value [54, 55]. A more subtle estimate is obtained by probabilistic methods [56, 57], in which the distribution of input data is taken into account and thus a distribution is also obtained for exposure. Care should be taken when considering test results below the limit of quantification (LOQ). If the proportion of samples below the LOQ is between 50 and 80%, a maximum likelihood estimate (MLE) gives the best results [58].

Whichever method is used for the estimation, it is important to take into account the uncertainty of each calculation step, their magnitude, and to evaluate the results obtained in light of their cumulative effect [59]. The calculated uncertainty interval includes the true value with a certain level of confidence, i.e., with a certain degree of certainty [60]. The amount of contaminant entering the consumer's body (EDI) is compared to the toxicological reference value(s) to determine the expected health risk.

For both short-term and long-term exposure estimation, it is worth examining the consumer groups that are particularly affected by the consumption of the given food/contaminant combination, and comparing the exposure of average consumers and „large consumers” [61].

3.1. Reference values for exposure assessment

Depending on the specific properties of the contaminant, the reference value may be the Acceptable Daily

Intake (ADI), the Provisionally Tolerable Weekly/Monthly Intake (PTW/MI) or the Acute Reference Dose (ARfD). For food contaminants, the reference value is usually the tolerable daily intake (TDI). The benchmark dose (BMD) is the smallest dose that is estimated from the fitted dose-response curve at which a preselected effect level (benchmark response – BMR) can be observed, usually an increase or decrease of 5 or 10% compared to the control group. The lower confidence value of the BMD is the BMDL [62]. In the case of aflatoxins, Margin of Exposure (MoE) analysis is used to characterize the risk, as no TDI or other toxicological reference value can be established. In such a case, the value of the BMDL, adjusted by the uncertainty factor, is compared to the estimated exposure. The risk attributed to a contaminant can also be expressed as the ratio of the exposure to other reference values, the Hazard Quotient (HQ) or the Hazard Index (HI), which is the sum of the hazard ratios of substances acting on the same target organ or organ system, usually used for cumulative estimates [63].

EFSA recommends the use of 4 µg/kg body weight/day as the BMDL₁₀ value as a benchmark for AFM1 risk characterization [29]. The results obtained are considered to be of concern below 10,000, with an MoE of 10,000 or greater indicating little risk to public health.

To characterize the risk of AFM1, the safe dose recommended by Kuiper-Goodmann (0.2 ng/kg body weight/day) can also be used to calculate the hazard index (HI), which is a quotient of a tumor-causing dose in 50% of animals and a safety factor of 50,000 [64].

According to the 2018 calculations of the JECFA [20], with an average daily intake of 1 ng/kg body weight AFB1, the probability of developing liver cancer is on average 0.269 per 100,000 persons per year, with the upper limit of the 95% confidence interval of the estimate being 0.562/100,000 persons/year in HBsAg+ (positive for hepatitis B surface antigen) individuals. For HBsAg- (negative for hepatitis B surface antigen) individuals, the mean value was 0.017 cancers/year/100,000 persons, with the upper limit of the 95% confidence interval of the estimate being 0.049/100,000 persons/year. The estimated mean values for AFM1 are one order of magnitude lower: 0.027/100,000 persons for HBsAg+, and 0.002/100,000 persons for HbsAg- individuals [20].

JECFA estimated the risk of hepatocellular carcinoma (HCC) associated with aflatoxin exposure using Equation 1:

$$R_i = [(P_{HBV+} \times HBV+) + (P_{HBV-} \times (1-HBV+))] \times AF \text{ input } (1),$$

where R_i is the HCC risk for region i , $HBV+$ is the prevalence of chronic hepatitis B in the study population, P_{HBV+} is the probability of developing liver cancer in this fraction of the population and P_{HBV-} is the probability of developing liver cancer in the rest of the population.

3.2 Food consumption data

The calculations were performed using data from two representative Hungarian food consumption surveys conducted 10 years apart. The three-day survey of 2009 provided food consumption data for 4,992 individuals for a total of 14,976 consumption days, processed by dietitians and broken down into raw materials for the characterization of food consumption habits [65]. The ratio of milk and dairy product consumption days is shown in **Figure 1**.

Of the 14,976 consumption days in the 2009 survey, the consumption frequency [%] of milk, sour cream and cream, cheese and kefir or yogurt was 75.2, 52.8, 46.3 and 19.1, respectively.

The 2018-2020 survey was conducted within the framework of EFSA's Europe-wide EU MENU or "What's on the table in Europe?" project, in accordance with the recommended, uniform methodology [66, 67]. Participating persons were selected from the households participating in the Hungarian Central Statistical Office Household Budget and Living Conditions survey. During the program, two consumption days of 2,657 individuals between the ages of 1 and 74 were recorded, with the help of dietitians. On the 5,314 consumption days, the consumption frequencies [%] of milk, sour cream and cream, cheese and kefir or yogurt were 96.8, 54, 60.6 and 24. The ratio of milk and dairy product consumption days is shown in **Figure 2**.

The distribution of consumers by age group is shown in **Table 2**.

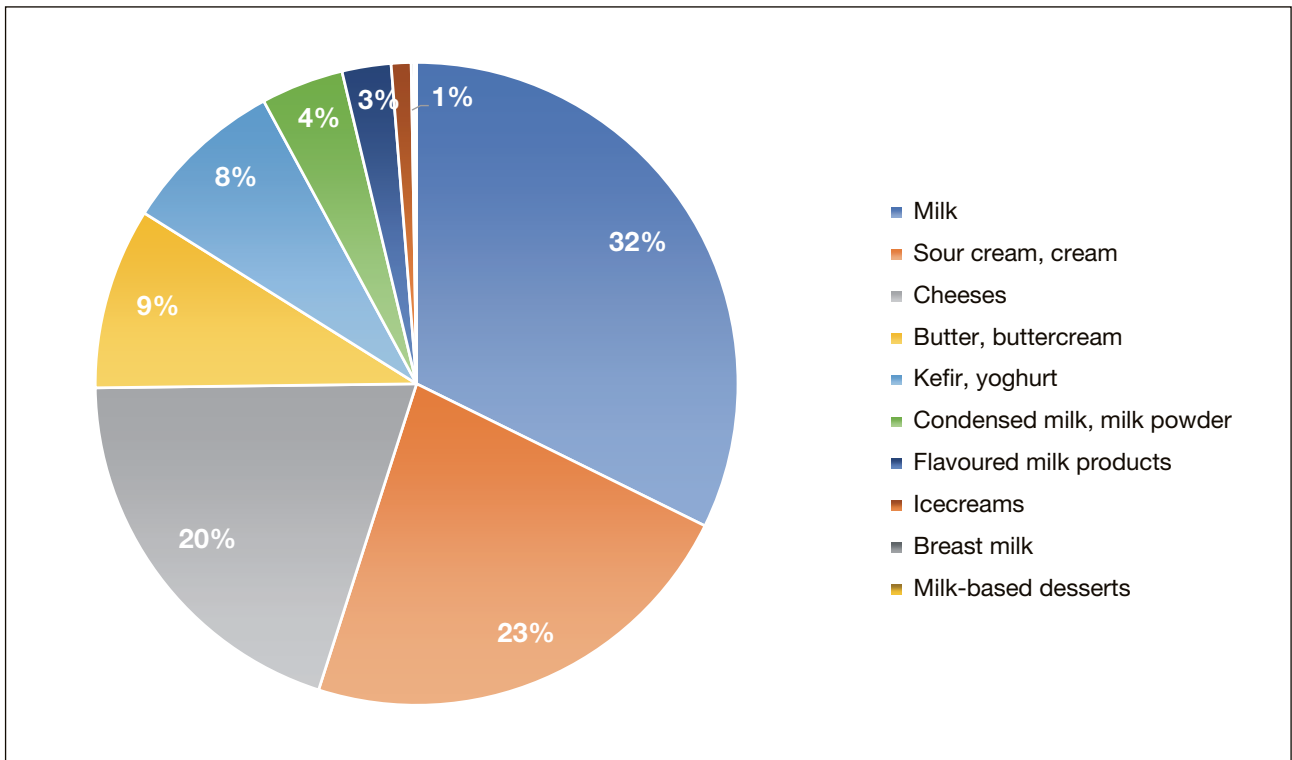


Figure 1. The proportion of milk and dairy product consumption days by food group in the 2009 survey

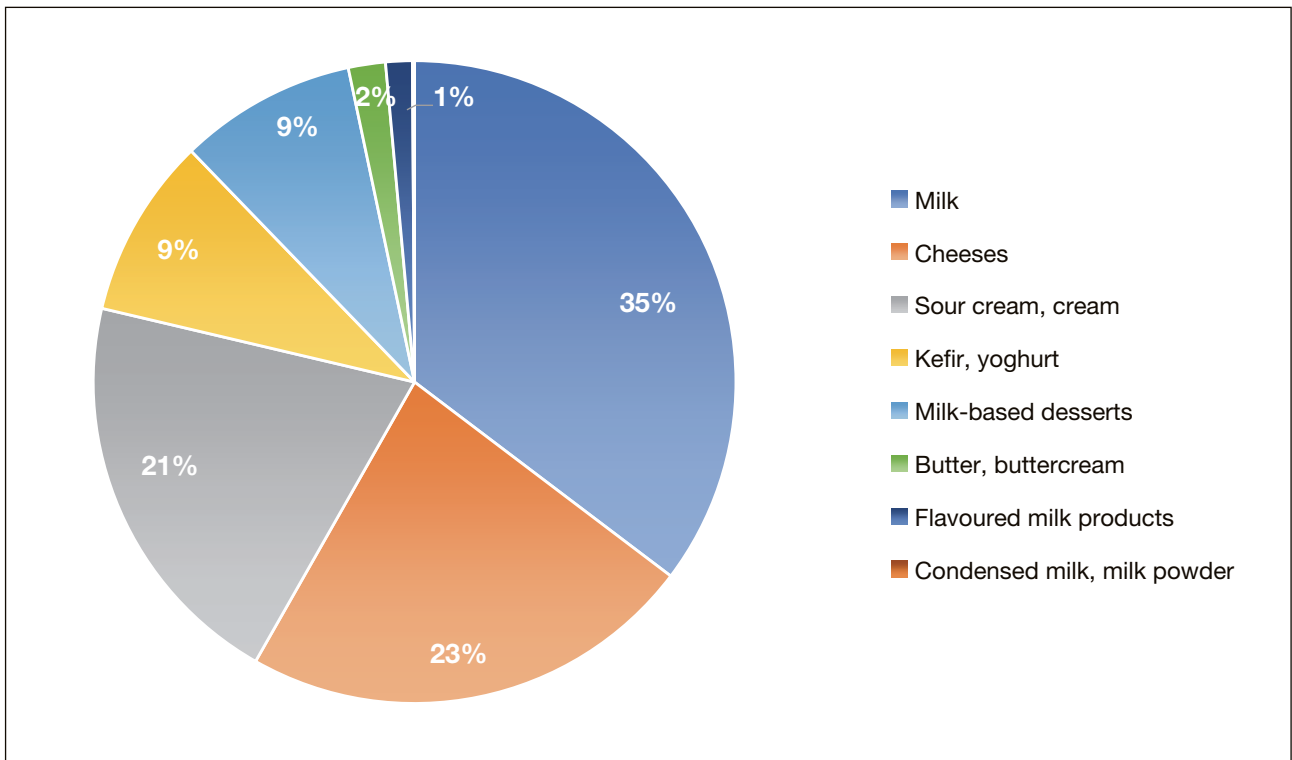


Figure 2. The proportion of milk and dairy product consumption days by food group in the 2018-2020 survey

Table 2. Age groups of the 2009 and 2018-2020 food consumption surveys and the number and proportion of consumers of dairy products by age group

Age group	Age (year)	Consumers 2009 (persons)	Dairy product consumers 2009		Consumers 2018-2020 (persons)	Dairy product consumers 2018-2020	
			persons	%		persons	%
Babies	0.0-0.9	26			0	0	0
Toddlers	1.0-2.9	90	90	100	535	482	90
Children	3.0-9.9	324	324	100	537	536	100
Adolescents	10.0-17.9	494	487	98	528	525	99
Adults	18.0-64.9	3360	3297	98	529	515	97
Elderly	65.0-	698	691	99	527	509	96
Total		4966	4889	98	2654	2567	97

Changes in the frequency of consumption of milk and various dairy products were compared using the milk and dairy product consumption days of the 2009 and 2018-2020 food consumption surveys. The numbers of consumption days of the different foods were compared to the total consumption days of the given survey (Figure 3). The frequencies of consumption of the different foods during the survey periods are characterized by the figure. Among the food categories studied, the consumption frequency of milk and milk-based desserts increased by more than 20%. The consumption frequency of cheeses shows an increase of 14%. The consumption frequencies of sour milk products (kefir, yogurt, sour cream), cream and flavored milks remained almost constant (with the former increasing slightly and the latter decreasing to a small degree). The consumption frequencies of condensed milk and milk powder has decreased significantly. Overall, it can be stated that the consumption frequencies of milk and dairy products has increased slightly over the last 10 years.

Based on the change in consumption frequencies over 10 years, an increase in aflatoxin exposure could be expected, however, this effect was offset by the change in the amounts consumed. The average consumption in milk equivalent, calculated with the median value of processing and enrichment factors, was 310.7 g/day in 2009, and this value decreased to 295.3 g/day in 2018-2020.

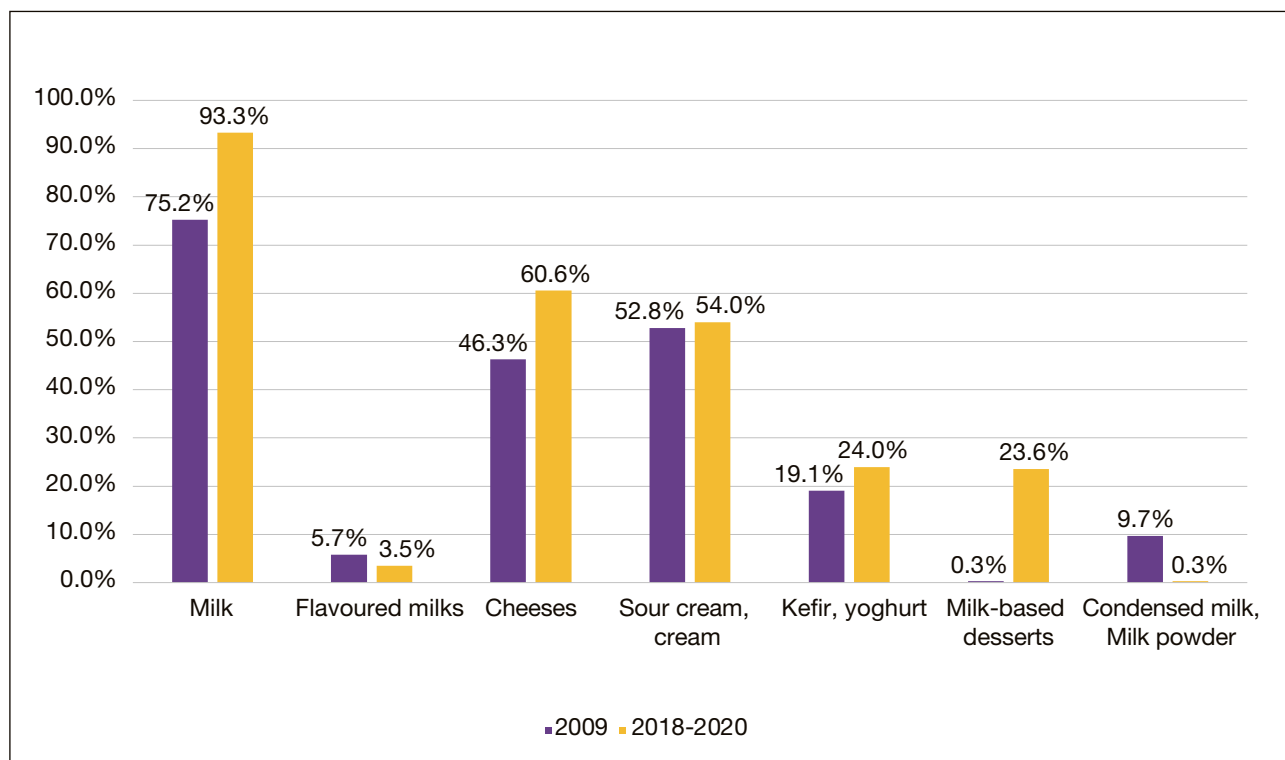


Figure 3. Proportion of consumption days to total consumption days; changes in consumption frequencies of various food groups based on the results of the 2009 and 2018-2020 food consumption surveys

Very little data were available on AFM1 concentrations in processed dairy products, so a database of AFM1 processing and enrichment factors for sour milk products (e.g., kefir, yogurt, sour cream) and various cheeses (hard, semi-hard, soft and processed cheeses, fresh cheeses) was compiled on the basis of the latest literature data, and consumer exposure was calculated with the milk equivalent of the consumed quantities of these products.

3.3. Aflatoxin concentration data

AFM1 analytical data are partly derived from NÉBIH's 2011-2020 Hungarian monitoring survey (1,288 data). 40% of the samples contained measurable amounts of AFM1. Most of the measurements were performed by and HPLC methods on samples taken from the milk of dairy farms or private producers and, to a small extent, from commercially available mixed milk. In addition to the large number of items exhibiting contamination below the LOQ (60%), there were also items with very high contamination compared to the average. Values above 100 ng/kg were: 110, 122, 141, 149, 150, 190, 238, 240, 252, 260, 292, 376, 513, 740 and 860 ng/kg, respectively. We were unable to check the correctness of the results, but we saw no reason to omit them either, so the full data set was used in our further calculations. Another 1,177 samples were analyzed by January 2021 within the framework of the joint project of the University of Debrecen and NÉBIH („Determining of the short- and long-term aflatoxin exposure of Hungarian consumers in the dairy product chain and establishing risk management measures”). In the latter case, milk samples taken directly from the transport tankers by the staff of the dairy company at the 9 dairy farms participating in the project were analyzed between 2019 and 2021 by the ELISA method in the laboratory of the Instrument Center of the University of Debrecen. In samples with concentrations above the 20 ng/kg „action level”, exact AFM1 concentrations were confirmed by HPLC in the laboratory of NÉBIH. The number of samples with concentrations above the LOQ was 672 (57.1%). In the case of samples with concentrations above 20 ng/kg, the dairy farm was notified and it was recommended that appropriate precautionary measures be taken. As a result of this intervention, it was possible to stop the increase in milk contamination, and the AFM1 contamination of the milk produced was kept below the 50 ng/kg level. Detailed results will be published in the final report of the project.

The number of milk samples examined, broken down by year, is shown in **Figure 4**.

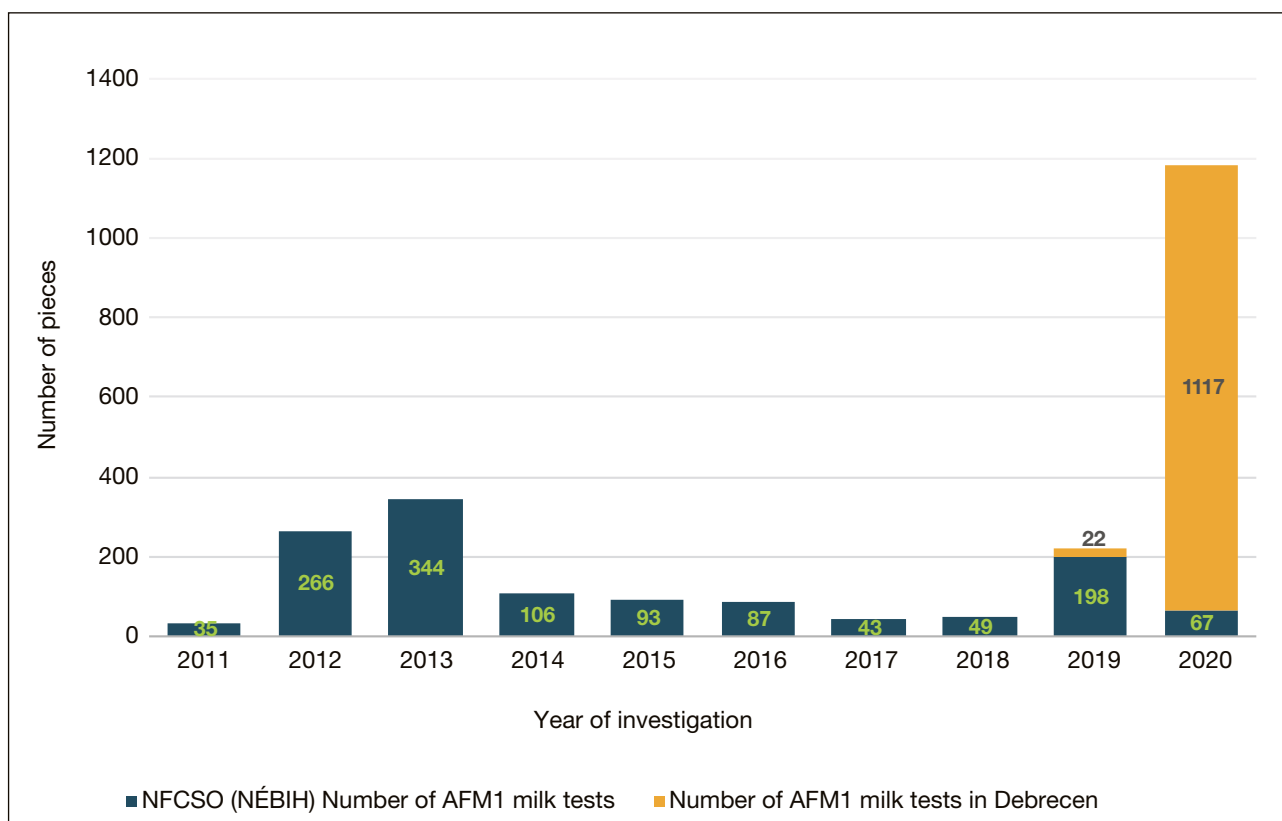


Figure 4. Yearly test sample numbers from the Hungarian survey of NFC SO (NÉBIH) and from dairy farms participating in the joint project

To refine our estimate and to compensate for the large number of values below the LOQ, instead of the usual LOQ, LOQ=0 and LOQ/2 approximations, the values of concentration data below the LOQ were also taken into account with the values of data generated with the help of a distribution with an element number identical to that of the number of measurement results. To measurement results above the LOQ, different distributions were fitted using the GAMLSS and GAMLSS.dist packages of the R statistical software using maximum likelihood estimation, then we used the parameters describing the goodness of the fit (AIC – Akaike’s Information Criterion, BIC – Bayesian Information Criterion and Global Deviance) to select the distributions that gave the optimal fit. The adequacy of the fits was also evaluated by visual comparison of the histogram made from the data and the distribution obtained, as well as by examining the normality of the differences and using a Q-Q plot. The two best-fit distributions were the two-parameter lognormal (Figure 6) and the four-parameter Box-Cox t-distribution (BCT) (Figure 7), which is suitable for the modeling of slowly decaying, continuously distributed data with positive or negative distortion similar to those of aflatoxins [68, 69]. Exposure calculations were performed with a lognormal distribution generated with the assumption of LOQ=5. The selected distributions were then fitted to the entire AFM1 data set, and the evaluation was performed again. Given that a positive change was observed in the parameters describing the goodness of the fit, the distribution chosen were considered to be acceptable.

Descriptive statistics for AFM1 test results and the fitted distribution are summarized below.

Table 3. Descriptive statistics of AFM1 test results (ng/kg) used for the calculations

	DE	NÉBIH	Total	LogLOQ5
Number	1,177	1,176	2,465	2,465
Minimum	2.9	3	2.9	0.50
P0.05	2.9	3	2.9	1.60
Median	3.17	7	4.19	3.80
Mean	6.96	15.3	10.9	9.66
P0.975	42	68.5	56	55.4
Maximum	71.0	860	860	860

The relative frequency distributions of NÉBIH and DE test results are shown in **Figure 5**.

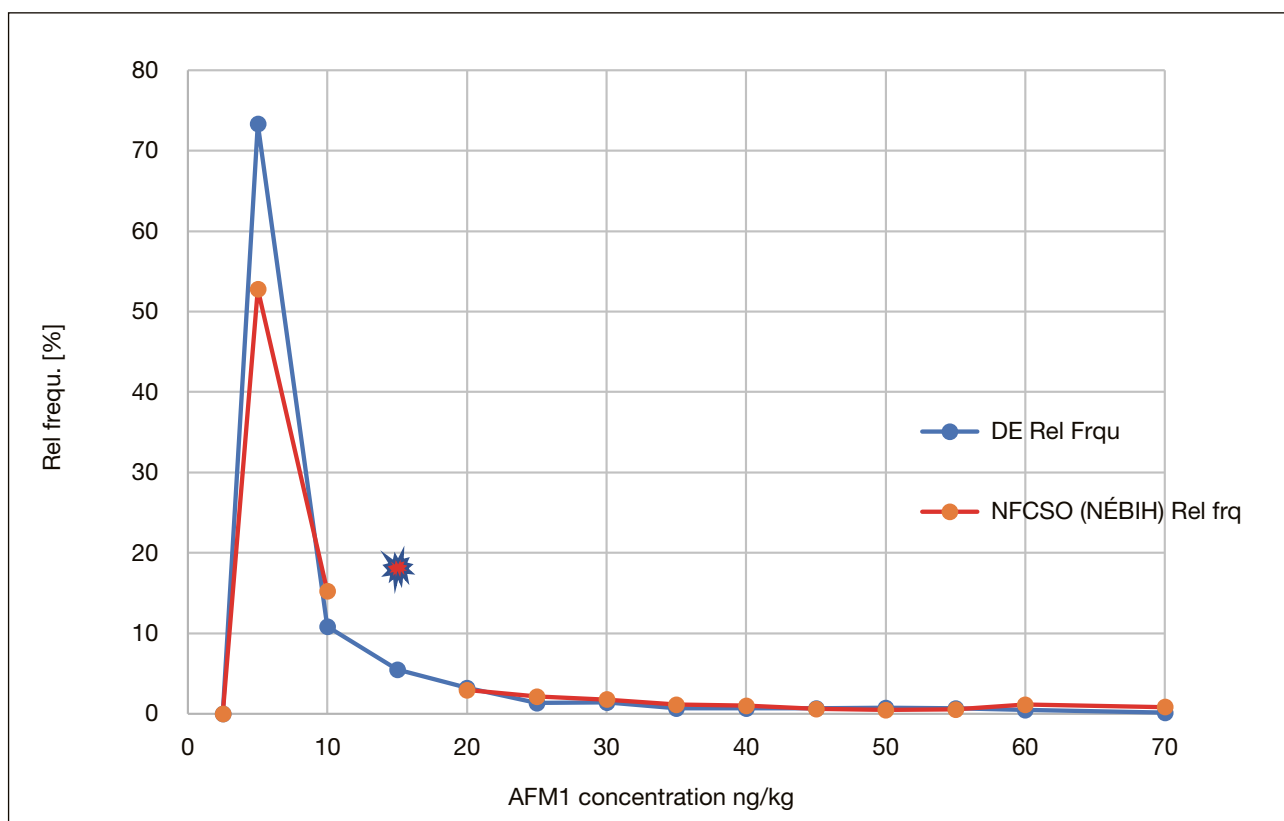


Figure 5. Relative frequency distribution of the AFM1 contamination of milk samples taken in the NÉBIH monitoring program and in the framework of the DE-NÉBIH cooperation

With the exception of the outstanding NÉBIH measurement result values (indicated with blue-red asterisk) in the 10-15 ng/kg range, the frequency of AFM1 concentrations in the LOQ-70 ng/kg range was very similar in the two series of measurements and this justifies the joint evaluation of the measurement results. The relative frequency of samples containing AFM1 in concentrations above 70 ng/kg was <0.5% in the NÉBIH study.

A limiting factor in the risk assessment of aflatoxins was the lack of contamination data. According to the recommendation of EFSA [29], food categories for which the number of positive samples does not exceed 25 or for which the proportion of samples below the limit of quantification is greater than 80% should be excluded. In terms of AFM1 results, only the testing of milk met this criterion (Table 4), the number of tests for processed dairy products proved to be very small.

Table 4. Number of samples tested and % of >LOQ values

	Cow's milk	Other milk	Formula ¹	Cheese, cottage cheese	Yogurt, kefir	Other ²
No. of samples	1288	61	193	30	28	12
>LOQ [%]	25	16.4	0	6.7	0	0

¹: Formula: infant formula and other baby food

²: Milk-based food

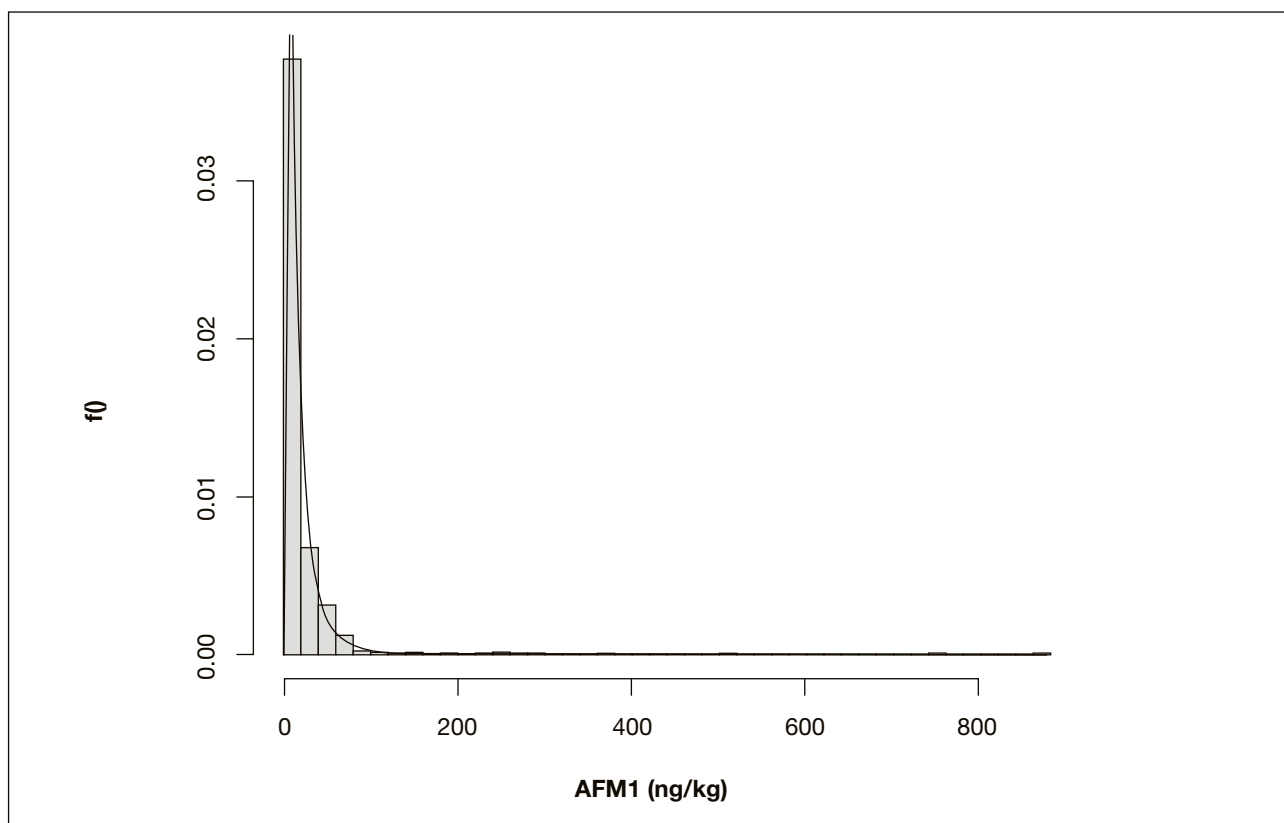


Figure 6. Lognormal distribution fitted to AFM1 concentration results measured in milk

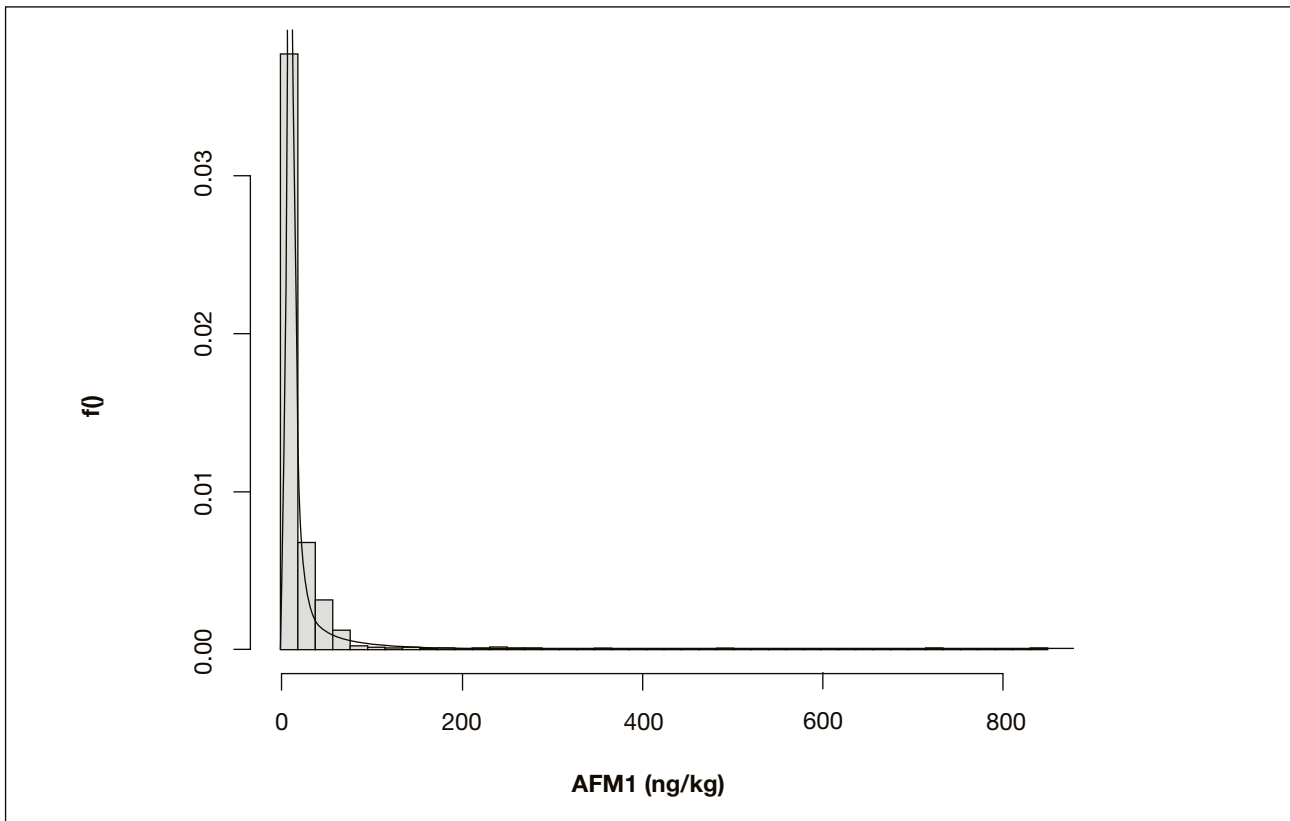


Figure 7. Box-Cox *t*-distribution fitted to AFM1 concentration results measured in milk

4. Consumer exposure

In the case of food consumption data, the Observed Individual Means (OIM) method recommended for long-term estimation was used. First, all milk and dairy product consumption data were converted to milk equivalent, using the enrichment and processing factors specific to the given food category (**Equations 2 and 3**).

The intake of foods e_1, \dots, e_j expressed in g/kg body weight (B) on a given consumption day (n), expressed in milk equivalent is

$$B_n = \frac{\sum_{e=1}^j (m_e \times F_e)}{tkg_n} \quad (2),$$

where

m_e is the mass (g) of food e on consumption day n ,

F is the processing (e.g., enrichment) factor characteristic of food e ,

kg body weight is the body weight of the person belonging to the given consumption day,

$$F = \frac{C_{AFM1e}}{C_{AFM1tej}} \quad (3),$$

where C_{AFM1e} is the AFM1 concentration in the milk used for the preparation of food e and $C_{AFM1tej}$ is the AFM1 concentration in the processed food.

F_e is the value calculated from the min., med. and max. results obtained in the experiments.

By multiplying the amounts consumed in g/kg body weight/day by the average AFM1 concentration (ng/kg) calculated from the values of the fitted distribution functions, the exposure values for each consumption day were obtained (ng/kg body weight/day). The intake values of the 2 (2018-2020 survey) or 3 (2009 survey) consumption days of the participating persons were averaged. The results were aggregated by consumer age group and consumer exposure was calculated using the data from both food consumption surveys.

First, the effects of the minimum (F_{min}), median (F_{med}) and maximum (F_{max}) values of the processing factors on the result of the exposure estimation were examined. The calculation was performed with the fitted lognormal AFM1 mean data, as well as with the mean (EDI_{att}) and 97.5 percentile ($EDI_{0.975}$) milk consumption values of the 2018-2020 survey. The results are summarized in Table 5. The table illustrates the differences between the mean calculated using the deterministic method and the 97.5 percentile results, based on the 2018-2020 (EU MENU) survey.

Table 5. Estimated combined daily milk and milk product consumption of the various age groups as a function of dairy product processing factors

	Toddlers	Children	Adolescents	Adults	Elderly
$EDI_{attlag}(F_{min})$	0.16	0.12	0.05	0.03	0.03
$EDI_{attlag}(F_{med})$	0.19	0.14	0.06	0.04	0.03
$EDI_{attlag}(F_{max})$	0.21	0.15	0.07	0.04	0.03
$EDI_{0.975}(F_{min})$	0.54	0.36	0.14	0.10	0.08
$EDI_{0.975}(F_{med})$	0.55	0.39	0.15	0.11	0.09
$EDI_{0.975}(F_{max})$	0.56	0.40	0.16	0.12	0.10

Taking into account the minimum-median-maximum values of the processing factors did not notably affect the results. There were significant differences in the mean values of the toddler age group when considering the minimum and median factors, therefore, the values calculated with the median of the processing and enrichment factors are used below to present the different exposure estimation results.

The exposure of the various age groups was calculated based on the P0.05, mean, median P0.975 percentile estimated daily intake values (EDI) of the 2009 food consumption survey, median processing factors and mean AFM1 concentration data. The exposures of the different consumer age groups were compared on the basis of the calculated EDI.

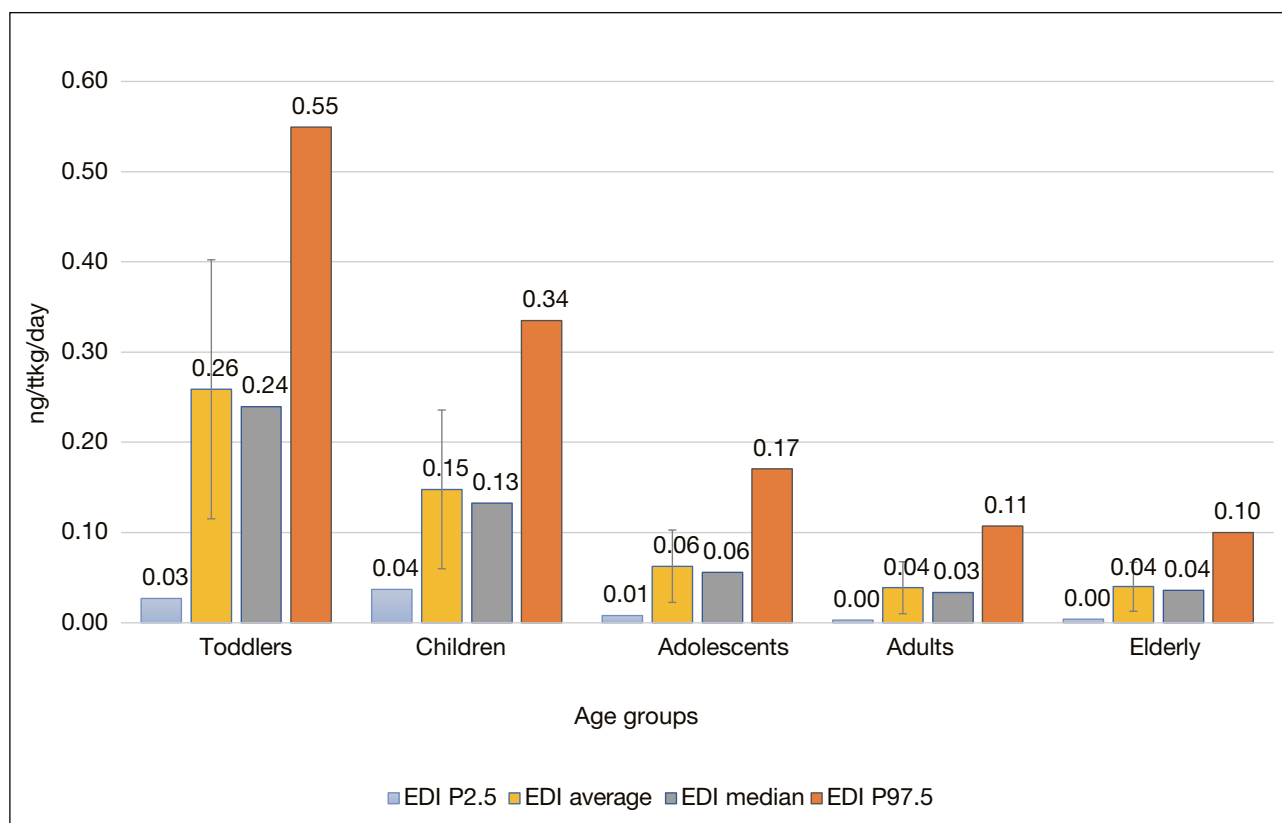


Figure 8. Estimated daily intakes (ng/kg/day) deterministic estimation; Comparison of the P0.025, mean, median and P0.95 EDI values of the different age groups, based on the 2009 consumption data

The estimated daily intake values of the age groups of the 2018-2020 survey show a trend similar to that of the 2009 data (**Figure 9**).

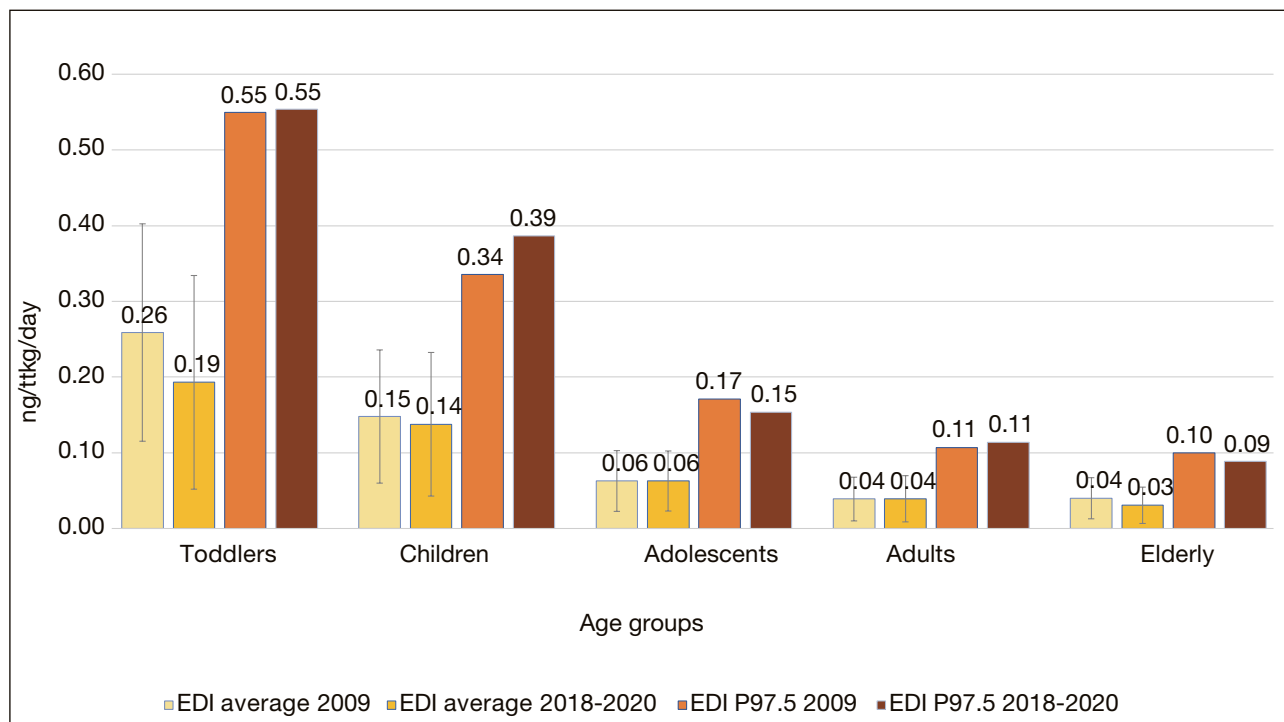


Figure 9. Estimated daily intakes, deterministic estimation; Comparison of the P0.025, mean, median and P0.95 EDI values of the different age groups, based on the 2009 and 2018-2020 consumption data

Comparing both the mean and the 97.5 percentile estimated daily intake values, it is clear that the exposure of each age group has been found mostly constant over the past 10 years. The only noticeable differences are in the mean values of the toddler age group and the 97.5 percentile values of the children age group, but the differences are not significant. The number of items in the toddler age group in the 2009 survey is very low (90 people) compared to the 2018-2020 survey (482 people). Values calculated with a smaller number of elements are burdened with a greater uncertainty.

4.1. Assessment of consumer exposure

Based on the obtained exposure values, the Margin of Exposure (MoE) approach (Equation 3), the hazard index (HI) (Equation 4) and the probability increase of liver cancer attributable to AFM1 intake were used to assess the risk of the Hungarian population. For the MoE method, the BMDL₁₀ value for AFM1 of 4 µg/kg body weight/day was taken into consideration:

$$MoE = \frac{BMDL_{10}}{EDI} \quad (4).$$

Consumer exposure is considered to be risky if the value of MoE is <10,000. The MoE values of exposure calculated by the deterministic estimation from the consumption data of the 2018-2020 food consumption survey are shown in **Table 6**.

Table 6. MoE values of average and large consumers (97.5 percentile) by age group

	Toddlers	Children	Adolescents	Adults	Elderly
MoE EDI mean	20722	29056	63779	101949	130605
MoE EDI P0.975	7179	10353	26059	35082	45182

The health risk threshold (10,000) is reached or approached only by the “large consumers” (97.5 percentile) of the toddler and children age groups. In the case of the other age groups, no significant risk can be identified using this risk characterization methodology.

For the calculation of the hazard index, the safe dose recommended by Kuiper-Goodmann [59] was used (0.2 ng/kg body weight):

$$HI = \frac{EDI \text{ (ng ttkg}^{-1}\text{)}}{0,2 \text{ ng ttkg}^{-1}} \text{ (5).}$$

When calculating the hazard index (HI), the degree of risk is directly proportional to the EDI values and is considered to be of concern when the value is 1 or higher. As an example, the results of deterministic estimates using the consumption data of the 2018-2020 food consumption survey by age group are shown in **Table 7**.

Table 7. Hazard indices (HI) calculated from the EDI values of the different age groups

	Toddlers	Children	Adolescents	Adults	Elderly
HI Mean	1.0	0.7	0.3	0.2	0.2
HI P0.975	2.8	1.9	0.8	0.6	0.4

Note: HI values that pose a health risk are indicated by bold numbers

HI values calculated from the mean and 97.5 percentile values of the estimated daily intakes of the age groups indicate that the risk from exposure of the adolescent, adult and elderly age groups is not considered to be of concern. However, for toddlers and children, in the case of the 97.5 percentile values (large consumers), exposure is well above levels considered to be safe. One of the most important of the above results is the HI value of 1, characterizing the average intake of toddlers, as it suggests that a significant proportion of this age group is exposed to large amounts of AFM1, which is of great health concern.

Assuming a Hungarian hepatitis B prevalence of 0,7% [70], the incidence of liver cancer associated with aflatoxin was calculated using Equation 1. Calculations were also performed with the mean and upper 95% confidence values for the likelihood of developing liver cancer:

$$\text{Mean } R_{Mo} = [(0.0269 \times 0.007) + (0.0017 \times 0.993)] \times EDI,$$

$$CI_{.95} R_{Mo} = [(0.0562 \times 0.007) + (0.0049 \times 0.993)] \times EDI.$$

The values of hepatocellular carcinoma (HCCi) attributable to aflatoxin exposure derived from the mean and 97.5 percentile results of AFM1 exposure values calculated from the consumption data of the 2018-2020 food consumption survey by deterministic estimation (DET) (illness/100,000 persons/year) are summarized by age group in **Table 8**.

Table 8. Incidence of liver cancer as a function of EDI by age group

	Toddlers	Children	Adolescents	Adults	Elderly
R (EDI mean)	0.00036	0.00026	0.00012	0.000074	0.000057
R (EDI mean, CI0.95)	0.0010	0.00072	0.00033	0.00021	0.00016
R (EDI 0.975)	0.00083	0.00062	0.00025	0.00018	0.00014
R (EDI 0.975, CI0.95)	0.0023	0.0017	0.00069	0.00050	0.00039

The risk of developing HCC is increased many times by aflatoxin exposure in the presence of chronic hepatitis B. As the prevalence of hepatitis B is low in Hungary (and in Europe in general), the increase in HCCi induced by aflatoxin is not high either. Although the numerical value of the estimated incidence of liver cancer proved to be very low, their relative values show in this case as well the high risk of “large consumers” of toddlers and children compared to the other age groups.

5. Situation assessment, recommendations

Chronic exposure to AFM1 calculated by the deterministic method and compared to various reference values consistently indicates that the exposure of children aged 1<3 is the highest in the studied age groups. The lowest exposure values are observed for the oldest age groups. Due to a lack of data, exposure in infants aged <1 could not be studied. However, the correlation is not directly between age and intake amounts, but between the change (typically increase) in body weight of increasingly older age groups and the intake amounts.

Given that the toxicity of aflatoxins primarily poses a health risk to developing organisms, special attention should be paid to reducing their exposure and keeping it to a minimum. However, it should be emphasized that the presence of carcinogenic compounds should be kept to a minimum in all age groups.

The body is burdened not only with the AFM1 contamination of breast milk and other milks or milk-based products, but also with the AFB1 taken with other foods and which is 10 times more toxic than AFM1. Since their mechanism of action is the same, the effects of aflatoxins and AFM1 add up. Therefore, we need to pay attention to the quality of our food and the storage conditions of products with open packaging. Products with a musty smell and traces of mold should not be consumed, even after cooking or baking. Milks, analyzed during the annual monitoring inspections and exhibiting contamination levels that are 10 to 15 times higher than the maximum tolerable level allowed by the law are also marketed. Particularly at risk are those individuals who regularly consume milk from the same source where the animals are fed aflatoxin-contaminated feed.

To date, there is no routine and industry-wide large scale process that can reliably and completely eliminate the aflatoxin content of foods, so the focus remains on preventing contamination. This is a complex task that requires the involvement of all stakeholders in the food chain, starting with the application of good agricultural practices, and the proper preparation and management of arable land. This is followed by the selection of hybrids resistant to mold, and then a series of measures taken during the harvesting, transport and storage of crops that can prevent the growth of molds (setting appropriate temperature and humidity levels, sorting, peeling and physical treatment of the crops). Last but not least, the appropriate storage and treatment cereals, silage or other processed feed products intended for animal feed, checking their aflatoxin levels and their physical, chemical or biological detoxification, if necessary [4].

The success of prevention and the adequacy of milk shipments can also be checked at the level of dairy farms and dairy plants. With a sampling plan developed for the detection of the aflatoxin M1 content of raw milk and an early warning system, and by applying the 20 ng/kg action threshold already proven to be useful in Italy, an increase in the level of contamination can be predicted effectively. Based on the warning, the dairy farm can prevent the maximum tolerable AFM1 concentration (50 ng/kg) from being reached in accordance with local conditions, for example, by modifying the composition of the feed or by using toxin binders. This can reduce the use of contaminated milk batches in primary and secondary milk processing and, consequently, reduce consumer exposure [1, 10, 71].

It should also be noted that, due to the uncertainty of the detection, ELISA kits set to indicate an AFM1 concentration of 50 ng/kg may still classify batches of milk with contaminations of ≤ 65 -70 ng/kg as adequate in 50% of the cases.

In order to protect infants and young children who are most exposed to AFM1 and who are also the most vulnerable, but also to protect the health of the entire population, it is recommended that the regulation of dairy plant inspections is amended in a way that ensures that if the AFM1 contamination of the milk delivered from a farm is ≥ 20 ng/kg, the plant is obligated to notify the dairy farm and NÉBIH, and thereafter to monitor the effectiveness of the dairy farm measures taken to reduce the contamination by daily monitoring of the contamination of the milk delivered from the farm.

It is also recommended that the warning level used in the self-inspection of dairy farms is set to 20 ng/kg instead of the current 50 ng/kg. ELISA kits for the detection of AFM1 at a concentration of 5-10 ng/kg are available for both dairy plant and producer monitoring, so there is no methodological obstacle to the establishment of a new warning threshold.

6. Acknowledgment

The authors would like to thank to Judit Sali and Katalin Csizmadia for providing the relevant data of the 2018-2020 NÉBIH consumption survey, the staff of the DE Instrument Center and NÉBIH for the AFM1 analysis of the milk samples, Attila Nagy and Gabriella Miklós of NÉBIH for their useful suggestions, Béla Béri, who participated in the DE-NÉBIH project, and to the managers and employees of Alföldi Tej and the dairy farms for their cooperation.

Our research program was supported by the National Research, Development and Innovation Fund in the 2018-1.2.1-NKP foundation system with the designation 2018-1.2.1-NKP-2018-00002 (AA, KK).

7. References

- [1] Ambrus Á., Szenczi-Cseh, J., Griff, T., Kerekes K., Miklós G., Szigeti, T., Vászárhelyi, A. (2020): Élelmiszereink mikotoxin és növényvédőszer-maradék szennyezettségének élelmiszerbiztonsági megítélése 2. rész Mikotoxinok; Food safety assessment of the mycotoxin and pesticide residue contamination of our foods, Part 2. Mycotoxins. *Journal of food Investigation*, **LXVI** (2) pp. 2923-2949.
- [2] Pfliegler, W. P., Pócsi, I., Győri, Z., & Pusztahelyi, T. (2020): The Aspergilli and Their Mycotoxins: Metabolic Interactions With Plants and the Soil Biota. *Frontiers in Microbiology*, Vol. **10** 2908. doi:10.3389/fmicb.2019.02921
- [3] Ráduly, Z., Szabó, L., Madar, A., Pócsi, I., & Csernoch, L. (2020): Toxicological and Medical Aspects of Aspergillus-Derived Mycotoxins Entering the Feed and Food Chain. *Frontiers in Microbiology* **10**. doi:10.3389/fmicb.2019.02908
- [4] Peles, F., Sipos, P., Kovács, S., Győri, Z., Pócsi, I., Pusztahelyi, T. (2021): Biological Control and Mitigation of Aflatoxin Contamination in Commodities. *Toxins* **13** (104). <https://doi.org/10.3390/toxins13020104>
- [5] Mahato, D.K., Lee, K.E., Kamle, M., Devi, S., Dewangan, K.N., Kumar, P, Kang, S.G. (2019): Aflatoxins in Food and Feed: An Overview on Prevalence, Detection and Control Strategies. *Front. Microbiol.* Vol. **10** (2266) doi: 10.3389/fmicb.2019.02266
- [6] Filazi, A., Tansel, U. (2019): Occurrence of Aflatoxins in Food (2013): in Mehdi Razzaghi, Abyaneh (Szerk.), *Aflatoxins - Recent Advances and Future Prospects*. doi:10.5772/51031
- [7] Mikló, G., Angeli, C., Ambrus, Á., Nagy, A., Kardos, V., Zentai, A., Kerekes, K., Farkas, Z., Józwiak, Á., Bartók, T. (2020): Detection of Aflatoxins in Different matrices and Food-Chain Positions. *Front. Microbiol* **11** (1916) doi: 10.3389/fmicb.2020.01916
- [8] Pócsi, I., Giacometti, F., Ambrus, Á. and Logrieco, A.F. (2020): Editorial: Aspergillus-Derived Mycotoxins in the Feed and Food Chain. *Front. Microbiol* **11** (606108). doi: 10.3389/fmicb.2020.606108
- [9] Martinez-Miranda, M. M., Rosero-Moreano, M., and Taborda-Ocampo, G. (2019): Occurrence, dietary exposure and risk assessment of aflatoxins in arepa, bread and rice. *Food Control* **98** pp. 359–366. doi: 10.1016/j.foodcont.2018.11.046
- [10] Serraino, A., Bonilauri, P., Kerekes, K., Farkas, Z., Giacometti, F., Canever, A., Zambrini, A.V., Ambrus, Á. (2019): Occurrence of Aflatoxin M1 in raw milk marketed in Italy: Exposure Assessment and Risk Characterization. *Front. Microbiol.* **10** (2516) doi: 10.3389/fmicb.2019.02516
- [11] Udovicki, B., Ilija Djekic, I., Eleni P., Kalogianni, E.P., Rajkovic, A. (2019): Exposure assessment and risk characterization of aflatoxin m1 intake through consumption of milk and yoghurt by student population in Serbia and Greece. *Toxins* **11** (4) pp. 205-216. <https://doi.org/10.3390/toxins11040205>
- [12] Peles, F., Sipos, P., Győri, Z., Pfliegler, W.P., Giacometti, F., Serraino, A., Pagliuca, G., Gazzotti, T., Pócsi, I. (2019): Adverse Effects, Transformation and Channeling of Aflatoxins Into Food Raw Materials in Livestock. *Front. Microbiol.* **10** (2861) doi: 10.3389/fmicb.2019.02861
- [13] Campagnollo, F. B., Ganey, K. C., Khaneghah, A. M., Portela, J. B., Cruz, A. G., Granato, D., Corassin, C. H., Oliveira, C. A. F., Sant'Ana, A. S. (2016): The occurrence and effect of unit operations for dairy products processing on the fate of aflatoxin M1: A review. *Food Control* **68** pp. 310-329. doi:10.1016/j.foodcont.2016.04.007
- [14] Wolzak, A., Pearson, A. M., Coleman, T. H. (1986): Aflatoxin carry-over and clearance from tissues of laying hens. *Food and Chemical Toxicology* **24** pp. 37-41. doi: 10.1016/0278-6915(86)90262-0
- [15] Hussain, Z., Khan, M. Z., Khan, A., Javed, I., Saleemi, M. K., Mahmood, S., Asi, M. R. (2010): Residues of aflatoxin B1 in broiler meat: Effect of age and dietary aflatoxin B1 levels. *Food and Chemical Toxicology* **48** pp. 3304-3307. doi: 10.1016/j.fct.2010.08.016
- [16] Bintvihok, A., Thiengnin, S., Doi, K., & Kumagai, S. (2002): Residues of Aflatoxins in the Liver, Muscle and Eggs of Domestic Fowls. *Journal of Veterinary Medical Science* **64** (11) pp. 1037–1039. doi:10.1292/jvms.64.1037
- [17] Moran, C. A., Kettunen, H., Yiannikouris, A., Ojanperä, S., Pennala, E., Helander, I. M., & Apajalahti, J. (2013): A dairy cow model to assess aflatoxin transmission from feed into milk – Evaluating efficacy of the mycotoxin binder Mycosorb®. *Journal of Applied Animal Nutrition*, 2. doi:10.1017/jan.2013.12

- [18] Britzi, M., Friedman, S., Miron, J., Solomon, R., Cuneah, O., Shimshoni, J., Shlosberg, A. (2013): Carry-Over of Aflatoxin B1 to Aflatoxin M1 in High Yielding Israeli Cows in Mid- and Late-Lactation. *Toxins* **5**(1), pp. 173–183. doi:10.3390/toxins5010173
- [19] Battacone, G., Nudda, A., Palomba, M., Pascale, M., Nicolussi, P., Pulina, G. (2005): Transfer of Aflatoxin B1 from Feed to Milk and from Milk to Curd and Whey in Dairy Sheep Fed Artificially Contaminated Concentrates. *J. Dairy Sci.* **88** (9) pp. 3063–3069. doi: 10.3168/jds.S0022-0302(05)72987-8
- [20] JECFA (2018): Aflatoxins. In: Safety evaluation of certain contaminants in food: prepared by the eighty-third meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA). *FAO JECFA Monographs*, pp. 3-280. SBN (PDF) 978-92-4-069847-5
- [21] Fakhri, Y., Ghorbani, R., Taghavi, M., Keramati, H., Amanidaz, N., Moradi, B., Nazari, S.H., Shariatifar, N., Khaneghah, A.M. (2019): Concentration and Prevalence of Aflatoxin M1 in Human Breast Milk in Iran: Systematic Review, Meta-Analysis, and Carcinogenic Risk Assessment: A Review. *Journal of Food Protection* **82** (5) pp. 785–795. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-367
- [22] Fakhri, Y., Rahmani, J., Oliveira, C.A.F., Franco, L.T., Corassin, C.H., Saba, S., Rafique, J., Khaneghah, A.M. (2019): Aflatoxin M1 in human breast milk: a global systematic review, metaanalysis, and risk assessment study (Monte Carlo simulation). *Trends in Food Science & Technology* **88** (5) pp. 333-342. doi:/10.1016/j.tifs.2019.03.013
- [23] Radonić, J. R., Kocić Tanackov, S. D., Mihajlović, I. J., Grujić, Z. S., Vojinović Miloradov, M. B., Škrinjar, M. M., & Turk Sekulić, M. M. (2017): Occurrence of aflatoxin M1 in human milk samples in Vojvodina, Serbia: Estimation of average daily intake by babies. *Journal of Environmental Science and Health, Part B* **52** (1) pp. 59-63. doi: 10.1080/03601234.2016.1229454
- [24] Kunter, I., Hürer, N., Gülcan, H. O., Öztürk, B., Dogan, I., Sahin, G. (2017): Assessment of Aflatoxin M1 and Heavy Metal Levels in Mothers Breast Milk in Famagusta, Cyprus. *Biol Trace Elem Res.* **175** pp. 42-49. doi:10.1007/s12011-016-0750-z
- [25] Valitutti, F., De Santis, B., Trovato, C.M., Montuori, M., Gatti, S., Oliva, S., Brera, C., Catassi, C. (2018): Assessment of Mycotoxin Exposure in Breastfeeding Mothers with Celiac Disease. *Nutrients* **10** (3) doi:10.3390/nu10030336.
- [26] Bogalho, F., Duarte, S., Cardoso, M., Almeida, A., Cabeças, R., Lino, C., Pena, A. (2018): Exposure assessment of Portuguese infants to Aflatoxin M1 in breast milk and maternal social-demographical and food consumption determinants, *Food Control* doi: 10.1016/j.foodcont.2018.02.043
- [27] Csapó, J., Albert, C., Sipos, P. (2020): The aflatoxin content of milk and dairy products as well as breast milk and the possibilities of detoxification. *Acta Universitatis Sapientiae, Alimentaria*, **13** pp. 99-117. doi:10.2478/ausal-2020-0006
- [28] Trevisani, M., Farkas, Z., Serraino, A., Zambrini, A. V., Pizzamiglio, V., Giacometti, F. Ambrus, A. (2014): Analysis of industry-generated data. Part 1: a baseline for the development of a tool to assist the milk industry in designing sampling plans for controlling aflatoxin M1 in milk. *Food Additives & Contaminants: Part A: Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **31** (7) pp. 1246-1256. doi: 10.1080/19440049.2014.925587
- [29] EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (2020): Scientific opinion - Risk assessment of aflatoxins in food. *EFSA Journal* **18** (e06040) pp. 1-112. doi: 10.2903/j.efsa.2020.6040
- [30] IARC (2012): Aflatoxins. Chemical Agents and Related Occupations. A review of Human Carcinogens. *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*.
- [31] Pascal, A., Risco-Castillo, V., Jouvion, G., Le Barzic, C. and Guillot, J. (2021): Aspergillosis in Wild Birds. *J. Fungi* **7** (3) p. 241; doi:10.3390/jof7030241
- [32] JECFA, (2001): Aflatoxin M1. In: Safety evaluation of certain mycotoxins in food. *FAO Food and Nutrition Paper* **74** pp. 1-102.
- [33] WHO (2002): Evaluation of certain mycotoxins in food TRS 906-JECFA 56/8 *WHO technical report series* 906 https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/42448/WHO_TRS_906.pdf?sequence=1 (Hozzáférés: 2021.01.28.)
- [34] Bedard, L. L., Massey, T. E. (2006): Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair. *Cancer Letters*, **241** (2) pp. 174-83. doi: 10.1016/j.canlet.2005.11.018
- [35] EFSA (2007): Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain (CONTAM) related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products. *EFSA Journal* **5** 446. doi: 10.2903/j.efsa.2007.446

- [36] Williams, J. H., Phillips, T. D., Jolly, P. E., Stiles, J. K., Jolly, C. M. & Aggarwal, D. (2004): Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. *The American Journal of Clinical Nutrition* **80** pp. 1106-1122. doi:10.1093/ajcn/80.5.1106
- [37] Wang, J. S. & Groopman, J. D. (1999): DNA damage by mycotoxins. *Mutation Research* **424** (1-2) pp. 167-181. doi: 10.1016/s0027-5107(99)00017-2
- [38] Denning, D. W., Allen, R., Wilkinson, A. P. & Morgan, M. R. (1990): Transplacental transfer of aflatoxin in humans. *Carcinogenesis* **11** (6) pp. 1033-1035. doi: 10.1093/carcin/11.6.1033
- [39] Serrano-Niño, J. C., Cavazos-Garduño, A., Hernandez-Mendoza, A., Applegate, B., Ferruzzi, M. G., San Martín-González, M. F., García, H. S. (2013): Assessment of probiotic strains ability to reduce the bioaccessibility of aflatoxin M1 in artificially contaminated milk using an in vitro digestive model. *Food Control* **31** (1) pp. 202-207. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.023
- [40] Bullerman, L. B., Bianchini, A. (2014): Good Food-Processing Techniques: Stability of Mycotoxins in Processed Maize-Based Foods. In: LESLIE, J. F. (Szerk.) *Mycotoxin Reduction in Grain Chains*. Ames, Iowa, USA: Wiley Blackwell, John Wiley & Sons, Inc. p. 92-97 ISBN 978-0-8138-2083-5
- [41] Ali, N. (2019): *Aflatoxins in rice: worldwide occurrence and public health perspectives*. *Toxicology Reports*. doi:10.1016/j.toxrep.2019.11.007
- [42] Prandini, A., Tansini, G., Sigolo, S., Filippi, L., Laporta, M., Piva, G. (2009): On the occurrence of aflatoxin M1 in milk and dairy products. *Food and Chemical Toxicology*, **47** (5) pp. 984-991. doi: 10.1016/j.fct.2007.10.005.
- [43] Yosef, T. A., Al-Julaifi, M. Z., Salah-El-Dein, W. M., Al-Rizqi, A. M. (2013): Assessment of Aflatoxin M1 Residues in Raw Cow Milk at Al- Riyadh Area with Reference to Some Detoxification Applications. *Life Science Journal - Acta Zhengzhou University Overseas Edition*, **10** pp. 3365-3369.
- [44] Iqbal, S. Z., Jinap, S., Pirouz, A. A. & Faizal, A. R. A. (2015): Aflatoxin M-1 in milk and dairy products, occurrence and recent challenges: A review. *Trends in Food Science and Technology*, **46** pp. 110-119. doi: 10.1016/j.tifs.2015.08.005
- [45] Kuharic, Z., Jakopovic, Z., Canak, I., Frece, J., Bosnir, J., Pavlek, Z., Ivesic, M., Markov, K. (2018): Removing aflatoxin M1 from milk with native lactic acid bacteria, centrifugation, and filtration. *Archives of Industrial Hygiene and Toxicology* **69** (4) pp. 334-339. doi: 10.2478/aiht-2018-69-3160
- [46] Foroughi, M., Jamab, M. S., Keramat, J. & Foroughi, M. (2018): Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* on Perlite Beads for the Decontamination of Aflatoxin M1 in Milk. *Journal of Food Science* **83** (7) pp. 2008-2013. doi:10.1111/1750-3841.14100
- [47] Mohammadi, H., Mazloomi, S. M., Eskandari, M. H., Aminlari, M., Niakousari, M. (2017): The Effect of Ozone on Aflatoxin M1, Oxidative Stability, Carotenoid Content and the Microbial Count of Milk. *Ozone: Science & Engineering* **39**(6) pp. 447-453. doi:10.1080/01919512.2017.1329647
- [48] Assaf, J. C., El Houry, A., Atoui, A., Louka, N., Chokr, A. (2018): A novel technique for aflatoxin M1 detoxification using chitin or treated shrimp shells: in vitro effect of physical and kinetic parameters on the binding stability. *Applied Microbiology & Biotechnology* **102** pp. 6687-6697. doi:10.1007/s00253-018-9124-0
- [49] Womack, E. D., Sparks, D. L., Brown, A. E. (2016): Aflatoxin M-1 in milk and milk products: a short review. *World Mycotoxin Journal* **9** (2) pp. 305-315. doi:10.3920/WMJ2014.1867
- [50] Corassin, C. H., Bovo, F., Rosim, R. E., Oliveira, C. A. F. (2013): Efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria strains to bind aflatoxin M-1 in UHT skim milk. *Food Control*, **31** (1) pp. 80-83. doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.033
- [51] Kamyar, S., Movassaghazani, M. (2017): Reduction of Aflatoxin M1 in Milk Using Kefir Starter. *Iranian Journal of Toxicology* **11** (6) pp. 27-31. doi:10.29252/arakmu.11.6.27
- [52] Rad, M. N., Razavilar, V., Anvar, S. A. A., Akbari-Adergani, B. (2018): Selected bio-physical factors affecting the efficiency of *Bifidobacterium animalis lactis* and *Lactobacillus delbrueckii bulgaricus* to degrade aflatoxin M-1 in artificially contaminated milk. *Journal of Food Safety*, **38** (4) (e12463) doi:10.1111/jfs.12463
- [53] Elsanhoty, R. M., Salam, S. A., Ramadan, M. F., Badr, F. H. (2014): Detoxification of aflatoxin M1 in yoghurt using probiotics and lactic acid bacteria. *Food Control* **43** pp. 129-134. doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.002
- [54] Hamilton, D., Murray, B., Ambrus, Á., Baptista, G., Ohlin, B., Kovacicova, J. (1997): Optimum use of available residue data in the estimation of dietary intake of pesticides. *Pure & Applied Chemistry* **69** (6) pp. 1373-1410. doi:/10.1351/pac199769061373

- [55] Zentai, A., Szeitzné Szabó, M., Mihucz, G., Szeli, N., Szabó, A., Kovács, M. (2019): Occurrence and risk assessment of fumonisin B1 and B2 mycotoxins in maize-based food products in Hungary. *Toxins* **11** (12) p. 709. doi: 10.3390/toxins11120709
- [56] Zentai, A., Sali, J., Szabó, I.J., Szeitzné-Szabó, M., Ambrus, Á., Vásárhelyi, A. (2013): Factors affecting the estimated probabilistic acute exposure to captan from apple consumption. *Food Additives & Contaminants: Part A* **30** (5) pp. 833-842. doi:10.1080/19440049.2013.794977
- [57] Zentai, A., Kerekes, K., Szabó, I., Ambrus, Á. (2015): A fogyasztók növényvédőszermaradékokból származó expozíciójának finomítása, 1. rész. *Élelmiszervizsgálati Közlemények* **LXI** (3) pp. 681-719.
- [58] EFSA (2010): Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA Journal* **8** (3) p. 1557 doi:10.2903/j.efsa.2010.1557
- [59] Szenczi-Cseh, J. & Ambrus, A. (2017): Uncertainty of exposure assessment of consumers to pesticide residues derived from food consumed. *Journal of Environmental Science and Health B*, **52** (9) pp. 658-670. doi: 10.1080/03601234.2017.1331671
- [60] EFSA (2006): Opinion of the Scientific Committee related to Uncertainties in Dietary Exposure Assessment. *EFSA Journal* **438** pp. 1-54. doi:https://doi.org/10.2903/j.efsa.2007.438
- [61] Delmaar, C., Heinemeyer, G., Jantunen, M., Schneide, K., Schumann, M. (2020): General Aspects of Exposure Evaluation. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG., pp. 55-155. ISBN 978-3-319-96148-4
- [62] Gürtler, R. (2020): Hazard Assessment and Derivation of Health-Based Guidance Values. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. pp. 253-254. ISBN 978-3-319-96148-4
- [63] Sieke, C. (2020): Principles of Consumer Exposure Assessment for Pesticide Residues. In: Heinemeyer, G. (Szerk.) *The Practice of Consumer Exposure Assessment*. Gewerbestrasse 11, 6330 Cham, Switzerland: Springer Nature Switzerland AG. pp. 315-322. ISBN 978-3-319-96148-4
- [64] Kuiper-Goodman, T. (1990): Uncertainties in the risk assessment of three mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin, and zearalenone. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **68** pp. 1017-1024. doi: 10.1139/y90-155
- [65] Szeitzne Szabo, M., Bíró, L., Bíró, Gy., Sali, J. (2011): Dietary survey in Hungary, 2009. Part I. Macronutrients, alcohol, caffeine, fibre. *Acta Alimentaria* **40** (1) pp. 142-152. doi: 10.1556/AAim.40.2011.1.16
- [66] Csizmadia, K., Larnsak, L., Pfaff, N., Sali, J., (2020): Hungarian national food consumption survey on adults. *EFSA supporting publication* **17** (12)EN-1981. p. 26.
- [67] Csizmadia, K., Larnsak, L., Pfaff, N., Sali, J. (2020): Hungarian national food consumption survey on toddlers and other children. *EFSA supporting publication* **17** (12)EN-1982. p. 26. doi:10.2903/sp.efsa.2020.EN-1982
- [68] Ferrari, S.L.P., Fumes, G. (2017): Box-Cox symmetric distributions and applications to nutritional data. *AStA Adv. Stat. Anal.* **101** pp. 321-344. doi:10.1007/s10182-017-0291-6
- [69] Rigby, R.A., Gillian, M. D. S., Heller, Z., De Bastiani, F. (2019): Continuous three parameter distribution on $(0, \infty)$. *Distributions for Modelling Location, Scale and Shape: Using GAMLSS in R*. 1 ed.: Chapman and Hall/CRC. ISBN 9780367278847
- [70] Horváth, G., Gerlei, Zs., Gervain, J., Lengyel, G., Makara, M., Pár, A., Rókus, L., Szalay, F., Tornai, I., Werling, K., Hunyady, B. (2018): Diagnosis and treatment of chronic hepatitis B and D. National consensus guideline in Hungary from 22 September 2017. *Orvosi Hetilap* **159** (1) pp. 24-37. doi: 10.1556/650.2018.31004
- [71] Kerekes, K., Bonilauri, P., Serraino, A., Giacometti, F., Piva, S., Zambrini, V., Canever, A., Farkas, Z., Ambrus, A. (2016): An effective self-control strategy for the reduction of aflatoxin M1 content in milk and to decrease the exposure of consumers. *Food Additives and Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure & Risk Assessment* **33** (12) pp. 1840-1849. doi: 10.1080/19440049.2016.1241895

A laktációszám és a laktáció stádium hatása a tejmennyiségre, a nyers tehéntej összetételére és mikrobiológiai tulajdonságaira egy hazai tehenészeti telepen

Kulcsszavak: laktációszám, laktáció stádium, tehéntej, tejmennyiség, tejösszetétel, mikrobiológia

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A tej összetételének és higiéniai tulajdonságainak változásai befolyásolják a termelői árat, ezért elengedhetetlen, hogy a felelős tejtermelő információt gyűjtsön ezen paraméterek különböző tényezők hatására bekövetkező változásairól. A szerzők a tanulmányukban arra keresik a választ, hogy tapasztalható-e változás a tehenek napi tejmennyiségében, illetve a nyers tehéntej összetételében (zsír- és fehérjetartalom) és mikrobiológiai tulajdonságaiban (szomatikus sejtszám, összcsíraszám, coliform- és *S. aureus*-szám) az egyszer és többször ellett teheneknél, illetve a laktációjuk különböző stádiumaiban. Egy hazai nagyüzemi tejtermelő telep adatai alapján megállapították, hogy a tej zsír- és fehérjetartalmában ugyan nem volt különbség, de a többször ellett teheneknél nagyobb volt a napi tejhozam, valamint az egyszer ellett tehenek tejéhez képest a tejben magasabb volt a szomatikus sejtszám és nagyobb mennyiségben fordultak elő coliform baktériumok. A napi tejmennyiség a laktáció egymást követő stádiumaiban csökkent, viszont a tej zsír- és fehérjetartalma növekedést mutatott, amely feltételezhetően a csökkenő tejmennyiség koncentráció hatásának tulajdonítható. A mikroorganizmusok telepszámában a laktáció különböző stádiumaiban nem tapasztaltak jelentős változást.

¹ Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet

² Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állattenyésztési nem önálló Tanszék

³ Debreceni Egyetem, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

2. Bevezetés

A tehéntejnek magas a tápértéke; többek között zsírokat, fehérjéket, szénhidrátokat, vitaminokat és ásványi anyagokat tartalmaz [1]. A tej összetételének vizsgálata a tejelő állományok higiéniai, táplálkozási és egészségügyi szempontjainak figyelemmel kísérésére céljából a tejgazdaságokban rutinszerű gyakorlat [2]. A tej összetételét számos tényező befolyásolhatja, többek között a laktációk száma, a laktáció stádiuma, az évszak, valamint a takarmányozási technológia is [3, 4, 5]. A tej összetétele tehát változhat a laktációk során, és a különböző környezeti tényezők kölcsönhatásainak eredményeként különbségek lehetnek különböző tejtermelő tehenészetek között is [6]. Dürr et al. szerint kiemelkedően fontos a tejhozamra és a tej összetételére vonatkozó eltérések okainak és következményeinek meghatározása érdekében adatbázisok létrehozása. Az adatbázisnak tartalmaznia kell ezen paraméterekre és a laktációkkal kapcsolatos eseményekre vonatkozó, egyedekre vonatkozó feljegyzéseket is [7].

A tej tápértéke, magas vízáktivitása és semleges pH-ja révén kitűnő táptalajként szolgál a különféle mikroorganizmusok számára, amelyek között patogén szervezetek is előfordulhatnak, például *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* stb. [8, 9]. A tej elsődleges fertőződése során maguk a beteg állatok a fertőződés forrásai. A szisztémás, kórokozók szóródásával járó betegségben szenvedő tejelő állatok esetében a kórokozók ugyanis kiválasztódhatnak a tejjel. A másodlagos szennyeződéskor a tej kontaminációja környezeti eredetű. A helytelen fejési higiénia miatt a tej többek között az állatok bélsarától, illetve a fejéskor alkalmazott eszközöktől (fejőgépek, tejvezetékek, tejtároló tartályok) szennyeződhet [10]. Ahogy a tej a tejmedencébe, majd a bimbócsatornába kerül, különböző környezeti eredetű mikroorganizmussal fertőződhet, ezért az első tejsugarak baktérium-fertőzöttsége kiemelkedően magas. A fejés megkezdésekor célszerű ezért az első tejsugarakat a továbbiakban fejt tejtől elválasztani, majd annak megsemmisítéséről gondoskodni kell [11]. A tejben lévő baktériumszám csökkentésére leginkább hőkezelést alkalmaznak. A tej kezdeti mikrobiológiai állapota nemcsak az élelmiszerbiztonság szempontjából fontos, de befolyásolhatja az abból készült tejtermékek minőségét is [12].

A coliform baktériumok tőgygyulladást idézhetnek elő a tejtermelő állatokban. A coliform baktériumok által okozott tőgygyulladás csökkentheti a tejelő állatok tejtermelését, gazdasági veszteségeket okozva ezzel a tejtermelő telepeknek [13]. Ezeknek a baktériumoknak a jelenléte a környezetben általános, ezért jelenlétük az élelmiszerben környezeti szennyeződésre utalhat [14, 15].

A nyerstej számos forrásból szennyeződhet *S. aureus*-szal, például a környezetből, a fejők kezéről, fejőberendezésekről stb. [16]. A *S. aureus* okozta tőgygyulladás gazdasági kára abból következik, hogy a termelt tej mennyisége lecsökken, minősége leromlik, a benne mért szomatikus sejtszám megnövekszik, a gyengébb minőségű tej felvásárlási ára csökken, így a tejtermelők árbevétele is csökken [17]. A *S. aureus* elleni védekezés hatékony eszköze a megelőzés. A fertőződés a megfelelő tartási és fejési technológia betartásával, a gyakoribb légyirtással, a tőgybimbó elő- és utófertőtlenítésével, az egyszer használatos tőgytörölő papírok használatával és a laborvizsgálatok rendszeres elvégzésével előzhető meg [18].

A külső és belső tényezők a tej összetételét, és a nyerstej mikrobiológiai állapotát is befolyásolhatják. Utóbbit leginkább a tejjel közvetlenül érintkező felületek higiéniai állapota határozza meg [19]. Peles és munkatársai kutatásai során arra a megállapításra jutottak, hogy a különböző tehénlétszámú tejtermelő gazdaságokban a különféle tartási és fejési módszerek befolyásoló hatást gyakorolnak a tej mikrobiológiai minőségére [20]. Tessema a fajta, az állatok kora, a laktáció száma és a laktáció stádiuma, valamint a *S. aureus* előfordulásának a valószínűsége között keresett összefüggést.

Tanulmányában a két vizsgált szarvasmarhafajta esetében jelentős különbséget tapasztalt a *S. aureus* tejben való előfordulására vonatkozóan. A *S. aureus* nagyobb arányban fordult elő a keresztezett teheneknél, illetve az idősebb egyedek esetében [21]. Bytyqi és munkatársai a különböző fajták tejtét vizsgálva nem tapasztaltak különbséget a kapott telepszámok között [22].

Bár magyar tanulmány kevesebb számban készült a témában, több külföldi közleményben vizsgálták, hogy vajon a laktációk száma, laktációk stádiuma befolyással van-e az állatok napi tejmennyiségére, a tej összetételére és mikrobiológiai paramétereire. Tessema szerint a *S. aureus* prevalenciájában jelentős különbség figyelhető meg aszerint, hogy az állatok hányadik laktációjukban vannak. Tanulmányában megállapította, hogy a *S. aureus* azoknál a több mint kétszer ellett tehenek tejében fordult elő gyakrabban, amelyek a California Mastitis Test-tel pozitívak voltak [21]. Tenhagen és munkatársai is úgy találták, hogy a *S. aureus* előfordulásának gyakorisága nő az állatok korával [23]. Ez összefüggésben állhat azzal, hogy a fejések alkalmával a fejőgép megsértheti a tőgybimbókat, így mikroorganizmusok kerülhetnek a környezetből a tőgybe [24]. Egy másik lehetséges ok az, hogy a tejelő állatok egészségügyi állapota azok életkora előrehaladtával romolhat, amelynek kedvezőtlen hatása lehet a tej szomatikus sejtszámára [25].

Vizsgálataink során a célunk az volt, hogy egy hazai nagyüzemi tejtermelő telepen megállapítsuk, hogy van-e különbség az egyszer és a többször ellett, valamint a laktáció különböző stádiumaiban lévő tehenek napi tejmenységében, illetve az egyszer és a többször ellett, valamint a laktáció különböző stádiumaiban lévő tehenektől származó tej összetételében (zsír- és fehérjetartalom) és mikrobiológiai paramétereiben (szomatikus sejttség, összcsíraszám, coliform- és *S. aureus*-szám).

3. Anyag és módszer

3.1. A mintavétel helye és ideje

Vizsgálatainkba egy Hajdú-Bihar megyében (Magyarország) található tejtermelő telepet vontunk be. A telepen 440–450 holstein-fríz tehenet fejnek. A telepen mélyalmos tartásmódot és monodiétás takarmányozást alkalmaznak. A fejés fejőházban történik, a fejést követően nem végeznek utófertőtlenítést.

A számításokhoz felhasznált napi tejmenységre, zsír- és fehérjetartalomra, szomatikus sejtstámra vonatkozó adatok a befejési eredményekből, azaz az Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. által havonta gyűjtött tejminták vizsgálati eredményeiből, a befejési eredményekből származnak. A számításokba 38 egyed valamennyi 2015. május-2020. január közötti befejési eredményét felhasználtuk. A számítások során összegeztük az említett időintervallum alatt a tehenek első laktációjára vonatkozó adatait ($n=387$), a tehenek 2-5. laktációjára vonatkozó adatait ($n=446$), továbbá a tehenek laktációjának korai stádiumára (100 nap alatt; $n=275$), közép stádiumára (100-200 nap; $n=249$) és a késői stádiumára (200 nap felett; $n=309$) vonatkozó adatokat.

A mikrobiológiai vizsgálatokat 2018. május és 2019. október között végeztük. A mikrobiológiai vizsgálatokhoz 38 véletlenszerűen kiválasztott, klinikailag egészséges egyedtől összesen 62 tejmintát vettünk. Aszerint, hogy a mintavétel során az állatok hányadik laktációs ciklusban, illetve a laktáció amely stádiumában voltak, a következő csoportokba soroltuk az egyedektől vett mintákat: a 15 egyszer ellett tehéntől 26 mintát, a 23 többször ellett (2-5 ellés) holstein-fríz tehéntől 36 mintát vettünk. Az összesen vett 62 mintából 23-t a laktáció korai stádiumában, 21 mintát a laktáció közép stádiumában, 18 mintát pedig a laktáció végén tartó tehenektől vettünk.

A tőgybimbók előfertőtlenítését, papírtörölővel való szárazra törölését és az első tejsugarak kifejését követően a tehenek mind a négy tőgynegyedéből 50 ml űrtartalmú, zárható steril műanyag mintavételi edényekbe vettünk mintákat. Az edényeket a mintavételt követő két órán belül hűtőtáskában szállítottuk a Debreceni Egyetem Élelmiszertudományi Intézet mikrobiológiai laboratóriumába. A mintákat a mintavételtől számított 24 órán belül feldolgoztuk.

3.2. Mikrobiológiai vizsgálatok

A tejminták előkészítését és az azt követő mikrobiológiai vizsgálatokat Petróczki és munkatársai által leírt eljárás szerint végeztük el [26]. A mintaelőkészítés az MSZ EN ISO 6887-1:2017 [27] szabvány alapján történt, a mintákat a vizsgálat kezdetéig 4 °C-on tároltuk, feldolgozásuk előtt pedig rázással homogenizáltuk. A hígítási sor elkészítéséhez peptonvizet használtunk, amelyet 8,5 g nátrium-klorid (VWR International Kft., Magyarország) és 1,0 g pepton (Merck Kft., Magyarország) 1000 ml desztillált vízben való feloldásával állítottunk elő.

A megfelelő mennyiségek (9-9 ml) kémcsőbe történő kimérését követően a hígítófolyadékot 30 percig 120 °C-on kuktában sterilizáltuk, majd lehűtöttük, végül elkészítettük a decimális hígítási sort.

Az összcsíraszám meghatározása az MSZ EN ISO 4833-1:2014 [28] szabvány szerint történt, amely tejpörrel kiegészített tripton-glükóz-élesztő (Plate Count Agar, PCA) agar táptalaj (Biolab Zrt., Magyarország) használatát írja elő. Az előírt lemezöntéses módszer végrehajtása után a lemezeket 72 órán át 30 °C-on inkubáltuk.

A coliform baktériumok mennyiségének meghatározását az ISO 4832:2006 [29] szabvány szerint lemezöntéses módszerrel végeztük, steril kristályibolya-epe-laktóz (Violet Red Bile Lactose, VRBL) agart (Biolab Zrt., Magyarország) használatával. Az inkubálás 30 °C-on történt 24 órán át tartott.

A *S. aureus* meghatározását az MSZ EN ISO 6888-1:2008 [30] szabványnak megfelelően szélesztéses módszerrel hajtottuk végre, amelyhez tojássárga-tellurit emulzióval (LAB-KA Kft., Magyarország) kiegészített Baird-Parker agart (BPA) (Biolab Zrt., Magyarország) használtunk. Az inkubálás 37 °C-on 48 órán át tartott. A *S. aureus* a többi *Staphylococcus* fajtól latex agglutinációs teszt (Prolex Staph Xtra Kit, Ferol Kft., Magyarország) alkalmazásával különítettük el.

3.3. Statisztikai analízis

Vizsgálati eredményeink elemzéséhez, leíró statisztika kiszámításához, valamint a mikroorganizmusok mennyiségének logaritmikus transzformációjához, a t-tesztek és a varianciaanalízis elvégzéséhez az SPSS v.22.0 [31] szoftvert alkalmaztuk.

A laktáció-szám esetében a változók összehasonlítását párosítatlan t-próbával, illetve nem paraméteres Mann-Whitney teszttel végeztük, a laktáció-stádium esetében pedig az összehasonlítást egytényezős varianciaanalízissel, illetve nem paraméteres Kruskal-Wallis teszttel végeztük el. Mivel az összcsíraszám, a coliform-szám és a szomatikus sejtszám több esetben nem bizonyult normál eloszlású változónak, e paraméterek esetében logaritmikus transzformációt alkalmaztunk. A statisztikai elemzések során a $P < 0,05$ értéket szignifikáns különbségnek értékeltük.

4. Eredmények

4.1. A laktációs szám hatása a tejhozamra, a nyers tej összetételére és mikrobiológiai paramétereire

Az egyszer és a többször ellett tehenek napi tejmennyiségének és az általuk termelt tej zsír- és fehérjetartalmának, továbbá a szomatikus sejtszámának, összcsíraszámának, coliform- és *S. aureus*-számának átlag és szórásértékeit az **1. táblázat** tartalmazza. A vizsgálatra kiválasztott teheneket laktációjuk (egyben ellésük) száma alapján az egyszer, illetve a többször ellett egyedek csoportjaiba soroltuk. Az egyszer ellett tehenek esetében az átlagos tejmennyiség 25,67 kg/nap volt, míg a többször ellett tehenek esetében 31,04 kg/nap. A különbség szignifikáns ($P < 0,05$), ezzel saját kísérleteinkkel is megerősítettük Bondan és munkatársai, valamint Yang és munkatársai megállapítását, miszerint a többször ellett tehenek által leadott napi tejmennyiség több az egyszer ellett tehenekéhez képest [5, 32]. Gurmessa és Melaku keresztezett holstein-fríz tehenek esetében vizsgálták többek között az ellésszám befolyását a tejmennyiségre, azonban nem tapasztaltak különbséget az egyszer és a többször ellett tehenek napi tejmennyisége között [33]. Pratap és kutatócsoportja az egyszer és a többször ellett tehenek napi átlagos tejmennyiségét ($6,43 \pm 1,39$ és $5,89 \pm 2,37$ l/nap) vizsgálva szintén nem tapasztalt különbséget [34].

A kutatómunkánk során kiválasztott tehenek első laktációja során a tej átlag zsírtartalma $3,74 \pm 0,40\%$ volt, míg a kettő, vagy annál több laktáció során vett tejmintákban az átlag zsírtartalom $3,75 \pm 0,36\%$ volt. A különbséget nem találtuk szignifikánsnak ($P > 0,05$). Saját eredményeinkhez hasonlóan Gurmessa és Melaku, továbbá Pratap és munkatársai sem tapasztaltak különbséget az egyszer, illetve többször ellett, keresztezett holstein-fríz tehenek tejének átlag zsírtartalma között [33, 34]. Bondan és csoportja viszont azt tapasztalta, hogy a laktációs szám befolyásolta a tej zsírtartalmát holstein-fríz tehenekben. Míg az első laktációs tehenek esetében a zsírtartalom $3,47 \pm 0,67\%$ volt, a 2-3. laktációs tehenek esetében, valamint a legalább négyszer ellett tehenek esetében $3,43 \pm 0,68\%$ és $3,41 \pm 0,67\%$ [5]. Shuipep és munkacsoportja a Szudánban készült tanulmányukban helyi és keresztezett tehenek esetében vizsgálták a tej zsírtartalmának változását a laktációs számmal. A helyi tehenek esetében a negyedik laktációs (többször ellett) teheneknél alacsonyabb volt a tej zsírtartalma ($4,82 \pm 0,55\%$), mint a kevesebbszer ellett (1: $5,16 \pm 0,32$; 2: $5,22 \pm 0,34$; 3: $5,14 \pm 0,34$) tehenek esetében. A keresztezett teheneknél nem tapasztaltak különbséget [6]. Yang és munkatársai a kutatásuk során ezzel szemben azt állapították meg, hogy az első laktációs holstein-fríz tehenek esetében volt kevesebb a tej zsírtartalma ($3,88\%$) [32]. A tanulmányunk, illetve a más szakirodalmak változatos eredményei alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a laktációs számon kívül más egyéb tényező is befolyással lehet a tej zsírtartalmára.

Az általunk kiválasztott holstein-fríz tehenek első laktációja során a tej átlag fehérjetartalma $3,24 \pm 0,19\%$, míg a kettő, vagy annál több laktációjuk során vett tejmintákban az átlag fehérjetartalom $3,31 \pm 0,16\%$ volt, a különbség nem jelentős ($P > 0,05$). Ez egybevág Gurmessa és Melaku, valamint Pratap és munkatársai megállapításaival, ugyanis a szerzők sem tapasztaltak különbséget az egyszer, illetve többször ellett tehenek tejének átlag fehérjetartalma között [33, 34]. Bondan kutatócsoportja ezzel szemben úgy találta, hogy a laktációs szám befolyásolta a tej fehérjetartalmát a holstein-fríz tehenekben. Míg az első laktációs tehenek esetében a fehérjetartalom $3,24 \pm 0,37\%$ volt, a 2-3. laktációs tehenek esetében, valamint a legalább négyszer ellett tehenek esetében $3,23 \pm 0,38\%$ és $3,19 \pm 0,37\%$ [5]. A tej fehérjetartalmának változását a laktációs számmal Shuipep kutatócsoportja is vizsgálta. A helyi tehenek esetében a negyedik laktációs (többször ellett) időszakba lépett teheneknél alacsonyabb volt a tej fehérjetartalma ($3,67 \pm 0,19\%$), mint a kevesebbszer ellett (1: $4,01 \pm 0,11$; 2: $3,82 \pm 0,12$; 3: $3,84 \pm 0,12$) tehenek esetében. A keresztezett teheneknél nem tapasztaltak különbséget [6].

Eredményeink szerint az egyszer ellett tehenek tejében az átlag szomatikus sejtszám [$242,2 \times 10^3$ ($5,12 \pm 0,42$ lg) sejt/ml] kevesebb ($P < 0,05$), mint a többször ellett tehenek tejében [$356,3 \times 10^3$ ($5,39 \pm 0,39$ lg) sejt/ml]. Az értékek átlagai egyik esetben sem haladták meg a 853/2004/EK rendeletben meghatározott határértéket [$M = 400,0 \times 10^3$ ($5,60$ lg) tke/ml] [35]. A hazai tejtermelő telepen kapott eredmények egybevágnak a vonatkozó szakirodalmakkal.

Mikó és munkatársai szerint a laktáció számának növekedésével a tej szomatikus sejtszáma is növekedhet [25]. Ezt a megállapítást Yang és csoportja is tapasztalta [32]. Sheldrake és munkatársai szignifikáns kapcsolatot figyeltek meg az ellésszám és a szomatikus sejtszám között. Megállapították, hogy az ellések számának emelkedésével az egészséges állatok tőgynegyedeiben kisebb mértékű változás történt, azonban a *S. aureus*-szal fertőzött tőgynegyedek esetében jelentősen nőtt a szomatikus sejtszám [36]. Bondan kutatócsoportja az tapasztalta, hogy a vizsgált holstein tehének laktációs számának növekedésével a tejben a szomatikus sejtszám is növekedő tendenciát mutatott. Míg az egyszer ellett tehének esetében az átlag szomatikus sejtszám $4,83 \pm 1,73$ lg sejt/ml volt, a két-háromszor ellett tehének, valamint a négy, vagy annál többször ellett tehének esetében $5,31 \pm 1,72$ és $5,84 \pm 1,62$ lg sejt/ml [5].

Az egyszer ellett, azaz első laktációs holstein-fríz tehénektől vett tejmintákban az átlag összcsíraszám $5,1 \times 10^3$ ($3,36 \pm 0,58$ lg) tke/ml volt és $4,6 \times 10^3$ ($3,30 \pm 0,59$ lg) tke/ml a többször ellett tehénektől vett tejmintákban azonban a különbség nem volt szignifikáns ($P > 0,05$).

A többször ellett tehének tejében az átlag coliform-szám [$1,1 \times 10^3$ ($1,35 \pm 1,20$ lg) tke/ml] viszont több ($P < 0,05$) volt, mint az egyszer ellett tehének tejében mért átlag telepszám [$1,1 \times 10^1$ ($0,65 \pm 0,61$) lg] tke/ml]. Tenhagen és munkatársai szintén klinikailag egészséges tehéneket vontak be a vizsgálatukba, amely során megállapították, hogy a coliform baktériumok bár nagyobb arányban fordultak elő a többször ellett tehének tejében, nem volt tapasztalható különbség [23].

S. aureus a 26 közül csak egyetlen, egyszer ellett egyedtől származó tejmintában fordult elő, $5,0 \times 10^1$ (1,70 lg) tke/ml mennyiségben, a vizsgált 36 többször ellett egyedtől vett minta közül pedig nyolc egyedi tejmintában tudtuk kimutatni. Ezekben a mintákban az átlag *S. aureus* szám $1,5 \times 10^2$ ($1,92 \pm 0,56$ lg) tke/ml volt. Az értékek nem haladják meg a 4/1998 (XI. 11.) EüM rendeletben meghatározott határértéket [$M = 5,0 \times 10^2$ (2,70 lg) tke/ml] [37]. Azon egyedek esetében, amelyeknek tejében a mikrobiológiai vizsgálatok során kimutatható volt a *S. aureus*, a befejeési adatok alapján az átlag szomatikus sejtszámuk $44,3 \times 10^3$ (4,65 lg) sejt/ml és $357,2 \times 10^3$ (5,55 lg) sejt/ml között alakult. Tessema a tanulmányában szintén megállapította, hogy a *S. aureus* prevalenciája nagyobb a többször (azaz több mint kétszer) ellett tehének (amelyek a California Mastitis Testtel pozitívak voltak) esetében [21]. Tenhagen és munkatársai szerint a *S. aureus* előfordulása növekedik az állatok életkorával és a laktáció stádiumával [23].

1. táblázat. Az egyszer és többször ellett tehének napi tejmennyisége és az általuk termelt tej összetétele és mikrobiológiai tulajdonságai

		Egyszer ellett ($\bar{x} \pm \sigma$)	Többször ellett ($\bar{x} \pm \sigma$)
Termelési paraméter	Napi tejmennyiség (kg/nap)	$25,67 \pm 4,42^a$	$31,04 \pm 5,08^b$
Összetétel	Zsírtartalom	$3,74 \pm 0,40^a$	$3,75 \pm 0,36^a$
	Fehérjetartalom	$3,24 \pm 0,19^a$	$3,31 \pm 0,16^a$
Mikrobiológiai paraméter	Szomatikus sejtszám (lg sejt/ml)	$5,12 \pm 0,42^a$	$5,39 \pm 0,39^b$
	Összcsíraszám (lg tke/ml)	$3,36 \pm 0,58^a$	$3,30 \pm 0,59^a$
	Coliform-szám (lg tke/ml)	$0,65 \pm 0,61^a$	$1,35 \pm 1,20^b$
	<i>S. aureus</i> -szám (lg tke/ml)	1,70	$1,92 \pm 0,56$

^{a, b} A táblázat azonos soraiban a különböző betűkkel jelölt értékek szignifikánsan különböznek ($P < 0,05$)

4.2. A laktáció stádium hatása a tejhozamra, a nyers tej összetételére és mikrobiológiai paramétereire

A korai, közép és késői laktációs stádiumban lévő tehének napi tejmennyiségének és az általuk termelt tej zsír- és fehérjetartalmának, továbbá a szomatikus sejtszámának, összes csíraszámának, coliform- és *S. aureus*-számának átlag és szórásértékeit a 2. táblázat tartalmazza. A vizsgálatra kiválasztott tehéneket laktációjuk stádiuma alapján korai, közép és késői laktáció stádiumú egyedek csoportjaiba soroltuk. Az egyedek napi tejmennyiségének a laktáció stádiumával való változásának a vizsgálata során igazolódott az a szakirodalomban is megtalálható megállapítás, miszerint a laktáció vége felé haladva a napi leadott tejmennyiség csökken. Míg a laktációjuk elején lévő tehének átlag napi tejmennyisége $32,10 \pm 4,73$ kg/nap, a laktáció közepén tartó tehéneké $29,08 \pm 5,09$ kg/nap, a laktáció végén tartó tehéneké $23,36 \pm 3,63$ kg/nap. A különbség szignifikáns ($P < 0,05$). Bondan és csoportja hasonló megállapításra jutottak a tanulmányukban. Az általuk vizsgált holstein-fríz tehének laktációjának 6. és 60. nap közötti időszakában az átlagos tejmennyiség $29,4 \pm 8,72$ l/tehén/nap volt; azon tehéneknek, amelyek laktációjuk 61-120. napján tartottak $29,2 \pm 8,66$ l/tehén/nap volt; a laktáció 121. és 220. napja közötti intervallumban a tehének tejmennyisége $26,2 \pm 8,01$ l/tehén/nap volt, a laktáció végén (>220 nap) pedig $22,0 \pm 7,49$ l/tehén/nap [5].

Gurmessa és Melaku, valamint Pratap és munkatársai ugyancsak azt tapasztalták, hogy a laktáció elején nagyobb volt az állatok napi tejmenyisége ($6,81 \pm 1,45$ l/nap), mint a laktáció végén ($5,48 \pm 0,05$ l/nap). Vizsgálataik során a laktáció közepén tartó keresztezett holstein-fríz tehének napi tejmenyisége ($7,17 \pm 0,05$ liter) volt a legnagyobb [33, 34]. Auldist és munkatársai szerint a laktáció-stádium tejmenyiségre gyakorolt hatása (például csökkenése) az emlőmirigyen belüli szekréciós sejtek számának és aktivitásának fiziológiai okból eredő változásából eredhet [2].

A vizsgált egyedek tejének zsírtartalma változást mutat a laktáció vége felé haladva. A laktáció elején, illetve közepén tartó tehének tejének zsírtartalma átlagosan $3,65 \pm 0,43\%$ és $3,59 \pm 0,41\%$ volt, amelyek kevesebbnek ($P < 0,05$) mutatkoztak, mint a laktáció végén járó tehének tejjében mért zsírtartalom ($3,99 \pm 0,47\%$). A laktáció végén a tejszír koncentrációjának növekedése összefüggésbe hozható a laktáció előrehaladásával tapasztalható tejhozam-csökkenéssel, ugyanis a csökkenő tejmenyiségnek koncentráló hatása lehet a tej összetételére nézve [2]. A tej zsírtartalma Gurmessa és Melaku közleménye szerint is változik az állatok laktációjának három stádiumában. A laktációjuk elején és végén tartó tehének esetében a tej átlagos zsírtartalma ($4,46 \pm 1,44\%$ és $4,46 \pm 1,44\%$) jelentősen magasabb azon tehének tejjéhez ($3,70 \pm 0,89\%$) képest, amelyek a laktáció közepén járnak [33]. Bondan és munkatársai közleményében az áll, hogy a tej zsírtartalma a laktáció végén (>200 nap) nagyobb ($3,55 \pm 0,67\%$), mint a laktáció korábbi stádiumaiban. Ugyanakkor azt is tapasztalta, hogy a mért átlagos zsírtartalom ($3,30 \pm 0,66\%$) a tehének laktációjának 61. és 120. napja közötti időintervallumban volt a legkevesebb. A laktáció 6. és 60., valamint a 121. és 220. napjai közötti időintervallumban $3,40 \pm 0,65\%$ és $3,40 \pm 0,66\%$ átlag zsírtartalmat mértek [5]. Shuipep és munkatársai a szudáni helyi és keresztezett tehének esetében vizsgálták a tej zsírtartalmának változását a laktáció stádiummal. A helyi fajta esetében nem volt különbség a zsírtartalommal illetően a laktáció elején ($5,31 \pm 0,51\%$), közepén ($4,67 \pm 1,56\%$) és végén ($5,28 \pm 0,75\%$). A keresztezett tehéneket tekintve azonban a laktáció végén több volt a zsírtartalom ($4,45 \pm 1,43\%$), mint a laktáció elején ($3,41 \pm 1,09\%$) és közepén ($3,33 \pm 1,05\%$) [6].

A zsírtartalomhoz hasonlóan a fehérjetartalom esetében is változás figyelhető meg az időben a laktáció vége felé haladva. A laktáció elején mért átlagos fehérjetartalom $3,08 \pm 0,15\%$, a laktáció közepén $3,20 \pm 0,19\%$, a laktáció végén $3,56 \pm 0,20\%$, a különbség szignifikáns ($P < 0,05$). Bondan és munkatársai hasonló megállapításra jutottak: a laktáció végén (>200 nap) nagyobb fehérjetartalmat ($3,41 \pm 0,36\%$) mértek, mint a laktáció korábbi stádiumaiban. Azt is tapasztalták továbbá, hogy a mért átlagos fehérjetartalom ($3,03 \pm 0,31\%$) a tehének laktációjának 61. és 120. napja közötti időintervallumban volt a legkevesebb. A laktáció 6. és 60., valamint a 121. és 220. napok közötti időintervallumban $3,05 \pm 0,36\%$ és $3,18 \pm 0,32\%$ átlag fehérjetartalmat mértek [5]. Gurmessa és Melaku, valamint Pratap kutatócsoportja nem tapasztalt különbséget a fehérjetartalommal illetően a laktáció elején ($3,55 \pm 1,43\%$), közepén ($3,17 \pm 0,15\%$) és végén ($3,33 \pm 0,16\%$) lévő tehének esetében [33, 34]. Shuipep és munkatársai a szudáni helyi és keresztezett tehéneket illetően vizsgálták a tej fehérjetartalmának változását a laktáció stádiummal. A helyi fajta esetében a laktáció elején ($3,87 \pm 0,52\%$) és közepén ($3,91 \pm 0,18\%$) több volt a fehérjetartalom az állatok tejjében, mint a laktáció végén ($3,67 \pm 0,17\%$). A keresztezett tehének esetében nem volt különbség a zsírtartalommal illetően a laktáció elején ($3,67 \pm 0,17\%$), közepén ($3,69 \pm 0,16\%$) és végén ($3,63 \pm 0,22\%$) [6].

A kutatómunkánk során kiválasztott tehének laktációjának korai stádiumában az átlagos szomatikus sejttség $195,1 \times 10^3$ ($5,07 \pm 0,43$ lg) sejt/ml, a laktáció közepén $370,6 \times 10^3$ ($5,28 \pm 0,50$ lg) sejt/ml, a késői laktációs stádiumban $336,4 \times 10^3$ ($5,33 \pm 0,41$ lg) sejt/ml volt. A késői laktációs stádiumban lévő egyedek tejjében magasabb ($P < 0,05$) volt a szomatikus sejttség, mint a laktáció elején lévő tehének esetében. A laktáció előrehaladásával a szomatikus sejttség Bondan és munkatársai szerint is növekedő tendenciát mutat. Míg azon holstein-fríz tehének tejjében, amelyeknek laktációja 6. és 60. nap között tartott, az átlagos szomatikus sejttség $4,79 \pm 1,90$ lg sejt/ml volt, a laktáció 61. és 120. napja között $4,89 \pm 1,90$ lg sejt/ml, a laktáció 121. és 220. napja között $5,21 \pm 1,75$ lg sejt/ml, a 220. napnál tovább tartó laktáció esetében pedig ez a paraméter a vizsgált tehének tejjében $5,53 \pm 1,53$ lg sejt/ml volt [5].

A holstein-fríz tehének laktációjának stádiumaiban az összes csíraszámot is meghatároztuk. A laktáció elején az átlagos összes csíraszám $6,8 \times 10^3$ ($3,42 \pm 0,67$ lg) tke/ml, a laktáció közepén $4,4 \times 10^3$ ($3,39 \pm 0,46$ lg) tke/ml, a laktáció végén $2,7 \times 10^3$ ($3,13 \pm 0,56$ lg) tke/ml volt. A kapott összes csíraszám-értékek között nem találtunk szignifikáns különbséget ($P > 0,05$).

A coliform baktériumok számát illetően a legnagyobb telepszámot [$1,3 \times 10^3$ ($1,30 \pm 1,23$ lg) tke/ml] a tehének laktációjának elején vett mintákból mértük, a legkevesebb átlagos coliform- számot [$2,2 \times 10^1$ ($0,76 \pm 0,79$ lg) tke/ml] pedig a laktáció közepén vett mintákban mutattuk ki. A laktáció végén vett mintákban az átlagos coliform-szám $1,50 \times 10^2$ ($0,90 \pm 0,94$ lg) tke/ml volt. Az eredmények között nem tapasztaltunk szignifikáns különbséget ($P > 0,05$).

S. aureus a 62 egyedi tejmintából összesen 9 (14,52%) mintában fordult elő átlagosan $1,4 \times 10^2$ ($1,89 \pm 0,53$ lg) tke/ml telepszámban. Abban a hat (9,68%) mintában, amelyek a laktációjuk elején tartó tehénektől származtak, az átlagos *S. aureus*-szám $1,2 \times 10^2$ ($1,81 \pm 0,56$ lg) tke/ml volt, a laktáció közepén lévő egy (1,61%) állat esetében a *S. aureus* szám $8,2 \times 10^1$ ($1,91$ lg) tke/ml volt, a laktáció végén lévő két (3,23%) tehen esetében pedig $2,4 \times 10^2$ ($2,15 \pm 0,70$ lg) tke/ml.

2. táblázat. A korai, közép és késői laktációs stádiumban lévő tehenek napi tejmennyisége és az általuk termelt tej összetétele és mikrobiológiai tulajdonságai

		Laktáció eleje ($\bar{x} \pm \sigma$)	Laktáció közepe ($\bar{x} \pm \sigma$)	Laktáció vége ($\bar{x} \pm \sigma$)
Termelési paraméter	Napi tejmennyiség (kg/nap)	32,10±4,73 ^a	29,08±5,09 ^b	23,36±3,63 ^c
Összetétel	Zsírtartalom	3,65±0,43 ^a	3,59±0,41 ^a	3,99±0,47 ^b
	Fehérjetartalom	3,08±0,15 ^a	3,20±0,19 ^b	3,56±0,20 ^c
Mikrobiológiai paraméter	Szomatikus sejtszám (lg sejt/ml)	5,07±0,43 ^a	5,28±0,50 ^{a,b}	5,33±0,41 ^b
	Összes csíraszám (lg tke/ml)	3,42±0,67 ^a	3,39±0,46 ^a	3,13±0,56 ^a
	Coliform-szám (lg tke/ml)	1,30±1,23 ^a	0,76±0,79 ^a	0,90±0,94 ^a
	<i>S. aureus</i> -szám (lg tke/ml)	1,81±0,56	1,91	2,15±0,70

a, b, c A táblázat azonos soraiban a különböző betűkkel jelölt értékek szignifikánsan különböznek ($P < 0,05$)

5. Következtetések

Egy hazai tejjgazdaságban végzett kutatómunkánk során igazoltuk, hogy nagyüzemi tartási körülmények között az egyszer ellett tehenek esetében az átlag napi tejmennyiség szignifikánsan kevesebb ($P < 0,05$), mint a többször ellett tehenek esetében. Ennek valószínűleg az az oka, hogy testük fejlődéséhez az első laktációjukban lévő teheneknek van több aminosavra és zsírra szükségük a már több laktációs időszakon átesett állatokhoz képest [38].

A tej zsír- és fehérjetartalmát illetően nem volt szignifikáns különbség az egyszer és a többször ellett tehenek között. Mivel a szakirodalomban a tanulmányunkban kapott eredményekkel megegyező, illetve azoktól eltérő megállapításokkal is találkoztunk, feltételezzük, hogy más tényező (pl. fajta, évszak stb.) is befolyásolja a tej zsír- és fehérjetartalmát, azonban ezeknek a tényezőknek a feltérképezése nem képezte célját a tanulmányunknak. Shuipep és munkatársai közleményükben például két különböző szarvasmarhafajta esetében eltérő eredményekről számolnak be a tej zsír- és fehérjetartalmának a laktációs számmal történő változását vizsgálva [6].

Mérési eredményeink alapján megállapítottuk, hogy a többször ellett tehenektől vett tejmintákban az első laktációs tehenektől vett tejmintákhoz képest szignifikánsan nagyobb ($P < 0,05$) volt a szomatikus sejtszám, illetve a coliform baktérium-szám, de a *S. aureus* is nagyobb arányban fordult elő. Ennek oka, hogy a többször ellett tehenek esetében a mikroorganizmusok nagyobb mennyiségben mérhetőek a tejmintákban, egyrészt valószínűleg az, hogy a tőgybimbók a laktációk során károsodhattak (többek között például a fejőgép miatt), amely növelte a mikroorganizmusok tőgybe jutásának esélyét [24]. Másik oka az lehet, hogy a kor előrehaladtával, illetve a laktációk számának növekedésével a tejelő állatok kondíciója gyengülhetett, amely kedvezőtlenül hathatott például a tej szomatikus sejtszámára [25].

Azt is igazoltuk, hogy a laktáció stádiumaiban a napi leadott tejmennyiség esetén csökkenő tendenciát lehet megfigyelni, viszont a zsír- és fehérjetartalom növekedést mutat. Ez feltételezhetően a csökkenő tejmennyiség koncentrációs hatásának tudható be.

A laktáció különböző stádiumaiból vett tejmintákban nem volt tapasztalható különbség az összes csíraszám és a coliform baktériumok telepszámait illetően, azonban a laktáció késői stádiumában a szomatikus sejtszám növekedést mutatott.

6. Köszönetnyilvánítás

A publikáció elkészítését az EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008 számú projekt támogatta. A projekt az Európai Unió támogatásával, az Európai Szociális Alap társfinanszírozásával valósult meg.

Köszönettel tartozom a tejtermelő telep vezetőinek és dolgozóinak a segítőkész közreműködésükért.

7. Irodalom

- [1] Hill B., Smythe B., Lindsay D., Shepherd J (2012): Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology* 157 2 pp. 305-308. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031>
- [2] Auld M. J., Walsh B. J., Thomson N. A. (1998): Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research* 65 (3) pp. 401-411. <https://doi.org/10.1017/S0022029998002970>
- [3] Heck J. M. L., van Valenberg H. J. F., Dijkstra J., van Hooijdonk A. C. M. (2009): Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science* 92 (10) pp. 4745-4755. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2146>
- [4] Lambert C., Sanker C., Gauly M. (2014): Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *Journal of Dairy Science* 97 (1) 3 pp. 19-329. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7217>
- [5] Bondan C., Folchini J. A., Noro M., Quadros D. L., Machado K. M., González F. H. D. (2018): Milk composition of Holstein cows: a retrospective study. *Ciência Rural* 48 (12) pp. 1-8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180123>
- [6] Shuiep E. S., Eltaher H. A., El Zubeir I. E. M. (2016): Effect of Stage of Lactation and order of Parity on Milk Composition and Daily Milk Yield among Local and Crossbred Cows in South Darfur State, Sudan. *SUST Journal of Agricultural and Veterinary Sciences (SJA VS)* 17 (2) pp. 86-99.
- [7] Dürr J. W., Ribas N. P., Costa C. N., Horst J. A., Bondan C. (2011): Milk recording as an indispensable procedure to assure milk quality. *Revista Brasileira Zootecnia* 40 pp. 76-81.
- [8] Quigley L., O'sullivan O., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. (2011): Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150 (2-3) pp. 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
- [9] Claeys W. I., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., De Zutter L., Huyghebaert A., Imberechts H., Thiange P., Vandenplas Y., Herman L. (2013): Raw or heated cow milk composition: Review of risks and benefits. *Food Control* 31 (1) pp. 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>
- [10] Laczay P., Lehel J., Lányi K., László N. (2016): A nyers tejben potenciálisan jelen levő kórokozók közegészségügyi jelentősége. *Magyar Állatorvosok Lapja* 138 pp. 231-242.
- [11] Laczay P. (2008): Élelmiszer-higiéniá - Élelmiszerlánc-biztonság. *Mezőgazda Kiadó, Budapest.*
- [12] Cilliers F. P., Gouws P. A., Koutchma T., Engelbrecht Y., Adriaanse C., Swart P. (2014): A microbiological, biochemical, and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 23 pp. 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.005>
- [13] Mbuk E. U., Kwaga J. K. P., Bale J. O. O., Boro L. A., Umoh J. U. (2016): Coliform organisms associated with milk of cows with mastitis and their sensitivity to commonly available antibiotics in Kaduna State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 8 (12) pp. 228-236. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0522>
- [14] Altalhi A. D., Hassan S. A. (2009): Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20 (10) pp. 913-917. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.01.005>
- [15] Mhone T. A., Matope G., Saidi P. T. (2011): Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 151 (2) pp. 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.028>
- [16] Markus G. (2001): A tejelő tehenek tőgygyulladásá III. *MezőHír.* 9
- [17] Ózsvári L., Fux A., Illés B. CS., Bíró O. (2003): A *Staphylococcus aureus* tőgygyulladás által okozott gazdasági veszteségek számszerűsítése egy nagyüzemi holstein-fríz tehenészetben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 125 pp. 579-584.
- [18] Rosengren Å., Fabricius A., Guss B., Sylvén S., Lindqvist R (2010): Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2) pp. 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004>

- [19] Anderson D., Dulmage D., McDougall M., Séguin G. (2003): General guidelines for effective dairy equipment cleaning. <https://www.milk.org/Corporate/pdf/Farmers-UdderEquipmentCleaning.pdf> (Hozzáférés: 21. 02. 2020.)
- [20] Peles F., Máthéné Sz. Zs., Béri B., Szabó A. (2008): A tartástechnológia hatása a nyers tej mikrobiológiai állapotára. *Agrártudományi Közlemények* 31 pp. 67-75. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/31/3009>
- [21] Tessema F. (2016): Prevalence and Drug Resistance Patterns of *Staphylococcus Aureus* in Lactating Dairy Cow's Milk in Wolayta Sodo, Ethiopia. *EC Veterinary Science* 2 (5) pp. 226-230.
- [22] Bytyqi H., Vehapi I., Rexhepi S., Thaqi M., Sallahi D., Mehmeti I. (2013): Impact of Bacterial and Somatic Cells Content on Quality Fresh Milk in Small-Scale Dairy Farms in Kosovo. *Food and Nutrition Sciences* 4 (10) pp. 1014-1020. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.410132>
- [23] Tenhagen B. A., Köster G., Wallmann J., Heuwieser W. (2006): Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science* 89 (7) pp. 2542-2551. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72330-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X)
- [24] Hamann J., Mein G. A., Wetzel S. (1993): Teat tissue reactions to milking: effects of vacuum level. *Journal of Dairy Science* 76 pp. 1040-1046. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77432-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77432-9)
- [25] Mikó E., Baranyi A., Gráff M. (2015): Analysis of somatic cells in cow's milk. *Lucrări Științifice* 17 (1) pp. 290-293.
- [26] Petróczki F. M., Tonamo T. A., Béri B., Peles F. (2019): The effect of breed and stage of lactation on the microbiological status of raw milk. *Acta Agraria Debreceniensis* 1 pp. 37-45. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/2367>
- [27] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2017): Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A vizsgálati minták, az alapszuszpenzió és a decimális hígítások elkészítése mikrobiológiai vizsgálathoz. 1. rész: Az alapszuszpenzió és a decimális hígítások elkészítésének általános szabályai. Magyar szabvány MSZ EN ISO 6887-1:2017. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [28] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2014): Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Horizontális módszer a mikroorganizmusok számlálására. 1. rész: Telepszámlálás 30 °C-on lemezöntés módszerrel. Magyar szabvány MSZ EN ISO 4833-1:2014. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [29] International Organization for Standardization (ISO) (2006): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique. ISO 4832:2006
- [30] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2008): Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a koagulázpozitív sztafilokokkusok (*Staphylococcus aureus* és más fajok) számának meghatározására. 1. rész: Baird-Parker-agar táptalajos eljárás. Magyar szabvány MSZ EN ISO 6888-1:2008. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [31] SPSS (2013): SPSS 22.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Copyright © SPSS Inc., 1989-2013.
- [32] Yang L., Yang Q., Yi M., Pang Z. H., Xiong B. H. (2013): Effects of seasonal change and parity on raw milk composition and related indices in Chinese Holstein cows in northern China. *Journal of Dairy Science* 96 (11) pp. 6863-6869. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6846>
- [33] Gurmessa J., Melaku A. (2012): Effect of Lactation Stage, Pregnancy, Parity and Age on Yield and Major Components of Raw Milk in Bred Cross Holstein Friesian Cows. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 7 (2) pp. 146-149.
- [34] Pratap A., Verma D. K., Kumar P., & Singh A. (2014): Effect of Pregnancy, Lactation Stage, Parity and Age on Yield and Components of Raw Milk in Holstein Friesian Cows in organized Dairy form in Allahabad. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* 7 (2) pp. 112-115. <https://doi.org/10.9790/2380-0721112115>
- [35] 853/2004/EK: Az Európai Parlament és a Tanács 853/2004/EK rendelete az állati eredetű élelmiszerek különleges higiéniai szabályainak megállapításáról
- [36] Sheldrake R. F., Hoare R. J. T., McGregor G. D. (1983): Lactation Stage, Parity, and Infection Affecting Somatic Cells, Electrical Conductivity, and Serum Albumin in Milk. *Journal of Dairy Science* 66 pp. 542-547. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81823-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81823-2)

- [37] 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről
- [38] Oltner R., Emanuelson M., Wiktorsson H. (1985): Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livestock Production Science* 12 (1) pp. 47-57. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(85\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0301-6226(85)90039-9)

The effect of lactation number and lactation stage on milk yield, on the composition and on the microbiological properties of raw cow milk in a Hungarian dairy farm

Keywords: lactation number, lactation stage, cow's milk, milk quantity, milk composition, microbiology

1. SUMMARY

Changes in the composition and hygienic properties of milk affect producer price, so it is essential for the responsible dairy farmer to collect information on changes in these parameters due to various factors. In their study, the authors seek to answer the question whether there is a fluctuation in the daily milk yield of cows and in the composition (fat and protein content) and microbiological properties (somatic cell count, total plate count, coliform and *S. aureus* count) of raw cow's milk in primiparous and multiparous cows or at different stages of their lactation. Based on the data of a Hungarian large-scale dairy farm, it was found that there was no difference in the fat and protein content of the milk, but the daily milk yield was higher in the case of multiparous cows and, compared to the milk of primiparous cows, their milk had a higher somatic cell count and larger amounts of coliform bacteria. The daily milk yield decreased in the successive stages of lactation, but the fat and protein content of the milk increased, which is presumably due to the concentrating effect of the decreasing milk yield. No significant change was observed in the colony count of microorganisms at the different stages of lactation.

¹ University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Food Science

² University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Animal Science, Biotechnology and Environmental Protection, not independent Faculty of Animal Husbandry

³ University of Debrecen, Doctoral School of Animal Science

2. Introduction

Cow's milk has a high nutritional value; it contains fats, proteins, carbohydrates, vitamins and minerals, among other things [1]. Examination of the composition of milk is a routine practice on dairy farms for monitoring the hygiene, nutritional and health aspects of dairy cows [2]. The composition of milk can be influenced by a number of factors, such as the number of lactations, the stage of lactation, the season and the feeding technology [3, 4, 5]. Thus, the composition of milk may vary during lactation, and as a result of the interactions of different environmental factors, there may be differences between the different dairy farms [6]. According to Dürri et al., the creation of databases in order to determine the causes and consequences of differences in milk yield and milk composition is of paramount importance. A database should also include records related to these parameters, as well as to lactation-related events and to the individual cows [7].

Due to its nutritional value, high water activity and neutral pH, milk serves as an excellent medium for various microorganisms, which may include pathogenic organisms such as *Campylobacter jejuni*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, etc. [8, 9]. During the primary infection of milk, sick animals themselves are the sources of infection. In case of dairy animals suffering from a systemic disease accompanied by the spread of pathogens, the pathogens may be excreted in the milk. During secondary contamination, the contamination of milk is of environmental origin. Due to improper milking hygiene, milk can be contaminated by the faeces of the animals or the equipment used in milking (milking machines, milk lines, milk storage tanks), among other things [10]. As the milk enters the teat cistern and then the teat canal, it can become infected with various microorganisms, of environmental origin, so the bacterial infection of the first milk jets is remarkably high. At the beginning of milking, it is therefore advisable to separate the first jets of milk from milk that is milked subsequently, and to ensure that they are destroyed [11]. To reduce the number of bacteria in milk, heat treatment is most commonly used. The initial microbiological state of the milk is not only important from a food safety point of view, but can also affect the quality of the dairy products made from it [12].

Coliform bacteria can cause mastitis in dairy animals. Mastitis caused by coliform bacteria can reduce milk production in dairy animals, causing economic losses to dairy farms [13]. The presence of these bacteria in the environment is common, so their presence in food may indicate environmental contamination [14, 15].

Raw milk can be contaminated with *S. aureus* from a number of sources, such as the environment, milkers' hands, milking equipment, and so on [16]. The economic damage due to mastitis caused by *S. aureus* comes from a decrease in the quantity and quality of the milk produced, an increase in the number of somatic cells measured in it, a reduction in the purchase price of lower quality milk, which also leads to a decrease in the turnover of dairy farmers [17]. Prevention is an effective means of controlling *S. aureus* infection. It can be prevented by adhering to appropriate housing and milking technologies, more frequent fly extermination, pre- and post-disinfection of the teats, the use of disposable udder wipers and regular laboratory testing [18].

External and internal factors can affect the composition of milk, as well as the microbiological state of raw milk. The latter is mostly determined by the hygienic condition of the surfaces that come into direct contact with the milk [19]. Research by Peles et al. found that different husbandry and milking methods at dairy farms with different cow numbers had influencing effects on the microbiological quality of milk [20]. Tessema sought to find a correlation between breed, the age of the animals, the number of lactations and the stage of lactation, as well as the likelihood of *S. aureus* occurrence.

In his study, he found a significant difference in the prevalence of *S. aureus* in milk for the two cattle species studied. *S. aureus* was found in higher proportion of crossbred cows and in older individuals [21]. Examining the milk of different varieties, Bytyqi et al. found no difference in the colony counts obtained [22].

Although fewer Hungarian studies have been conducted on the subject, several international publications have examined whether the number of lactations and the stage of lactation have an influence on the daily milk volume of the animals, the composition of the milk and its microbiological parameters. According to Tessema, there is a significant difference in the prevalence of *S. aureus*, depending on how many lactations the animals have been through. In his study, he found that *S. aureus* was more common in the milk of cows that had calved more than twice and produced a positive California Mastitis Test [21]. Tenhagen et al. also found that the incidence of *S. aureus* increases with the age of the animals [23]. This may be related to the fact that the milking machine may damage the teats during milking, allowing microorganisms to enter the udder from the environment [24]. Another possible reason is that the health status of dairy animals may deteriorate with advancing age, which may have an adverse effect on the somatic cell count of milk [25].

The objective of our study was to determine at a Hungarian large-scale dairy farm whether there is a difference in the daily milk yield of primiparous and multiparous cows, as well as cows at different stages of lactation, and also in the composition (fat and protein content) and microbiological parameters (somatic cell count, total plate count, coliform and *S. aureus* count) of primiparous and multiparous cows, as well as cows at different stages of lactation.

3. Materials and methods

3.1. Place and time of sampling

A dairy farm in Hajdú-Bihar county (Hungary) was the site of our studies. 440–450 Holstein-Friesian cows are milked on the farm. The farm uses deep litter livestock-keeping and monodiet feeding. Milking takes place in a milking parlor, and no post-disinfection is carried out after milking.

The data on the daily amount of milk, fat and protein content and somatic cell count used for the calculations are derived from the milking results, i.e., from the examination results of the milk samples collected monthly by the Állattenyésztési Teljesítményvizsgáló Kft. All milking results of 38 individuals between May 2015 and January 2020 were used in the calculations. During the calculations, data on the first lactation of the cows (n=387), data on the 2nd to 5th lactation of the cows (n=446), as well as data on the early (under 100 days; n=275), middle (100 to 200 days; n=249) and late (over 200 days; n=309) stages of the lactation of the cows were summarized for the abovementioned time period.

Microbiological tests were performed between May 2018 and October 2019. A total of 62 milk samples were taken from 38 randomly selected, clinically healthy individuals for the microbiological tests. According to which lactation cycle the animals were in and in which stage of lactation during the sampling, the samples taken from the individual cows were classified as follows: 26 samples were taken from 15 primiparous cows and 36 samples were taken from 23 multiparous (2 to 5 calvings) Holstein-Friesian cows. Of the total 62 samples taken, 23 were taken in the early stage of lactation, 21 samples in the middle stage of lactation and 18 samples were taken from cows in the late stage of lactation.

Following pre-disinfection of the teats, wiping them dry using paper towels and milking of the first milk jets, samples were taken from all four udder quarters into sealable sterile plastic sampling vessels with a capacity of 50 ml. The vessels were transported in coolers to the microbiology laboratory of the Institute of Food Science of the University of Debrecen within two hours of sampling. Samples were processed within 24 hours of sampling.

3.2. Microbiological tests

Preparation of the milk samples and the subsequent microbiological tests were performed according to the procedure described by Petróczki et al. [26]. Sample preparation was carried out according to standard MSZ EN ISO 6887-1:2017 [27], the samples were stored at 4 °C until the beginning of the analysis, and they were homogenized by shaking before processing. To prepare the dilution series, peptone water was used which was prepared by dissolving 8.5 g of sodium chloride (VWR International Kft., Hungary) and 1.0 g of peptone (Merck Kft., Hungary) in 1,000 ml of distilled water.

After weighing the appropriate amounts (9 ml each) into test tubes, the diluent was sterilized in a pressure cooker at 120 °C for 30 minutes, then it was cooled and the decimal dilution series was prepared.

The total plate count was determined according to standard MSZ EN ISO 4833-1:2014 [28], which prescribes the use of a tryptone-glucose-yeast agar (Plate Count Agar, PCA) culture medium (Biolab Zrt., Hungary) supplemented with milk powder. After performing the prescribed plate casting method, the plates were incubated at 30 °C for 72 hours.

The amount of coliform bacteria was determined by the plate casting method according to standard ISO 4832:2006 [29], using sterile crystal violet-bile-lactose agar (Violet Red Bile Lactose, VRBL, Biolab Zrt., Hungary). The incubation period was 24 hours at 30 °C.

The determination of *S. aureus* was performed according to standard MSZ EN ISO 6888-1:2008 [30] by the spreading method, for which Baird-Parker agar (BPA, Biolab Zrt., Hungary) supplemented with egg yolk-tellurite emulsion (LAB-KA Kft., Hungary). The incubation period was 48 hours at 37 °C. *S. aureus* was isolated from other *Staphylococcus* species using a latex agglutination test (Prolex Staph Xtra Kit, Ferol Kft., Hungary).

3.3. Statistical analysis

For the analysis of our experimental results, for the calculation of descriptive statistics, for the logarithmic transformation of the amount of microorganisms and for performing t-tests and analysis of variance, the SPSS v.22.0 [31] software was used.

In the case of lactation number, variables were compared using unpaired t-tests and non-parametric Mann-Whitney tests, while in the case of lactation stage, the comparison was performed by one factor analysis of variance and non-parametric Kruskal-Wallis tests. Since the total plate count, the coliform count and the somatic cell count were not found to be normally distributed variables in several cases, a logarithmic transformation was used for these parameters. During statistical analyses, a value of $P < 0.05$ was considered to indicate a significant difference.

4. Results

4.1. Effect of lactation number on milk yield, raw milk composition and its microbiological parameters

Mean and standard deviation values of the daily milk yield of primiparous and multiparous cows, as well as those of the fat and protein content, somatic cell count, total plate count, coliform and *S. aureus* count of the milk produced by them are shown in **Table 1**. Cows selected for the study were classified into groups based on the number of lactations (and calvings) into groups of primiparous and multiparous individuals. The average milk yield was 25.67 kg/day for primiparous cows, while in the case of multiparous cows it was 31.04 kg/day. The difference is significant ($P < 0.05$), which means that our experiments confirmed the findings of Bondan et al. and Yang et al., that the daily amount of milk produced by multiparous cows is higher than that of primiparous cows [5, 32]. In the case of crossbred Holstein-Friesian cows, Gurmessa and Melaku studied, inter alia, the effect of calving number on milk yield, but found no difference between the daily milk yield of primiparous and multiparous cows [33]. Pratap and his research group also found no difference in the average daily milk yield of primiparous and multiparous cows (6.43 ± 1.39 and 5.89 ± 2.37 l/day, respectively) [34].

The average fat content of milk during the first lactation of cows selected during our research was $3.74 \pm 0.40\%$, while the average fat content of milk samples taken during the second or later lactation was $3.75 \pm 0.36\%$. The difference was not found to be significant ($P > 0.05$). Similarly to our own results, no difference was found between the average fat content of the milk of primiparous and multiparous crossbred Holstein-Friesian cows by Gurmessa and Melaku, or Pratap et al. [33, 34]. On the other hand, it was found by Bondan and his group that the number of lactations did have an effect on the fat content of milk in Holstein-Friesian cows. While the fat content was $3.47 \pm 0.67\%$ in the case of cows lactating for the first time, it was $3.43 \pm 0.68\%$ and $3.41 \pm 0.67\%$ for cows lactating for the 2nd or 3rd time and for cows that had calved at least 4 times, respectively [5]. In their study in Sudan, Shuiep and his working group examined changes in the fat content of milk with the number of lactations in local and crossbred cows. In the case of local cows, cows in their fourth lactation period had a lower milk fat content ($4.82 \pm 0.55\%$) than cows with fewer calvings ($1: 5.16 \pm 0.32$; $2: 5.22 \pm 0.34$; $3: 5.14 \pm 0.34$). No difference was observed in the case of crossbred cows [6]. In contrast, Yang et al. found in their research that Holstein-Friesian cows lactating for the first time had a lower milk fat content (3.88%) [32]. Based on the varied results of our study and other literature references, we came to the conclusion that the fat content of milk may be influenced by other factors besides the lactation number.

During the first lactation of the Holstein-Friesian cows selected by us, the average protein content of the milk was $3.24 \pm 0.19\%$, while the average protein content of milk samples taken during the second or later lactation was $3.31 \pm 0.16\%$, with the difference being not significant ($P > 0.05$). This is in line with the findings of Gurmessa and Melaku, as well as those of Pratap et al., as these authors did not find any difference between the average protein content of the milk of primiparous and multiparous cows [33, 34]. In contrast, the research group of Bondan found that the lactation number affected the protein content of milk in Holstein-Friesian cows. While the protein content was $3.24 \pm 0.37\%$ in the case of cows lactating for the first time, it was $3.23 \pm 0.38\%$ and $3.19 \pm 0.37\%$ in the case of cows lactating for the 2nd or 3rd time and for cows that had calved at least 4 times, respectively [5]. Changes in the protein content of milk with the lactation number was also studied by the research group of Shuiep. In the case of local cows, the protein content of milk was lower in the case of cows in their fourth lactation period ($3.67 \pm 0.19\%$), than in the case of cows with fewer calvings ($1: 4.01 \pm 0.11$; $2: 3.82 \pm 0.12$; $3: 3.84 \pm 0.12$). No difference was observed in crossbred cows [6].

According to our results, the average somatic cell count [242.2×10^3 (5.12 ± 0.42 lg) cell/ml] in the milk of primiparous cows is less ($P < 0.05$) than in the milk of multiparous cows [356.3×10^3 (5.39 ± 0.39 lg) cell/ml]. In none of the cases did the averages exceed the limit value [$M = 400.0 \times 10^3$ (5.60 lg) cfu/ml] laid down in Regulation (EC) No 853/2004 [35]. The results obtained at the Hungarian dairy farm are in line with relevant literature data. According to Mikó et al., as the lactation number increases, the somatic cell count of milk

may also increase [25]. This finding was also found to be true by Yang and his group [32]. Sheldrake et al. observed a significant relationship between the calving number and the somatic cell count. They found that with the increase in calving number, there was a smaller change in the udder quarters of healthy animals, however, in the case of udder quarters infected with *S. aureus*, the somatic cell count increased significantly [36]. The research team of Bondan found that as the lactation number of the Holstein cows studied increased, so did the somatic cell count in milk. While the average somatic cell count in primiparous cows was 4.83 ± 1.73 lg cell/ml, it was 5.31 ± 1.72 és 5.84 ± 1.62 lg cell/ml in cows that had calved 2 or 3 times and cows that calved 4 or more times, respectively [5].

In the milk samples taken from Holstein-Friesian cows that only calved once, i.e., cows in their first lactation period, the average total plate count was 5.1×10^3 (3.36 ± 0.58 lg) cfu/ml, while it was 4.6×10^3 (3.30 ± 0.59 lg) cfu/ml in the milk samples taken from multiparous cows, however, the difference was not significant ($P > 0.05$).

However, the average coliform count [1.1×10^3 (1.35 ± 1.20 lg) cfu/ml] in the milk of multiparous cows was more ($P < 0.05$) than the average coliform count [1.1×10^1 (0.65 ± 0.61 lg) cfu/ml] measured in the milk of primiparous cows. Tenhagen et al. also included clinically healthy cows in their study, which found that although coliform bacteria were found in higher quantities in the milk of multiparous cows, the difference was not significant [23].

S. aureus was present in only one of the 26 milk samples taken from primiparous cows, in an amount of 5.0×10^1 (1.70 lg) cfu/ml, while it could be detected in eight of the 36 milk samples taken from multiparous cows. The mean *S. aureus* count in these samples was 1.5×10^2 (1.92 ± 0.56 lg) cfu/ml. The values do not exceed the limit value [$M = 5.0 \times 10^2$ (2.70 lg) cfu/ml] specified by EüM decree 4/1998 (XI. 11.) [37]. In the case of the individuals in whose milk *S. aureus* could be detected during the microbiological tests, the average somatic cell count was between 44.3×10^3 (4.65 lg) cell/ml and 357.2×10^3 (5.55 lg) cell/ml on the basis of milking data. In his study, Tessema also found that the prevalence of *S. aureus* was higher in the case of multiparous cows (i.e., who had calved more than twice) (who produced a positive California Mastitis Test) [21]. According to Tenhagen et al., the incidence of *S. aureus* increases with the age and lactation stage of the animals [23].

Table 1. Milk yield of primiparous and multiparous cows and compositional and microbiological properties of milk collected from them

		Primiparous ($\bar{x} \pm \sigma$)	Multiparous ($\bar{x} \pm \sigma$)
Production parameter	Milk yield (kg/day)	25.67 ± 4.42^a	31.04 ± 5.08^b
Composition	Fat content (%)	3.74 ± 0.40^a	3.75 ± 0.36^a
	Protein content (%)	3.24 ± 0.19^a	3.31 ± 0.16^a
Microbiological parameter	Somatic cell count (lg cell/ml)	5.12 ± 0.42^a	5.39 ± 0.39^b
	Total plate count (lg cfu/ml)	3.36 ± 0.58^a	3.30 ± 0.59^a
	Coliform count (lg cfu/ml)	0.65 ± 0.61^a	1.35 ± 1.20^b
	<i>S. aureus</i> count (lg cfu/ml)	1.70	1.92 ± 0.56

^{a, b} The values marked with different letters in the same rows of the table differ significantly ($P < 0.05$)

4.2. Effect of lactation stage on milk yield, raw milk composition and its microbiological parameters

Mean and standard deviation values of the daily milk yield of cows in the early, middle and late stages of lactation, as well as those of the fat and protein content, somatic cell count, total plate count, coliform and *S. aureus* count of the milk produced by them are shown in **Table 2**. The cows selected for the study were classified into groups of early, middle and late lactation stage individuals, based in their stage of lactation. When examining the changes in the daily milk yield of the individuals with the stage of lactation, the finding in the literature that the daily milk yield decreases towards the end of lactation was confirmed. While the average daily milk yield of cows in the early stage of their lactation was 32.10 ± 4.73 kg/day, that of cows in the middle stage of their lactation was 29.08 ± 5.09 kg/day, while that of cows in the late stage of lactation was 23.36 ± 3.63 kg/day. The difference was significant ($P < 0.05$). Bondan and his group came to a similar conclusion in their study. The average milk yield between days 6 and 60 of the lactation of the Holstein-Friesian cows studied by them was 29.4 ± 8.72 l/cow/day; for cows between days 61 and 120 of their lactation, it was 29.2 ± 8.66 l/cow/day; for cows between lactation days 121 and 220, the milk yield was 26.2 ± 8.01 l/cow/day, and at the end of the lactation (> 220 days), it was 22.0 ± 7.49 l/cow/day [5]. Gurmessa and Melaku, as well as Pratap et al. also

found that the daily milk yield of the animals was higher at the beginning of lactation (6.81 ± 1.45 l/day) than at the end of lactation (5.48 ± 0.05 l/day). In their studies, the daily milk yield of crossbred Holstein-Friesian cows in the middle stage of their lactation was the highest (7.17 ± 0.05 liter) [33, 34]. According to Auld et al., the effect of lactation stage on milk yield (e.g., a decrease) may be due to a change in the number and activity of the secretory cells within the mammary gland because of physiological reasons [2].

The fat content of the milk of the individuals studied shows a change as we progress towards the end of lactation. The average fat content of cows in the early and middle stages of lactation was $3.65 \pm 0.43\%$ and $3.59 \pm 0.41\%$, respectively, which were lower ($P < 0.05$) than the fat content of the milk of cows in the late stage of lactation ($3.99 \pm 0.47\%$). The increase in milk fat concentration at the end of lactation may be associated with a decrease in milk yield as lactation progresses, as a decrease in milk yield may have a concentrating effect on milk composition [2]. The fat content of milk also varies at the three stages of lactation according to the publication of Gurmessa and Melaku. For cows in the early or late stages of lactation, the average fat content of the milk ($4.46 \pm 1.44\%$ and $4.46 \pm 1.44\%$, respectively) was significantly higher than that of cows in the middle stage of lactation ($3.70 \pm 0.89\%$) [33]. The publication of Bondan et al. states that the fat content of milk at the end of lactation (>200 days) is higher ($3.55 \pm 0.67\%$) than at earlier stages of lactation. However, they also found that the measured average fat content ($3.30 \pm 0.66\%$) was lowest between days 61 and 120 of the lactation of the cows. Between days 6 and 60, and between days 121 and 220, average fat contents of $3.40 \pm 0.65\%$ and $3.40 \pm 0.66\%$ were measured, respectively [5]. Shuiep et al. studied changes in the fat content of milk of local and crossbred cows in Sudan with lactation stage. In the case of the local breed, there was no difference in the fat content between the early ($5.31 \pm 0.51\%$), middle ($4.67 \pm 1.56\%$) and late ($5.28 \pm 0.75\%$) stages of lactation. However, in the case of crossbred cows, the fat content was higher at the end of lactation ($4.45 \pm 1.43\%$) than at the beginning of the lactation ($3.41 \pm 1.09\%$) or in the middle stage of lactation ($3.33 \pm 1.05\%$) [6].

Similar to the fat content, a change in protein content can also be observed as we progress towards the end of lactation. The average protein content measured at the beginning of lactation was $3.08 \pm 0.15\%$, it was $3.20 \pm 0.19\%$ in the middle of lactation and $3.56 \pm 0.20\%$ at the end of lactation, the difference being significant ($P < 0.05$). Bondan et al. came to a similar conclusion: a higher protein content ($3.41 \pm 0.36\%$) was measured at the end of lactation (>200 days) than at earlier stages of lactation. It was also found that the measured average protein content ($3.03 \pm 0.31\%$) was the lowest between days 61 and 120 of the lactation of the cows. The measured average protein content between days 6 and 60 of the lactation and between days 121 and 220 were $3.05 \pm 0.36\%$ and $3.18 \pm 0.32\%$, respectively [5]. Gurmessa and Melaku, as well as the research group of Pratap did not find any difference in protein content between cows in the early ($3.55 \pm 1.43\%$), middle ($3.17 \pm 0.15\%$) and late ($3.33 \pm 0.16\%$) stages of their lactation [33, 34]. In the case of local and crossbred cows in Sudan, changes in milk protein content with the lactation stage were investigated by Shuiep et al. In the case of the local breed, the protein content of the milk of the animals was higher at the beginning ($3.87 \pm 0.52\%$) and in the middle ($3.91 \pm 0.18\%$) of lactation than at the end of lactation ($3.67 \pm 0.17\%$). In the case of crossbred cows, there was no difference in protein content at the beginning ($3.67 \pm 0.17\%$), middle ($3.69 \pm 0.16\%$) and end ($3.63 \pm 0.22\%$) of lactation [6].

The average somatic cell count in the early stage of lactation of the cows selected for our research was 195.1×10^3 (5.07 ± 0.43 lg) cell/ml, it was 370.6×10^3 (5.28 ± 0.50 lg) cell/ml in the middle of lactation, and it was 336.4×10^3 (5.33 ± 0.41 lg) cell/ml in the late stage of lactation. The somatic cell count was higher ($P < 0.05$) in the milk of individuals in the late stage of lactation than in the case of cows at the beginning of lactation. As lactation progresses, somatic cell counts also show an increasing trend according to Bondan et al. While in the milk of Holstein-Friesian cows between days 6 and 60 of their lactation the average somatic cell count was 4.79 ± 1.90 lg cell/ml, between days 61 and 120 it was 4.89 ± 1.90 lg cell/ml, between days 121 and 220 it was 5.21 ± 1.75 lg cell/ml, and in the case of lactations lasting more than 220 days, this parameter was 5.53 ± 1.53 lg cell/ml in the milk of the cows studied [5].

Total plate counts were also determined during the different stages of lactation of Holstein-Friesian cows. At the beginning of lactation, the average total plate count was 6.8×10^3 (3.42 ± 0.67 lg) cfu/ml, in the middle of lactation it was 4.4×10^3 (3.39 ± 0.46 lg) cfu/ml, while at the end of lactation it was 2.7×10^3 (3.13 ± 0.56 lg) cfu/ml. No significant difference was found between the total plate count values obtained ($P > 0.05$).

Regarding the number of coliform bacteria, the highest count [1.3×10^3 (1.30 ± 1.23 lg) cfu/ml] was measured in samples taken at the beginning of the lactation of the cows, while the lowest average coliform count [2.2×10^1 (0.76 ± 0.79 lg) cfu/ml] was detected in samples taken in the middle stage of lactation. The average coliform count in the samples taken at the end of lactation was 1.50×10^2 (0.90 ± 0.94 lg) cfu/ml. There was no significant difference between the results ($P > 0.05$).

S. aureus was present in a total of 9 samples (14.52%) out of 62 individual milk samples, with an average count of 1.4×10^2 (1.89 ± 0.53 lg) cfu/ml. In the six samples (9.68%) taken from cows in the early stage of lactation, the average *S. aureus* count was 1.2×10^2 (1.81 ± 0.56 lg) cfu/ml, for the single animal in the middle of lactation (1.61%) the *S. aureus* count was 8.2×10^1 (1.91 lg) cfu/ml, while for the two cows at the end of lactation (3.23%) it was 2.4×10^2 (2.15 ± 0.70 lg) cfu/ml.

Table 2. Milk yield of cows in their early, mid and late lactation stages and compositional and microbiological properties of milk from them

		Early lactation ($\bar{x} \pm \sigma$)	Mid lactation ($\bar{x} \pm \sigma$)	Late lactation ($\bar{x} \pm \sigma$)
Production parameter	Milk yield (kg/day)	32.10 \pm 4.73 ^a	29.08 \pm 5.09 ^b	23.36 \pm 3.63 ^c
Composition	Fat content (%)	3.65 \pm 0.43 ^a	3.59 \pm 0.41 ^a	3.99 \pm 0.47 ^b
	Protein content (%)	3.08 \pm 0.15 ^a	3.20 \pm 0.19 ^b	3.56 \pm 0.20 ^c
Microbiological parameter	Somatic cell count (lg cell/ml)	5.07 \pm 0.43 ^a	5.28 \pm 0.50 ^{a,b}	5.33 \pm 0.41 ^b
	Total plate count (lg cfu/ml)	3.42 \pm 0.67 ^a	3.39 \pm 0.46 ^a	3.13 \pm 0.56 ^a
	Coliform count (lg cfu/ml)	1.30 \pm 1.23 ^a	0.76 \pm 0.79 ^a	0.90 \pm 0.94 ^a
	<i>S. aureus</i> count (lg cfu/ml)	1.81 \pm 0.56	1.91	2.15 \pm 0.70

^{a, b, c} The values marked with different letters in the same rows of the table differ significantly ($P < 0.05$)

5. Conclusions

In the course of our research work in a Hungarian dairy farm, it was proven that, under large-scale husbandry conditions, for primiparous cows the average daily milk yield is significantly lower ($P < 0.05$) than in the case of multiparous cows. This is probably due to the fact that cows in their first lactation need more amino acids and fat to develop their bodies compared to animals that have already undergone several lactation periods [38].

Regarding the fat and protein content of the milk, there was no significant difference between primiparous and multiparous cows. Since one can find in the literature findings that both support and contradict our results, we assume that the fat and protein contents of milk are also influenced by other factors (e.g., breed, season, etc.), but mapping out of these factors was not the objective of our study. For example, Shuiep et al. reported in their paper different results for two different cattle breeds when examining the changes in the fat and protein contents of milk with the lactation number [6].

Based on our measurement results, we found that the somatic cell count, as well as the coliform count and the *S. aureus* count were significantly higher ($P < 0.05$) in the milk samples taken from multiparous cows compared to the milk samples taken from primiparous cows. The reason why microorganisms can be measured in larger amounts in milk samples taken from multiparous cows is probably that the teats may have been damaged during the lactations (due to, for example, the milking machine), which may have increased the chances of microorganisms entering the udder [24]. Another reason may be that as the age progressed or the number of lactations increased, the condition of the dairy animals may have deteriorated, which may have had an adverse effect, for example, on the somatic cell count of the milk [25].

It was also proven that, in the stages of lactation, a decreasing trend in daily milk yield can be observed, but the fat and protein contents show an increase. This is presumably due to the concentrating effect of the decreasing milk yield.

There was no difference in milk samples taken at different stages of lactation in terms of total plate count and coliform count, however, in the late stage of lactation, the somatic cell count showed an increase.

6. Acknowledgment

This publication was supported by the project EFOP-3.6.3-VEKOP-16-2017-00008. The project was supported by the European Union and co-financed by the European Social Fund.

We are grateful to the management and staff of the dairy farm for their helpful assistance.

7. Literature

- [1] Hill B., Smythe B., Lindsay D., Shepherd J (2012): Microbiology of raw milk in New Zealand. *International Journal of Food Microbiology* 157 2 pp. 305-308. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.031>
- [2] Auldust M. J., Walsh B. J., Thomson N. A. (1998): Seasonal and lactational influences on bovine milk composition in New Zealand. *Journal of Dairy Research* 65 (3) pp. 401-411. <https://doi.org/10.1017/S0022029998002970>
- [3] Heck J. M. L., van Valenberg H. J. F., Dijkstra J., van Hooijdonk A. C. M. (2009): Seasonal variation in the Dutch bovine raw milk composition. *Journal of Dairy Science* 92 (10) pp. 4745-4755. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2146>
- [4] Lambertz C., Sanker C., Gauly M. (2014): Climatic effects on milk production traits and somatic cell score in lactating Holstein-Friesian cows in different housing systems. *Journal of Dairy Science* 97 (1) 3 pp. 19-329. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7217>
- [5] Bondan C., Folchini J. A., Noro M., Quadros D. L., Machado K. M., González F. H. D. (2018): Milk composition of Holstein cows: a retrospective study. *Ciência Rural* 48 (12) pp. 1-8. <https://doi.org/10.1590/0103-8478cr20180123>
- [6] Shuiep E. S., Eltaher H. A., El Zubeir I. E. M. (2016): Effect of Stage of Lactation and order of Parity on Milk Composition and Daily Milk Yield among Local and Crossbred Cows in South Darfur State, Sudan. *SUST Journal of Agricultural and Veterinary Sciences (SJA VS)* 17 (2) pp. 86-99.
- [7] Dürr J. W., Ribas N. P., Costa C. N., Horst J. A., Bondan C. (2011): Milk recording as an indispensable procedure to assure milk quality. *Revista Brasileira Zootecnia* 40 pp. 76-81.
- [8] Quigley L., O'sullivan O., Beresford T. P., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Cotter P. D. (2011): Molecular approaches to analysing the microbial composition of raw milk and raw milk cheese. *International Journal of Food Microbiology* 150 (2-3) pp. 81-94. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.001>
- [9] Claeys W. I., Cardoen S., Daube G., De Block J., Dewettinck K., Dierick K., De Zutter L., Huyghebaert A., Imberechts H., Thiange P., Vandenplas Y., Herman L. (2013): Raw or heated cow milk composition: Review of risks and benefits. *Food Control* 31 (1) pp. 251-262. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2012.09.035>
- [10] Laczay P., Lehel J., Lányi K., László N. (2016): A nyers tejben potenciálisan jelen levő kórokozók közegészségügyi jelentősége. *Magyar Állatorvosok Lapja* 138 pp. 231-242.
- [11] Laczay P. (2008): *Élelmiszer-higiéniá - Élelmiszerlánc-biztonság. Mezőgazda Kiadó, Budapest.*
- [12] Cilliers F. P., Gouws P. A., Koutchma T., Engelbrecht Y., Adriaanse C., Swart P. (2014): A microbiological, biochemical, and sensory characterisation of bovine milk treated by heat and ultraviolet (UV) light for manufacturing Cheddar cheese. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 23 pp. 94-106. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.005>
- [13] Mbuk E. U., Kwaga J. K. P., Bale J. O. O., Boro L. A., Umoh J. U. (2016): Coliform organisms associated with milk of cows with mastitis and their sensitivity to commonly available antibiotics in Kaduna State, Nigeria. *Journal of Veterinary Medicine and Animal Health* 8 (12) pp. 228-236. <https://doi.org/10.5897/JVMAH2016.0522>
- [14] Altalhi A. D., Hassan S. A. (2009): Bacterial quality of raw milk investigated by *Escherichia coli* and isolates analysis for specific virulence-gene markers. *Food Control* 20 (10) pp. 913-917. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.01.005>
- [15] Mhone T. A., Matope G., Saidi P. T. (2011): Aerobic bacterial, coliform, *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* counts of raw and processed milk from selected smallholder dairy farms of Zimbabwe. *International Journal of Food Microbiology* 151 (2) pp. 223-228. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.08.028>
- [16] Markus G. (2001): A tejelő tehenek tőgygyulladására III. *MezőHír*. 9
- [17] Ózsvári L., Fux A., Illés B. CS., Bíró O. (2003): A *Staphylococcus aureus* tőgygyulladás által okozott gazdasági veszteségek számszerűsítése egy nagyüzemi holstein-fríz tehenészetben. *Magyar Állatorvosok Lapja* 125 pp. 579-584.
- [18] Rosengren Å., Fabricius A., Guss B., Sylvén S., Lindqvist R (2010): Occurrence of foodborne pathogens and characterization of *Staphylococcus aureus* in cheese produced on farm-dairies. *International Journal of Food Microbiology* 144 (2) pp. 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.10.004>

- [19] Anderson D., Dulmage D., McDougall M., Séguin G. (2003): General guidelines for effective dairy equipment cleaning. <https://www.milk.org/Corporate/pdf/Farmers-UdderEquipmentCleaning.pdf> (Acquired: 21. 02. 2020.)
- [20] Peles F., Máthéné Sz. Zs., Béri B., Szabó A. (2008): A tartástechnológia hatása a nyers tej mikrobiológiai állapotára. *Agrártudományi Közlemények* 31 pp. 67-75. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/31/3009>
- [21] Tessema F. (2016): Prevalence and Drug Resistance Patterns of *Staphylococcus Aureus* in Lactating Dairy Cow's Milk in Wolayta Sodo, Ethiopia. *EC Veterinary Science* 2 (5) pp. 226-230.
- [22] Bytyqi H., Vehapi I., Rexhepi S., Thaqi M., Sallahi D., Mehmeti I. (2013): Impact of Bacterial and Somatic Cells Content on Quality Fresh Milk in Small-Scale Dairy Farms in Kosovo. *Food and Nutrition Sciences* 4 (10) pp. 1014-1020. <https://doi.org/10.4236/fns.2013.410132>
- [23] Tenhagen B. A., Köster G., Wallmann J., Heuwieser W. (2006): Prevalence of Mastitis Pathogens and Their Resistance Against Antimicrobial Agents in Dairy Cows in Brandenburg, Germany. *Journal of Dairy Science* 89 (7) pp. 2542-2551. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(06\)72330-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(06)72330-X)
- [24] Hamann J., Mein G. A., Wetzel S. (1993): Teat tissue reactions to milking: effects of vacuum level. *Journal of Dairy Science* 76 pp. 1040-1046. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77432-9](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77432-9)
- [25] Mikó E., Baranyi A., Gráff M. (2015): Analysis of somatic cells in cow's milk. *Lucrări Științifice* 17 (1) pp. 290-293.
- [26] Petróczki F. M., Tonamo T. A., Béri B., Peles F. (2019): The effect of breed and stage of lactation on the microbiological status of raw milk. *Acta Agraria Debreceniensis* 1 pp. 37-45. <https://doi.org/10.34101/actaagrar/1/2367>
- [27] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2017): Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. A vizsgálati minták, az alapszuszpenzió és a decimális hígítások elkészítése mikrobiológiai vizsgálathoz. 1. rész: Az alapszuszpenzió és a decimális hígítások elkészítésének általános szabályai. Magyar szabvány MSZ EN ISO 6887-1:2017. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [28] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2014): Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Horizontális módszer a mikroorganizmusok számlálására. 1. rész: Telepszámlálás 30 °C-on lemezöntés módszerrel. Magyar szabvány MSZ EN ISO 4833-1:2014. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [29] International Organization for Standardization (ISO) (2006): Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique. ISO 4832:2006
- [30] Magyar Szabványügyi Testület (MSzT) (2008): Élelmiszerek és takarmányok mikrobiológiája. Horizontális módszer a koagulázpozitív sztafilokokkuszok (*Staphylococcus aureus* és más fajok) számának meghatározása. 1. rész: Baird-Parker-agar táptalajos eljárás. Magyar szabvány MSZ EN ISO 6888-1:2008. Magyar Szabványügyi Testület, Budapest.
- [31] SPSS (2013): SPSS 22.0 for Windows. SPSS Inc., Chicago, IL, USA. Copyright © SPSS Inc., 1989-2013.
- [32] Yang L., Yang Q., Yi M., Pang Z. H., Xiong B. H. (2013): Effects of seasonal change and parity on raw milk composition and related indices in Chinese Holstein cows in northern China. *Journal of Dairy Science* 96 (11) pp. 6863-6869. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-6846>
- [33] Gurmessa J., Melaku A. (2012): Effect of Lactation Stage, Pregnancy, Parity and Age on Yield and Major Components of Raw Milk in Bred Cross Holstein Friesian Cows. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 7 (2) pp. 146-149.
- [34] Pratap A., Verma D. K., Kumar P., & Singh A. (2014): Effect of Pregnancy, Lactation Stage, Parity and Age on Yield and Components of Raw Milk in Holstein Friesian Cows in organized Dairy form in Allahabad. *IOSR Journal of Agriculture and Veterinary Science (IOSR-JAVS)* 7 (2) pp. 112-115. <https://doi.org/10.9790/2380-0721112115>
- [35] 853/2004/EK: Az Európai Parlament és a Tanács 853/2004/EK rendelete az állati eredetű élelmiszerek különleges higiéniai szabályainak megállapításáról
- [36] Sheldrake R. F., Hoare R. J. T., McGregor G. D. (1983): Lactation Stage, Parity, and Infection Affecting Somatic Cells, Electrical Conductivity, and Serum Albumin in Milk. *Journal of Dairy Science* 66 pp. 542-547. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(83\)81823-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(83)81823-2)

- [37] 4/1998. (XI. 11.) EüM rendelet az élelmiszerekben előforduló mikrobiológiai szennyeződések megengedhető mértékéről
- [38] Oltner R., Emanuelson M., Wiktorsson H. (1985): Urea concentrations in milk in relation to milk yield, live weight, lactation number and amount and composition of feed given to dairy cows. *Livestock Production Science* 12 (1) pp. 47-57. [https://doi.org/10.1016/0301-6226\(85\)90039-9](https://doi.org/10.1016/0301-6226(85)90039-9)

Serratia fajok jellemzése, valamint *Serratia marcescens* kvalitatív kimutatása nyers és pasztörözött tejből polimeráz láncreakción alapuló vizsgálati módszerrel

Kulcsszavak: nozokomiális fertőzés, *Serratia* fajok, *Serratia marcescens*, patogén, prodigiozin, pigment, polimeráz láncreakció (PCR), élelmiszer-diagnosztika

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A *Serratia* fajok elsősorban nozokomiális (kórházhygiénés fertőzés – a Szerk.) fertőzőként ismert opportunista patogén mikroorganizmusok, amelyek élelmiszer-minőségi elváltozásokat is okozhatnak. Az extracelluláris pigment-termelő *Serratia marcescens* tehéntejben való megjelenése annak piros elszíneződését okozza, kihívások elé állítva a tejipart és az élelmiszer-minősítő laboratóriumokat. A baktérium kimutatása hagyományos mikrobiológiai módszereken alapuló eljárásokkal idő- és munkaigényes, ezen túlmenően sok esetben nem is vezet eredményre, a kísérő mikroflóra kompetitív gátló hatása miatt. A vonatkozó szakirodalom elemzését követően a *S. marcescens* kimutatása kapcsán publikált végpont PCR módszereket és alkalmazott primereket *in silico* és *in vitro* vizsgálatban értékeltük, majd az eljárást üzemi tejmintákon teszteltük. A módszer alkalmazásával összesen 60 db nyers, illetve pasztörözött tejmintát vizsgáltunk meg, amelyeknek több mint felét (32 db-ot) azonosítottuk *S. marcescens* pozitívként. Munkánk jelentőségét legfőképp a publikált vizsgálati módszerek élelmiszeripari gyakorlatban való alkalmazása adja. Eredményeink felhívják a figyelmet e baktériumfaj detektálásának a fontosságára.

¹ Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár

² Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola, Mosonmagyaróvár

³ Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék, Mosonmagyaróvár

2. Bevezetés és irodalmi áttekintés

Napjainkban az élelmiszerek kifogástalan minősége és hosszú eltarthatósági ideje a vásárlók által támasztott alapkövetelmény. Ennek megfelelően fokozódik az igény az egyre gyorsabb, pontosabb, megbízhatóbb élelmiszer-diagnosztikai eljárások iránt is. A molekuláris diagnosztikai módszerek ezzel összefüggésben mind nagyobb teret nyernek, például a kórokozó mikroorganizmusok gyors kimutatásában. Számos gyártó állít elő polimeráz láncreakción (PCR) alapuló, patogén mikrobák azonosítására alkalmas diagnosztikai kitéket, amelyeket sikerrel alkalmaznak magyarországi élelmiszervizsgáló laboratóriumokban is. Ezek a molekuláris biológiai tesztek főleg olyan mikrobák kimutatására alkalmasak, amelyek jelenléte nagy közegészségügyi kockázatot jelent (például *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria* spp.). Kisebbségi figyelem irányul azokra a kórokozókra, amelyek vizsgálatát jogszabály nem teszi kötelezővé. Ilyen mikrobák például a nyers és pasztörözött tejben előforduló *Serratia* fajok is.

A *Serratia* fajok a környezetünkben sokfelé megtalálhatók [1]. Szaprofiták, illetve opportunistáknak [2]. Fakultatív anaerob, biofilmképző élőlények [1, 3]. A *S. marcescens* különösen jól szaporodik foszfortartalmú környezetben (például szappanok, samponok), és ellenáll egyes fertőtlenítőszernek is [4, 5], így különböző nozokomiális betegségek okozója lehet [6, 7, 8]. A szakirodalom beszámol a *S. marcescens* fokozódó antibiotikum-rezisztenciájáról is [8, 9, 10]. A baktérium tehát könnyen túlél, szaporodik, így nem megfelelő higiénés körülmények között az élelmiszerekbe kerülhet. A fogyasztói tejbe is feltehetően a higiéniai szabályok áthágása következtében juthat, ott elszaporodik és többek között az élelmiszer minőségét is rontja [1, 11, 12]. A romlást némely faj esetén jellegzetes piros színárnyalat jelezi.

A magyarországi tejágazat esetében nem állnak rendelkezésre pontos adatok arról, hogy milyen mértékű a *Serratia* fajok, illetve a *S. marcescens* elterjedtsége, és hogy mely fajok okozzák a fertőzéseket, valamint rontják a tej minőségét. Arra vonatkozóan sincs hazai felmérés, hogy milyen mértékű a tejüzemek *Serratia*-szennyezettsége. Néhány publikációt leszámítva nemzetközi szinten is szegényesek a rendelkezésre álló információk a tejipar *Serratia* érintettségéről. Ilyen kivétel egy, a finn tejtermelő gazdaságokban tapasztalt, *S. marcescens* okozta tőgygyulladás-járványt bemutató tudományos cikk [1], valamint egy régebbi beszámoló, amely pigmentképző *Serratia* fajok masztitiszben játszott szerepét tárgyalja [13].

A tej piros elszíneződéséért a következő *Serratia* fajok lehetnek felelősek: *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *S. plymuthica* és *S. nematodiphila* (1. táblázat). Előfordulási gyakoriságuk szerint a *S. marcescens*-nek van nagyobb jelentősége. Jellegzetes pigmentjük a vörös prodigiozin, amely vízben nem oldódó másodlagos anyagcseretermék, és amely meghatározott környezeti körülmények között termelődik [14, 15, 16, 17] (1. ábra). A táptalajon megjelenő tipikus piros telepek önmagukban még nem hordoznak elegendő információt a *Serratia* azonosításához, ugyanis számos egyéb, nem az enterobaktériumok közé tartozó nemzetség egyes fajai szintén termelhetnek prodigiozint [14, 18].

1. táblázat. *Serratia* fajok és pigmenttermelésük jellemzése [19–22]

Faj	Pigmenttermelés jellemzése	Forrás
<i>Serratia aquatilis</i>	Krémszínű	[23]
<i>Serratia entomophila</i>	Nincs pigmenttermelés	[24]
<i>Serratia ficaria</i>	Nincs pigmenttermelés	[25, 26]
<i>Serratia fonticola</i>	Nincs pigmenttermelés	[27]
<i>Serratia grimesii</i>	Nincs pigmenttermelés	[28]
<i>Serratia inihbens</i>	Halvány rózsaszín	[29]
<i>Serratia liquefaciens</i>	Nincs pigmenttermelés	[28]
<i>Serratia marcescens</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés / Rózsaszínes pyrimine	[16, 30, 31]
<i>Serratia microhaemolytica</i>	Nincs pigmenttermelés	[32]

Faj	Pigmenttermelés jellemzése	Forrás
<i>Serratia myotis</i>	Nincs pigmenttermelés	[33]
<i>Serratia nematodiphila</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[34]
<i>Serratia odorifera</i>	Nincs pigmenttermelés	[35, 36]
<i>Serratia oryzae</i>	Nincs pigmenttermelés	[37]
<i>Serratia plymuthica</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[35, 38, 39]
<i>Serratia proteamaculans</i>	Nincs pigmenttermelés	[28, 40, 41]
<i>Serratia quinivorans</i>	Nincs pigmenttermelés	[28, 36, 42]
<i>Serratia rubidaea</i>	Pirosas prodigiosin / Nincs pigmenttermelés	[16, 43, 44]
<i>Serratia symbiotica</i>	Nincs pigmenttermelés	[45]
<i>Serratia ureilytica</i>	Nincs pigmenttermelés	[46]
<i>Serratia vespertilionis</i>	Nincs pigmenttermelés	[33]



1. ábra. *Serratia marcescens* tisztatenyésztete tripton-szója agaron (TSA) (30 °C, 48 óra)

A *Serratia* fajok élelmiszerekből történő kimutatására ISO szabvány jelenleg nem áll rendelkezésre. Grimont és Grimont 2006-ban megjelent könyvfejezetében [9] foglalkozik a *Serratia* nemzetség jellemzőivel, az izolálás és az azonosítás szempontjaival is. A klasszikus mikrobiológiai módszerekkel történő azonosítás azonban meglehetősen körülményes, és a kísérőflóra gátló hatása miatt gyakran eredménytelen is, annak ellenére, hogy a tejminta rózsaszínes elszíneződése szemmel látható. A baktérium szelektív tenyésztésére elérhető ugyan táptalajok [47], a gyakorlatban viszont ezek használata nem nyújt kielégítő megoldást. A hagyományos eljárások ráadásul idő- és munkaigényesek.

S. marcescens meghatározására létezik kereskedelmi forgalomban lévő gyorsmódszer, például a bioMérieux cég Rapid ID 32 E elnevezésű miniatürizált tesztkészlete, amely megfelel az ISO 7218 szabvány előírásainak [48]. A vizsgálat kivitelezéséhez azonban táptalajon felövő telep szükséges. A kimutatás nehézségeinek kiküszöbölésére a már korábban említett, PCR módszeren alapuló diagnosztikai tesztek nyújthatnának megoldást. Jelenleg azonban egyedül a Primerdesign cég Genesig fantázianevű terméke említhető *S. marcescens* kimutatására alkalmas molekuláris diagnosztikai egységcsomagként [49].

Az élelmiszeripari és azon belül a tejipari vonatkozású szakirodalom meglehetősen szegényes a *Serratia* fajok és köztük *S. marcescens* végpont PCR vagy real-time PCR módszerrel történő kimutatásának témakörében. Hejazi és munkatársai [50] *S. marcescens* szerotipizálását végezték el RAPD-PCR technikával. Vizsgálataikhoz kórházi ellátásra szoruló páciensek szerológiai mintáit használták. Iwaya és munkatársai [6] szintén vérmintákat teszteltek *S. marcescens* törzsekre, real-time PCR módszert alkalmazva. Zhu és munkatársai [51] *S. marcescens* törzsek molekuláris jellemzését RFLP és PCR módszerrel végezték, míg Joyner és munkatársai [2] real-time PCR vizsgálattal detektáltak *S. marcescens* törzseket tengeri és egyéb vízi környezeti mintákból (például korall nyák, szivacs pórusvíz, üledék, csatornavíz, szennyvíz és hígított szennyvíz). Bussalleu és Althouse 2018-ben megjelent tanulmánya *S. marcescens* azonosítására alkalmas, hagyományos végpont PCR-technikáról számol be, amely hatékonyan detektálja a mikroorganizmus jelenlétét vaddisznó spermájában [52].

Célul tűztük ki *S. marcescens* tejből történő kimutatására alkalmas klasszikus PCR módszer beállítását. Munkánk jelentősége abban áll, hogy a szakirodalomban leírt, PCR vizsgálaton alapuló módszereket és alkalmazott primereket elemeztük, majd a megfelelőnek ítélt eljárást átültettük az élelmiszer-higiéniai vizsgálati gyakorlatba. Kísérleteinkben üzemi, nyers és pasztörözött tejminták elszíneződésének a háttérben álló esetleges *S. marcescens* szennyeződés kvalitatív meghatározását végeztük.

3. Anyagok és módszerek

3.1. *In silico* vizsgálatok

Szakirodalmi közlések alapján kiválasztottunk három primerpárt (2. táblázat), amelyeket számítógépes modellezéssel, ún. *in silico* analízis során, valamint *in vitro* kísérletekben értékeltünk abból a célból, hogy a későbbi PCR vizsgálatok megvalósításához megtaláljuk a legalkalmasabbat.

2. táblázat. Alkalmazott *Serratia marcescens*-specifikus primerpárok

Oligo neve	Szekvencia	TM [°C]	Fragment hossza	Forrás
Fpfs1	CCGGCATCGGCAAAGTCT	58,2	193 bp	[53]
Rpfs2	ATCTGGCCCGGCTCGTAGCC	65,5		
FluxS1	GCTGGAACACCTGTTCGC	58,2	102 bp	
RluxS2	ATGTAGAAACCGGTGCGG	56,0		
<i>Serratia</i> 2-for	GGTGAGCTTAATACGTTTCATCAA	57,1	107 bp	[52]
<i>Serratia</i> 2-rev	AATTCCGATTAACGCTTGAC	55,9		

In silico vizsgálatainkban a primer szekvenciák specifikusságát DNS-adatbázissal (NCBI BLAST) [54] történő összehasonlítás útján ellenőriztük. Az adatbázissal történő összevetés a homológia-keresést („blasztolás”) teszi lehetővé. Ezt követően a primerek megfelelőségét, azaz választott genomokon egy lehetséges PCR reakció megvalósulását, molekuláris biológiai szoftverrel (SnapGene 5.1.5.) teszteltük [55]. Az utóbbi esetben az NCBI adatbázisából letöltöttünk pozitív és negatív kontroll genomokat, majd a SnapGene szoftver alkalmazásával vizsgáltuk, hogy *in silico* módon a primerpárokkal megvalósulhat-e PCR reakció. A referenciának használt pozitív és negatív kontrollok teljes kromoszóma genomok voltak (3. táblázat).

3. táblázat. *In silico* elemzésben pozitív és negatív kontrollként alkalmazott baktériumtörzsek genomjai, valamint a primerpárookra adott reakcióik

Alkalmazott baktériumtörzs		GenBank szekvencia azonosító	Primerpárokkal történő <i>in silico</i> amplifikáció eredménye*		
			A.	B.	C.
Pozitív kontroll genomok	<i>Serratia marcescens</i> Db11	HG326223.1			
	<i>Serratia marcescens</i> WW4	CP003959.1			
	<i>Serratia marcescens</i> B3R3	CP013046.2			
	<i>Serratia marcescens</i> N4-5	CP031316.1			
	<i>Serratia marcescens</i> 1274	CP019927.2			
	<i>Serratia marcescens</i> AR_0099	CP027539.1			
	<i>Serratia marcescens</i> AS-1	AP019009.1			
	<i>Serratia marcescens</i> S2I7	CP021984.1			
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 274	AP021873.1			
	<i>Serratia marcescens</i> LY1	CP053918.1			
Negatív kontroll genomok	<i>Serratia grimesii</i> BXF1	LT883155.1			
	<i>Serratia grimesii</i> NCTC11543	NZ_UGYI01000001.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	NC_021741.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> FG3	CP033893.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DH-S01	CP038662.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	NZ_JPUX01000001.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> 1122	CP014474.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> NCTC10848	NZ_LS483492.1			
	<i>Escherichia coli</i> 58-3	CP050036.1			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	CP000946.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp52.145	FO834906.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N16-03892	CP047271.1			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	CP000438.1			
	<i>Pseudomonas putida</i> T25-27	CP043576.1			

* Primerrek: A. Fpfs1 és Rpfs2; B. FluxS1 és RluxS2; C. *Serratia*2-for és *Serratia*2-rev.

Jelmagyarázat:

	a primerpárral fragment amplifikálható
	a primerpárral nincs amplifikáció

3.2. *In vitro* kísérletes vizsgálatok

Az *in silico* vizsgálatok megerősítéseként *in vitro* kísérleteket végeztünk, amelyek során a kiválasztott primerpárokat laboratóriumi PCR vizsgálatban teszteltük baktériumok (pozitív kontroll törzsként több *S. marcescens*, negatív kontroll törzsként pedig *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* és *Micrococcus luteus*) választott törzseinek genomi DNS mintáján. A mikroorganizmusok az MTKI Kft. gyűjteményébe tartozó, üzemi környezetből származó, genetikai azonosítással meghatározott baktériumtörzsek voltak.

A PCR reakcióhoz szükséges komponensek összemérése során egy reakcióra 5,2 µL PCR tisztaságú steril vizet, 10 µL DreamTaq Green 2× PCR Master Mixet (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, Egyesült Államok), 0,4–0,4 µL (10 pmol/µl) primert és 4 µL izolált bakteriális genomi DNS-t használtunk. A reakciók negatív kontrollja PCR tisztaságú steril víz volt. A PCR berendezés (Mastercycler Nexus Gradient; Eppendorf International, Hamburg, Németország) programjának paraméterei a következőképpen alakultak: 95 °C 1 perc, majd 40 cikluson keresztül 95 °C 15 másodperc, 59,5 °C 15 másodperc, 72 °C 10 másodperc, végül 72 °C 7 perc [52].

A PCR reakció során képződött DNS szakaszok méret szerinti elválasztáshoz 10 µL mintát vizsgáltunk 2%-os agaróz gélben [TBE puffer (Tris-borate-EDTA) (10×), Thermo Fisher Scientific; Agarose DNA Pure Grade, VWR International, Debrecen, Magyarország; ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20.000×, Pacific Image

Electronics, Torrance, Kalifornia, Egyesült Államok]. A DNS méretmarker a GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) volt. A géldokumentálás a Gel Doc Universal Hood II géldokumentációs berendezés és program (Bio-Rad, Hercules, Kalifornia, Egyesült Államok) alkalmazásával történt.

3.3. Nyers és pasztörözött tejminták vizsgálata

Vizsgálatainkban egyrészt olyan, üzemi nyers és pasztörözött tejmintákat alkalmaztunk, amelyek kapcsán felmerült a *S. marcescens* szennyeződés gyanúja azok rózsaszínes elszíneződése miatt. Másrészt teszteltünk az előbbiekkal együtt a laboratóriumba érkezett, elszíneződést azonban nem mutató, szintén üzemi nyers és pasztörözött tejmintákat is.

A DNS-feltáró és -tisztító folyamathoz NucleoSpin Microbial DNA kitet (Macherey-Nagel, Düren, Németország) alkalmaztunk a gyártói előírások szerint. Az eluált DNS-t tartalmazó reakciócsöveket fagyasztóban tároltuk, -20 °C-on.

A következőkben 16S rDNS polimeráz láncreakcióval kontrolláltuk a DNS izolálás megfelelőségét és a minták amplifikálhatóságát, melyhez a 27f (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3') és 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3') primert alkalmaztuk. A PCR reakció összemérési térfogata 1 mintára: 5,6 µL PCR tisztaságú steril víz, 10 µL DreamTaq Green 2x PCR Master Mix, 0,2–0,2 µL (10 pmol/µl) primerek és 4 µL izolált bakteriális genomi DNS. A reakció negatív kontrollja PCR minőségű steril víz volt. A PCR berendezés programjának paraméterei a következők voltak: 95 °C 4 perc, majd 40 cikluson keresztül 95 °C 20 másodperc, 54 °C 30 másodperc, 72 °C 1 perc, végül 72 °C 5 perc.

A PCR reakció során képződött DNS szakaszok elválasztáshoz 5 µL mintát vizsgáltunk 1%-os agaróz gélben. DNS méretmarker a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific) volt. A vizsgált DNS mintát további PCR vizsgálatra alkalmasnak értékeltük, amennyiben az amplifikált DNS fragment kópiáinak hossza a várt méret (~1500 bp) szerint alakult.

Következő lépésben a minták *S. marcescens*-specifikus PCR vizsgálata és a gélelektroforézis történt **a 3.2. In vitro kísérletes vizsgálatok** című alfejezetben ismertetett módon. Az eredményeket jelenlét-hiány elv alapján értékeltük.

A módszer megfelelőségének ellenőrzése céljából kontrollvizsgálatban tejminták PCR eredményeit hasonlítottuk össze a néhány esetben meglévő API (bioMérieux, Budapest, Magyarország) vizsgálat eredményeivel. A módszert ezt követően alkalmaztuk *S. marcescens* jelenlétének nyers és pasztörözött tejkéből történő kimutatására.

4. Eredmények

In silico vizsgálatainkban a primerek homológia vizsgálata során azok elsősorban *S. marcescens* kromoszóma genomokkal mutattak hasonlóságot. Találtunk azonban egyezést *S. rubidaea* és *S. nematodiphila* törzseknél és néhány nem *Serratia* fajnál is. Az eredményeket figyelembe vettük a SnapGene szoftveres vizsgálatainkhoz tervezett referencia genomok kiválasztásánál. További vizsgálat szükségességét indokolta, hogy a megfelelő homológia, a bázisok illeszkedése még nem jelenti automatikusan egy PCR reakció megvalósulását, mert például a primerek iránya, olvadási hőmérséklete és a képződő PCR termék mérete is meghatározó.

A SnapGene vizsgálatban PCR reakciókat a következő paraméterek mellett prediktáltunk: elemzéseinket legalább 15 bázis egyezése és eltérés (ún. single isolated mismatch) kizárása mellett végeztük. Az olvadási hőmérséklet (melting temperature) legkisebb értéke 50 °C, az amplifikáció eredményeképpen keletkezett fragmentum maximális hossza pedig 3 kbp volt.

Ahogy a **3. táblázat**ban látható, a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpár *S. marcescens* genomokra illetve minden esetben mutatott amplifikációt. A PCR reakció általában hat-hét amplikont is eredményezett a 16S rDNS szakaszokon. Az Fpfs1–Rpfs2 és a FluxS1–RluxS2 primerpárok tapadási helye a 16S rDNS-en kívül található a legtöbb *S. marcescens* törzsből, viszont néhány esetben nem mutattak *in silico* amplifikációt, érzékenyséjük tehát nem bizonyult megfelelőnek. A negatív kontroll genomoknál a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpár néhány esetben PCR reakció lezajlását jelzi előre bizonyos *S. rubidaea* és *S. nematodiphila* törzseknél. Az Fpfs1–Rpfs2 primerek alkalmazásával a PCR reakció egy *S. nematodiphila* törzs esetén játszódna le. A FluxS1–RluxS2 primerek nem jelezték előre reakció lezajlását egyik választott negatív kontroll genomon sem (**3. táblázat**).

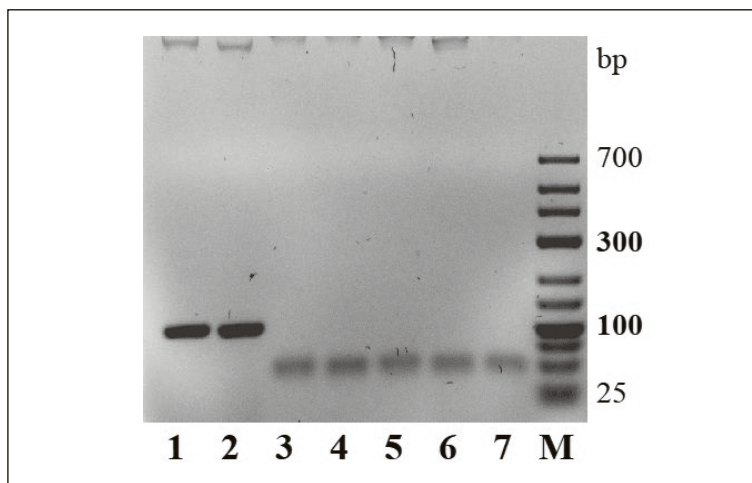
Az *in vitro* kísérletekben a pozitív kontrollnak választott *S. marcescens* genomokon mindhárom primerpár adott jelet a várt fragmentméret szerint, és egyik sem adott jelet a negatív kontrollokon. A *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpárral végzett vizsgálatot mutatja be a **2. ábra**. A negatív mintáknál az 50 bp magasságban megjelenő gyenge jeleket a melléktermékként keletkező aspecifikus DNS darabok, a primer-dimerek felszaporodása okozza.

Az *in silico* analízisek és az *in vitro* vizsgálatok eredményei alapján további munkánkhoz a *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primereket ítéltük megfelelőnek, annak ellenére, hogy azok specifikussága nem tökéletes. A döntés alapja egyrészt a *S. marcescens* előfordulásának valószínűsíthető gyakorisága, másrészt a fals negatív vizsgálati eredmények elkerülésének a fontossága volt.

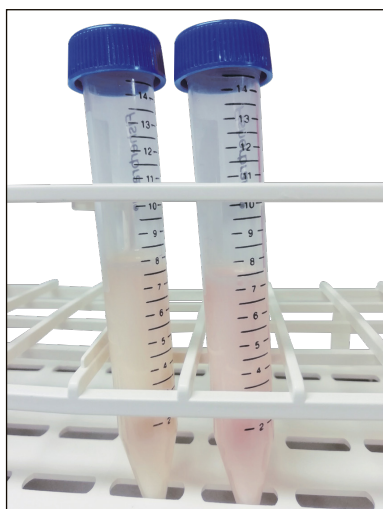
A beállított módszer megfelelőségét ellenőrizendő, kontroll vizsgálatban üzemi tejmintákat teszteltünk. A tejminták ($n=10$) közül néhány rózsaszínes elszíneződést mutatott. Vizsgálati módszerünkkel kilenc mintát pozitívnak ítéltünk a keresett mikroba. A minták közül négy esetben API vizsgálati eredménnyel is rendelkezünk. A négy API-pozitív minta a PCR vizsgálatban is pozitívnak bizonyult. A módszert ezt követően alkalmaztuk *S. marcescens* nyers és pasztőrözött tejekből történő kimutatására.

A tejminták egy része barackos-rózsaszínes elszíneződést mutatott (**3. ábra**), ez azonban számos esetben nem volt egyértelmű, a halvány vagy sárgásba hajló színárnyalat miatt. Összesen 60 minta vizsgálatát végeztük el. Ebből 32 db (53,3%) pozitív és 28 db (46,7%) negatív eredményt adott *S. marcescens* jelenlétére.

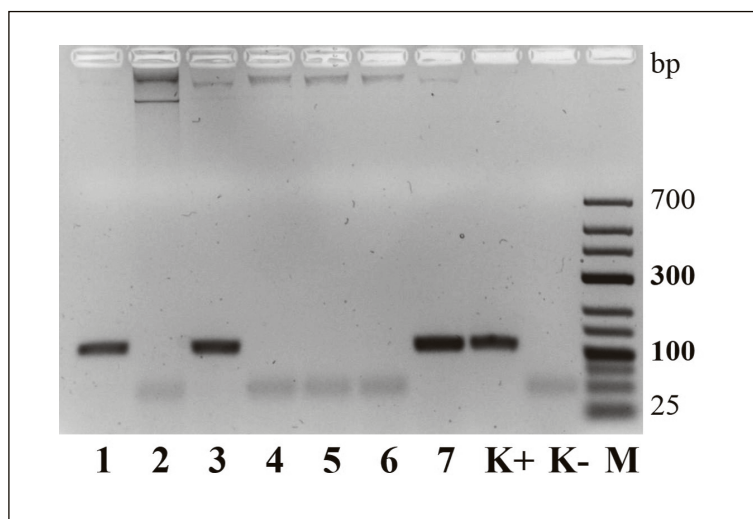
A **4. ábrán** egyik vizsgálatunk eredményét, a gélelektroforézissel végzett elválasztás képét mutatjuk be. Jól látható, hogy a pozitív kontroll törzs pozitív, a negatív kontroll minta negatív jelet adott, mindemellett három vizsgálati minta esetében pozitív jelet kaptunk. A negatív mintáknál megjelenő gyenge jeleket ebben az esetben is a primer-dimerek felszaporodása okozta.



2. ábra. *Serratia2*-for és *Serratia2*-rev primerpárral végzett PCR vizsgálat eredménye választott baktériumtörzsek genomján. Sorok: 1. *Serratia marcescens* 551R; 2. *Serratia marcescens* 1911; 3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 0801; 4. *Streptococcus thermophilus* 1102; 5. *Enterococcus faecalis* 1101; 6. *Micrococcus luteus* CLTB1; 7. Negatív kontroll (steril víz); M: Molekulasúly marker



3. ábra. Tejminták. Baloldali minta: *Serratia marcescens*-negatív, jobboldali minta: *Serratia marcescens*-pozitív a PCR vizsgálat eredménye alapján



4. ábra. *Serratia marcescens*-specifikus PCR vizsgálat gélelektroforézis képe. 1.–7.: Tejminták; K+: Pozitív kontroll (*Serratia marcescens* genomi DNS); K-: Negatív kontroll (steril víz); M: Molekulasúly marker

5. Megbeszélés

Eredményeink értékelésekor fontos figyelembe venni, hogy a PCR vizsgálat a mintában található cél DNS amplifikálására, detektálására alkalmas módszer, amelynek alapján nem lehet megállapítani, hogy az amplifikált *S. marcescens*-specifikus DNS vajon szaporodóképes, elpusztult, vagy ún. VBNC állapotú sejtekből származik-e. VBNC („viable but not culturable”) állapotban a sejtek életképesek, metabolikusan aktívak, viszont klasszikus, tenyésztéses módszerekkel nem szaporíthatók fel. Az állapot reverzibilis.

Munkánk célja *S. marcescens* kimutatását szolgáló klasszikus PCR módszer beállítása volt. Az alkalmazott vizsgálati eljárással elvégezhető a tejminták elszíneződésének háttérében álló *S. marcescens* szennyeződés kvalitatív meghatározása.

Noha itt bemutatott kísérleteinkben a pigmenttermelő *S. marcescens* kimutatására összpontosítottunk, egy jövőbeli, nemzetség-szintű vizsgálat során mind a 20 *Serratia* faj (**1. táblázat**) azonosítása megvalósulhatna. A többi *Serratia* faj detektálásának jelentőségét az adja, hogy jóllehet a *Pseudomonas* nemzetség a hűtött nyerstej romlásának legfőbb okozója, ismeretesebb a *Serratia* fajok e tekintetben kimutatható veszélyei is [56]. *Pseudomonas* törzsekkel együtt ugyanis számos esetben *Serratia* törzseket is azonosítottak a tej romlásának okozóiként. A *Serratia* nemzetség tagjait kimutatták tejfeldolgozó üzemekben [3, 12], 4 °C-on tárolt nyerstej-mintákban [56, 57, 58] és tejtartályokban is [59]. Grimont és Grimont [9] már másfél évtizeddel ezelőtt megállapította, hogy a nyerstej-tételek esetenként *Serratia* fajokkal szennyeződhetnek, a tejtermékekben megjelenő leggyakoribb fajok pedig a *S. liquefaciens* és a *S. grimesii*.

A pszichotróf *Serratia* fajok (például a *S. liquefaciens*) nyerstejben való előfordulása a hőkezelés után is minőségromlást okozhat. Baglinière és munkatársai úgy találták, hogy a *S. liquefaciens* által termelt hőstabil Ser2 proteáz az UHT tej destabilizációjának jelentős tényezője lehet [11, 60].

Következtetésképpen megállapítható, hogy érdekes és hiánypótló kutatás lenne egy nemzetség-szintű vizsgálat, amelynek révén lehetőség nyílna a nyerstejek ilyen szempontú monitorozására, a *Serratia* fajok széleskörű detektálására. Az eredmények vélhetően nemcsak a tejjgazdaság, tejipar szereplői számára nyújtanának hasznos információkat, hanem a hazai szabályozási és ellenőrzési gyakorlatra is hatással lehetnének.

6. Irodalom

- [1] Friman, M.J., Eklund, M.H., Pitkälä, A.H., Rajala-Schultz, P.J., Rantala, M.H.J. (2019): Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61, pp. 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- [2] Joyner, J., Wanless, D., Sinigalliano, C.D., Lipp, E.K. (2014): Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, pp. 1679-1683. <https://doi.org/10.1128/AEM.02755-13>
- [3] Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., Vieira, M.J. (2012): Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*. 7(6), e40189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>
- [4] Langsrud, S., Møretrø, T., Sundheim, G. (2003): Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology*. 95, pp. 186-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01968.x>
- [5] Møretrø, T., Langsrud, S. (2017): Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16, pp. 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- [6] Iwaya, A., Nakagawa, S., Iwakura, N., Taneike, I., Kurihara, M., Kuwano, T., Gondaira, F., Endo, M., Hatakeyama, K., Yamamoto, T. (2005): Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real-time PCR assay: Its clinical application and evaluation in a mouse infection model. *FEMS Microbiology Letters*. 248, pp. 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.041>
- [7] Bayramoglu, G., Buruk, K., Dinc, U., Mutlu, M., Yilmaz, G., Aslan, Y. (2011): Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 44, pp. 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.02.002>
- [8] Moradigaravand, D., Boinett, C.J., Martin, V., Peacock, S.J., Parkhill, J. (2016): Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*. 26, pp. 1101-1109. <https://doi.org/10.1101/gr.205245.116>
- [9] Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2006): The genus *Serratia*. *Prokaryotes*. 6, pp. 219-244. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11
- [10] Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., Morales-Espinosa, R. (2018): The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*. 9, pp. 828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>
- [11] Baglinière, F., Tanguy, G., Salgado, R.L., Jardin, J., Rousseau, F., Robert, B., Harel-Oger, M., Dantas Vanetti, M.C., Gaucheron, F. (2017): Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*. 229, pp. 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.054>
- [12] Salgado, C.A., Baglinière, F., Vanetti, M.C.D. (2020): Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. *LWT - Food Science and Technology*. 126, 109289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109289>
- [13] Barnum, D.A., Thackeray, E.L., Fish, N.A. (1958): An outbreak of mastitis caused by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Comparative and Medical Veterinary Science*. 22, pp. 392-395.
- [14] Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S. (2012): Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*. 1 (4), pp. 361-365.
- [15] Petersen, L.M., Tisa, L.S. (2013): Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian Journal of Microbiology*. 59, pp. 627-640. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0343>
- [16] Darshan, N., Manonmani, H.K. (2015): Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*. 52, pp. 5393-5407. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>
- [17] Srimathi, R., Priya, R., Nirmala, M., Malarvizhi, A. (2017): Isolation, identification, optimization of prodigiosin pigment produced by *Serratia marcescens* and its applications. *International Journal of Latest Engineering and Management Research*. 2 (9), pp. 11-21.
- [18] Giri, A.V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., Pennathur, G. (2004): A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 4, pp. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
- [19] Mahlen, S.D. (2011): *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 24, pp. 755-791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-11>

- [20] Analyzer of Bio-resource Citations (2020): Microorganism Search for Paper, Patent, Genome and Nucleotic. <http://abc.wfcc.info/index.jsp>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [21] Birla Institute of Scientific Research, Bioinformatics Centre (2015): Database of Biochemical Tests of Pathogenic Enterobacteriaceae Family. <https://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/docter/serratia.cgi>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [22] LPSN (2020): List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [23] Kämpfer, P., Glaeser, S.P. (2016): *Serratia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, pp. 407-413. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000731>
- [24] Grimont, P.A.D., Jackson, T.A., Ageron, E., Noonan, M.J. (1988): *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-1>
- [25] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1979): *Serratia ficaria* sp. nov., a bacterial species associated with Smyrna figs and the fig wasp *Blastophaga psenes*. *Current Microbiology*. 2, pp. 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF02602859>
- [26] Anahory, T., Darbas, H., Ongaro, O., Jean-Pierre, H., Mion, P. (1998): *Serratia ficaria*: A misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, pp. 3266-3272. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3266-3272.1998>
- [27] Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P.A., Leclerc, H., Lefebvre, B., Mossel, D.A.A. (1979): *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29, pp. 92-101. <https://doi.org/10.1099/00207713-29-2-92>
- [28] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Irino, K. (1982): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov.. *Current Microbiology*. 7, pp. 69-74. <https://doi.org/10.1007/BF01568416>
- [29] Hennessy, R.C., Dichmann, S.I., Martens, H.J., Zervas, A., Stougaard, P. (2020): *Serratia inhibens* sp. nov., a new antifungal species isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, pp. 4204-4211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004270>
- [30] Bizio, B. (1823): Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Biblioteca Italiana, o sia Giornale di Letteratura, Scienze, e Arti* (Anno VIII). 30, pp. 275-295.
- [31] Williams, R.P., Gott, C.L., Qadri, S.M.H., Scott, R.H. (1971): Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 106, pp. 438-443. <https://doi.org/10.1128/JB.106.2.438-443.1971>
- [32] Wang, J., Zheng, M.L., Jiao, J.Y., Wang, W.J., Li, S., Xiao, M., Chen, C., Qu, P.H., Li, W.J. (2019): *Serratia microhaemolytica* sp. nov., isolated from an artificial lake in Southern China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 112, pp. 1447-1456. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01273-9>
- [33] García-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., Kolařík, M. (2015): *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, pp. 90-94. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.066407-0>
- [34] Zhang, C.X., Yang, S.Y., Xu, M.X., Sun, J., Liu, H., Liu, J.R., Liu, H., Kan, F., Sun, J., Lai, R., Zhang, K.Y. (2009): *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, pp. 1603-1608. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.003871-0>
- [35] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Richard, C., Davis, B.R., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. (1978): Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain: ICPB 3995). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 453-463. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-453>
- [36] Van Houdt, R., Moons, P., Jansen, A., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W. (2005): Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS Microbiology Letters*. 246, pp. 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.016>

- [37] Zhang, C.W., Zhang, J., Zhao, J.J., Zhao, X., Zhao, D.F., Yin, H.Q., Zhang, X.X. (2017): *Serratia oryzae* sp. nov., isolated from rice stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67, pp. 2928-2933. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002049>
- [38] Lehman, K.B., Neumann, R. (1896): *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik*, Volume 11st Ed. J.F. Lehmann, München.
- [39] Breed, R.S., Murray, E.G.D., Hitchens, A.P. (Eds.) (1948): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. pp. 1-1529.
- [40] Paine, S.G., Stansfield, H. (1919): Studies in bacteriosis. III. A bacterial leaf spot disease of *Peotea cynaroides*, exhibiting a host reaction of possibly bacteriolytic nature. *Annals of Applied Biology*. 6, pp. 27-39. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1919.tb05299.x>
- [41] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1978): *Serratia proteamaculans* (Paine and Stansfield) comb. nov., a senior subjective synonym of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 503-510. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-503>
- [42] Ashelford, K.E., Fry, J.C., Bailey, M.J., Day, M.J. (2002): Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1982 to *Serratia quinovorans* corrig., sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, pp. 2281-2289. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2281>
- [43] Stapp, C. (1940): *Bacterium rubidaeu* nov. spec. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. II*. 102, pp. 252-260.
- [44] Ewing, W.H., Davis, B.R., Fife, M.A., Lessel, E.F. (1973): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. (formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23, pp. 217-225. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-3-217>
- [45] Sabri, A., Leroy, P., Haubruge, E., Hance, T., Frère, I., Destain, J., Thonart, P. (2011): Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, pp. 2081-2088. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.024133-0>
- [46] Bhadra, B., Roy, P., Chakraborty, R. (2005): *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, pp. 2155-2158. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.63674-0>
- [47] Starr, M.P., Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, P.B. (1976): Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 4, pp. 270-276.
- [48] BioMérieux (2015): API & ID 32 Identification Databases. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [49] Primerdesign (2019): *Serratia marcescens* Genesig kit. <https://www.genesig.com/products/9405-serratia-marcescens>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [50] Hejazi, A., Keane, C.T., Falkiner, F.R. (1997): The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 46, pp. 913-919. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-913>
- [51] Zhu, H., Zhou, W.Y., Xu, M., Shen, Y.L., Wei, D.Z. (2007): Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Letters in Applied Microbiology*. 45, pp. 174-178. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02166.x>
- [52] Bussalleu, E., Althouse, G.C. (2018): A PCR detection method for discerning *Serratia marcescens* in extended boar semen. *Journal of Microbiological Methods*. 151, pp. 106-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.012>
- [53] Zhu, H., Sun, S.J., Dang, H.Y. (2008): PCR detection of *Serratia* spp. using primers targeting *pfs* and *luxS* genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Current Microbiology*. 57, pp. 326-330. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9197-6>
- [54] National Center for Biotechnology Information (2020): Search database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hozzáférés 2020.03.20.
- [55] Insightful Science (2020): SnapGene Software. <https://www.snapgene.com/>. Hozzáférés 2020.03.20.

- [56] Machado, S.G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M.C.D., De Block, J., Heyndrick, M. (2017): The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 8, p. 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>
- [57] Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004): Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, pp. 5644-5650. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004>
- [58] Ribeiro Jr., J.C., de Oliveira, A.M., de G. Silva, F., Tamanini, R., de Oliveira, A.L.M., Beloti, V. (2018): The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*. 101, pp. 75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>
- [59] Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M. (2014): Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*. 79, pp. 81-90. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- [60] Baglinière, F., Salgado, R.L., Salgado, C.A., Dantas Vanetti, M.C. (2017): Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk. *Journal of Food Science*. 82, pp. 952-959. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13660>

Characterization of Serratia species and qualitative detection of Serratia marcescens in raw and pasteurized milk by an analytical method based on polymerase chain reaction

Keywords: nosocomial infection, *Serratia* species, *Serratia marcescens*, pathogen, prodigiosin, pigment, polymerase chain reaction (PCR), food diagnostics

1. SUMMARY

Serratia species are opportunistic pathogenic microorganisms primarily known as nosocomial infectious agents, which can also cause food quality problems. The appearance of the extracellular pigment-producing *Serratia marcescens* in cow's milk causes its red discoloration, posing a challenge to the dairy industry and food certification laboratories. The detection of the bacterium by conventional procedures based on microbiological methods is time-consuming and labor-intensive, and in many cases does not lead to satisfactory results due to the competitive inhibitory effect of the accompanying microflora. Following the analysis of the relevant literature, the published endpoint PCR methods and the primers used for the detection of *S. marcescens* were evaluated in *in silico* and *in vitro* assays, and then the procedure was tested on farm milk samples. Using the method, a total of 60 raw and pasteurized milk samples were analyzed, more than half of which (i.e., 32) were identified as *S. marcescens* positive. The significance of our work is mainly represented by the application of the published test methods in food industry practice. Our results highlight to the importance of detecting this bacterial species.

¹ Hungarian Dairy Research Institute Ltd, Mosonmagyaróvár

² Széchenyi István University, Wittmann Antal Multidisciplinary Doctoral School in Plant, Animal, and Food Sciences, Mosonmagyaróvár

³ Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food Science, Mosonmagyaróvár

2. Introduction and literature review

Nowadays, the impeccable quality and long shelf life of foods is a basic requirement of consumers. Accordingly, there is a growing demand for ever faster, more accurate and more reliable food diagnostic procedures. In this context, molecular diagnostic methods are gaining ground, for example in the rapid detection of pathogenic microorganisms. Polymerase chain reaction (PCR)-based diagnostic kits suitable for the identification of pathogenic microbes are produced by many manufacturers, and these are also used successfully in Hungarian food testing laboratories. These molecular biological tests are mainly suitable for the detection of microbes whose presence poses a high risk to public health (e.g., *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Listeria* spp.). Less attention is paid to pathogens that are not required to be tested by law, such as *Serratia* species present in raw and pasteurized milk.

Serratia species are found in many places in our environment [1]. They are saprophytes or opportunistic pathogens [2], facultative anaerobic, biofilm-forming organisms [1, 3]. *S. marcescens* grows particularly well in phosphorus-containing environments (e.g., soaps, shampoos) and is also resistant to certain disinfectants [4, 5], so it can cause various nosocomial diseases [6, 7, 8]. Increasing antibiotic resistance of *S. marcescens* has also been reported in the literature [8, 9, 10]. The bacterium therefore survives and grows easily, so it may find its way into foods under inadequate hygienic conditions. Presumably, it can enter drinking milk as a result of violating hygiene rules, it can grow there and degrade the quality of food [1, 11, 12]. For some species, spoilage is indicated by a characteristic red hue.

In the case of the Hungarian dairy sector, accurate data are not available on the extent of the prevalence of *Serratia* species and *S. marcescens*, and on which species cause the infections and degrade milk quality. Nor is there a Hungarian survey on the extent of *Serratia* contamination of dairy farms. With the exception of a few publications, the available information on the exposure of the dairy industry to *Serratia* is also lacking at the international level. Such exceptions are a scientific article on the epidemic of mastitis caused by *S. marcescens* at Finnish dairy farms [1], and an older report discussing the role played by pigment-forming *Serratia* species in mastitis [13].

The following *Serratia* species may be responsible for the red discoloration of milk: *S. marcescens*, *S. rubidaea*, *S. plymuthica* and *S. nematodiphila* (Table 1). According to their incidence, *S. marcescens* is of greater importance. Their characteristic pigment is the red prodigiosin, a water-insoluble secondary metabolite that is produced under specific environmental conditions [14, 15, 16, 17] (Figure 1). The typical red colonies appearing on the culture medium alone do not provide sufficient information to identify *Serratia*, as certain species of many other genera, not belonging to Enterobacteria, may also produce prodigiosin [14, 18].

Table 1. Characterization of *Serratia* species and their pigment production [19–22]

Species	Characterisation of pigment production	Source
<i>Serratia aquatilis</i>	Cream coloured	[23]
<i>Serratia entomophila</i>	No pigment production	[24]
<i>Serratia ficaria</i>	No pigment production	[25, 26]
<i>Serratia fonticola</i>	No pigment production	[27]
<i>Serratia grimesii</i>	No pigment production	[28]
<i>Serratia inihbens</i>	Pale pink	[29]
<i>Serratia liquefaciens</i>	No pigment production	[28]
<i>Serratia marcescens</i>	Reddis (prodigiosin) / No pigment production / Pink (pyrimine)	[16, 30, 31]
<i>Serratia microhaemolytica</i>	No pigment production	[32]

<i>Serratia myotis</i>	No pigment production	[33]
<i>Serratia nematodiphila</i>	Reddis (prodigiosin) / No pigment production	[34]
<i>Serratia odorifera</i>	No pigment production	[35, 36]
<i>Serratia oryzae</i>	No pigment production	[37]
<i>Serratia plymuthica</i>	Reddis (prodigiosin) / No pigment production	[35, 38, 39]
<i>Serratia proteamaculans</i>	No pigment production	[28, 40, 41]
<i>Serratia quinivorans</i>	No pigment production	[28, 36, 42]
<i>Serratia rubidaea</i>	Reddis (prodigiosin) / No pigment production	[16, 43, 44]
<i>Serratia symbiotica</i>	No pigment production	[45]
<i>Serratia ureilytica</i>	No pigment production	[46]
<i>Serratia vesperilionis</i>	No pigment production	[33]



Figure 1. Pure culture of *Serratia marcescens* on tryptone-soy agar (TSA) (30 °C, 48 h)

There is currently no ISO standard for the detection of *Serratia* species in foods. In their 2006 book chapter [9], Grimont and Grimont discuss the characteristics of the genus *Serratia*, as well as aspects of their isolation and identification. However, identification by classical microbiological methods is rather cumbersome and often ineffective due to the inhibitory effect of the accompanying flora, despite the fact that the pink discoloration of the milk sample is clearly visible to the naked eye. Although culture media are available for the selective growth of the bacterium [47], in practice their use does not provide a satisfactory solution. In addition, conventional methods are time and labor intensive.

There are commercially available rapid methods for the determination of *S. marcescens*, for example the miniaturized test kit from bioMérieux called Rapid ID 32 E, which satisfies the requirements of standard ISO 7218 [48]. However, a colony growing on a culture medium is required to perform the test. Diagnostic tests based on the PCR method, as mentioned before, could provide a solution to overcome the difficulties of detection. At present, however, only the Genesig product of Primerdesign can be mentioned as a molecular diagnostic kit for the detection of *S. marcescens* [49].

The literature relevant for the food industry and, in particular, the dairy industry, is rather poor on the detection of *Serratia* species, including *S. marcescens*, by either endpoint PCR or real-time PCR methods. Hejazi et al. [50] carried out the serotyping of *S. marcescens* by the RAPD-PCR technique. Serological samples from patients in need of hospital care were used in their study. Iwaya et al. [6] also tested blood samples for *S. marcescens* strains using a real-time PCR method. Zhu et al. [51] performed molecular characterization of *S. marcescens* strains by RFLP and PCR methods, while Joyner et al. [2] detected *S. marcescens* strains in marine and other aquatic environmental samples (e.g., coral mucus, sponge pore water, sediment, sewage, wastewater and diluted wastewater) by real-time PCR. A study of Bussalleu and Althouse, published in 2018, reports a conventional endpoint PCR technique suitable for the identification of *S. marcescens* that effectively detects the presence of the microorganism in wild boar semen [52].

Our goal was the set up a classical PCR method suitable for the detection of *S. marcescens* in milk. The significance of our work lies in the fact that PCR-based methods described in the literature and the primers used were analyzed, then the procedure deemed appropriate was adopted to food hygiene analytical practice. In our experiments, qualitative determination of the possible *S. marcescens* contamination underlying the discoloration of factory, raw and pasteurized milk samples was performed.

3. Materials and methods

3.1. *In silico* studies

Based on the literature, three primer pairs (Table 2) were selected, which were evaluated by computer modeling, by so-called *in silico* analysis, as well as *in vitro* experiments in order to find the most suitable one for subsequent PCR assays.

Table 2. *Serratia marcescens*-specific primer pairs used in this study

Name of oligo	Sequence	TM [°C]	Length of fragment	Source
Fpfs1	CCGGCATCGGCAAAGTCT	58,2	193 bp	[53]
Rpfs2	ATCTGGCCCGGCTCGTAGCC	65,5		
FluxS1	GCTGGAACACCTGTTCGC	58,2	102 bp	
RluxS2	ATGTAGAAACCGGTGCGG	56,0		
Serratia2-for	GGTGAGCTTAATACGTTTCATCAA	57,1	107 bp	[52]
Serratia2-rev	AATTCCGATTAACGCTTGAC	55,9		

In our *in silico* studies, the specificity of the a primer sequences was verified by comparison with a DNA database (NCBI BLAST) [54]. Comparison with the database allows for homology search (“blasting”). Following this, the suitability of the primers, i.e., whether a possible PCR reaction takes place with the selected genomes, was tested with a molecular biology software (SnapGene 5.1.5.) [55]. In the latter case, positive and negative control genomes were downloaded from the NCBI database, and then the SnapGene software was used, in an *in silico* way, to investigate whether the PCR reaction would take place with the primer pairs. The positive and negative controls used for reference purposes were whole chromosome genomes (Table 3).

Table 3. Genomes of bacterial strains used as positive and negative controls in *in silico* analyses and their reactions to primer pairs

Applied bacteria strain		Identifier of GenBank sequence	Result of amplification carried out with primer pairs		
			A.	B.	C.
Pozitív kontroll genomok	<i>Serratia marcescens</i> Db11	HG326223.1			
	<i>Serratia marcescens</i> WW4	CP003959.1			
	<i>Serratia marcescens</i> B3R3	CP013046.2			
	<i>Serratia marcescens</i> N4-5	CP031316.1			
	<i>Serratia marcescens</i> 1274	CP019927.2			
	<i>Serratia marcescens</i> AR_0099	CP027539.1			
	<i>Serratia marcescens</i> AS-1	AP019009.1			
	<i>Serratia marcescens</i> S2I7	CP021984.1			
	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 274	AP021873.1			
	<i>Serratia marcescens</i> LY1	CP053918.1			
Negatív kontroll genomok	<i>Serratia grimesii</i> BXF1	LT883155.1			
	<i>Serratia grimesii</i> NCTC11543	NZ_UGYI01000001.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> ATCC 27592	NC_021741.1			
	<i>Serratia liquefaciens</i> FG3	CP033893.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DH-S01	CP038662.1			
	<i>Serratia nematodiphila</i> DZ0503SBS1	NZ_JPUX01000001.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> 1122	CP014474.1			
	<i>Serratia rubidaea</i> NCTC10848	NZ_LS483492.1			
	<i>Escherichia coli</i> 58-3	CP050036.1			
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	CP000946.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> Kp52.145	FO834906.1			
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> N16-03892	CP047271.1			
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> UCBPP-PA14	CP000438.1			
	<i>Pseudomonas putida</i> T25-27	CP043576.1			

* Primerek: A. Fpfs1 és Rpfs2; B. FluxS1 és RluxS2; C. *Serratia*2-for és *Serratia*2-rev.

Jelmagyarázat:

	a primerpárral fragment amplifikálható
	a primerpárral nincs amplifikáció

3.2. *In vitro* experimental studies

To confirm the results of the *in silico* studies, *in vitro* were performed in which the selected primer pairs were tested in laboratory PCR analyses on genomic DNA samples of selected strains of bacteria (several *S. marcescens* strains were used as positive control and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Streptococcus thermophilus*, *Enterococcus faecalis* and *Micrococcus luteus* were used as negative controls). The microorganisms were bacterial strains belonging to the collection of MTKI Kft. and coming from factory environment, determined by genetic identification.

When putting together the components required for the PCR reaction, 5.2 µL of PCR grade sterile water, 10 µL of DreamTaq Green 2× PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 0.4 µL (10 pmol/µl) primer and 4 µL of isolated bacterial genomic DNA were used for each reaction. The negative control of the reactions was PCR grade sterile water. The program parameters of the PCR instrument (Mastercycler Nexus Gradient; Eppendorf International, Hamburg, Germany) were as follows: 95 °C for 1 minute, then for 40 cycles 95 °C for 15 seconds, 59.5 °C for 15 seconds, 72 °C for 10 seconds and, finally, 72 °C for 7 minutes [52].

For size separation of the DNA segments formed during the PCR reaction, a 10 µL sample was analyzed on a 2% agarose gel [TBE buffer (Tris-borate-EDTA) (10×), Thermo Fisher Scientific; Agarose DNA Pure Grade, VWR International, Debrecen, Hungary; ECO Safe Nucleic Acid Staining Solution 20.000×, Pacific

Image Electronics, Torrance, California, USA]. The DNA size marker was the GeneRuler Low Range DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Gel documentation was performed using the Gel Doc Universal Hood II gel documentation equipment and software (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

3.3. analysis of raw and pasteurized milk samples

On the one hand, we used in our study factory raw and pasteurized milk samples in the case of which *S. marcescens* contamination was suspected due to their pink discoloration. On the other hand, factory raw and pasteurized milk samples that arrived at the laboratory together with the above samples but not exhibiting discoloration were also tested.

For the DNA digestion and purification process, the NucleoSpin Microbial DNA kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) was used according to the manufacturer's instructions. The reaction tubes containing the eluted DNA were stored in a freezer at -20 °C.

Next, the suitability of DNA isolation and the amplifiability of the samples were checked by 16S rDNS polymerase chain reaction, using primers 27f (5'-AGAGTTGATCMTGGCTCAG-3') and 1492r (5'-TACGGYTACCTTGTTACGACTT-3'). The total volume of the PCR reaction for 1 sample was 5.6 µL of PCR grade sterile water, 10 µL DreamTaq Green 2× PCR Master Mix, 0.2 µL (10 pmol/µl) of the primers and 4 µL of isolated bacterial genomic DNA. The negative control of the reactions was PCR grade sterile water. The program parameters of the PCR instrument were as follows: 95 °C for 4 minutes, then for 40 cycles 95 °C for 20 seconds, 54 °C for 30 seconds, 72 °C for 1 minute and, finally, 72 °C for 5 minutes.

For the separation of the DNA segments formed during the PCR reaction, a 5 µL sample was analyzed on a 1% agarose gel. The DNA size marker was the GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). The DNA sample tested was judged to be suitable for further PCR analysis if the length of the copies of the amplified DNA fragment was as expected (~1500 bp).

In the next step, samples were subjected to *S. marcescens*-specific PCR analysis and gel electrophoresis as described in subsection *IN VITRO EXPERIMENTAL STUDIES*. The results were evaluated on the basis of the presence/absence principle.

In order to check the suitability of the method, PCR results of the milk samples were compared with the few available API (bioMérieux, Budapest, Hungary) test results in a control test. The method was then used to detect the presence of *S. marcescens* in raw and pasteurized milks.

4. Results

In our *in silico* studies, when examining the homology of the primers, they showed similarity primarily to *S. marcescens* chromosome genomes. However, matches were also found in the case of *S. rubidaea* and *S. nematodiphila* strains and some non-*Serratia* species. These results were taken into account during the selection of reference genomes designed for our SnapGene software studies. The need for further investigation was justified by the fact that appropriate homology or the matching of the basis do not automatically mean that the PCR reaction will take place, because the direction of the primers, their melting temperature and the size of the PCR product formed are also critical, among other things.

In the SnapGene test, PCR reactions were predicted with the following parameters: our analyses were performed with at least 15 bases matching and the exclusion of single isolated mismatches. The minimum melting temperature was 50 °C and the maximum length of the fragment obtained as the result of the amplification was 3 kbp.

As shown in **Table 3**, when matched with the *S. marcescens* genomes, the primer pair *Serratia2*-for and *Serratia2*-rev showed amplification in all cases. The PCR reaction generally resulted in six or seven amplicons on the 16S rDNA sections. The adhesion site of the *Fpfs1*-*Rpfs2* and *FluxS1*-*RluxS2* primer pairs is located outside the 16S rDNA in most *S. marcescens* strains, but in some cases they did not show *in silico* amplification, so their sensitivity did not prove to be adequate. In the negative control genomes, the completion of a PCR reaction was predicted by the primer pair *Serratia2*-for and *Serratia2*-rev in some cases for certain *S. rubidaea* and *S. nematodiphila* strains. Using primers *Fpfs1*-*Rpfs2*, the PCR reaction would take place in the case of a *S. nematodiphila* strain. Primers *FluxS1*-*RluxS2* did not predict the occurrence of a reaction on any of the selected negative control genomes (**Table 3**).

In *S. marcescens* genomes selected as positive controls in *in vitro* experiments, all three primer pairs gave signals according to the expected fragment size, and none gave a signal on the negative controls. The analysis carried out with the primer pair *Serratia2*-for and *Serratia2*-rev is shown in **Figure 2**. In the case of negative samples, the weak signals at around 50 bp are caused by the accumulation of the byproduct aspecific DNA fragments, primer dimers.

Based on the results of *in silico* analyses and *in vitro* studies, primers Serratia2-for and Serratia2-rev were considered to be suitable for further work, despite the fact that their specificity was not perfect. The decision was based on the probable frequency of occurrence of *S. marcescens* on the one hand and the importance of avoiding samples with false negative results on the other.

In order to check the suitability of the method that had been set up, factory milk samples were tested in a control study. Some of the milk samples ($n=10$) exhibited pink discoloration. Using our test method, nine samples were found to be positive for the microbe sought. We also had API test results for four of the samples. The four API-positive samples were also found to be positive in the PCR assay. The method was then used to detect *S. marcescens* in raw and pasteurized milks.

Some of the milk samples showed peach-pink discoloration (**Figure 3**), but it was not clear in many cases due to the pale or yellowish tint. A total of 60 samples were analyzed. Of these, 32 (53.3%) gave positive results and 28 (46.7%) gave negative results for the presence of *S. marcescens*.

Figure 4 shows the result of one of our assays, the separation by gel electrophoresis. It can be clearly seen that the positive control strain gave a positive signal, while the negative control sample gave a negative signal, and positive signals were obtained for three test samples. The weak signals appearing in the case of negative samples are again caused by the accumulation of primer dimers.

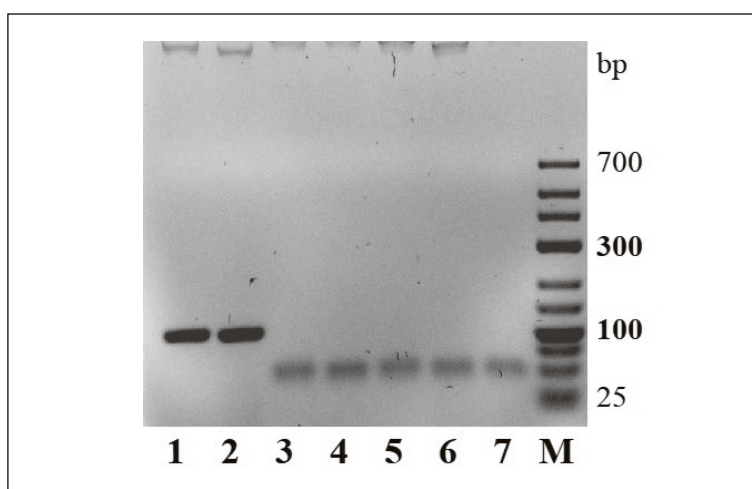


Figure 2. Results of PCR analysis with Serratia2-for and Serratia2-rev primers on the genome of selected bacterial strains. Lanes: 1. *Serratia marcescens* 551R; 2. *Serratia marcescens* 1911; 3. *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* 0801; 4. *Streptococcus thermophilus* 1102; 5. *Enterococcus faecalis* 1101; 6. *Micrococcus luteus* CLTB1; 7. Negative control (sterile water); M: Molecular weight marker

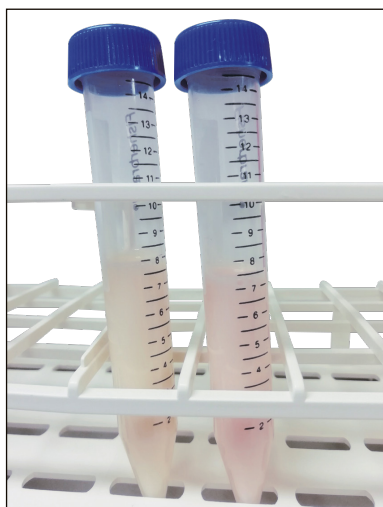


Figure 3. Milk samples. Left sample is netive and right sample is positive for *Serratia marcescens*, based on the result of PCR test

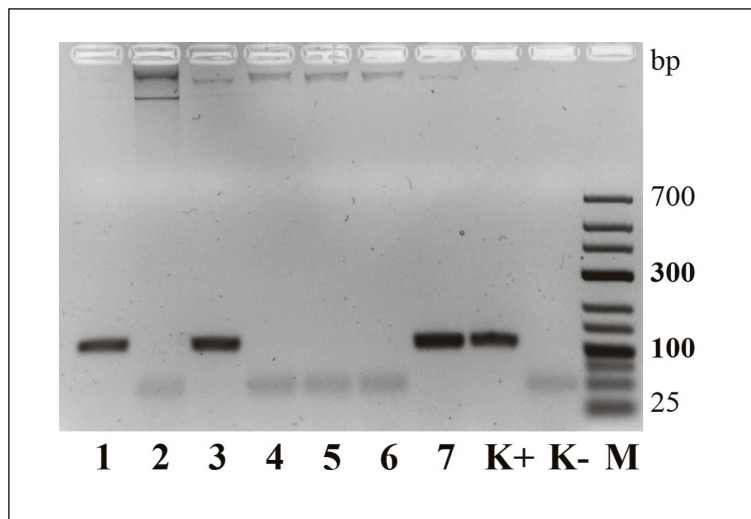


Figure 4. Gel electrophoresis image of *Serratia marcescens*-specific PCR assay. Lanes 1 to 7: Milk samples; K+: Positive control (genomic DNA from *Serratia marcescens*); K-: Negative control (sterile water); M: Molecular weight marker

5. Discussion

When evaluating our results, it is important to take into account that the PCR analysis is a method suitable for the amplification and detection of the target DNA in the sample, based on which it is not possible to determine whether the amplified *S. marcescens*-specific DNA comes from viable, dead or so-called VBNC cells. In the VBNC (“viable but not culturable”) state, the cells are viable, metabolically active, but cannot be propagated by classical culture methods. This condition is reversible.

The objective of our work was to establish a classical PCR method for the detection of *S. marcescens*. Using the test procedure applied, qualitative determination of the *S. marcescens* contamination responsible for the discoloration of milk samples can be carried out.

Although the experiments presented here focused on the detection of pigment-producing *S. marcescens*, a future genus-level study could identify all 20 *Serratia* species (**Table 1**). The significance of the detection of other *Serratia* species is evidenced by the fact that, although the genus *Pseudomonas* is the main cause of the spoilage of chilled raw milk, the dangers of *Serratia* species in this respect are also known [56]. In addition to *Pseudomonas* strains, *Serratia* strains have also been identified in many cases as causes of milk spoilage. Members of the genus *Serratia* have been detected in dairy plants [3, 12], in raw milk samples stored at 4° C [56, 57, 58] and in milk containers [59]. It was noted by Grimont and Grimont [9] already a decade and a half ago that raw milk lots can occasionally be contaminated with *Serratia* species, and the species most often occurring in dairy products are *S. liquefaciens* and *S. grimesii*.

The presence of psychrotrophic *Serratia* species (e.g., *S. liquefaciens*) in raw milk can cause spoilage even after heat treatment. Baglinière et al. found that the thermally stable Ser2 protease produced by *S. liquefaciens* may be a significant factor in the destabilization of UHT milk [11, 60].

In conclusion, it can be stated that a genus-level study would be an interesting research project that would fill a gap, and which would allow the monitoring of raw milk in this respect, the wide detection of *Serratia* species. Presumably, the results would provide useful information not only to the stakeholders of the dairy economy and the dairy industry, but could also have an impact on Hungarian regulatory and monitoring practice.

6. References

- [1] Friman, M.J., Eklund, M.H., Pitkälä, A.H., Rajala-Schultz, P.J., Rantala, M.H.J. (2019): Description of two *Serratia marcescens* associated mastitis outbreaks in Finnish dairy farms and a review of literature. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 61, pp. 54. <https://doi.org/10.1186/s13028-019-0488-7>
- [2] Joyner, J., Wanless, D., Sinigalliano, C.D., Lipp, E.K. (2014): Use of quantitative real-time PCR for direct detection of *Serratia marcescens* in marine and other aquatic environments. *Applied and Environmental Microbiology*. 80, pp. 1679-1683. <https://doi.org/10.1128/AEM.02755-13>
- [3] Cleto, S., Matos, S., Kluskens, L., Vieira, M.J. (2012): Characterization of contaminants from a sanitized milk processing plant. *PLoS ONE*. 7(6), e40189. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040189>
- [4] Langsrud, S., Møretrø, T., Sundheim, G. (2003): Characterization of *Serratia marcescens* surviving in disinfecting footbaths. *Journal of Applied Microbiology*. 95, pp. 186-195. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.01968.x>
- [5] Møretrø, T., Langsrud, S. (2017): Residential bacteria on surfaces in the food industry and their implications for food safety and quality. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 16, pp. 1022-1041. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12283>
- [6] Iwaya, A., Nakagawa, S., Iwakura, N., Taneike, I., Kurihara, M., Kuwano, T., Gondaira, F., Endo, M., Hatakeyama, K., Yamamoto, T. (2005): Rapid and quantitative detection of blood *Serratia marcescens* by a real-time PCR assay: Its clinical application and evaluation in a mouse infection model. *FEMS Microbiology Letters*. 248, pp. 163-170. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.05.041>
- [7] Bayramoglu, G., Buruk, K., Dinc, U., Mutlu, M., Yilmaz, G., Aslan, Y. (2011): Investigation of an outbreak of *Serratia marcescens* in a neonatal intensive care unit. *Journal of Microbiology, Immunology and Infection*. 44, pp. 111-115. <https://doi.org/10.1016/j.jmii.2010.02.002>
- [8] Moradigaravand, D., Boinett, C.J., Martin, V., Peacock, S.J., Parkhill, J. (2016): Recent independent emergence of multiple multidrug-resistant *Serratia marcescens* clones within the United Kingdom and Ireland. *Genome Research*. 26, pp. 1101-1109. <https://doi.org/10.1101/gr.205245.116>
- [9] Grimont, F., Grimont, P.A.D. (2006): The genus *Serratia*. *Prokaryotes*. 6, pp. 219-244. https://doi.org/10.1007/0-387-30746-X_11
- [10] Sandner-Miranda, L., Vinuesa, P., Cravioto, A., Morales-Espinosa, R. (2018): The genomic basis of intrinsic and acquired antibiotic resistance in the genus *Serratia*. *Frontiers in Microbiology*. 9, pp. 828. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00828>
- [11] Baglinière, F., Tanguy, G., Salgado, R.L., Jardin, J., Rousseau, F., Robert, B., Harel-Oger, M., Dantas Vanetti, M.C., Gaucheron, F. (2017): Ser2 from *Serratia liquefaciens* L53: A new heat stable protease able to destabilize UHT milk during its storage. *Food Chemistry*. 229, pp. 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.02.054>
- [12] Salgado, C.A., Baglinière, F., Vanetti, M.C.D. (2020): Spoilage potential of a heat-stable lipase produced by *Serratia liquefaciens* isolated from cold raw milk. *LWT - Food Science and Technology*. 126, 109289. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109289>
- [13] Barnum, D.A., Thackeray, E.L., Fish, N.A. (1958): An outbreak of mastitis caused by *Serratia marcescens*. *Canadian Journal of Comparative and Medical Veterinary Science*. 22, pp. 392-395.
- [14] Malik, K., Tokkas, J., Goyal, S. (2012): Microbial pigments: A review. *International Journal of Microbial Resource Technology*. 1 (4), pp. 361-365.
- [15] Petersen, L.M., Tisa, L.S. (2013): Friend or foe? A review of the mechanisms that drive *Serratia* towards diverse lifestyles. *Canadian Journal of Microbiology*. 59, pp. 627-640. <https://doi.org/10.1139/cjm-2013-0343>
- [16] Darshan, N., Manonmani, H.K. (2015): Prodigiosin and its potential applications. *Journal of Food Science and Technology*. 52, pp. 5393-5407. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1740-4>
- [17] Srimathi, R., Priya, R., Nirmala, M., Malarvizhi, A. (2017): Isolation, identification, optimization of prodigiosin pigment produced by *Serratia marcescens* and its applications. *International Journal of Latest Engineering and Management Research*. 2 (9), pp. 11-21.
- [18] Giri, A.V., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., Pennathur, G. (2004): A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*. 4, pp. 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-4-11>
- [19] Mahlen, S.D. (2011): *Serratia* infections: From military experiments to current practice. *Clinical Microbiology Reviews*. 24, pp. 755-791. <https://doi.org/10.1128/CMR.00017-11>

- [20] Analyzer of Bio-resource Citations (2020): Microorganism Search for Paper, Patent, Genome and Nucleotic. <http://abc.wfcc.info/index.jsp>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [21] Birla Institute of Scientific Research, Bioinformatics Centre (2015): Database of Biochemical Tests of Pathogenic Enterobacteriaceae Family. <https://bioinfo.bisr.res.in/cgi-bin/project/docter/serratia.cgi>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [22] LPSN (2020): List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature. <https://lpsn.dsmz.de/genus/serratia>. Hozzáférés 2020.04.21.
- [23] Kämpfer, P., Glaeser, S.P. (2016): *Serratia aquatilis* sp. nov., isolated from drinking water systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 66, pp. 407-413. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.000731>
- [24] Grimont, P.A.D., Jackson, T.A., Ageron, E., Noonan, M.J. (1988): *Serratia entomophila* sp. nov. associated with amber disease in the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 38, pp. 1-6. <https://doi.org/10.1099/00207713-38-1-1>
- [25] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1979): *Serratia ficaria* sp. nov., a bacterial species associated with Smyrna figs and the fig wasp *Blastophaga psenes*. *Current Microbiology*. 2, pp. 277-282. <https://doi.org/10.1007/BF02602859>
- [26] Anahory, T., Darbas, H., Ongaro, O., Jean-Pierre, H., Mion, P. (1998): *Serratia ficaria*: A misidentified or unidentified rare cause of human infections in fig tree culture zones. *Journal of Clinical Microbiology*. 36, pp. 3266-3272. <https://doi.org/10.1128/JCM.36.11.3266-3272.1998>
- [27] Gavini, F., Ferragut, C., Izard, D., Trinel, P.A., Leclerc, H., Lefebvre, B., Mossel, D.A.A. (1979): *Serratia fonticola*, a new species from water. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 29, pp. 92-101. <https://doi.org/10.1099/00207713-29-2-92>
- [28] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Irino, K. (1982): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* sensu stricto, *Serratia proteamaculans*, and *Serratia grimesii* sp. nov.. *Current Microbiology*. 7, pp. 69-74. <https://doi.org/10.1007/BF01568416>
- [29] Hennessy, R.C., Dichmann, S.I., Martens, H.J., Zervas, A., Stougaard, P. (2020): *Serratia inhibens* sp. nov., a new antifungal species isolated from potato (*Solanum tuberosum*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 70, pp. 4204-4211. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004270>
- [30] Bizio, B. (1823): Lettera di Bartolomeo Bizio al chiarissimo canonico Angelo Bellani sopra il fenomeno della polenta porporina. *Biblioteca Italiana, o sia Giornale di Letteratura, Scienze, e Arti* (Anno VIII). 30, pp. 275-295.
- [31] Williams, R.P., Gott, C.L., Qadri, S.M.H., Scott, R.H. (1971): Influence of temperature of incubation and type of growth medium on pigmentation in *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*. 106, pp. 438-443. <https://doi.org/10.1128/JB.106.2.438-443.1971>
- [32] Wang, J., Zheng, M.L., Jiao, J.Y., Wang, W.J., Li, S., Xiao, M., Chen, C., Qu, P.H., Li, W.J. (2019): *Serratia microhaemolytica* sp. nov., isolated from an artificial lake in Southern China. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 112, pp. 1447-1456. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01273-9>
- [33] García-Fraile, P., Chudíčková, M., Benada, O., Pikula, J., Kolařík, M. (2015): *Serratia myotis* sp. nov. and *Serratia vespertilionis* sp. nov., isolated from bats hibernating in caves. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 65, pp. 90-94. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.066407-0>
- [34] Zhang, C.X., Yang, S.Y., Xu, M.X., Sun, J., Liu, H., Liu, J.R., Liu, H., Kan, F., Sun, J., Lai, R., Zhang, K.Y. (2009): *Serratia nematodiphila* sp. nov., associated symbiotically with the entomopathogenic nematode *Heterorhabditoides chongmingensis* (Rhabditida: Rhabditidae). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 59, pp. 1603-1608. <https://doi.org/10.1099/ijms.0.003871-0>
- [35] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Richard, C., Davis, B.R., Steigerwalt, A.G., Brenner, D.J. (1978): Deoxyribonucleic acid relatedness between *Serratia plymuthica* and other *Serratia* species, with a description of *Serratia odorifera* sp. nov. (type strain: ICPB 3995). *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 453-463. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-453>
- [36] Van Houdt, R., Moons, P., Jansen, A., Vanoirbeek, K., Michiels, C.W. (2005): Genotypic and phenotypic characterization of a biofilm-forming *Serratia plymuthica* isolate from a raw vegetable processing line. *FEMS Microbiology Letters*. 246, pp. 265-272. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.016>

- [37] Zhang, C.W., Zhang, J., Zhao, J.J., Zhao, X., Zhao, D.F., Yin, H.Q., Zhang, X.X. (2017): *Serratia oryzae* sp. nov., isolated from rice stems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 67, pp. 2928-2933. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002049>
- [38] Lehman, K.B., Neumann, R. (1896): *Atlas und Grundriss der Bakteriologie und Lehrbuch der Speziellen Bakteriologischen Diagnostik*, Volume 11st Ed. J.F. Lehmann, München.
- [39] Breed, R.S., Murray, E.G.D., Hitchens, A.P. (Eds.) (1948): *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 6th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore, MD, USA. pp. 1-1529.
- [40] Paine, S.G., Stansfield, H. (1919): Studies in bacteriosis. III. A bacterial leaf spot disease of *Peotea cynaroides*, exhibiting a host reaction of possibly bacteriolytic nature. *Annals of Applied Biology*. 6, pp. 27-39. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1919.tb05299.x>
- [41] Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, M.P. (1978): *Serratia proteamaculans* (Paine and Stansfield) comb. nov., a senior subjective synonym of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 28, pp. 503-510. <https://doi.org/10.1099/00207713-28-4-503>
- [42] Ashelford, K.E., Fry, J.C., Bailey, M.J., Day, M.J. (2002): Characterization of *Serratia* isolates from soil, ecological implications and transfer of *Serratia proteamaculans* subsp. *quinovora* Grimont et al. 1982 to *Serratia quinovorans* corrig., sp. nov.. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, pp. 2281-2289. <https://doi.org/10.1099/00207713-52-6-2281>
- [43] Stapp, C. (1940): *Bacterium rubidaeu* nov. spec. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abt. II*. 102, pp. 252-260.
- [44] Ewing, W.H., Davis, B.R., Fife, M.A., Lessel, E.F. (1973): Biochemical characterization of *Serratia liquefaciens* (Grimes and Hennerty) Bascomb et al. (formerly *Enterobacter liquefaciens*) and *Serratia rubidaea* (Stapp) comb. nov. and designation of type and neotype strains. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23, pp. 217-225. <https://doi.org/10.1099/00207713-23-3-217>
- [45] Sabri, A., Leroy, P., Haubruge, E., Hance, T., Frère, I., Destain, J., Thonart, P. (2011): Isolation, pure culture and characterization of *Serratia symbiotica* sp. nov., the R-type of secondary endosymbiont of the black bean aphid *Aphis fabae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 61, pp. 2081-2088. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.024133-0>
- [46] Bhadra, B., Roy, P., Chakraborty, R. (2005): *Serratia ureilytica* sp. nov., a novel urea-utilizing species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 55, pp. 2155-2158. <https://doi.org/10.1099/ijse.0.63674-0>
- [47] Starr, M.P., Grimont, P.A.D., Grimont, F., Starr, P.B. (1976): Caprylate-thallos agar medium for selectively isolating *Serratia* and its utility in the clinical laboratory. *Journal of Clinical Microbiology*. 4, pp. 270-276.
- [48] BioMérieux (2015): API & ID 32 Identification Databases. <https://www.biomerieux-diagnostics.com/sites/clinic/files/9308960-002-gb-b-apiweb-booklet.pdf>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [49] Primerdesign (2019): *Serratia marcescens* Genesig kit. <https://www.genesig.com/products/9405-serratia-marcescens>. Hozzáférés 2020.04.02.
- [50] Hejazi, A., Keane, C.T., Falkiner, F.R. (1997): The use of RAPD-PCR as a typing method for *Serratia marcescens*. *Journal of Medical Microbiology*. 46, pp. 913-919. <https://doi.org/10.1099/00222615-46-11-913>
- [51] Zhu, H., Zhou, W.Y., Xu, M., Shen, Y.L., Wei, D.Z. (2007): Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Letters in Applied Microbiology*. 45, pp. 174-178. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2007.02166.x>
- [52] Bussalleu, E., Althouse, G.C. (2018): A PCR detection method for discerning *Serratia marcescens* in extended boar semen. *Journal of Microbiological Methods*. 151, pp. 106-110. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2018.06.012>
- [53] Zhu, H., Sun, S.J., Dang, H.Y. (2008): PCR detection of *Serratia* spp. using primers targeting *pfs* and *luxS* genes involved in AI-2-dependent quorum sensing. *Current Microbiology*. 57, pp. 326-330. <https://doi.org/10.1007/s00284-008-9197-6>
- [54] National Center for Biotechnology Information (2020): Search database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Hozzáférés 2020.03.20.
- [55] Insightful Science (2020): SnapGene Software. <https://www.snapgene.com/>. Hozzáférés 2020.03.20.

- [56] Machado, S.G., Baglinière, F., Marchand, S., Van Coillie, E., Vanetti, M.C.D., De Block, J., Heyndrick, M. (2017): The biodiversity of the microbiota producing heat-resistant enzymes responsible for spoilage in processed bovine milk and dairy products. *Frontiers in Microbiology*. 8, p. 302. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00302>
- [57] Lafarge, V., Ogier, J.C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J.Y., Gruss, A., Delacroix-Buchet, A. (2004): Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Applied and Environmental Microbiology*. 70, pp. 5644-5650. <https://doi.org/10.1128/AEM.70.9.5644-5650.2004>
- [58] Ribeiro Jr., J.C., de Oliveira, A.M., de G. Silva, F., Tamanini, R., de Oliveira, A.L.M., Beloti, V. (2018): The main spoilage-related psychrotrophic bacteria in refrigerated raw milk. *Journal of Dairy Science*. 101, pp. 75-83. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-13069>
- [59] Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., Brasca, M. (2014): Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of Food Science*. 79, pp. 81-90. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12645>
- [60] Baglinière, F., Salgado, R.L., Salgado, C.A., Dantas Vanetti, M.C. (2017): Biochemical characterization of an extracellular heat-stable protease from *Serratia liquefaciens* isolated from raw milk. *Journal of Food Science*. 82, pp. 952-959. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13660>

Golden Delicious almák és Packham körték mechanikai kifáradási mutatóinak összehasonlítása

Kulcsszavak: gyümölcsök sérülése, TTF (time to failure), gyümölcsök reológiai vizsgálata, viszkoelasztikus modellek, időfüggő alakváltozás, terhelési és tehermentesítési görbék, disszipált energia, biológiai folyáshár, biológiai töréspont, sérülési határérték, sérülési ellenállás, kúszási görbe, deformáció

1. ÖSSZEFOGLALÁS

A kertészeti termények feldolgozási folyamataiban az egyik legjelentősebb, a gyümölcs tönkremeneteléhez vezető jelenség az ismétlődő mechanikai igénybevételek miatt bekövetkező kifáradás, ami főleg a szállítás során veszélyezteti a termények épségét. Ilyen sérülések esetében a károsodott gyümölcs közvetlen környezete, vagy akár a teljes terményhalmaz is veszélybe kerülhet, hiszen a romláshoz vezető biológiai folyamatok nem korlátozódnak a károsodott terményegyedre. Az ismétlődő hatások esetében a statikus határtértékhez képest kisebb erő is elegendő a tönkremenetelhez, de a terhelés mellett az adott termény anyagi tulajdonságai, valamint a károsodás közben megfigyelhető energiamérleg is fontos szerepet játszik a mechanikai ellenállás meghatározásában. Munkánkban ennek megfelelően a választott terményeket leginkább jellemző anyagmodellekre, az ismételt terhelések során mért disszipált-energia mutatókra, valamint a tönkremeneteli idő definiálására és meghatározására építjük a tönkremeneteli folyamat leírását. A kísérletek során az Európai Unió almatermelésének legnagyobb arányú képviselője, a Golden Delicious alma, valamint a hosszú tárolhatóságú Packham körte kifáradási jellemzőit hasonlítjuk össze lineáris regressziós modellek felállításával.

¹ Szent István Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézet, Gödöllő (2021. február 1. óta: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Műszaki Intézet)

² Szent István Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Géptani és Informatikai Intézet, Gödöllő (2021. február 1. óta: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Műszaki Intézet)

2. Bevezetés

A termények szortírozásánál nem csupán a méret és az alak, de az esetleges sérülés kiterjedése, vagy sok esetben maga a károsodás ténye is a válogatás alapját képezi. Az automatizált gépi felismerés – amelyet legtöbb esetben spektrális képalkotási módszerekkel végeznek – napjainkban már hatékonyan különíti el a sérült terményszövetet az egészségestől, a technológia számára pedig a szabad szemmel nem látható, felszín alatti károsodások észlelése sem jelent akadályt [1, 2]. A megbízhatóság egyrészt a hardveres kialakításnak (vagyis a felhasznált eszközök pontosságának), másrészt az alkalmazott algoritmusoknak a függvénye [3]. A módszerrel a válogatáson túl olyan kamerás megfigyelést is alkalmaznak, amely a megfelelő szoftver segítségével a paradicsomok érési állapotát is figyelembe tudja venni, és amely a szedőrobotok teljesen automatizált működését teszi lehetővé [4].

Bár az eredményes felismeréssel a sérült termények könnyedén eltávolíthatók a feldolgozási láncból, a szűrés mellett azt a célkitűzést is szem előtt kell tartani, hogy a betakarítás és a szükséges kezelési folyamatok után minél több egészséges áru jusson el a vevőkhöz. Mivel a nemzetközi felmérések szerint a feldolgozás különböző fázisaiban keletkező veszteségek miatt a termények jelentős része már nem kerül a fogyasztók elé a piacon [5, 6, 7], a sérülések precíz feltárása mellett a megelőzésnek is kiemelten fontos szerepet kell kapnia. Ehhez a termények roncsolásos úton történő vizsgálatára és a tönkremeneteli folyamat közvetlen megfigyelésére is szükség van.

A különféle mezőgazdasági és kertészeti termények anyagi tulajdonságai viszkoelasztikus modellek segítségével írhatók le, amelyek részben rugalmas, részben pedig viszkózus alkotóelemekből állnak. A sorban vagy párhuzamosan kapcsolt alaptagokból összetett anyagi struktúrák is előállíthatók, a háromelemes rendszerek közül pedig a Poynting-Thomson modellt már korábbi kutatásokban is többször alkalmazták az almástermésűek jellemzéséhez [8, 9, 10]. A viszkoelasztikus rendszerek esetében a mechanikai kölcsönhatások miatt létrejövő deformáció nem csupán az igénybevétel nagyságától, de a terhelés sebességétől is függ, a kúszás és a relaxáció pedig fontos részét képezi a terhelési és az alakváltozási folyamatnak: míg az előbbi esetében az állandó terhelés növekvő deformációt eredményez, addig az utóbbi jelenség során az állandó deformáció folyamatos feszültségcsökkenéssel jár [11].

Egy adott termény valamilyen mechanikai behatásra adott reakciója a terhelés-deformáció görbén jelenik meg, amely a kúszási és relaxációs paraméterek mellett a terhelési folyamatban keletkező összes energiamennyiségről is információt ad: a terhelési és tehermentesítési görbék által határolt terület egyéb szakterületeken is alapját képezi a disszipált energiaszámításoknak [12, 13], ez pedig szoros összefüggésben áll a vizsgált anyag viszkoelasztikus tulajdonságaival, valamint a termények esetében a mechanikai ellenállóképességgel és a sérülési hajlandósággal [14].

Azt a terhelési határértéket, amely a sejtszerkezetben bekövetkező mikroszkopikus károsodáshoz vezet – és amely a termény romlását is okozhatja - biológiai folyáshatárnak nevezzük. Bár biológiai anyagként a különböző termények a gyógyulásra, vagy akár a teljes regenerációra is képesek lehetnek, a feldolgozás során alkalmazott mechanikai hatásokat érdemes a biológiai folyáshatár alatt tartani. A határértéket ezen kívül a szabad szemmel is jól látható, nagyobb kiterjedésű károsodás is jelentheti, amelyet a szakirodalom töréspontnak nevez. Ilyen roncsolódás esetén a termény már nagy valószínűség szerint ténylegesen tönkremegy [15, 16]. A sérülési határértékek között általában jelentős szórás tapasztalható (teljesen azonos terhelőerő esetében is), amelyre az adott termény érési állapota, valamint a tárolás és feldolgozás közben biztosított körülmények is hatást gyakorolnak.

A nem megfelelő kezelésemből adódó ütközések mellett a sérülések zömét a szállítás során kialakuló rezgések okozzák. A sérüléssel végződő folyamatok roncsolásos vizsgálatokkal történő megfigyelése sajnos kiesik napjaink kutatási irányvonaláiból, pedig az ismételt terhelés hatására kialakuló kifáradási jelenség feltérképezése a gyümölcsöknél is elengedhetetlen [17].

A szállítási szimulációk során a legnagyobb károsodást előidéző frekvenciákat már egybehangzóan kimutatták [18, 19, 20], az ismétlődő terhelésekkel végzett roncsolásos vizsgálatoknál a tapasztalatok alapján így a 10 Hz alatti frekvenciatartományt érdemes beállítani.

A zöldségek és a gyümölcsök egy-egy mechanikai tulajdonságának leírásához gyakran alkalmaznak többváltozós regressziós modelleket, amelyek a különböző vizsgálati paraméterek figyelembevételével készülnek [21, 22]. Kutatásunk célja a termények esetében kevésbé tárgyalt kifáradási jelenség tanulmányozása, valamint a sérülési határértékek (biológiai folyáshatár vagy töréspont), és az ezzel összefüggésben álló tényezők (energiamérleg, anyagtulajdonságok) közötti összefüggés meghatározása. A cél egy sérülési határértékre vonatkozó lineáris egyenlet felállítása, amelyet az ismétlődő nyomóterhelés során mérhető paraméterek figyelembevételével határozunk meg.

3. Anyag és módszer

3.1. Mérőeszköz és a gyümölcsök rögzítése

A roncsolásos vizsgálatokat a DyMaTest nevű berendezéssel végeztük, amelyet a NAIK Mezőgazdasági Gépesítési Intézet bocsátott a rendelkezésünkre. Az eszköz egy hengeres (lapos felszínű) nyomócsappal terheli a gyümölcsöket, a nyomóerő pedig tetszőlegesen beállítható a készülékhez fejlesztett szoftveres kezelőfelületen [23]. A termény deformációja a mérőcsap elmozdulását érzékelő lézeres szenzorral, az erő pedig a műszerhez kialakított speciális mérőcellával regisztrálható. A vizsgálatok egy szinuszos nyomóerő beállítását követően a gyümölcsök tönkremeneteli határáig történnek.

A terményeket a mérések lebonyolításához egy homokágyban rögzítettük. Annak ellenőrzéséhez, hogy az alkalmazott homok kúszása nem befolyásolja a gyümölcsöknél kapott eredményeket, kontroll méréseket végeztünk, ehhez pedig egy teljesen rugalmatlan, 32 mm átmérőjű csapágygolyót alkalmaztunk. A nyomóterhelések során a fotoelektromos érzékelő mérési tartományában nem volt kimutatható elmozdulás, ezért a homok alakváltozása a gyümölcsök terhelési görbéin egyáltalán nem jelenik meg. A vizsgálatok előtt a homok előkészítése nedvesítési, szítálási és tömörítési műveletekből állt [24].

3.2. A termények alakváltozási görbéi

Az ismétlődő terhelésekkel végzett vizsgálatokhoz egy ciklikus jelalakot alkalmaztunk, amely az alábbi függvénnyel jellemezhető:

$$F_m = F_{max} (1 - \cos(\omega t)),$$

ahol F_{max} a periodikus terhelési függvény csúcserőértéke [N], ω pedig a terhelés szögsebessége [s^{-1}].

A periodikus terhelés hatására a keletkező deformáció szintén periodikus. Az **1.a ábrán** egy Golden alma deformációjának időfüggvénye látható, a **3.b ábrán** pedig az erő-deformáció görbéje. A Packham körtéknél tapasztalható tipikus deformációs görbéket **a 3.c és 3.d ábra** mutatja.

Az állandó amplitúdójú ciklikus terhelés hatására az alakváltozás folyamatosan módosul, ezt pedig a burkológörbék (vagy a középérték) növekedésén vehetjük észre. Mivel ezek a burkológörbék hasonlóan növekednek, mint a statikus terheléskor megfigyelhető kúszási görbék, ezt a folyamatot dinamikus kúszásnak nevezik [25].

A ciklikus terhelésre adott válaszfüggvény a

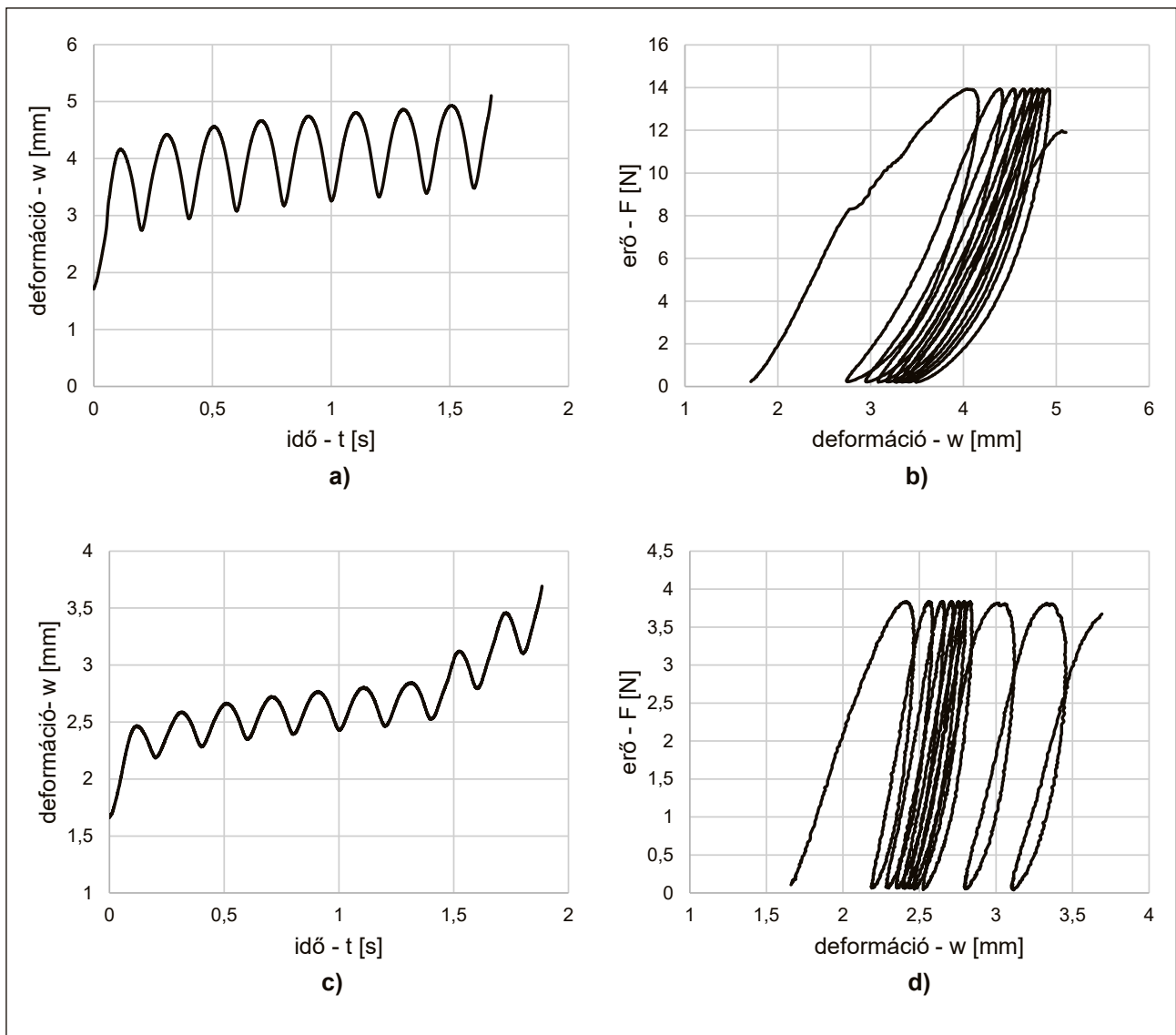
$$w_m = \beta + w_{max} (1 - \cos(\omega t - \delta))$$

egyenlettel írható le, ahol w a deformáció [mm], β a kúszási tag, w_{max} a periodikus alakváltozási függvény csúcserőértéke [mm], ω a szögsebesség [s^{-1}], δ pedig a terhelés és az alakváltozás időfüggvényei közötti fáziseltolódás.

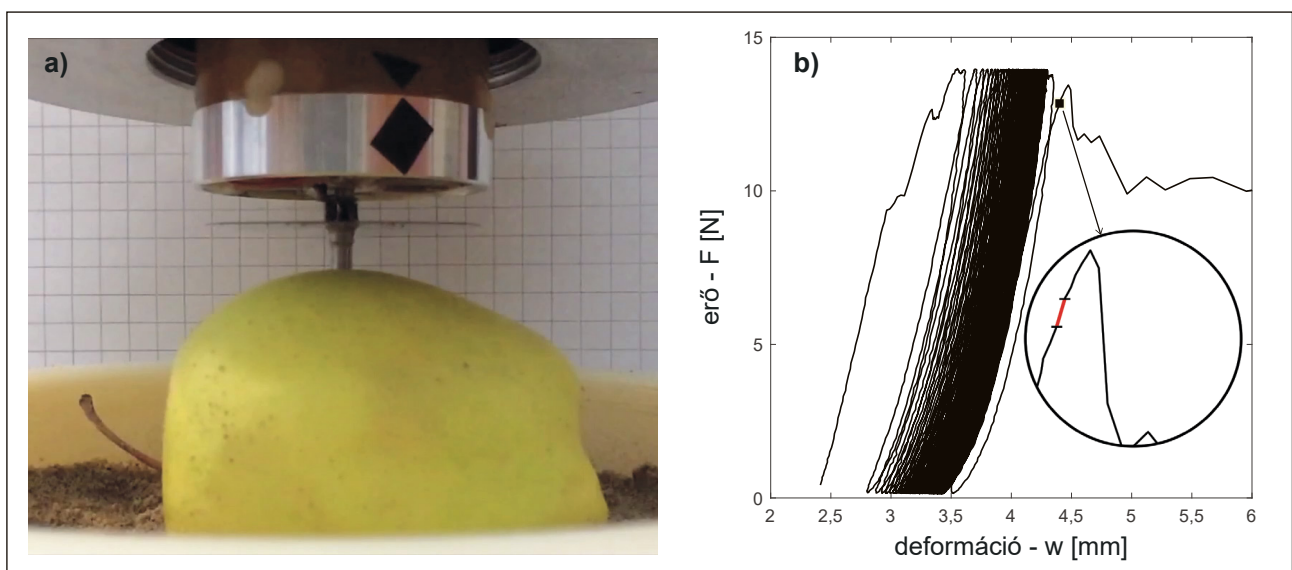
A kúszás jellemzéséhez (jelen esetben a β megadásához) a szakirodalom általában lineáris közelítést alkalmaz. Bár a kúszás jelentős szakaszához ez a közelítés a legtöbb esetben megfelelő lehet, a görbe kezdete és tönkremeneteli szakasza már nem linearizálható, így a módszer a teljes kúszási folyamatot tekintve pontatlanságokat hordoz. Ennek elkerülése érdekében az alakváltozást érintő adatkezelési folyamatokban olyan numerikus megoldásokat alkalmaztunk, amelyben a műveleteket nem közelítéssel, hanem az adatsorok közvetlen feldolgozásával végeztük.

Az **1. ábrán** látható görbék esetében a gyümölcsök tönkremeneteli határértékét – jelen esetben a töréspontot – már meghatároztuk, a diagramokról pedig az ezt követő adatokat eltávolítottuk. Az így kapott görbék elemzésével már ténylegesen a tönkremenetelig bekövetkező energiaviszonyokról, valamint az eddig tapasztalható anyagtulajdonságokról kapunk információkat.

Mivel a töréspont sok esetben – főleg a gyorsan lezajló terheléseknél, és az ezzel együtt meredeken változó alakváltozási folyamatoknál – nem vehető ki tisztán a diagramok elemzésénél, a pontos meghatározást nagy képkockasebességű videós megfigyeléssel végeztük (**2. ábra**). Az alkalmazott kamera másodpercenként 240 képkockát rögzített, a keresett töréspontot pedig a tönkremeneteli szakasz első képkockája jelenti, amikor a mérőcsap jól láthatóan kilép a kúszási fázis során lassan növekedő deformációs tartományból, és a héjat átszakítva egy kívülről is jól látható károsodást okoz a termény szövetében. Ilyenkor a héj és a gyümölcshús egyaránt károsodik, az anyagi viselkedést így nem egy homogén összetételű struktúra, hanem egy „szerkezet” modellezésével közelítettük.



1. ábra. Golden delicious alma deformációjának időfüggvénye (a) és erő-deformáció függvénye (b), valamint egy Packham körte deformációjának időfüggvénye (c) és erő-deformáció függvénye (d)



2. ábra. Töréspont meghatározása nagy képkockasebességű felvétel elemzésével

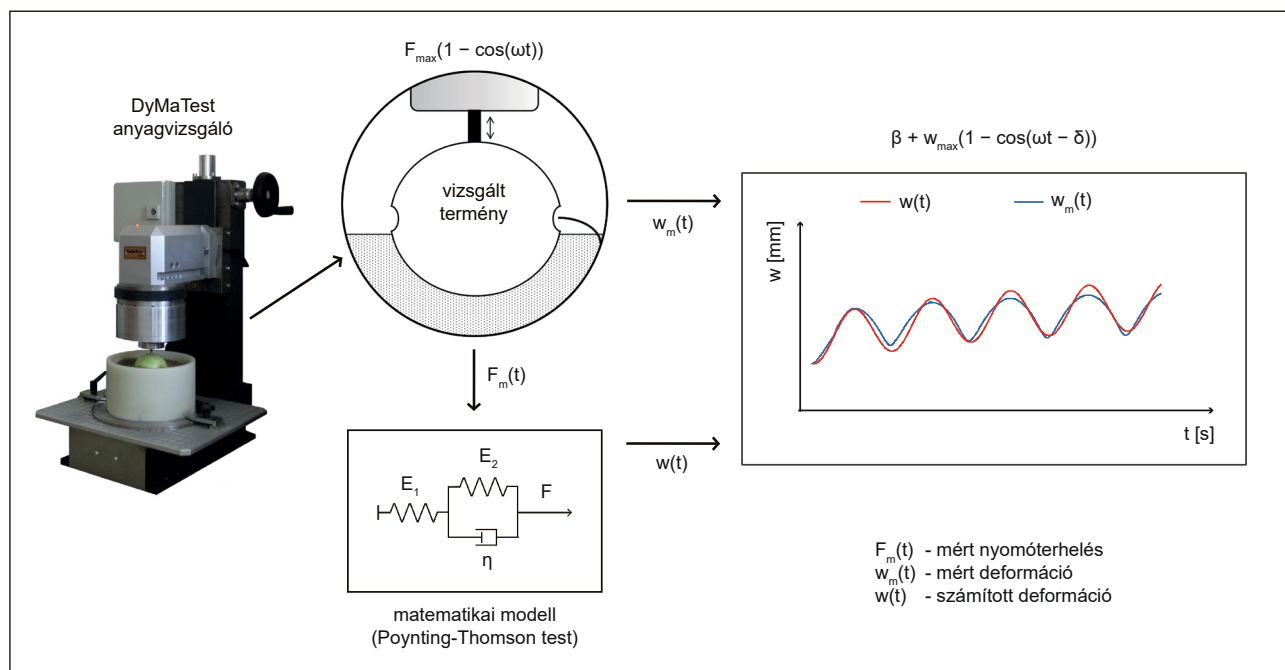
A DyMaTest mintavételi frekvenciája 2 kHz, ami 8,3-szor nagyobb, mint a töréspontból készített videófelvételek esetében. A képkockaelemzés abszolút hibája az anyagvizsgáló berendezéssel gyűjtött adatokhoz képest 4,16 milliszekundum – ami a kamera legkisebb felbontási egysége. A **2.b ábra** a töréspontban tartózkodó hibásávot szemlélteti. A töréspontot, mint vizsgálati paramétert a továbbiakban a *TTF* jelöléssel tüntetjük fel, ami a *time to failure* (azaz a sérülésig eltelt időtartam) kifejezésre utal.

3.3. Viszkoelasztikus anyagtulajdonságok

A gyümölcsök anyagtulajdonságainak a meghatározásához a háromelemes Poynting-Thomson modellt használtuk, amelyet almák esetében már korábbi kutatásokban is alkalmaztak. A modell kapcsolása a **3. ábrán** látható, ami az alábbi egyenlettel jellemezhető:

$$F_m + \frac{\eta}{E_1 + E_2} \dot{F}_m = \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} w_m + \frac{E_1 \eta}{E_1 + E_2} \dot{w}_m,$$

ahol E_1 és E_2 a mechanikai modell rugalmas komponensei [N mm^{-1}], η pedig a viszkózus elem [Ns mm^{-1}]. F_m a mérések során rögzített nyomóerő [N], w_m pedig a mérések során kapott deformáció [mm].



3. ábra. Számítógépes matematikai modell identifikációja

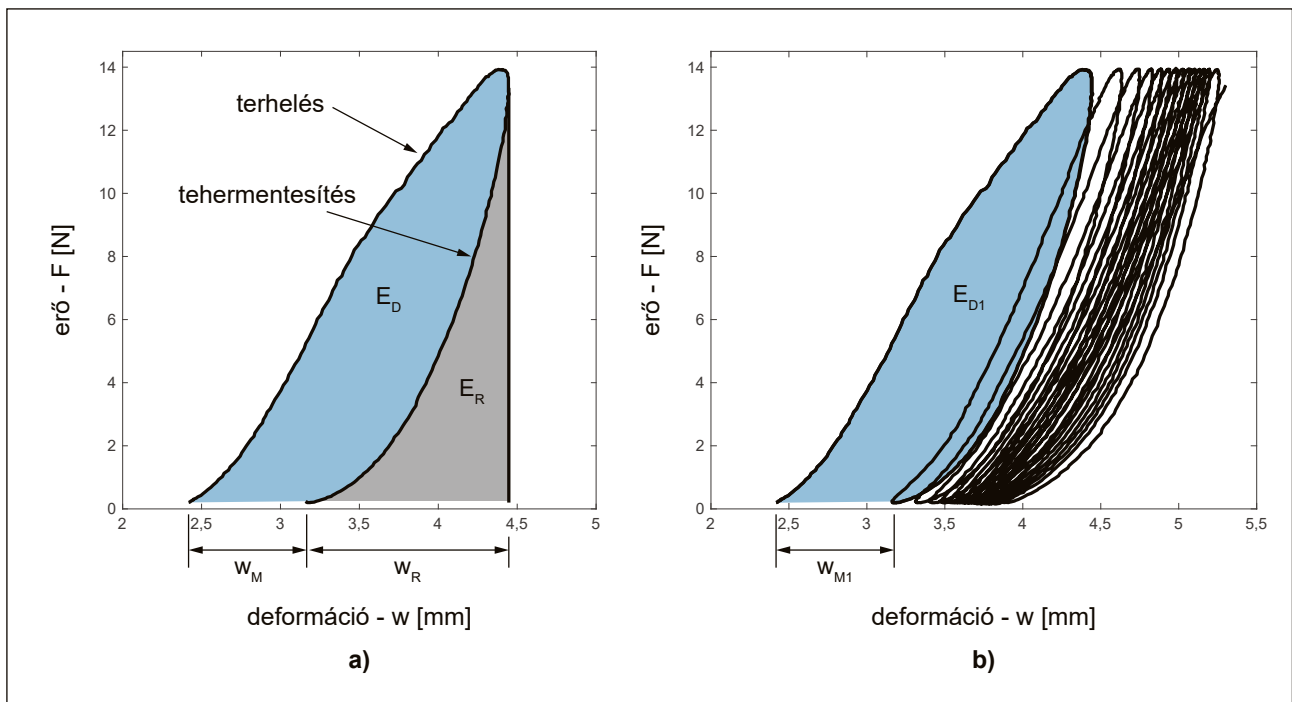
Az egyenlet blokkorientált felírását Matlab Simulink környezetben végeztük, ahol a modellt a mérések során kapott erő és deformáció adatokkal identifikáltuk (**3. ábra**). A rugalmas és viszkózus együtthatók értékeit annál a számított görbénél (w) határoztuk meg, ami a legjobban illeszkedik a mért eredményekre (w_m). A két adatsor közötti eltérés minimalizálásához olyan eljárást alkalmaztunk, amely a legkisebb négyzetek módszerén alapul:

$$\int_0^T (w_m(t) - w(t))^2 dt \rightarrow \min.$$

A minimumkeresési folyamat futtatása után az E_1 , E_2 és η modellegyütthatókat rögzítettük, és vizsgálati paraméterként felhasználtuk. A bemutatott matematikai rendszerrel végzett közelítések $R^2 = 0,967 - 0,998$ értékek között változtak.

3.4. A hiszterézis görbék elemzése

Az **1.b és 1.d**, valamint a **4. ábrán** látható erő-deformáció diagramokon olyan ismétlődő hiszterézis folyamatok figyelhetők meg, ahol a terhelési és tehermentesítési görbék által határolt terület szoros összefüggésben áll a termény adott ciklusra jellemző energiamutatóival. A vízszintes tengelyen látható, hogy a görbe a tehermentesítés után nem záródik, így az anyagban a következő nyomóterhelésig minden ciklusban egy w_M maradó alakváltozás keletkezik, az adott termény w_R rugalmas alakváltozása pedig a terhelési csúcspont és a maradó alakváltozás közötti különbségből adódik (a kettő összege így az alakváltozás teljes nagyságát adja az adott ciklusban).



4. ábra. Egy terhelési ciklus erő-deformáció görbéje (a), a termény erő-deformáció görbéje a tönkremenetelig egy Golden Delicious alma esetében (b)

Ha a görbék közötti területeket vizsgáljuk, a rugalmas alakváltozáshoz tartozó energiát (E_R) a teljes munkából (E) kivonva a ciklus disszipált energiáját kapjuk (E_D). Ez az energiavesztés a görbék közötti terület meghatározásával számítható:

$$E_D = \int_0^{t_{w_M}} F \frac{dw}{dt} dt,$$

ahol t_{w_M} a terhelési folyamat kezdete és a tehermentesítés vége között eltelt idő [s], F pedig a vizsgálóberendezéssel előállított terhelési függvény [N].

Mivel a területszámítást az erő- és deformáció-adatok idő szerinti numerikus integrálásával végeztük, a korábban említett közelítő függvények, és az ezekkel együtt járó pontatlanságok elkerülhetők.

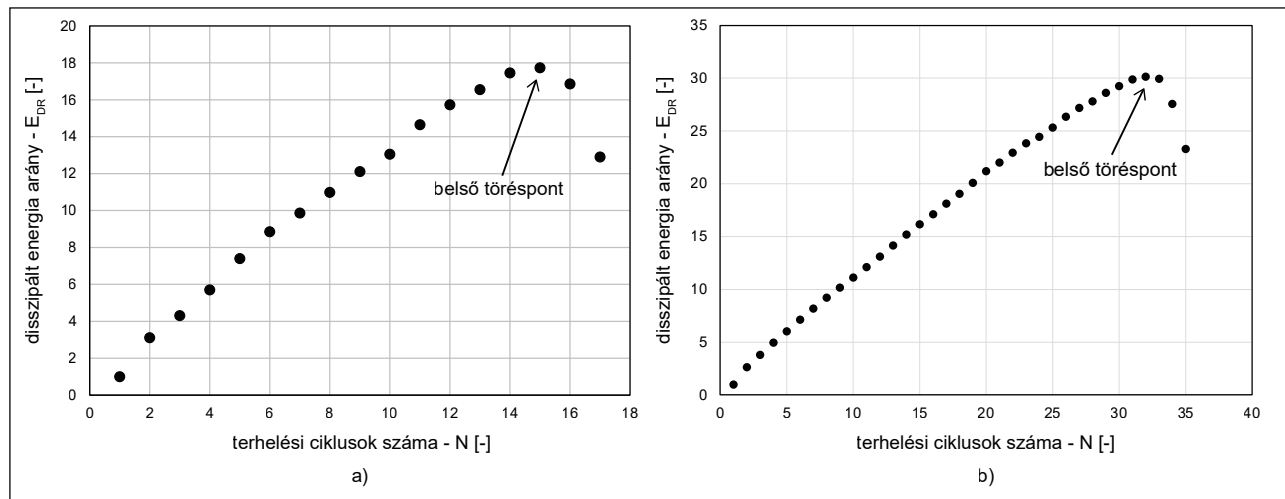
Bár az energiavesztések számítása több kutatásban hozzátartozik a sérülési mechanizmus leírásához, a hiszterézis görbéből meghatározható disszipált energiának csak egy része kötődik az anyag károsodásához és a tönkremeneteli folyamathoz [13]. Más szakterületeken, például az útburkolati aszfaltrétegek reológiai leírásánál olyan számítási módszereket is kidolgoztak, amelyek a disszipált-energia adatokat felhasználva közvetlenül mutatnak rá a tönkremenetel pillanatára. Ezek közé tartozik az ún. disszipált energia hányados, amely a következő összefüggéssel számítható [26]:

$$E_{DR} = \frac{\sum_{i=0}^n E_{Di}}{E_{Dn}},$$

ahol E_{Di} az adott ciklusig összegzett energiavesztés [N mm], E_{Dn} pedig az adott ciklus energiavesztése [N mm].

Amikor a disszipált energiahányadost a ciklusszám függvényében ábrázolják (**5. ábra**), akkor az két károsodási mutatóra is utalhat: az adott aszfalt repedésképződési folyamatának a kezdetét a görbe felfutási meredekségének 10%-os zuhanása jelzi, a csúcsponton látható törés pedig a kifáradásos tönkremenetelt [26].

A gyümölcsökön végrehajtott kísérleteink során az említett meredekség zuhanása a legtöbb esetben nem figyelhető meg ennyire egyértelműen, ami valószínűleg a gyors terhelési beállítások következménye. A belső töréspont viszont a saját eredményeinkben is egyértelműen megjelenik. Ezt az adatot a töréspontig eltelt idő és a viszkoelasztikus modellegyütthatók mellett szintén felhasználjuk a károsodási folyamatot leíró egyenletek felállításához.



5. ábra. A kifáradásra utaló belső töréspont a disszipált energiákból képzett hányados alapján egy Golden Delicious (a) és egy Packham (b) termény esetén

3.5. Vizsgálati paraméterek, terhelési beállítások

Célunk, hogy a sérülési folyamattal összefüggésben álló paraméterek felhasználásával a töréspontig eltelt időtartamot írjuk le (TTF), ami a kapott egyenletek függő változója lesz. A tönkremenetel jellemzésénél lineáris regressziós egyenletek felállítására törekszünk.

A nyomóterheléseket 25 db Golden Delicious almán és 25 db Packham körtén hajtottuk végre (a mérésorozat ismétlési száma terményenként tehát 25), minden gyümölcsön hat különböző mérési frekvenciát állítottunk be. Ezek a frekvenciák a szállítással foglalkozó kutatások legveszélyesebbnek ítélt tartományába, a főleg 10 Hz alatti sávba esnek, a műszerünk beállítási lehetőségeihez mérten ezek 2,5, 3,7, 5, 7,5, 10 és 11,6 Hz voltak. Így összesen 300 nyomóterhelés történt, a terhelések során kapott erő, deformáció- és időadatokról pedig a fent részletezett módszerekkel minden esetben meghatároztuk az anyagmodell E_1 , E_2 és η együtthatóit, a TTF tönkremeneteli időt, valamint az E_{DRmax} belső károsodási mutatót. Ezek mellett azt is figyelembe vettük, hogy a vizsgálati frekvenciák befolyásolják-e a folyamatot.

A Golden és Packham termények eltérő terhelési ellenállása miatt különböző nyomóerők beállítására volt szükség: a Packham körték esetében a vizsgált frekvenciatartomány bizonyos értékeinél már az első ciklusok némelyikében megtörtént a tönkremenetel, a Golden almák viszont sokkal ellenállóbbak voltak, ezért a későbbiekben részletezésre kerülő károsodási idők és disszipált energiaértékek összehasonlíthatóságát figyelembe véve a körtéket 4 N-nal, az almákat pedig 14 N-nal terheljük. A gyakorlatban ez azt jelenti, hogy a 4 N erőnél nagyobb beállításoknál – a vizsgált frekvenciaértékek többségénél – a körték anyagában azonnali roncsolódás jönne létre, 14 N alatt pedig nagyságrendekkel hosszabb terhelési folyamatot kéne futtatni az almák látható károsításához.

4. Eredmények

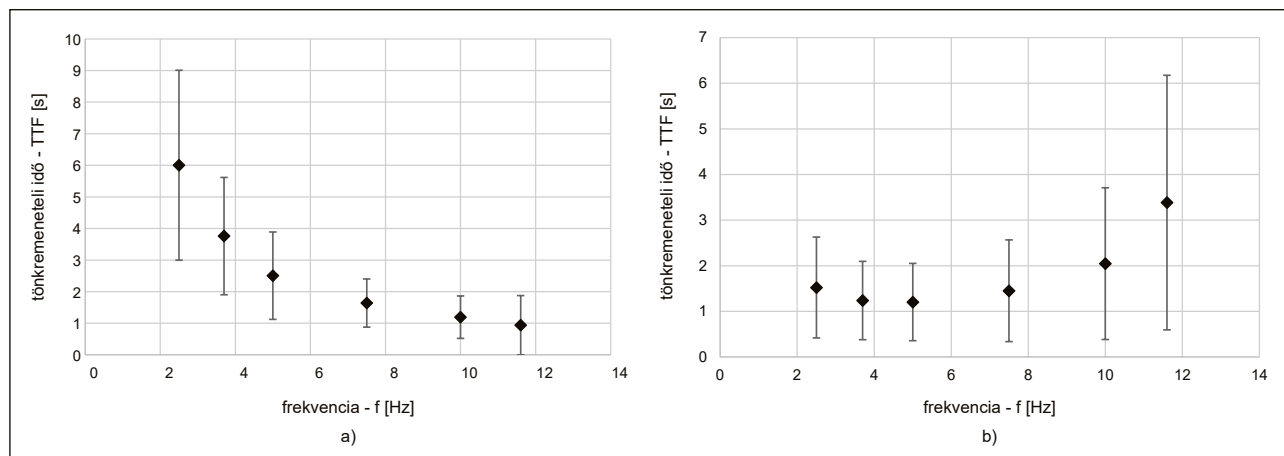
4.1. Tönkrementeli időtartamok és a belső károsodásra utaló energiamutatók

A töréspontig eltelt időtartamok egyes frekvenciabeállításokhoz tartozó átlag- és szórásértékeit az **1. táblázat** tartalmazza. A **6.a ábrán** a Golden almák átlagértékeiből készített grafikon látható, a Packham körték esetében pedig a **6.b ábrán** tekinthetők meg az ábrázolt eredmények. Az almák esetében a töréspont bekövetkezése a várakozásoknak megfelelően alakult, vagyis a nagyobb frekvenciákon hamarabb következett be a visszafordíthatatlan károsodás, a körtékénél kapott átlagértékek tekintetében ehhez képest viszont változás tapasztalható, ugyanis az 5 Hz feletti beállításoknál egy növekvő tendencia kezdődik a tönkrementeli idő tekintetében.

1. táblázat. A töréspontig eltelt időtartam átlagai és az eredmények szórása

frekvencia [Hz]	Golden		Packham	
	TTF [s]	szórás - s_{TTF} [s]	TTF [s]	szórás - s_{TTF} [s]
2,5	6,002	3,006	1,522	1,105
3,7	3,758	1,857	1,237	0,858
5	2,505	1,383	1,203	0,847
7,5	1,639	0,762	1,451	1,114
10	1,192	0,672	2,046	1,662
11,6	0,938	0,938	3,384	2,790

A Golden termények esetében az alacsonyabb frekvenciabeállításoknál nagyobb szórásmezőkkel találkozunk, a magasabb frekvenciákon viszont a hibasávok szélsőértékei már közelebb kerülnek az átlaghoz. A szórásmezők végpontjai a Golden almáknál még hasonló trendet mutatnak az átlag frekvenciafüggéséhez, a körték esetében azonban szórásmezők minimumértékei már nem reprezentálják az átlagértékek változását, a körtékénél tehát eltérőbb karakterisztikák tapasztalhatók a 25 mérés között.

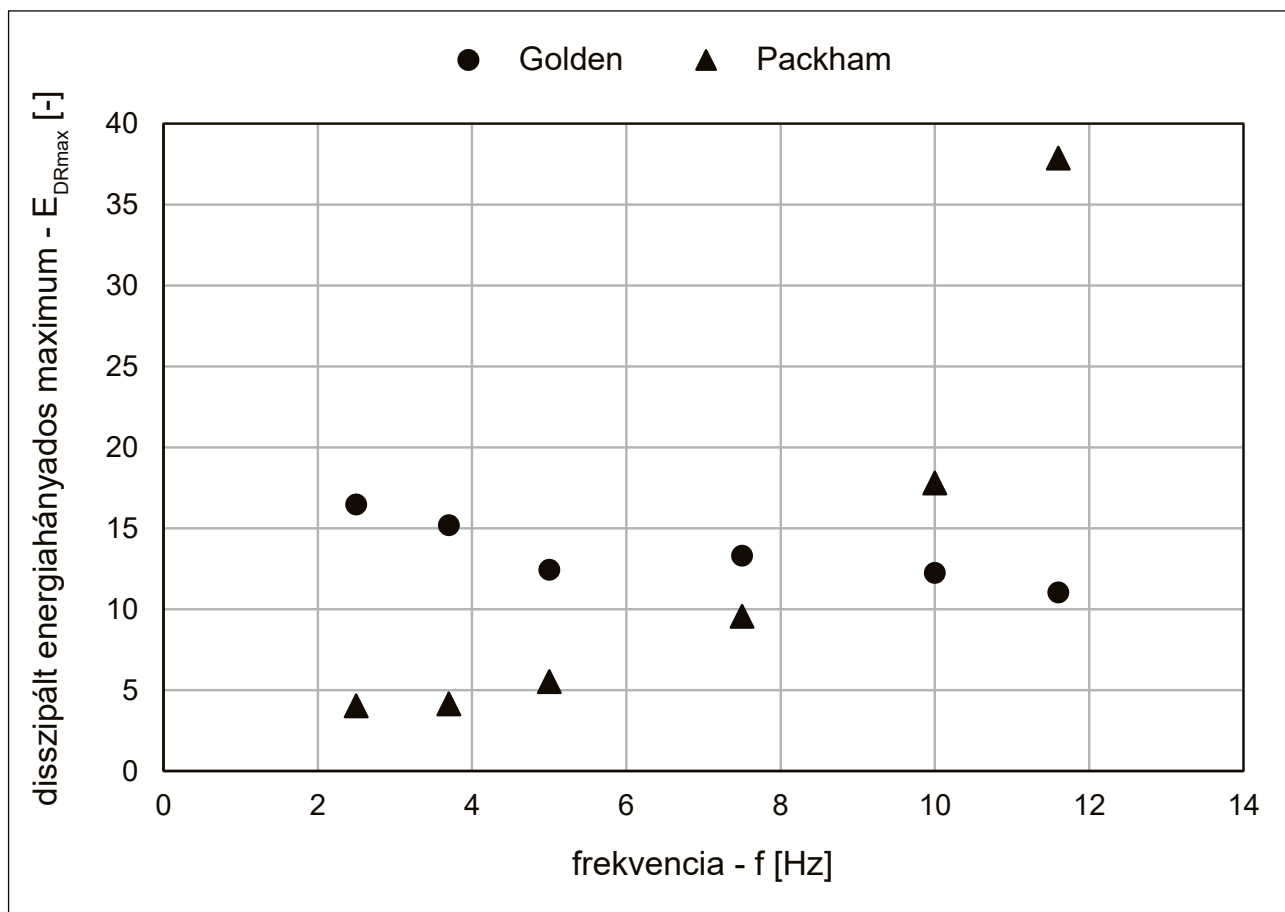


6. ábra. A töréspontig eltelt időtartamok frekvenciafüggése Golden Delicious almák (a) és Packham körték (b) esetében

Mivel a szórás az almák és körték esetében is elég jelentős (**1. táblázat**), a vizsgálatnál figyelembe vett további paraméterek (a viskoelasztikus modellegyütthatók, valamint az energiamutatók) szerepe kiemelten fontos, amikor a károsodási folyamatra gyakorolt hatásukat vesszük figyelembe a tönkrementeli idő leírása során.

A **7. ábra** a disszipált energiából számított energiaveszteségi hányados csúcserkéit mutatja, a 25-25 terményhez tartozó eredményeket szintén átlagoltuk az egyes frekvenciabeállításokhoz tartozóan.

A vizsgált Golden almák esetében a ciklusonként rögzített energiaveszteségi értékek, valamint a belső törésre utaló maximális hányadosértékek a magasabb frekvenciabeállítások felé haladva csökkenő tendencia szerint változnak, a körtékénél ez a folyamat viszont fordítottan jelenik meg. Ezzel együtt a frekvenciafüggést jellemző trend is más jelleget ölt.



7. ábra. A halmozódó disszipált energiák átlagértékeinek frekvenciafüggése

4.2. Viszkoelasztikus modellparaméterek kiértékelése

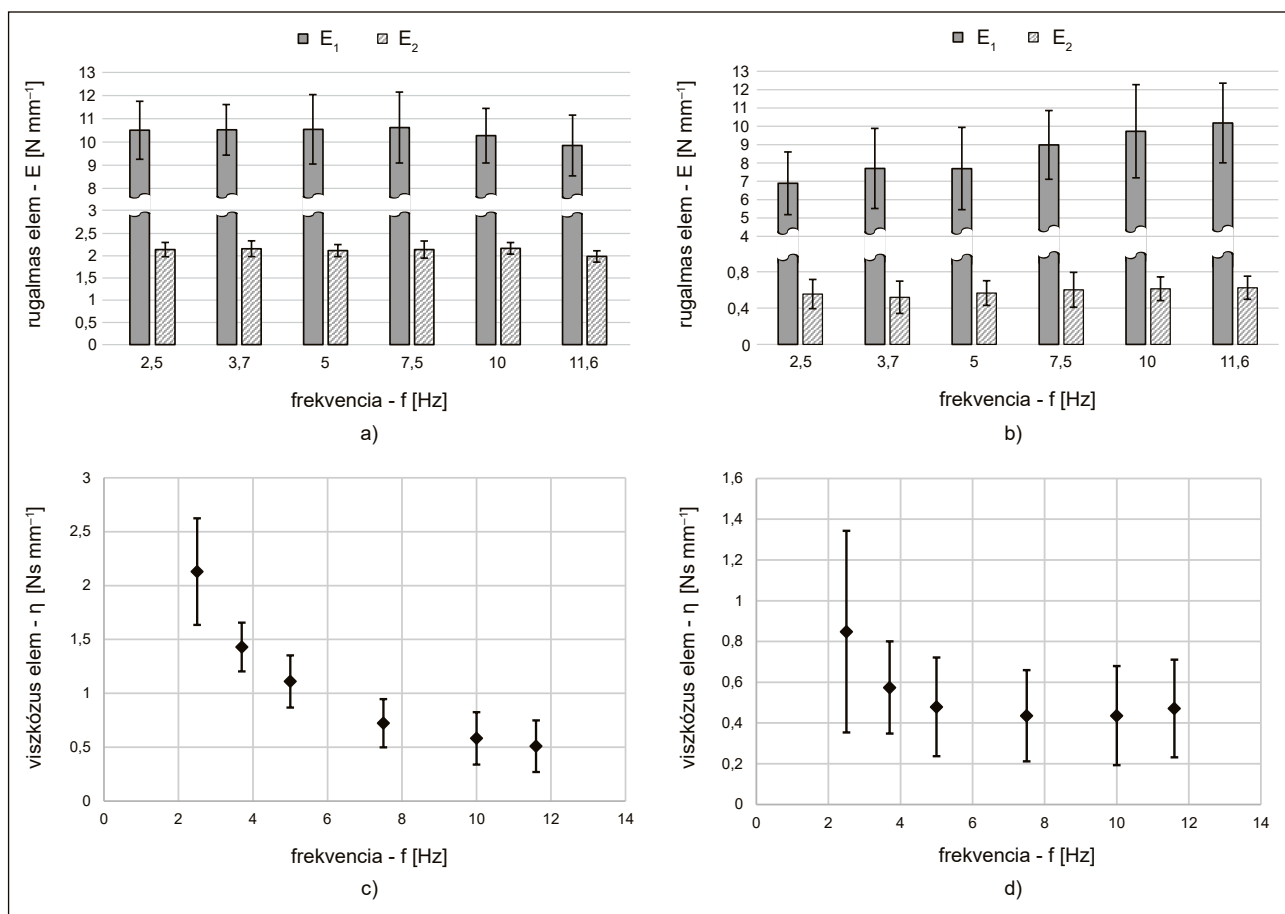
A termények rugalmas (E_1 , E_2) és viszkózus (η) anyagtulajdonságainak frekvenciafüggését a **8. ábra** mutatja be, ahol a méréssorozat értékeit az egyes frekvenciabeállításoknál átlagolva jelenítjük meg. A számszerű eredményeket a **2. táblázat** és a **3. táblázat** foglalja össze.

2. táblázat. Viszkoelasztikus modellparaméterek átlagértékei és szórások az egyes terhelési frekvenciákon Golden Delicious almák esetében

Golden						
f [Hz]	E_1 [N mm ⁻¹]	E_1 szórás [N mm ⁻¹]	E_2 [N mm ⁻¹]	E_2 szórás [N mm ⁻¹]	η [Ns mm ⁻¹]	η szórás [Ns mm ⁻¹]
2,5	10,504	1,250	2,139	0,277	2,129	0,703
3,7	10,523	1,091	2,158	0,277	1,429	0,358
5	10,546	1,497	2,116	0,292	1,109	0,251
7,5	10,622	1,529	2,139	0,269	0,722	0,204
10	10,271	1,177	2,167	0,206	0,581	0,154
11,6	9,848	1,310	1,984	0,361	0,509	0,106

3. táblázat. Viszkoelasztikus modellparaméterek átlagértékei és szórások az egyes terhelési frekvenciákon Packham körték esetében

Packham						
f [Hz]	E_1 [N mm ⁻¹]	E_1 szórás [N mm ⁻¹]	E_2 [N mm ⁻¹]	E_2 szórás [N mm ⁻¹]	η [Ns mm ⁻¹]	η szórás [Ns mm ⁻¹]
2,5	6,896	1,710	0,554	0,160	0,848	0,494
3,7	7,705	2,184	0,518	0,177	0,574	0,226
5	7,695	2,243	0,565	0,135	0,479	0,242
7,5	8,981	1,873	0,600	0,192	0,435	0,223
10	9,730	2,540	0,613	0,130	0,436	0,243
11,6	10,178	2,172	0,623	0,127	0,471	0,239



8. ábra. Rugalmas és viszkozus modellparaméterek átlagai Golden almák (a, c) és Packham körték (b, d) esetében

A rugalmas együtthatók a Golden almák esetében nem mutatnak szembeűnő frekvenciafüggést, az E_1 paraméterek esetében enyhe csökkenés fedezhető fel, amikor magasabb vizsgálati frekvenciákat használunk. Korábbi kísérletekben a nagyobb sebességű terhelés során az almák általában merevebben viselkednek [25]: ha a nagyobb terhelési sebességnek jelen esetben a nagyobb frekvencia felel meg, akkor ez a reakció egybevág a régebbi tapasztalatokkal.

A körték esetében azonban egyértelmű a növekedés, amikor az E_1 komponenst vizsgáljuk, ez az eredmény pedig magyarázatot adhat a tönkremeneteli időtartamok esetében kapott adatokra: a vizsgált körtéknél az 5 Hz feletti frekvenciákon egy rugalmasabb, puhább felület keletkezik a terhelési zóna közelében, a megnövekedett rugalmasság pedig kedvezőbb mechanikai ellenállást biztosít a termények számára. A legveszélyesebb frekvenciatartományban így nem feltétlenül a magasabb értékek hordozzák a legjelentősebb károsodási potenciált. Az E_2 rugalmas együttható a vizsgált tartományban a Golden és Packham termények esetében is állandó.

A viszkózus paramétereket ábrázolva a Golden és a Packham terményeknél is egyértelmű frekvenciafüggést kaptunk. Az almáknál kapott görbe hasonlóságot mutat egy korábbi kutatásban prezentált dinamikus viszkózus tényező frekvenciafüggéséhez [27], a körtéknél pedig szintén az 5 Hz körüli frekvencia töri meg az addigi csökkenő tendenciát – ez szintén összefüggésben állhat a tönkrementeli időtartamok frekvenciagörbéjénél tapasztalt törésponttal.

A szórásokat megjelenítő hibasávok a körték esetében nagyobbak, az adatokat a 2,5 Hz-es beállításánál rögzítettük a legszélesebb szórástartományban. Ennek egyik oka, hogy ennél a beállításnál több körte már az első ciklus első felterhelési szakaszában azonnal tönkrement.

4. táblázat. Viszkoelasztikus modellparaméterek varianciaanalízise

Golden			Packham		
Együttható	F	p	Együttható	F	p
E_1	1,196	0,314	E_1	8,008	<0,001
E_2	1,408	0,225	E_2	1,488	0,198
η	75,393	<0,001	η	6,427	<0,001

A frekvenciafüggés mértékét varianciaanalízis (ANOVA - Analysis of Variance) segítségével ellenőriztük, az eredményeket a 4. táblázat foglalja össze. A Golden almák esetében kizárólag az η együtthatónál fedezhető fel szignifikáns összefüggés ($p < 0,05$), ez pedig megerősíti a diagramok alapján levonható következtetést, amit az E_1 és E_2 együtthatók esetében tettünk: a rugalmas elemek és a frekvencia a vizsgált tartományban nem állnak kimutatható összefüggésben. A Packham körték esetében viszont az η mellett az E_1 rugalmas együttható frekvenciafüggése is kimutatható, ami jelentős szerepet játszik az 5 Hz felett tapasztalt mechanikai ellenállásban.

4.3. Lineáris tönkrementeli modellek

A bemutatott vizsgálatok eredményeit, valamint a terhelési frekvenciák értékeit felhasználva a Golden Delicious almák esetében négy különböző tönkrementeli modell lehetősége vetődik fel, a következő keresőfüggvény szerint:

$$TTF = A + B\eta + CE_{DRmax} + Df + KE_1 + JE_2,$$

ahol A, B, C, D, K és E konstansok. Az egyes változatokat az 5. táblázat ismerteti. Ezek között a termények rugalmas és viszkózus anyagtulajdonságai, valamint a disszipált energia csúcserőértéke is rendre megjelenik, a frekvenciabeállítások azonban nem.

5. táblázat. A mért paraméterekből létrehozható lineáris modellek Golden almák esetében

Modell	R	R ²	Módosított R ²	A becslés standard hibája	R ² változása	F változása	F szignifikanciájának változása
1	0,902(a)	0,814	0,812	1,03413	0,814	641,502	0,000
2	0,963(b)	0,927	0,926	0,64922	0,113	226,984	0,000
3	0,971(c)	0,943	0,941	0,57824	0,015	39,039	0,000
4	0,972(d)	0,945	0,943	0,56840	0,002	6,064	0,015

(a) változók: η

(b) változók: η, E_{DRmax}

(c) változók: η, E_{DRmax}, E_1

(d) változók: $\eta, E_{DRmax}, E_1, E_2$

A modellparamétereket bemutató görbéken, valamint a varianciaanalízis nyomán az elasztikus együtthatók nem álltak szignifikáns összefüggésben a frekvenciával, a Golden almák rugalmassága azonban egyértelmű hatást gyakorol a tönkrementeli folyamatra, kimutatható növekedést eredményezve. Míg az E_1 rugalmas együttható meghatározó része az egyenletnek, az E_2 csupán elhanyagolható mértékben ad hozzá az illeszkedés pontosságához, ezért a Golden almák tönkrementelének legegyszerűbb leírásához a harmadik egyenletet választottuk:

$$TTF = 0,533 + 2,736\eta + 0,141E_{DRmax} - 0,261E_1$$

A Packham körtékre alkalmazható modelleket a **6. táblázat** foglalja össze. Ezekben a változatokban már a terhelési frekvencia is megjelenik, ami ezúttal fontos szerepet játszik a tönkremeneteli idő leírásában.

6. táblázat. A mért paramétereiből létrehozható lineáris modellek Packham körték esetében

Modell	R	R ²	Módosított R ²	A becslés standard hibája	R ² változása	F változása	F szignifikanciájának változása
1	0,886(a)	0,785	0,783	0,66044	0,785	488,514	0,000
2	0,933(b)	0,871	0,869	0,51404	0,086	88,193	0,000
3	0,946(c)	0,896	0,893	0,46299	0,025	31,948	0,000
4	0,959(d)	0,920	0,917	0,40765	0,024	39,273	0,000

(a) változók: E_{DRmax}
 (b) változók: E_{DRmax}, η

(c) változók: E_{DRmax}, η, f
 (d) változók: E_{DRmax}, η, f, E_2

Bár az E_1 paraméter a frekvenciával összefüggésbe került, a tönkremenetelt mégsem ez az együttható befolyásolja, hanem a viszkózus komponenssel párhuzamosan kapcsolt E_2 . Mivel a frekvencia, valamint az E_2 rugalmas tényező jelentősen hozzájárul a lineáris közelítés pontosságához, így a Packham körték esetében a negyedik egyenletet írjuk fel:

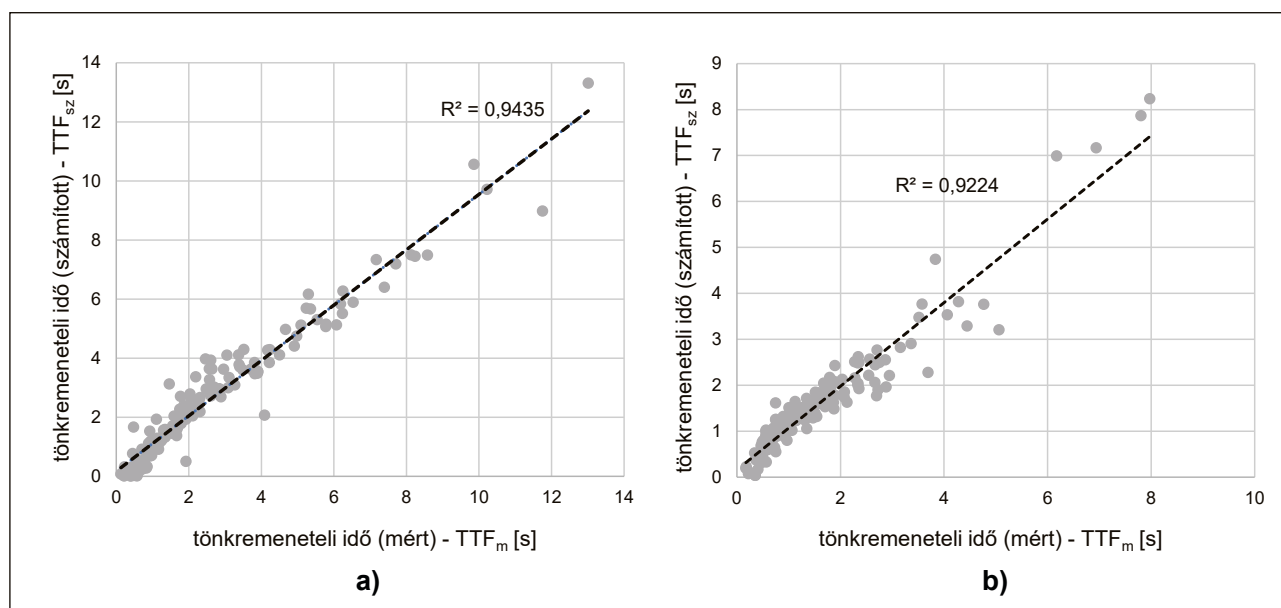
$$TTF = 0,091 + 0,788\eta + 0,085E_{DRmax} - 0,103f + 1,524E_2.$$

Az egyenletek érvényességét ellenőrző varianciaanalízis eredményeit a **7. táblázat** tartalmazza. Mivel a kapott F értékek szignifikánsnak minősülnek ($p < 0,05$), a felírt közelítések érvényesek.

7. táblázat. Közelítő egyenletek varianciaanalízise

Golden		Packham	
F	p	F	p
792,307	<0,001	375,742	<0,001

A létrehozott modellek behelyettesítés utáni törésponti eredményeit (TTF_{sz}), valamint a mért eredmények (TTF_m) kapcsolatát a **9. ábra** mutatja be a teljes vizsgálati tartományban. A Golden Delicious almáknál alkalmazott közelítés frekvenciánként átlagolt eredményei az 1,54% és 3,85% relatív hiba közé esnek, a terményenként átlagolt eredmények pedig 1,01% és 31,13% között alakulnak. A Packham körtéknél az egyes frekvenciabeállításoknál kapott eredményeket átlagolva a relatív hibák 2,42 és 6,22% közé esnek, a terményegyenként számított értékek eltérései pedig 0,04% és 34,51% között alakulnak a mért tönkremeneteli időtartammal összehasonlítva. A jelentősebb hibaértékek nem az adott frekvenciabeállításokhoz, hanem az egyes termények eltérő mechanikai ellenállóképességéhez és anyagtulajdonságaihoz kötődnek.



9. ábra. Mért és számított tönkremeneteli időtartamok kapcsolata Golden Delicious almák (a) és Packham körték (b) esetében az összes mérési eredményt kiértékelve

5. Következtetések

Az ismétlődő terhelés a gyümölcsök feldolgozási és szállítási folyamataiban jelentős mértékű károsodást okoz, munkánkban ezért a kifáradás okozta tönkremenetelt vizsgáltuk, ennek érdekében pedig olyan többváltozós lineáris regressziós modelleket dolgoztunk ki, amelyek a tönkremeneteli folyamathoz kötődő legfontosabb anyagtulajdonságokra és energiamutatókra utaló paraméterekre támaszkodnak, és amelyek a vizsgált almástermésűek (Golden Delicious almák és Packham körték) sérülési ellenállására adnak előrejelzést.

A tönkremenetelt jelző töréspont bizonyos esetekben nem értékelhető ki a mérések során kapott deformációs adatokból, ilyenkor a gyorsfilmezéssel és képkocka-elemzéssel megállapított határérték nyújthat segítséget a vizsgálatok során. Ennek pontossága az alkalmazott kamerák képkockafrissítésén múlik, ez pedig a képfelbontással együtt a mobileszközökben is folyamatosan fejlődik, így ezek az eszközök a hasonló jellegű mérés technikai feladatokhoz is alkalmassá válnak. Használatuk a gyümölcsök alakváltozásának figyelésében már napjainkban sem példa nélküli.

Az energiaszámításokon alapuló belső károsodás megfigyelése új kutatási irányokat jelenthet a gyümölcssérülések vizsgálatában, hiszen a feldolgozási folyamatokban fellépő környezeti hatásokat ennek függvényében kell kezelni (megfogási, ejtési és rezgési határértékek korlátozása vagy módosítása). A jelenség pontos definiálása azonban a sejtszerkezetben létrejövő károsodási folyamat részletesebb leírása érdekében még mikroszintű vizsgálatra és megerősítésre vár.

6. Köszönetnyilvánítás

A DyMaTest anyagvizsgáló berendezés biztosítása miatt a szerzők köszönetüket fejezik a NAIK Mezőgazdasági Gépesítési Intézet felé. Köszönjük továbbá Dr. Földi Lászlónak a számítógépes modellezésben, valamint Dr. Székely Lászlónak a többváltozós egyenletek felállításában nyújtott segítségét.

7. Irodalom

- [1] Che, W., Sun, L., Zhang, Q., Tan, W., Ye, D., Zhang, D., Liu, Y. (2018): Pixel based bruise region extraction of apple using Vis-NIR hyperspectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture* 146, pp. 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.01.013>
- [2] Tan, W., Sun, L., Yang, F., Che, W., Ye, D., Zhang, D., Zou, B. (2018): Study on bruising degree classification of apples using hyperspectral imaging and GS-SVM. *Optik* 154, pp. 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.10.090>
- [3] Gergely, Z., Beke, J. (2015): Az osztályozási hibák csökkentésének lehetőségei a HPV-I sorozatú paprikaválogató gépeken, *Mezőgazdasági Technika* 2015/11, pp. 2-4.
- [4] Malik, M., Zhang, T., Li, H., Zhang, M., Shabbir, S., Saeed, A. (2018): Mature Tomato Fruit Detection Algorithm Based on improved HSV and Watershed Algorithm. *IFAC-PapersOnLine* 51 (17) pp. 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2018.08.183>
- [5] FAO, (2011): Global Food Losses and Waste. Extent, Causes and Prevention. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf> (Hozzáférés / Aquired: 12.08.2020)
- [6] NRDC, (2012): Wasted: How America is losing up to 40 percent of its food from farm to fork. NRDC Issue PAPER. <https://www.nrdc.org/sites/default/files/wasted-food-IP.pdf> (Hozzáférés / Aquired: 12.08.2020)
- [7] Yahia, E. M., Fonseca, J. M., Kitinoja, L. (2019): Postharvest Losses and Waste. p. 43. In: Yahia, E. M, Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00002-X>
- [8] Morrow, C., Mohsenin, N. (1966): Consideration of Selected Agricultural Products as Viscoelastic Materials. *Journal of Food Science* 31 (5) pp. 686-698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb01925.x>
- [9] Tscheuschner, H., Doan, D. (1988): Modelling of mechanical properties of apple flesh under compressive load. *Journal of Food Engineering* 8 (3) pp. 173-186. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(88\)90052-0](https://doi.org/10.1016/0260-8774(88)90052-0)
- [10] Fenyvesi, L. (2004): Mezőgazdasági termények sérülésvizsgálata. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [11] Szendrő, P. (2000): Mezőgazdasági Gépszerkezettan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- [12] Kim, J., Roque, R., Birgisson, B. (2006): Interpreting Dissipated Energy from Complex Modulus Data. *Road Materials and Pavement Design* 7 (2) pp. 223-245. <https://doi.org/10.1080/14680629.2006.9690034>

- [13] Ghuzlan, K., Carpenter, S. (2000): Energy-Derived, Damage-Based Failure Criterion for Fatigue Testing. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board* 1723 (1) pp. 141-149. <https://doi.org/10.3141/1723-18>
- [14] Lee, J., Tan, J., Waluyo, S. (2016): Hysteresis characteristics and relationships with the viscoelastic parameters of apples. *Engineering in Agriculture, Environment and Food* 9 (1) pp. 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2015.09.005>
- [15] Mohsenin, N. (1986): *Physical properties of plant and animal materials*. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- [16] Sitkei, Gy. (1981): *A mezőgazdasági anyagok mechanikája*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [17] Li, Z., Miao, F., Andrews, J. (2017): Mechanical Models of Compression and Impact on Fresh Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (6) pp. 1296-1312. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12296>
- [18] Fischer, D., Craig, W. L., Watada, A. E., Douglas, W., Ashby, B. H. (1992): Simulated In-Transit Vibration Damage to Packaged Fresh Market Grapes and Strawberries. *Applied Engineering in Agriculture* 8 (3) pp. 363-366. <https://doi.org/10.13031/2013.26078>
- [19] Hinsch, R. T., Slaughter, D. C., Craig, W. L., Thompson, J. F. (1993): Vibration of Fresh Fruits and Vegetables During Refrigerated Truck Transport. *Transactions of the ASAE* 36 (4) pp. 1039-1042. <https://doi.org/10.13031/2013.28431>
- [20] Vursavuş, K., Özgüven, F. (2004): Determining the Effects of Vibration Parameters and Packaging Method on Mechanical Damage in Golden Delicious Apples. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry* 28 (5) pp. 311-320.
- [21] Oveisi, Z., Minaei, S., Rafiee, S., Eyvani, A., Borghei, A. (2012): Application of vibration response technique for the firmness evaluation of pear fruit during storage. *Journal of Food Science and Technology* 51 (11) pp. 3261-3268. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0811-z>
- [22] Vursavus K., Kesilmis Z., Oztekin B. (2017): Nondestructive dropped fruit impact test for assessing tomato firmness. *Chemical Engineering Transactions* 58, pp. 325-330.
- [23] Petróczki, K., Fenyvesi, L. (2014): Improvement of compressive testing instrument with wide range of speed for examining agricultural materials. *Computers and Electronics in Agriculture* 101, pp. 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.12.003>
- [24] Pillinger, G., Géczy, A., Hudoba, Z., Kiss, P. (2018): Determination of soil density by cone index data. *Journal of Terramechanics* 77, pp. 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.jterra.2018.03.003>
- [25] Fenyvesi, L. (2004): *Mezőgazdasági termények sérülésvizsgálata*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [26] Delgadillo, R., Bahia, H. (2005): Rational fatigue limits for asphalt binders derived from pavement analysis. *Asphalt paving thechnology: Journal of the association of asphalt paving technologists* 74, pp. 1-42.
- [27] Van Zeebroeck, M., Dintwa, E., Tijskens, E., Deli, V., Loodts, J., De Baerdemaeker, J., Ramon, H. (2004): Determining tangential contact force model parameters for viscoelastic materials (apples) using a rheometer. *Postharvest Biology and Technology* 33 (2) pp. 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.008>

Comparison of the mechanical fatigue indices of Golden Delicious apples and Packham pears

Keywords: fruit damage, TTF (time to failure), rheological testing of fruits, viscoelastic models, time-dependent deformation, loading and unloading curves, dissipated energy, biological yield point, biological rupture point, damage limit value, damage resistance, creep curve, deformation

1. SUMMARY

One of the most significant phenomena in the processing of horticultural crops, leading to the damaging of the fruit, is fatigue due to repeated mechanical stress, which endangers the integrity of the produce, especially during transport. In the event of such damages, the immediate environment of the damaged fruit, or even the entire batch of crops may be in danger, as the biological processes leading to spoilage are not limited to the individual crop damaged. In the case of repeated effects, a force less than the static limit value is sufficient to cause spoilage, but in addition to the load, the material properties of the given crop, as well as the energy balance observed during damage play important roles in determining the mechanical resistance. Accordingly, in our work, a description of the spoilage process is built on the material models most characteristic of the selected crops, on the dissipated energy indicators measured during repeated loads, and on the definition and determination of the spoilage time. In the experiments, the fatigue indices of Golden Delicious apples, making up most of the apple production of the European Union, and of long shelflife Packham pears are compared by setting up linear regression models.

¹ Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Process Engineering, Gödöllő (Since 01. February 2021: Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Technology)

² Szent István University, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Machinery and Informatics, Gödöllő (Since 01. February 2021: Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Technology)

2. Introduction

When sorting produce, not only the size and shape, but also the extent of a possible damage or, in many cases, the fact of the damage itself is the basis for the selection. Automated machine recognition, which in most cases is performed by spectral imaging methods, today can effectively separate damaged crop tissues from healthy ones and finding damages under the surface which are not visible to the naked eye does not pose a problem to the technology either [1, 2]. Reliability depends on the hardware design (i.e., the accuracy of the equipment used) on the one hand, and on the algorithms used [3]. In addition to sorting, the method also uses camera monitoring, which can take into account the ripeness of tomatoes with the help of the appropriate software, and which allows the fully automated operation of the harvesting robots [4].

Although with effective detection the damaged crops can be easily removed from the processing chain, in addition to screening, the objective of getting as many healthy goods as possible to customers after the harvest, and the necessary treatment processes must also be kept in mind. Since international surveys show that a significant proportion of crops does not reach consumers in the market due to losses at different stages of processing [5, 6, 7], in addition to the precise detection of injuries, prevention must also play a key role. This also requires destructive testing of the crops and the direct observation of spoilage processes.

The material properties of various agricultural and horticultural crops can be described using viscoelastic models, consisting partly of elastic and partly of viscous components. Complex material structures can also be built from basic elements connected in a serial or parallel way, and of the three-element systems, the Poynting-Thomson model has been used several times in previous research to characterize Maloideae [8, 9, 10]. In the case of viscoelastic systems, deformation due to mechanical interactions depends not only on the magnitude of the stress, but also on the speed of the load, and creep and relaxation are an important part of the load and deformation process: while in the case of the former, a constant load results in increasing deformation, in the case of the latter phenomenon, a constant deformation results in a continuous decrease in stress [11].

The reaction of a given crop to a mechanical impact is shown on the load-deformation curve which, in addition to the creep and relaxation parameters, provides information on the total amount of energy generated in the load process: the area enclosed by the load and unload curves also serves as the basis for dissipated energy calculations in other fields [12, 13], and it is closely related to the viscoelastic properties of the test material and, in the case of crops, to the mechanical resistance and the susceptibility to damages [14].

The load limit that leads to microscopic damage to the cell structure, which can also cause crop spoilage, is called the biological yield point. Although as biological materials, different crops may be capable of healing or even complete regeneration, mechanical impacts applied during processing should be kept below the biological yield point. The limit value can also be indicated by a damage visible to the naked eye and affecting a larger area, which is called the rupture point in the literature. In the case of such damages, the crop is very likely to spoil [15, 16]. There is usually a significant variance between damage limits (even in the case of the same exact load), which is also affected by the ripeness of the given crop, as well as the conditions provided during storage and processing.

In additions to collisions resulting from improper handling, most damages are caused by vibrations during transport. Unfortunately, the observation of processes that end in damages by destructive tests is not an area that today's research focuses on, although the mapping of fatigue due to repeated loads is also essential in fruits [17].

During transport simulations, the frequencies causing the greatest damage have already been unanimously identified [18, 19, 20], so in the case of destructive tests with repeated loads, experience shows that it is advisable to set the frequency range below 10 Hz.

Multivariate regression models that take into account different test parameters are often used to describe the mechanical properties of fruits and vegetables [21, 22]. The objective of our research was to study the less discussed phenomenon of fatigue in crops, and to determine the relationship between damage limit values (biological yield point or rupture point) and related factors (energy balance, material properties). The goal was to establish a linear equation for the damage limit value, which is determined by considering the parameters that can be measured during repetitive compressive load.

3. Materials and methods

3.1. Measuring instrument and the securing of the fruits

Destructive tests were performed with the instrument called DyMaTest, provided by the Hungarian Institute of Agricultural Engineering of NAIK. The instrument applies a load to the fruit with a cylindrical (flat-faced) pressure pin, and the pressure force can be adjusted arbitrarily using the software interface developed for the instrument [23]. The deformation of the crop can be registered with a laser sensor that detects the movement of the measuring pin, and the force can be registered with a special measuring cell designed for the instrument. Tests were performed after setting a sinusoidal pressure force up to the fruit failure limit.

To perform the measurements, the crops were secured in a sand bed. To check that the creep of the sand applied did not affect the results obtained, control measurements were performed using a completely inelastic bearing ball with a diameter of 32 mm. During the compressive loads, there was no detectable displacement in the measuring range of the photoelectric sensor, so the deformation of the sand does not appear on the load curves of the fruits at all. Prior to testing, sand preparation consisted of wetting, sieving and compaction operations [24].

3.2. Crop deformation curves

For the tests with repetitive loads, a cyclic waveform was used, which can be characterized by the following function:

$$F_m = F_{max} (1 - \cos(\omega t)),$$

where F_{max} is the peak value of the periodic load function [N] and ω is the angular velocity of the load [s^{-1}].

The resulting deformation due to periodic loading is also periodic. **Figure 1.a** shows the time function of the deformation of a Golden apple, while **Figure 3.b** shows the force–deformation curve. Typical deformation curves for Packham pears are shown in **Figures 3.c** and **3.d**.

As a result of the cyclic load with a constant amplitude, the deformation changes continuously, and this can be noticed in the increase of the envelope (or the mean). Since these envelopes increase similarly to the creep curves observed under static loading, this process is called dynamic creep [25].

The response function to the cyclic load can be described by the following equation:

$$w_m = \beta + w_{max} (1 - \cos(\omega t - \delta)),$$

where w is the deformation [mm], β is the creep term, w_{max} is the peak value of the periodic deformation function [mm], ω is the angular velocity [s^{-1}], and δ is the phase shift between the load and deformation time functions.

To characterize creep (in this case, to give), the literature generally uses a linear approximation. Although this approximation may be appropriate for a significant region of the creep in most cases, the initial and failure sections of the curve cannot be linearized, so the method carries inaccuracies when considering the entire creep process. In order to avoid this, numerical solutions were used in the data management processes related to deformation, in which the operations were performed not by approximation, but by direct processing of the data series.

In the case of the curves shown in **Figure 1**, the damage limit of the fruits, in this case the rupture point, has already been determined, and the data after this point have been removed from the diagrams. By analyzing the curves obtained this way, we can actually obtain information about the energy conditions taking place until failure, as well as about the material properties experienced this far.

Since the rupture point cannot be distinguished clearly during the analysis of the diagrams in many cases, especially in the case of loads that take place rapidly and the concomitant sharply changing deformation processes, accurate determination was therefore performed by high frame rate video surveillance (**Figure 2**). The camera used recorded 240 frames per second, and the rupture point sought was the first frame of the failure phase, when the pressure pin visibly exits the slowly increasing deformation range during the creep phase and causes damage to the crop tissue that is visible from the outside by breaking the skin. In this case, both the skin and the flesh are damaged, so the material behavior is approximated by the modeling of not a structure with a homogeneous composition, but of a „structure”.

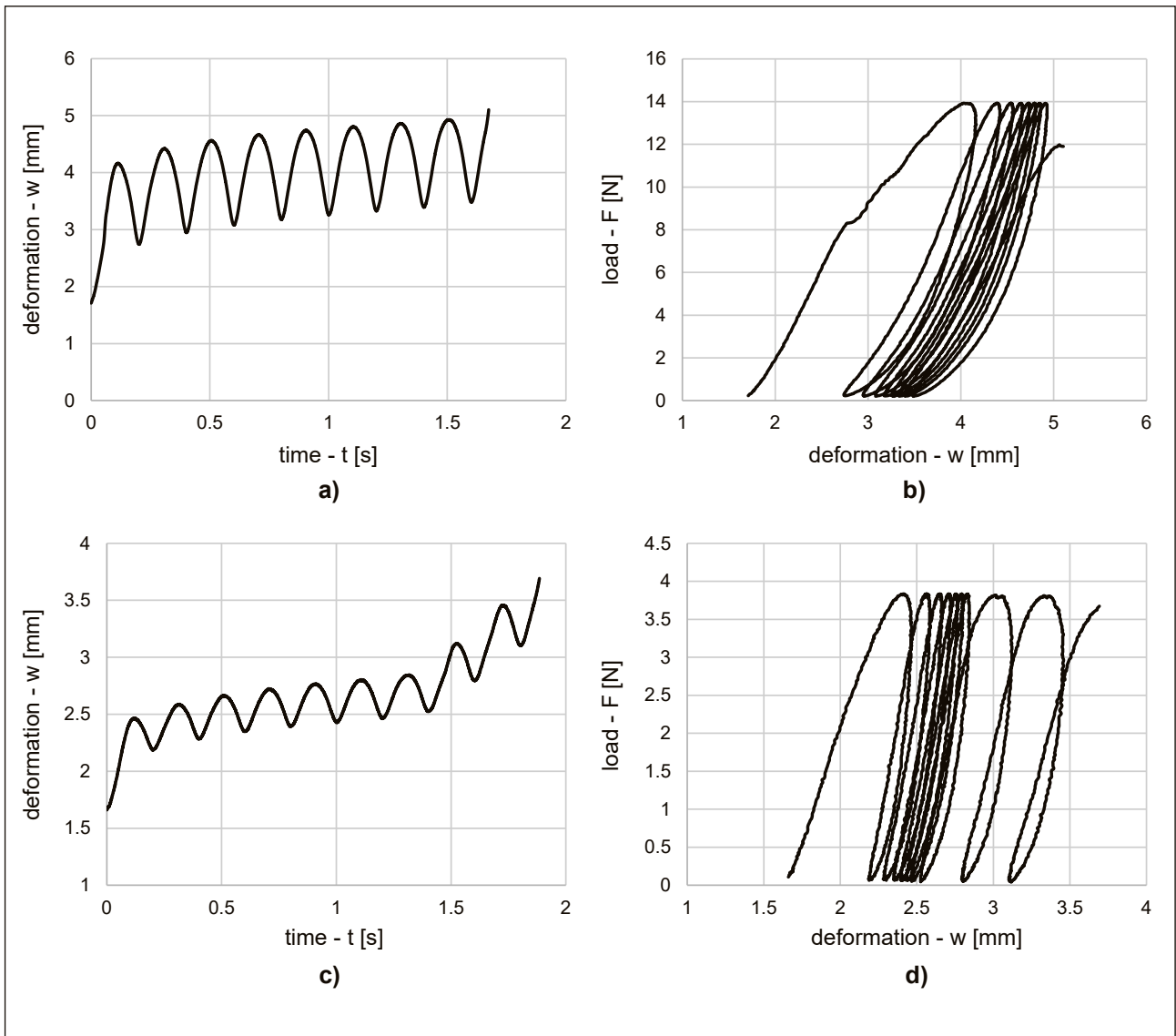


Figure 1. Time vs. deformation (a) and force vs. deformation (b) functions of a Golden Delicious apple, and time vs. deformation (c) and force vs. deformation (d) functions of a Packham pear
Deformation – Time – Force

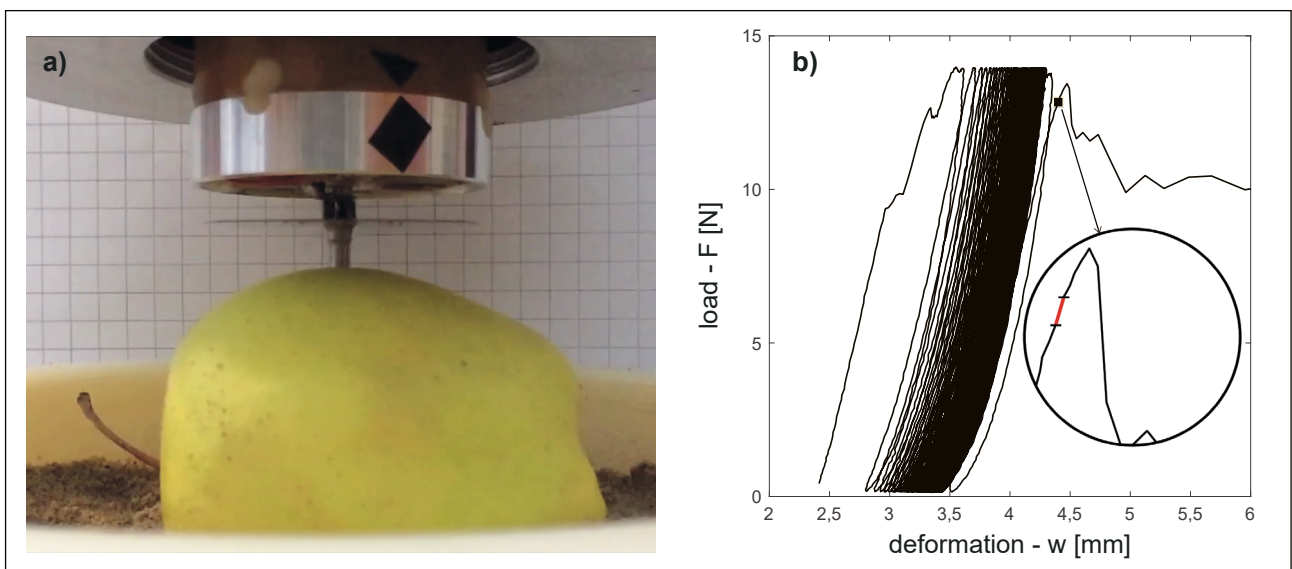


Figure 2. Determination of the rupture point by analyzing high frame rate recording
Force - Deformation

The sampling frequency of the DyMaTest is 2 kHz, which is 8.3 times higher than that of the video recordings of the rupture point. The absolute error of the frame analysis compared to the data collected by the material testing instrument is 4.16 milliseconds, which is the lowest resolution unit of the camera. **Figure 2.b** illustrates the error range for the rupture point. The rupture point as a test parameter is hereinafter denoted by the notation t_f , which refers to the term *time to failure*.

3.3. Viscoelastic material properties

To determine the material properties of fruits, the three-element Poynting-Thomson model was used, which had already been used in previous research projects on apples. The coupling of the model is shown in **Figure 3**, and it can be characterized by the following equation:

$$F_m + \frac{\eta}{E_1 + E_2} \dot{F}_m = \frac{E_1 E_2}{E_1 + E_2} w_m + \frac{E_1 \eta}{E_1 + E_2} \dot{w}_m,$$

where E_1 and E_2 are the elastic components of the mechanical model [N mm^{-1}] and η is the viscous element [Ns mm^{-1}]. F_m is the compressive force recorded during the measurements [N] and w_m is the deformation obtained during the measurements [mm].

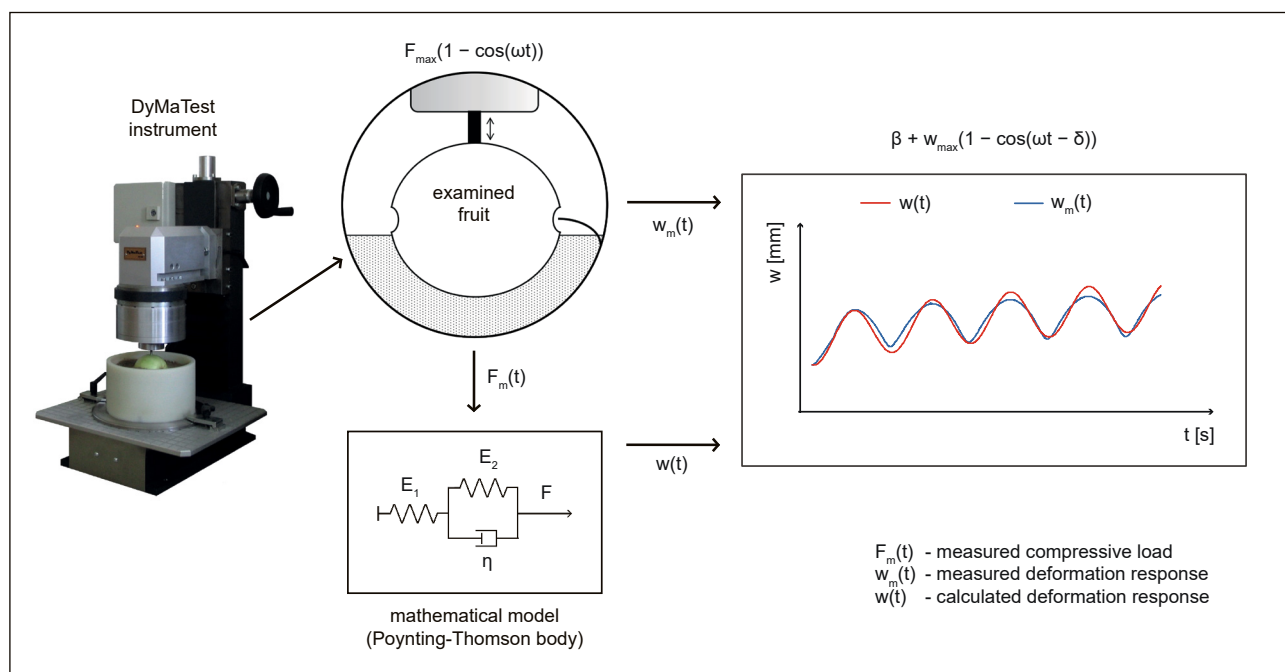


Figure 3. Identification of the computer mathematical model
DyMaTest material testing equipment - Investigated crop - Mathematical model – Measured compressive load – Measured deformation – Calculated deformation

The block-oriented writing of the equation was performed in a Matlab Simulink environment, where the model was identified with the force and deformation data obtained during the measurements (**Figure 3**). The values of the elastic and viscous coefficients were determined for the calculated curve (w) that best fit the measured results (w_m). To minimize the difference between the two data sets, we used a procedure based on the least square method:

$$\int_0^T (w_m(t) - w(t))^2 dt \rightarrow \min.$$

After running the minimum search process, the model coefficients E_1 , E_2 and η were recorded and were used as test parameters. The approximations carried out with the presented mathematical system provided R^2 values between 0.967 and 0.998.

3.4. Analysis of the hysteresis curves

The force vs. deformation diagrams in **Figures 1.b, 1.d** and **4** show recurrent hysteresis processes where the area enclosed by the load and unload curves is closely related to the energy indices of the crop for the given cycle. The horizontal axis shows that the curve does not close after unloading, so a w_M permanent deformation occurs in the material in each cycle until the next compressive load, and the w_R elastic deformation of the given crop is due to the difference between the load peak and the permanent deformation (the sum of the two gives the total magnitude of the deformation in the given cycle).

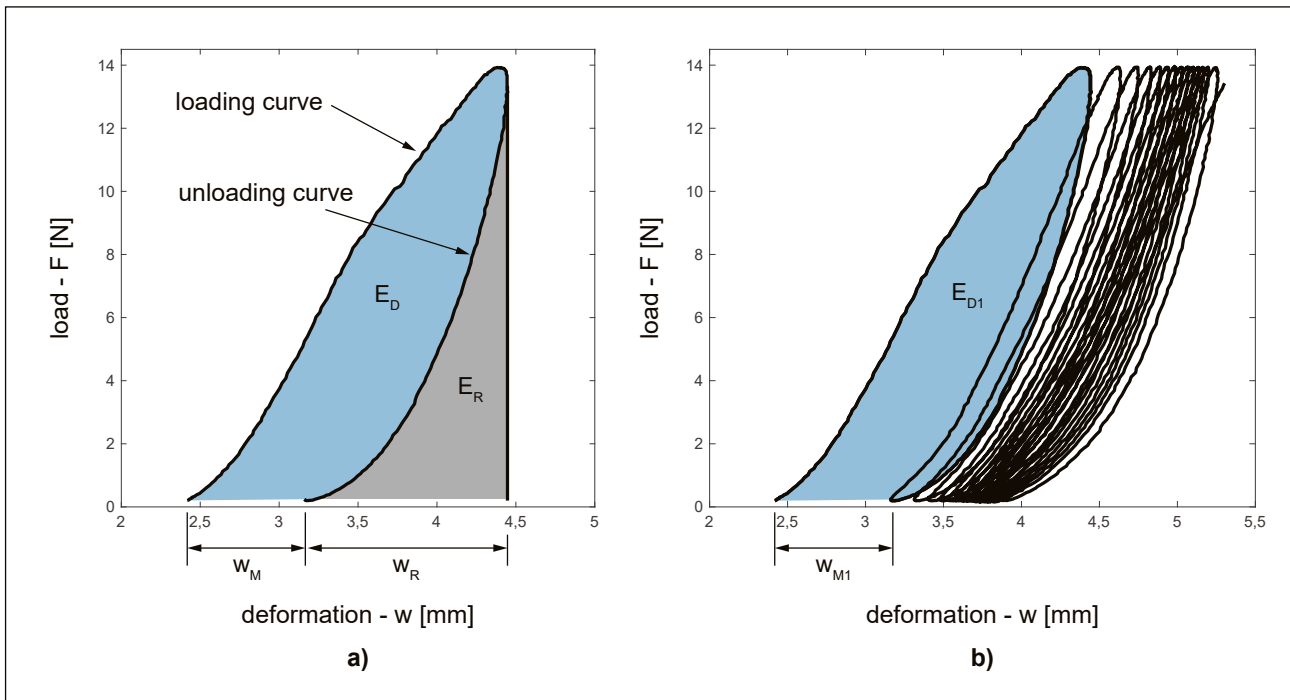


Figure 4. Force vs. deformation curve of a single load cycle (a) and the force vs. deformation curve until failure of a crop (b) for a Golden Delicious apple
Load – Unloading - Deformation

If we examine the areas between the curves, by subtracting the energy associated with the elastic deformation (E_R) from the total work ($E_D + E_R$), the dissipated energy of the cycle (E_D) is obtained. This energy loss can be calculated by determining the area between the curves:

$$E_D = \int_0^{t_{wM}} F \frac{dw}{dt} dt,$$

where t_{wM} is the time elapsed between the start of the loading process and the end of the unloading [s] and F is the load function produced by the test equipment [N].

Since the area calculation was performed by the numerical integration of the force and deformation data over time, the previously mentioned approximation functions and their inaccuracies associated with them can be avoided.

Although the calculation of energy losses is included in several studies that describe the damage mechanism, only a portion of the dissipated energy that can be determined from the hysteresis curve is related to material damage and the failure process [13]. In other fields, such as the rheological description of pavement asphalt layers, calculation methods have also been developed that point directly to the moment of failure using the dissipated energy data. These include the so-called dissipated energy quotient, which can be calculated by the following equation [26]:

$$E_{DR} = \frac{\sum_{i=0}^n E_{Di}}{E_{Dn}},$$

where E_{Di} is the total energy loss up to the given cycle [N mm] and E_{Dn} is the energy loss of the given cycle [N mm].

When the dissipated energy quotient is plotted as a function of the number of cycles (**Figure 5**), it can hint at two damage indicators: the onset of the cracking process of the given asphalt is indicated by a 10% drop in the ramp-up slope of the curve, and the fracture seen at the peak is the fatigue failure [26].

In the course of our experiments on fruits, the said drop in the slope cannot be observed so clearly in most cases, which is probably a consequence of the rapid load settings. However, the internal rupture point clearly appears in our own results as well. In addition to the time elapsed until the rupture point and the viscoelastic model coefficients, this data is also used to construct the equations describing the damage process.

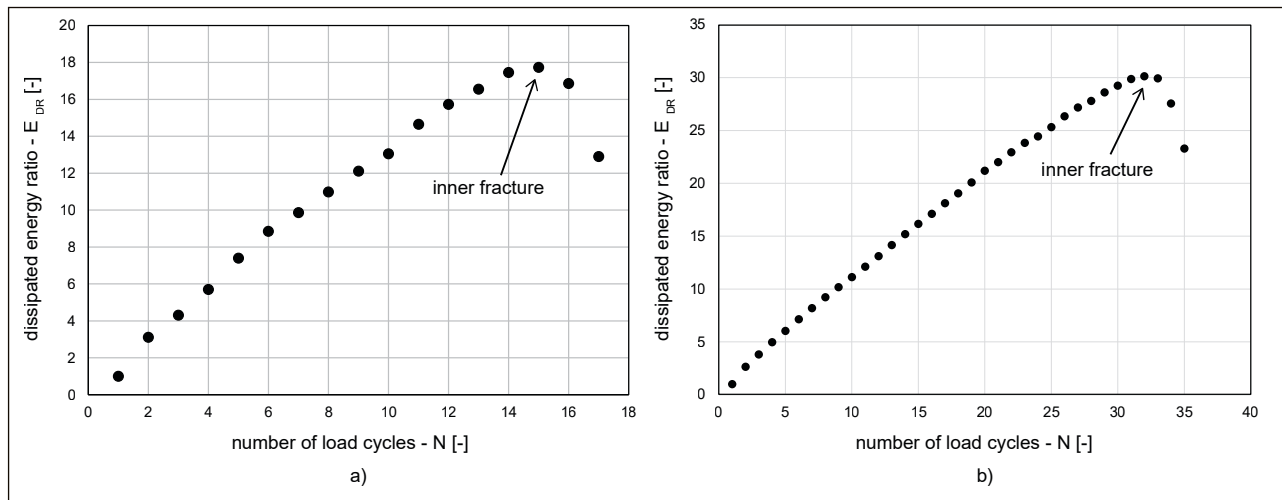


Figure 5. Internal rupture point indicating fatigue based on the quotient calculated from dissipated energies for a Golden Delicious (a) and a Packham (b) produce
Ratio of dissipated energy – Internal breaking point – Number of load cycles

3.5. Test parameters, load settings

Our objective was to describe, using parameters related to the damage process, the time to failure (t_f), which will be a dependent variable of the resulting equations. When characterizing failure, we aim to establish linear regression equations.

Compressive loads were applied to 25 Golden Delicious apples and 25 Packham pears (i.e., the number of replicates for each crop was 25), and six different measurement frequencies were used for each fruit. These frequencies fall into the range considered to be the most dangerous in transportation research, mainly in the range below 10 Hz, and taking into account the setting options of our instrument, they were 2.5, 3.7, 5, 7.5, 10 and 11.6 Hz. Thus, a total of 300 compressive loads were applied, and from the force, deformation and time data obtained during the loads, the E_1 , E_2 and η coefficients of the material model were determined in each case, as well as the TTF time to failure and the E_{DRmax} internal damage index, using the methods detailed above. In addition, it is also taken into account whether the process was influenced by the test frequencies.

Because of the different load resistance of the Golden and Packham crops, different compressive forces had to be applied: in the case of Packham pears, failure was already reached in one of the first cycles at certain values of the frequency range, while Golden apples were much more resistant, so considering the compatibility of the damage times and dissipated energy values to be detailed later, a load of 4 N to pears and a load of 14 N was applied to apples. In practice this means that at settings greater than 4 N, for most of the frequency values investigated, immediate destruction occurred in pears, and in the case of settings below 14 N, load processes orders of magnitude longer would have to be run to visibly damage the apples.

4. Results

4.1. Times to failure and energy indicators hinting at internal damage

Average and standard deviation values of the times to failure for each frequency setting are shown in **Table 1**. **Figure 6.a** shows a chart of the average values of Golden apples, while for Packham pears, the results are shown in **Figure 6.b**. In the case of apples, the rupture points occurred as expected, i.e., irreversible damage occurred earlier at higher frequencies, while there was a deviation from this in the average values obtained for pears, as at settings above 5 Hz, there is an increasing trend can be seen in time to failure.

Table 1. Average times to failure and standard deviations of the results

Frequency [Hz]	Golden		Packham	
	TTF [s]	Standard deviation – s_{TTF} [s]	TTF [s]	Standard deviation – s_{TTF} [s]
2.5	6.002	3.006	1.522	1.105
3.7	3.758	1.857	1.237	0.858
5	2.505	1.383	1.203	0.847
7.5	1.639	0.762	1.451	1.114
10	1.192	0.672	2.046	1.662
11.6	0.938	0.938	3.384	2.790

In the case of the Golden apples, larger standard deviation values can be found at lower frequency settings, while at higher frequencies, the extreme values of the error ranges move closer to the average values. The endpoints of the standard deviation range show a similar trend to the frequency dependence of the average in Golden apples, but in the case of pears, the minimum values of the standard deviation range no longer represent the change in the average values, thus different characteristics are observed for pears between the 25 measurements.

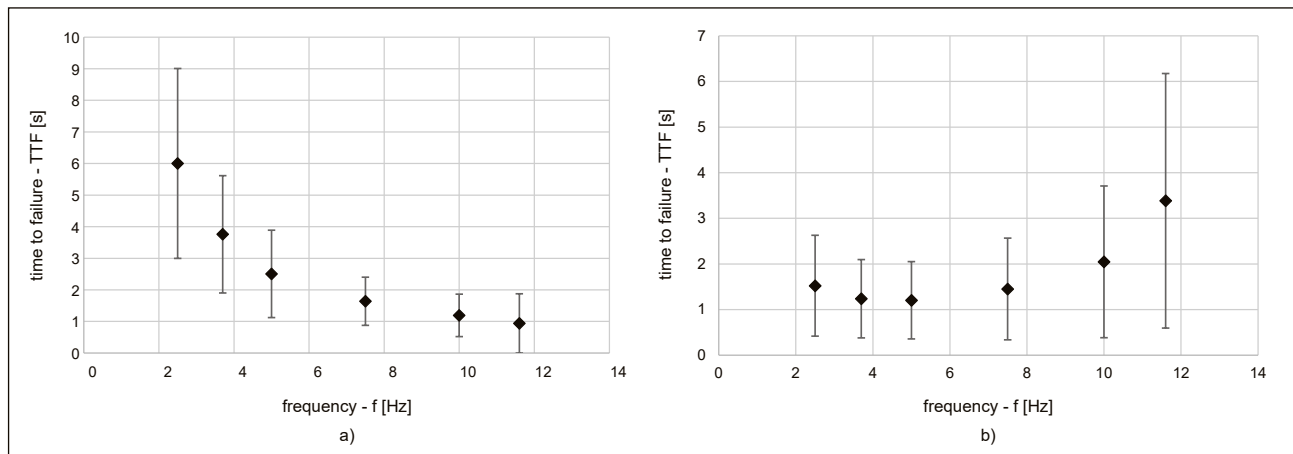


Figure 6. Frequency dependence of the times to failure for Golden Delicious apples (a) and for Packham pears (b)
Failure time - Frequency

Since the standard deviation is quite significant for both apples and pears (**Table 1**), the role of the additional parameters considered in the study (viscoelastic model coefficients, as well as energy indices) is particularly important when considering their effect on the damage process during the description of time to failure.

Figure 7 shows the peak values of the energy loss quotient calculated from the dissipated energy, and the results for 25 crops each were also averaged for each frequency setting.

In the case of the Golden apples examined, both the energy loss values recorded for each cycle and the maximum quotient values indicating internal rupture show a decreasing trend towards higher frequency settings, however, in the case of pears, this process is reversed, and the trend describing the frequency dependence also has a different nature.

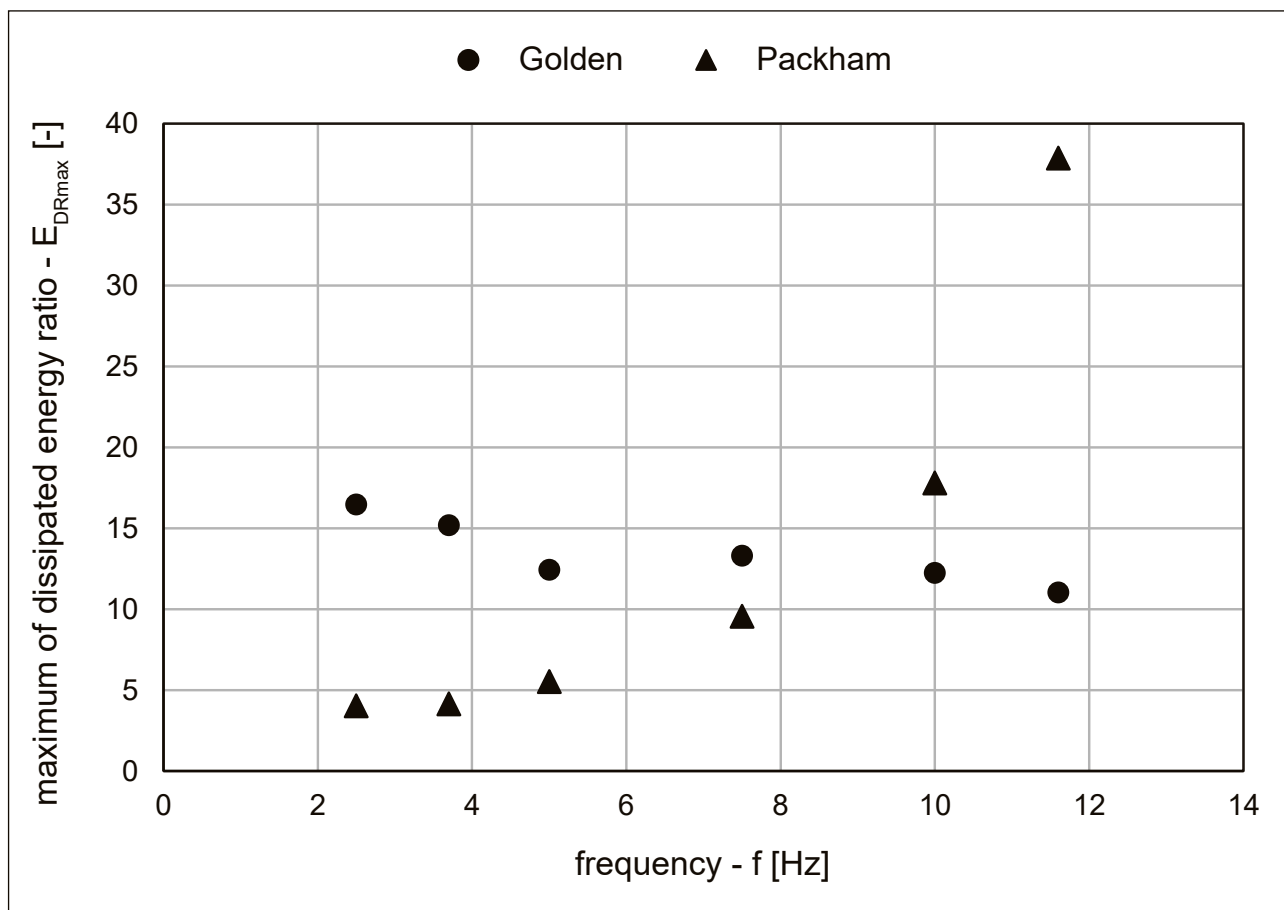


Figure 7. Frequency dependence of the average values of accumulated dissipated energy Maximum of dissipated energy ratio

4.2. Evaluation of viscoelastic model parameters

The frequency dependence of the elastic (E_1) and viscous (η) material properties of the crops is shown in **Figure 8**, where the values of each series of measurements are displayed averaged at each frequency setting. Numerical results are summarized in **Tables 2 and 3**.

Table 2. Average values and standard deviations of viscoelastic model parameters at each load frequency for Golden Delicious apples

Golden						
f [Hz]	E_1 [N mm ⁻¹]	E_1 standard deviation [N mm ⁻¹]	E_2 [N mm ⁻¹]	E_2 standard deviation [N mm ⁻¹]	η [Ns mm ⁻¹]	η standard deviation [Ns mm ⁻¹]
2.5	10.504	1.250	2.139	0.277	2.129	0.703
3.7	10.523	1.091	2.158	0.277	1.429	0.358
5	10.546	1.497	2.116	0.292	1.109	0.251
7.5	10.622	1.529	2.139	0.269	0.722	0.204
10	10.271	1.177	2.167	0.206	0.581	0.154
11.6	9.848	1.310	1.984	0.361	0.509	0.106

Table 3. Average values and standard deviations of viscoelastic model parameters at each load frequency for Packham pears

Packham						
f [Hz]	E_1 [N mm ⁻¹]	E_1 standard deviation [N mm ⁻¹]	E_2 [N mm ⁻¹]	E_2 standard deviation [N mm ⁻¹]	η [Ns mm ⁻¹]	η standard deviation [Ns mm ⁻¹]
2.5	6.896	1.710	0.554	0.160	0.848	0.494
3.7	7.705	2.184	0.518	0.177	0.574	0.226
5	7.695	2.243	0.565	0.135	0.479	0.242
7.5	8.981	1.873	0.600	0.192	0.435	0.223
10	9.730	2.540	0.613	0.130	0.436	0.243
11.6	10.178	2.172	0.623	0.127	0.471	0.239

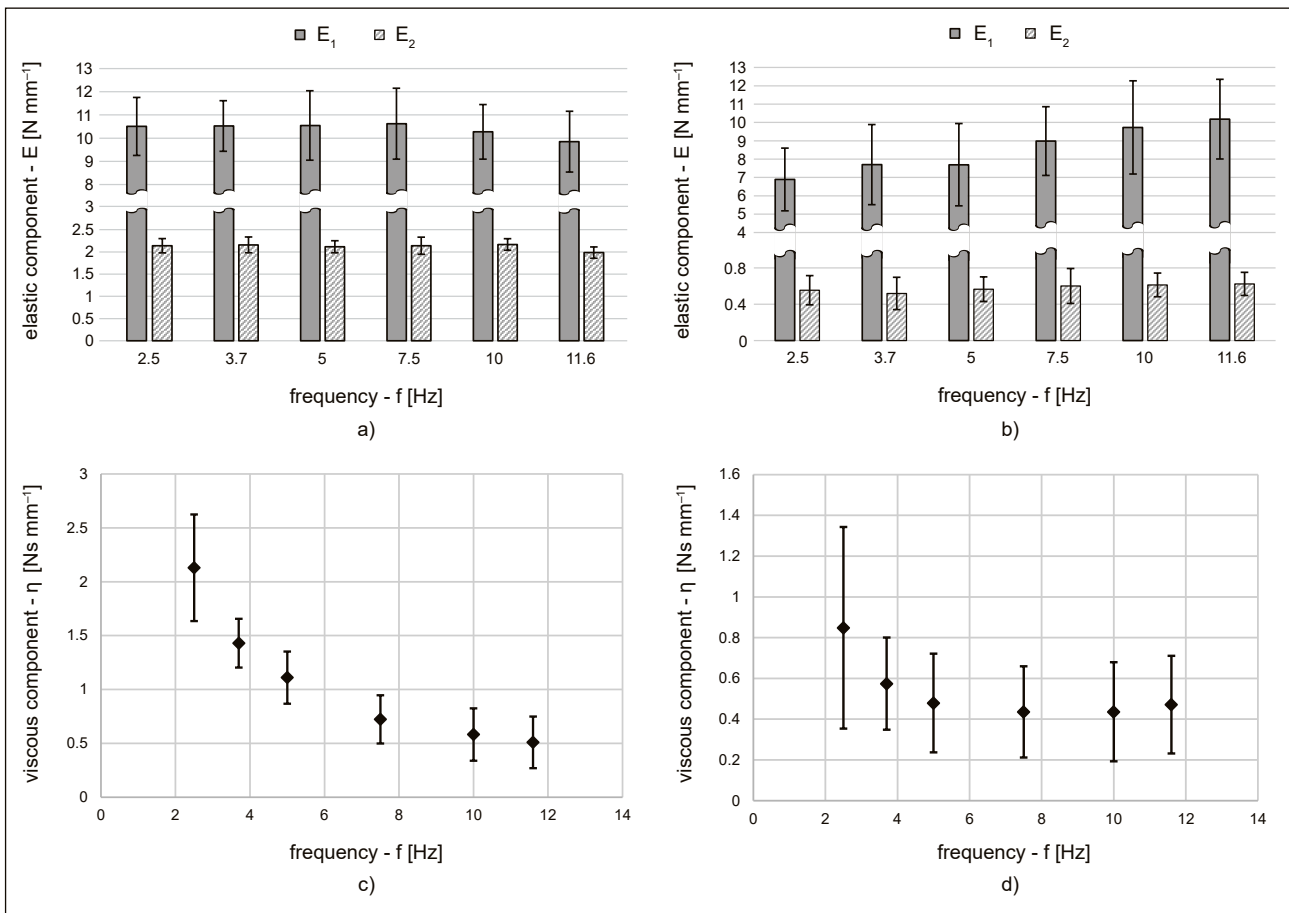


Figure 8. Averages of elastic and viscous model parameters for Golden apples (a, c) and Packham pears (b, d) Viscous element - Frequency

The elastic coefficients in the case of Golden apples do not exhibit an apparent frequency dependence, while a slight decrease can be detected in the case of the E_1 parameters when higher test frequencies are used. In previous experiments, apples tended to behave more rigidly at higher load velocities [25]: if a higher load velocity corresponds to a higher frequency in the present case, then this reaction is consistent with the earlier experience.

However, in the case of pears, there is a clear increase when component E_1 is examined, and this result may explain the obtained time to failure data: at the frequencies above 5 Hz, a more elastic, softer surface is formed near the load zone in the pears examined, and the increased elasticity provides a more favorable mechanical resistance for the crops. Thus, in the most dangerous frequency range, higher values do not necessarily carry the most significant damage potential. The E_2 elastic coefficient is constant in the studied range for both Golden apples and Packham pears.

By plotting the viscous parameters, a clear frequency dependence is obtained for both Golden apples and Packham pears. The curve obtained for apples shows a similarity to the frequency dependence of a dynamic viscosity factor presented in a previous research [27], while in the case of pears, also the frequency around 5 Hz breaks the downward trend, this may also be related to the rupture point in the frequency curve of the times to failure.

The error ranges showing the standard deviations are wider in the case of pears, the widest range of standard deviation was recorded at the 2.5 Hz setting. One of the reasons for this is that with this setting, several pears were already destroyed in the first loading phase of the first cycle.

Table 4. Analysis of variance of viscoelastic model parameters

Golden			Packham		
Coefficient	F	p	Coefficient	F	p
E_1	1.196	0.314	E_1	8.008	<0.001
E_2	1.408	0.225	E_2	1.488	0.198
η	75.393	<0.001	η	6.427	<0.001

The degree of frequency dependence was checked by analysis of variance (ANOVA) and the results are summarized in **Table 4**. In the case of Golden apples, a significant correlation can only be detected for coefficient η ($p < 0.05$), and this confirms the conclusion that can be drawn from the diagrams, which were reached in the case of coefficients E_1 and E_2 : the elastic elements and the frequency in the studied range are not detectably related. In the case of Packham pears, however, in addition to η , the frequency dependence of the elastic coefficient E_1 can also be detected, which plays a significant role in the mechanical resistance experienced above 5 Hz.

4.3. Linear failure models

Using the results of the tests presented and the values of the load frequencies, the possibility of four different failure modes for Golden Delicious apples is suggested, according to the following search function:

$$TTF = A + B\eta + CE_{DRmax} + Df + KE_1 + JE_2,$$

where A, B, C, D, K are E constants. The different versions are described in **Table 5**. These include the elastic and viscous material properties of the crops, as well as the peak value of the dissipated energy, but not the frequency settings.

Table 5. Linear models that can be created from the measured parameters for Golden apples

Model	R	R ²	Modified R ²	Standard deviation of the estimate	Change in R ²	Change in F	Change in the significance of F
1	0.902(a)	0.814	0.812	1.03413	0.814	641.502	0.000
2	0.963(b)	0.927	0.926	0.64922	0.113	226.984	0.000
3	0.971(c)	0.943	0.941	0.57824	0.015	39.039	0.000
4	0.972(d)	0.945	0.943	0.56840	0.002	6.064	0.015

(a) variable: η

(b) variables: η, E_{DRmax}

(c) variables: η, E_{DRmax}, E_1

(d) variables: $\eta, E_{DRmax}, E_1, E_2$

In the curves showing the model parameters and as the result of the analysis of variance, there was no significant relationship between the elastic coefficients and the frequency, but the elasticity for the Golden apples had a clear effect on the failure process, resulting in a detectable increase. While the elastic coefficient E_1 is a defining part of the equation, E_2 contributes only negligibly to the accuracy of the fit, so we chose the third equation for the simplest description of the failure of Golden apples:

$$TTF = 0,533 + 2,736\eta + 0,141E_{DRmax} - 0,261E_1.$$

The models applicable to Packham pears are summarized in **Table 6**. In these versions, the load frequency appears as well, playing an important role in the description of the time to failure.

Table 6. Linear models that can be created from the measured parameters for Packham pears

Model	R	R ²	Modified R ²	Standard deviation of the estimate	Change in R ²	Change in F	Change in the significance of F
1	0.886(a)	0.785	0.783	0.66044	0.785	488.514	0.000
2	0.933(b)	0.871	0.869	0.51404	0.086	88.193	0.000
3	0.946(c)	0.896	0.893	0.46299	0.025	31.948	0.000
4	0.959(d)	0.920	0.917	0.40765	0.024	39.273	0.000

(a) variable: E_{DRmax}

(b) variables: E_{DRmax}, η

(c) variables: E_{DRmax}, η, f

(d) variables: E_{DRmax}, η, f, E_2

Although the parameter E_1 was related to the frequency, failure is not affected by this coefficient, but E_2 connected in parallel with the viscous component. Since both the frequency and the elastic factor E_2 contribute significantly to the accuracy of the linear approximation, a fourth equation was written for Packham pears:

$$TTF = 0,091 + 0,788\eta + 0,085E_{DRmax} - 0,103f + 1,524E_2.$$

The results of the analysis of variance checking the validity of the equations are shown in **Table 7**. Since the F values obtained are considered to be significant ($p < 0.05$), the approximations described are valid.

Table 7. Analysis of variance of the approximation equations

Golden		Packham	
F	p	F	p
792.307	<0.001	375.742	<0.001

Time to failure results (TTF_{sz}) of the models generated after substitution, as well as their relationships to the measured results (TTF_m) are shown in **Figure 9** over the entire study range. Averaged results by frequency of the approximation applied to Golden Delicious apples were between 1.54% and 3.85% relative error, while the results averaged by crop were between 1.01% and 31.13%. For Packham pears, averaging the results obtained for each frequency setting, the relative errors were between 2.42% and 6.22%, while the deviations of the values calculated for individual crops were between 0.04% and 34.51% compared to the measured time to failure. The higher error values were not related to the given frequency settings, but to the different mechanical resistance and material properties of each crop.

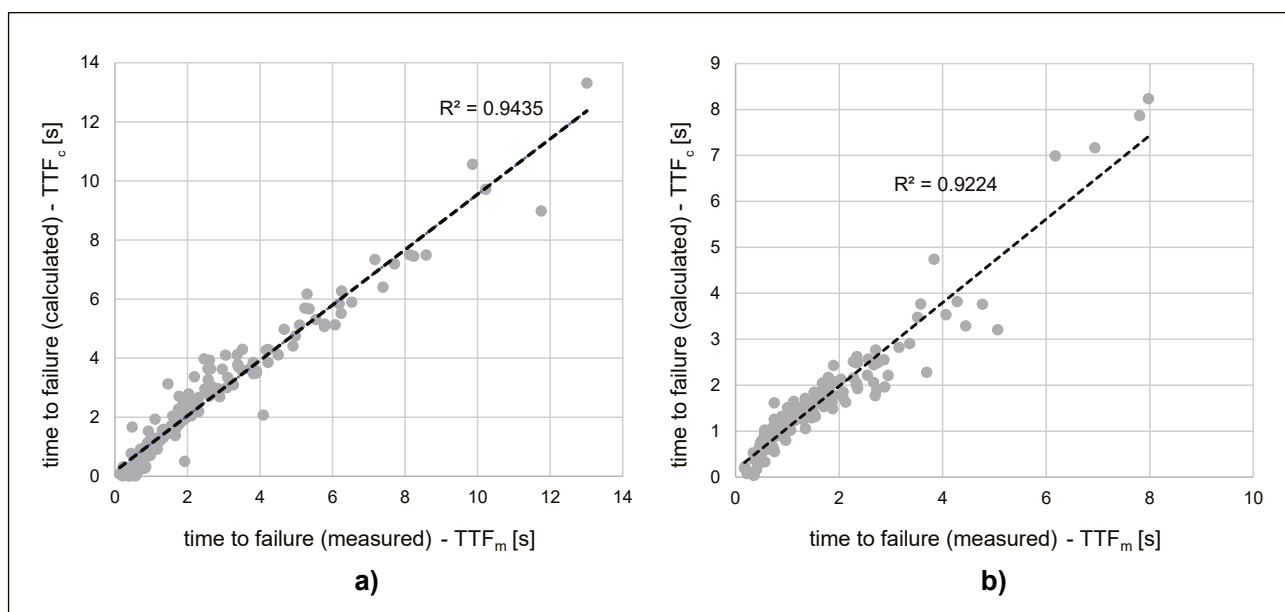


Figure 9. Relationship between measured and calculated times to failure for Golden Delicious apples (a) and Packham pears (b), evaluating all measurement results
Failure time (measured) - Failure time (calculated)

5. Conclusions

Repetitive loading during fruit processing and transport procedures causes significant damage, so in our work we investigated failure caused by fatigue, and to this end we developed multivariate linear regression models based on the most important material properties and energy indices related to the failure process, and which can predict the damage resistance of the tested Maloideae (Golden Delicious apples and Packham pears).

In some cases, the rupture point indicating failure cannot be evaluated from the deformation data obtained during the measurements, in which case limit values determined by rapid filming and frame analysis may be helpful during the analyses. The accuracy of this depends on the frame refresh rate of the cameras used, and this, together with image resolution, is constantly evolving in mobile devices, so these devices are also becoming suitable for similar measurement tasks, and their use in the monitoring of the deformation of fruits is no longer unprecedented.

Observing internal damage on the basis of energy calculations may represent a new research direction in the study of fruit damages, as environmental impacts in processing procedures need to be addressed accordingly (limitation or modification of handling, dropping and vibration limit values). However, a precise definition of the phenomenon in order to describe the damage process in the cellular structure in more detail is still awaiting microlevel investigation and confirmation.

6. Acknowledgment

The authors would like to thank the Institute of Agricultural Mechanization of NAIK for providing the DyMaTest material testing instrument. We would also like to thank Dr. László Földi for his help in computer modeling and Dr. László Székely for his help in establishing the multivariate equations.

7. References

- [1] Che, W., Sun, L., Zhang, Q., Tan, W., Ye, D., Zhang, D., Liu, Y. (2018): Pixel based bruise region extraction of apple using Vis-NIR hyperspectral imaging. *Computers and Electronics in Agriculture* 146, pp. 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2018.01.013>
- [2] Tan, W., Sun, L., Yang, F., Che, W., Ye, D., Zhang, D., Zou, B. (2018): Study on bruising degree classification of apples using hyperspectral imaging and GS-SVM. *Optik* 154, pp. 581-592. <https://doi.org/10.1016/j.ijleo.2017.10.090>
- [3] Gergely, Z., Beke, J. (2015): Az osztályozási hibák csökkentésének lehetőségei a HPV-I sorozatú paprikaválogató gépeken, *Mezőgazdasági Technika* 2015/11, pp. 2-4.
- [4] Malik, M., Zhang, T., Li, H., Zhang, M., Shabbir, S., Saeed, A. (2018): Mature Tomato Fruit Detection Algorithm Based on improved HSV and Watershed Algorithm. *IFAC-PapersOnLine* 51 (17) pp. 431-436. <https://doi.org/10.1016/j.ifacol.2018.08.183>
- [5] FAO, (2011): Global Food Losses and Waste. Extent, Causes and Prevention. <http://www.fao.org/docrep/014/mb060e/mb060e00.pdf> (Hozzáférés / Aquired: 12.08.2020)
- [6] NRDC, (2012): Wasted: How America is losing up to 40 percent of its food from farm to fork. NRDC Issue PAPER. <https://www.nrdc.org/sites/default/files/wasted-food-IP.pdf> (Hozzáférés / Aquired: 12.08.2020)
- [7] Yahia, E. M., Fonseca, J. M., Kitinoja, L. (2019): Postharvest Losses and Waste. p. 43. In: Yahia, E. M, Postharvest Technology of Perishable Horticultural Commodities. Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813276-0.00002-X>
- [8] Morrow, C., Mohsenin, N. (1966): Consideration of Selected Agricultural Products as Viscoelastic Materials. *Journal of Food Science* 31 (5) pp. 686-698. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1966.tb01925.x>
- [9] Tscheuschner, H., Doan, D. (1988): Modelling of mechanical properties of apple flesh under compressive load. *Journal of Food Engineering* 8 (3) pp. 173-186. [https://doi.org/10.1016/0260-8774\(88\)90052-0](https://doi.org/10.1016/0260-8774(88)90052-0)
- [10] Fenyvesi, L. (2004): Mezőgazdasági termények sérülésvizsgálata. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [11] Szendrő, P. (2000): Mezőgazdasági Gépszerkezettan. Mezőgazdasági Szaktudás Kiadó, Budapest.
- [12] Kim, J., Roque, R., Birgisson, B. (2006): Interpreting Dissipated Energy from Complex Modulus Data. *Road Materials and Pavement Design* 7 (2) pp. 223-245. <https://doi.org/10.1080/14680629.2006.9690034>

- [13] Ghuzlan, K., Carpenter, S. (2000): Energy-Derived, Damage-Based Failure Criterion for Fatigue Testing. *Transportation Research Record: Journal of the Transportation Research Board* 1723 (1) pp. 141-149. <https://doi.org/10.3141/1723-18>
- [14] Lee, J., Tan, J., Waluyo, S. (2016): Hysteresis characteristics and relationships with the viscoelastic parameters of apples. *Engineering in Agriculture, Environment and Food* 9 (1) pp. 36-42. <https://doi.org/10.1016/j.eaef.2015.09.005>
- [15] Mohsenin, N. (1986): *Physical properties of plant and animal materials*. Gordon and Breach Science Publishers, Amsterdam.
- [16] Sitkei, Gy. (1981): *A mezőgazdasági anyagok mechanikája*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [17] Li, Z., Miao, F., Andrews, J. (2017): Mechanical Models of Compression and Impact on Fresh Fruits. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety* 16 (6) pp. 1296-1312. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12296>
- [18] Fischer, D., Craig, W. L., Watada, A. E., Douglas, W., Ashby, B. H. (1992): Simulated In-Transit Vibration Damage to Packaged Fresh Market Grapes and Strawberries. *Applied Engineering in Agriculture* 8 (3) pp. 363-366. <https://doi.org/10.13031/2013.26078>
- [19] Hinsch, R. T., Slaughter, D. C., Craig, W. L., Thompson, J. F. (1993): Vibration of Fresh Fruits and Vegetables During Refrigerated Truck Transport. *Transactions of the ASAE* 36 (4) pp. 1039-1042. <https://doi.org/10.13031/2013.28431>
- [20] Vursavuş, K., Özgüven, F. (2004): Determining the Effects of Vibration Parameters and Packaging Method on Mechanical Damage in Golden Delicious Apples. *Turkish Journal Of Agriculture And Forestry* 28 (5) pp. 311-320.
- [21] Oveisi, Z., Minaei, S., Rafiee, S., Eyvani, A., Borghei, A. (2012): Application of vibration response technique for the firmness evaluation of pear fruit during storage. *Journal of Food Science and Technology* 51 (11) pp. 3261-3268. <https://doi.org/10.1007/s13197-012-0811-z>
- [22] Vursavus K., Kesilmis Z., Oztekin B. (2017): Nondestructive dropped fruit impact test for assessing tomato firmness. *Chemical Engineering Transactions* 58, pp. 325-330.
- [23] Petróczki, K., Fenyvesi, L. (2014): Improvement of compressive testing instrument with wide range of speed for examining agricultural materials. *Computers and Electronics in Agriculture* 101, pp. 42-47. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2013.12.003>
- [24] Pillinger, G., Géczy, A., Hudoba, Z., Kiss, P. (2018): Determination of soil density by cone index data. *Journal of Terramechanics* 77, pp. 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.jterra.2018.03.003>
- [25] Fenyvesi, L. (2004): *Mezőgazdasági termények sérülésvizsgálata*. Akadémiai Kiadó, Budapest.
- [26] Delgadillo, R., Bahia, H. (2005): Rational fatigue limits for asphalt binders derived from pavement analysis. *Asphalt paving thechnology: Journal of the association of asphalt paving technologists* 74, pp. 1-42.
- [27] Van Zeebroeck, M., Dintwa, E., Tijskens, E., Deli, V., Loodts, J., De Baerdemaeker, J., Ramon, H. (2004): Determining tangential contact force model parameters for viscoelastic materials (apples) using a rheometer. *Postharvest Biology and Technology* 33 (2) pp. 111-125. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.02.008>

Nemzeti szabványosítási hírek

A következő felsorolásban szereplő szabványok megvásárolhatók vagy megrendelhetők az MSZT Szabványboltban (1082 Budapest VIII., Horváth Mihály tér 1., telefon: 456-6893, telefax: 456-6841, e-mail: kiado@mszt.hu; levélcím: Budapest 9., Pf. 24, 1450), illetve elektronikus formában beszerezhetők a www.mszt.hu/webaruhaz címen.

A nemzetközi/európai szabványokat bevezetjük magyar nyelven, valamint magyar nyelvű címdallal és angol nyelvű tartalommal. A magyar nyelven bevezetett nemzetközi/európai szabványok esetén külön feltüntetjük a magyar nyelvű hozzáférést.

2021. március – 2021. május hónapban bevezetett szabványok:

07.100.30 Élelmiszer-mikrobiológia

MSZ EN ISO 6887-3:2017/A1:2021 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. A vizsgálati minták, az alapszuszpenzió és a decimális hígítások elkészítése mikrobiológiai vizsgálathoz. 3. rész: A halak és a halászati termékek előkészítésének specifikus szabályai. 1. módosítás: Minta-előkészítés nyers tengeri csigák esetén (ISO 6887-3:2017/Amd 1:2020) – Az MSZ EN ISO 6887-3:2017 módosítása

MSZ EN ISO 16140-4:2021 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Módszervalidálás. 4. rész: A módszer validálásának protokollja egyetlen laboratóriumban (ISO 16140-4:2020)

MSZ EN ISO 16140-5:2021 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Módszervalidálás. 5. rész: A nem szabadalmaztatott (saját) módszerek laboratóriumok közötti, faktoriális validálásának protokollja (ISO 16140-5:2020)

MSZ EN ISO 18593:2018 Az élelmiszerlánc mikrobiológiája. Horizontális módszerek a felületi mintavételre (ISO 18593:2018) – Az MSZ ISO 18593:2008 helyett

13.060 Vízhőminőség

MSZ ISO 5667-10:2021 Vízhőminőség. Mintavétel. 10. rész: Útmutató a szennyvíz mintavételéhez – Az MSZ ISO 5667-10:1995 helyett

65.120 Takarmányanyagok

MSZ EN 17374:2021 Takarmányok. Mintavétel és vizsgálati módszerek. Szervetlen arzén meghatározása takarmányban anioncserés HPLC-ICP-MS-sel

67 Élelmiszeripar

67.050 Élelmiszertermékek vizsgálatának és elemzésének általános módszerei

MSZ EN 16852:2017 Élelmiszerek. Az etil-karbamát meghatározása csonthéjas gyümölcsökből készült szeszes italokból, gyümölcstörkölyből és más szeszes italokból. GC-MS módszer

MSZ EN 16857:2017 Élelmiszerek. A benzol meghatározása üdítőitalokból, egyéb italokból és zöldségalapú bébiételekből gőztér-analízises gázkromatográfiás tömegspektrometriával (HS-GC-MS)

MSZ EN 16858:2017 Élelmiszerek. A melamin és a cianursav meghatározása élelmiszerekben folyadékromatográfiával és tandem-tömegspektrometriával (LC-MS/MS)

MSZ EN 17424:2021 Élelmiszerek. Az aflatoxinok meghatározása fűszerekben, a paprika kivételével, IAC-tisztítással és HPLC-FLD-vel, oszlop utáni származékképzéssel

¹ Magyar Szabványügyi Testület (MSZT)

67.060 Gabonafélék, hüvelyesek és a belőlük származó termékek

MSZ EN 15948:2021 Gabonafélék. A nedvesség- és a fehérjetartalom meghatározása. Közeleli infravörös spektroszkópiás módszer teljes gabonaszemekre – Az MSZ EN 15948:2015 helyett

MSZ EN ISO 6647-1:2021 Rizs. Az amilóztartalom meghatározása. 1. rész: Spektrofotometriás módszer metanolos zsirtalanító eljárással, burgonya-amilóz és viaszosrizs-amilopektin kalibrálóoldataival (ISO 6647-1:2020) – Az MSZ EN ISO 6647-1:2015 helyett

MSZ EN ISO 6647-2:2021 Rizs. Az amilóztartalom meghatározása. 2. rész: Spektrofotometriás rutinmódszer zsirtalanító eljárás nélkül és kalibrálás rizsstandardok alapján (ISO 6647-2:2020) – Az MSZ EN ISO 6647-2:2015 helyett

67.200 Étolajok és -zsírok. Olajmagvak

MSZ EN 14105:2021 Zsír- és olajszármazékok. Zsír-sav-metil-észterek (FAME). A szabad és az összes glicerintartalom, valamint a mono-, di- és trigliceridtartalom meghatározása – Az MSZ EN 14105:2012 helyett

MSZ EN 14112:2021 Zsír- és olajszármazékok. Zsír-sav-metil-észterek (FAME). Az oxidációs stabilitás meghatározása (gyorsított oxidációs vizsgálat) – Az MSZ EN 14112:2016 helyett

MSZ EN ISO 660:2021 Állati és növényi zsírok és olajok. A savszám és a savasság meghatározása (ISO 660:2020) – Az MSZ EN ISO 660:2009 helyett

67.220 Fűszerek és ízesítők. Élelmiszerek adalékanyagai

MSZ EN ISO 7540:2021 Fűszerek és ízesítők. Őrölt édes és csípős paprika (*Capsicum annuum* L. és *Capsicum frutescens* L.). Előírások (ISO 7540:2020) – Az MSZ EN ISO 7540:2010 helyett

MSZ EN ISO 7541:2021 Fűszerek és ízesítők. A paprika extrahálható színének spektrofotometriás meghatározása (ISO 7541:2020) – Az MSZ EN ISO 7541:2010 helyett

67.240 Érzékszervi vizsgálat

MSZ EN ISO 11136:2017/A1:2021 Érzékszervi vizsgálat. Módszertan. Általános útmutató a kedveltségi vizsgálatok levezetésére ellenőrzött területen, fogyasztókkal. 1. módosítás (ISO 11136:2014/Amd 1:2020) – Az MSZ EN ISO 11136:2017 módosítása

2021. március – 2021. május hónapban visszavont szabványok:

07.080 Biológia. Botanika. Zoológia. (Beleértve biotechnológia)

MSZ CR 12250:2000 Biotechnológia. Mikroorganizmusok. Az organizmusok további vizsgálata a 90/679/EEC irányelv szerinti osztályozási munka céljából

MSZ CR 12292:2000 Biotechnológia. Mikroorganizmusok. A növényi kórokozók különféle besorolásának vizsgálata és egy jelentés elkészítése

MSZ CR 12739:2000 Biotechnológia. Kutató, fejlesztő és vizsgáló laboratóriumok. Jelentés a biotechnológiai laboratóriumok veszélyessége szerint szükséges felszereléseinek kiválasztásáról

MSZ CR 12894:2000 Biotechnológia. Mikroorganizmusok. Az állati kórokozók különféle besorolásának vizsgálata és egy jelentés elkészítése

MSZ CR 13426:2000 Biotechnológia. Mikroorganizmusok. Jelentés a genetikailag módosított, I. csoportú mikroorganizmusok osztályzásához alkalmazott kritériumokról

67.060 Gabonafélék, hüvelyesek és a belőlük származó termékek

MSZ EN 13585:2002 Élelmiszerek. Fumonizin B₁ és B₂ meghatározása kukoricában. HPLC-módszer szilárd fázisú extrakciós tisztítással

MSZ ISO 8981:1994 Búza. Fajtaazonosítás elektroforézissel

The following Hungarian standards are commercially available at MSZT (Hungarian Standards Institution, H-1082 Budapest, Horváth Mihály tér 1., phone: +36 1 456 6893, fax: +36 1 456 6841, e-mail: kiado@mszt.hu, postal address: H-1450 Budapest 9., Pf. 24) or via website: www.mszt.hu/webaruhaz.

Review of national standardization

07.100.30 Food microbiology

MSZ EN ISO 6887-3:2017/A1:2021 Microbiology of the food chain. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 3: Specific rules for the preparation of fish and fishery products. Amendment 1: Sample preparation for raw marine gastropods (ISO 6887-3:2017/Amd 1:2020) – which is amendment of the MSZ EN ISO 6887-3:2017

MSZ EN ISO 16140-4:2021 Microbiology of the food chain. Method validation. Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory (ISO 16140-4:2020)

MSZ EN ISO 16140-5:2021 Microbiology of the food chain. Method validation. Part 5: Protocol for factorial interlaboratory validation for non-proprietary methods (ISO 16140-5:2020)

MSZ EN ISO 18593:2018 Microbiology of the food chain. Horizontal methods for surface sampling (ISO 18593:2018) – which has withdrawn the MSZ ISO 18593:2008

13.060 Water quality

MSZ ISO 5667-10:2021 Water quality. Sampling. Part 10: Guidance on sampling of waste water – which has withdrawn the ISO 5667-10:1995

65.120 Animal feeding stuffs

MSZ EN 17374:2021 Animal feeding stuffs: Methods of sampling and analysis. Determination of inorganic arsenic in animal feed by anion-exchange HPLC-ICP-MS

67 Food technology

67.050 General methods of tests and analysis for food products

MSZ EN 16852:2017 Foodstuffs. Determination of ethyl carbamate in stone fruit spirits, fruit marc spirits and other spirit drinks. GC-MS method

MSZ EN 16857:2017 Foodstuffs. Determination of benzene in soft drinks, other beverages and vegetable-based infant foods by headspace gas chromatography mass spectrometry (HS-GC-MS)

MSZ EN 16858:2017 Foodstuffs. Determination of melamine and cyanuric acid in foodstuffs by liquid chromatography and tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

MSZ EN 17424:2021 Foodstuffs. Determination of aflatoxins in spices other than paprika by IAC clean-up and HPLC-FLD with post-column derivatization

67.060 Cereals, pulses and derived products

MSZ EN 15948:2021 Cereals. Determination of moisture and protein. Method using Near-Infrared Spectroscopy in whole kernels – which has withdrawn the MSZ EN 15948:2015

MSZ EN ISO 6647-1:2021 Rice. Determination of amylose content. Part 1: Spectrophotometric method with a defatting procedure by methanol and with calibration solutions of potato amylose and waxy rice amylopectin (ISO 6647-1:2020) – which has withdrawn the MSZ EN ISO 6647-1:2015

MSZ EN ISO 6647-2:2021 Rice. Determination of amylose content. Part 2: Spectrophotometric routine method without defatting procedure and with calibration from rice standards (ISO 6647-2:2020) – which has withdrawn the MSZ EN ISO 6647-2:2015

¹ Hungarian Standards Institution

67.200 Edible oils and fats. Oilseeds

MSZ EN 14105:2021 Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of free and total glycerol and mono-, di-, triglyceride contents – which has withdrawn the MSZ EN 14105:2012

MSZ EN 14112:2021 Fat and oil derivatives. Fatty Acid Methyl Esters (FAME). Determination of oxidation stability (accelerated oxidation test) – which has withdrawn the MSZ EN 14112:2016

MSZ EN ISO 660:2021 Animal and vegetable fats and oils. Determination of acid value and acidity (ISO 660:2020) – which has withdrawn the MSZ EN ISO 660:2009

67.220 Spices and condiments. Food additives

MSZ EN ISO 7540:2021 Spices and condiments. Ground sweet and hot paprika (*Capsicum annuum* L. and *Capsicum frutescens* L.). Specifications (ISO 7540:2020) – which has withdrawn the MSZ EN ISO 7540:2010

MSZ EN ISO 7541:2021 Spices and condiments. Spectrophotometric determination of the extractable colour in paprika (ISO 7541:2020) – which has withdrawn the MSZ EN ISO 7541:2010

67.240 Sensory analysis

MSZ EN ISO 11136:2017/A1:2021 Sensory analysis. Methodology. General guidance for conducting hedonic tests with consumers in a controlled area. Amendment 1 (ISO 11136:2014/Amd 1:2020) – which is amendment of the MSZ EN ISO 11136:2017

Withdrawn national standards from March 2021 to May 2021

07.080 Biology. Botany. Zoology (Including biotechnology)

MSZ CR 12250:2000 Biotechnology. Microorganisms. Further examination of organisms in support of the classification work carried out under directive 90/679/EEC

MSZ CR 12292:2000 Biotechnology. Microorganisms. Examination of the various existing lists of plant pathogens and production of a report

MSZ CR 12739:2000 Biotechnology. Laboratories for research, development and analysis. Report on the selection of equipment needed for biotechnology laboratories according to the degree of hazard

MSZ CR 12894:2000 Biotechnology. Microorganisms. Examination of the various existing lists of animal pathogens and production of a report

MSZ CR 13426:2000 Biotechnology. Microorganisms. Report on the criteria used to classify Group I genetically modified microorganisms

67.060 Cereals, pulses and derived products

MSZ EN 13585:2002 Foodstuffs. Detection of fumonisins B₁ and B₂ in maize. HPLC method with solid phase extraction clean-up

MSZ ISO 8981:1994 Wheat. Identification of varieties by electrophoresis

For further information please contact Ms Anna Szalay, sector manager on food and agriculture, e-mail: a.szalay@mszt.hu

Szerzőink / Authors

ALBERT Ervin Dr.

Állatorvostudományi Egyetem, Patológiai Tanszék
University of Veterinary Medicine, Department of Pathology

AMBRUS Árpád Prof. Dr.

Debreceni Egyetem, Táplálkozás- és Élelmiszertudományi Doktori Iskola
University of Debrecen, Doctoral School of Nutrition and Food Sciences

BÉRI Béla Dr.

Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattudományi, Biotechnológiai és Természetvédelmi Intézet, Állattenyésztési nem önálló Tanszék
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Institute of Animal Science, Biotechnology and Environmental Protection, not independent Faculty of Animal Husbandry

CSORBA Szilveszter

Állatorvostudományi Egyetem, Digitális Élelmiszerlánc Oktatási, Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Intézet
University of Veterinary Medicine, Digital Food Chain Education, Research, Development and Innovation Institute

ERŐS Ágnes

BIOMI Kft.

FARKAS Csaba

Szent István Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézet, Gödöllő
(2021. január 1. óta: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő; a Szerk.)
Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Process Engineering, Gödöllő, Hungary (Since 1st January 2021 Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Technology, Gödöllő, Hungary; the Ed.)

FENYVESI László Prof. Dr.

Szent István Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Géptani és Informatikai Intézet, Gödöllő
(2021. január 1. óta: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő; a Szerk.)
Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Mechanical Engineering and Informatics, Gödöllő (Since 1st January 2021 Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Technology, Gödöllő; the Ed.)

GASPARIKNÉ REICHARDT Judit Dr.

WESSLING Hungary Kft.

HORVÁTH Brigitta

Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management

KEREKES Kata

Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal, Rendszerszervezési és Felügyeleti Igazgatóság
National Food Chain Safety Office, System Management and Supervision Directorate

KERÉNYI Zoltán Dr.

Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár
Hungarian Dairy Experimental Institute Kft., Mosonmagyaróvár

KORCZ Evelin

Magyar Tejgazdasági Kísérleti Intézet Kft., Mosonmagyaróvár; Széchenyi István Egyetem, Wittmann Antal Növény-, Állat- és Élelmiszer-tudományi Multidiszciplináris Doktori Iskola
Hungarian Dairy Experimental Institute Kft., Mosonmagyaróvár; Széchenyi István University, Antal Wittmann Plant, Animal and Food Science Multidisciplinary Doctoral School

MICSINAI Adrienn Dr.

WESSLING Hungary Kft.

PELES Ferenc Dr.

*Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management*

PETRÓCZKI Flóra Mária

*Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Élelmiszertudományi Intézet; Debreceni Egyetem, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management;
University of Debrecen, Faculty of Agricultural and Food Sciences and Environmental Management, Doctoral School of Animal Husbandry Sciences*

PETRÓCZKI Károly Dr.

*Szent István Egyetem, Gépészmérnöki Kar, Folyamatmérnöki Intézet, Gödöllő
(2021. január 1. óta: Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Gödöllő; a Szerk.)
Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Faculty of Mechanical Engineering, Institute of Process Engineering, Gödöllő, Hungary (Since 1st January 2021 Hungarian University of Agriculture and Life Sciences, Institute of Technology, Gödöllő, Hungary; the Ed.)*

POCKLÁN Edit

WESSLING Hungary Kft.

SIPOS Rita Dr.

BIOMI Kft.

SZALAY Anna

*Magyar Szabványügyi Testület
Hungarian Standards Institution*

SZÚCS Kata Dorina

*Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Pázmány Péter Catholic University*

VARGA László Prof. Dr.

*Széchenyi István Egyetem, Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék
Széchenyi István University, Faculty of Agricultural and Food Sciences, Department of Food Science*



Megbízható Mennyiségi Meghatározás

Minden komponens, mátrix és felhasználó esetében

A tudományos és üzleti célok elérése csak megbízható eredmények birtokában lehetséges.

A felhasználási területtől függetlenül a Thermo Scientific™ TSQ hármas kvadrupol tömegspektrometriás rendszerei kiemelkedő precizitást biztosítanak a mennyiségi meghatározási feladatokra. Nagy felbontású SRM üzemmód, robusztusság, megbízhatóság és érzékenység egy készülékben, mely segítségével minden felhasználó a mérendő komponenstől vagy a mátrixtól függetlenül megbízható mérési eredményekhez juthat.



Thermo Scientific™ TSQ Altis™
hármas kvadrupol tömegspektrométer



Thermo Scientific™ TSQ Quantis™
hármas kvadrupol tömegspektrométer



Thermo Scientific™ TSQ Fortis™
hármas kvadrupol tömegspektrométer

További információk:

thermofisher.com/confidentquantitation

Kizárólagos képviselő:

UNICAM Magyarország Kft.
1144 Budapest, Kőszeg utca 25.
Telefon: +36 1 221 5536
E-mail: unicam@unicam.hu
Web: www.unicam.hu

UNICAM

Élelmiszervizsgálati Közlemények / Journal of Food Investigation

Kiadó / Publisher: Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Nonprofit Kft. / Wessling International Research and Educational Centre Nonprofit Ltd. / **HU ISSN 2676-8704**

Felelős kiadó / Director: Dr. ZANATHY László ügyvezető igazgató / CEO

Főszerkesztő / Editor in chief: Dr. SZIGETI Tamás János

Szerkesztő / Editor: KONECSNY Tímea, SZUNYOGH Gábor

Angol fordítás / English translation: Dr. HANTOSI Zsolt

Honlap adminisztrátor / web admin.: JUHÁSZ Péter

Szerkesztőbizottság / Editorial Board:

- AMBRUS Árpád Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal (NÉBIH) főtanácsadó;
Retired university professor, National Food Chain Safety Office (NFCSO) chief advisor*
- BÁNÁTI Diána Dr. *Egyetemi tanár, rektori megbízott, Szegedi Tudományegyetem Mérnöki Kar;
Full professor special advisor of the rector University of Szeged Faculty of Engineering*
- BARNA Sarolta Dr. *Igazgató, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal, Élelmiszerbiztonsági Kockázatértékelési Hivatal (NÉBIH, KÉI);
Director of National Food Chain Safety Office, Directorate of Risk Assessment (NFCSO, DRA)*
- BÉKÉS Ferenc Dr. *Az MTA külső tagja, igazgató, FBFD PTY LTD NSW Ausztrália;
External Member of Hung. Acad. Sci., director of FBFD PTY LTD NSW Australia*
- BIACS Péter Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE);
Retired university professor Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS)*
- BIRÓ György Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar;
Retired university professor, Semmelweis University, Faculty of Health Sci.*
- BOROSS Ferenc Dr. *Ügyvezető elnök, Európai Minőségügyi Szervezet, Magyar Nemzeti Bizottság (EOQ MNB); Executive chairman, European Organization for Quality, Hungarian National Committee (EOQ HNC)*
- CSAPÓ János Dr. *Egyetemi tanár, Debreceni Egyetem, Sapientia Egyetem, Csíkszeredai Kar;
University professor, University of Debrecen, Sapientia Univ., Miercurea Ciuc)*
- DANK Magdolna Dr. *Egyetemi tanár, Semmelweis Egyetem, Onkológiai Intézet;
University professor, Semmelweis University, Institute of Oncology*
- FARKAS József Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, akadémikus;
Retired university professor, academician*
- GAGÁN Anita *J.S. Hamilton Hungaria Kft.*
- GYIMES Ernő Dr. *Egyetemi docens, Szegedi Tudományegyetem, Mérnöki Kar;
University docent, University of Szeged Faculty of Engineering*
- GYŐRI Zoltán Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, intézetigazgató, Debreceni Egyetem;
Retired university professor, institute director, University of Debrecen*
- HANTOSI Zsolt Dr. *Angol nyelvi lektor, WESSLING Hungary Kft.; English lecturer, WESSLING Hungary Kft.*
- KASZA Gyula Dr. *Osztályvezető, Kockázatmegelőzési és Oktatási Osztály, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal (NÉBIH),
Egyetemi docens, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE),
Címzetes egyetemi tanár, Állatorvostudományi Egyetem;
Head of Department of Risk Prevention and Education, National Food Chain Safety Office (NFCSO),
Associate professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS),
Honored university professor, University of Veterinary Science*
- KONECSNY Tímea *Szerkesztő, WESSLING Hungary Kft.; Editor, WESSLING Hungary Kft.*
- KOVÁCS Béla Dr. *Egyetemi tanár, Debreceni Egyetem;
University professor, University of Debrecen*

- MARÁZ Anna Dr. *Egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE); University professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS)*
- MOLNÁR Pál Dr. *Egyetemi tanár, Szegedi Egyetem Mérnöki Kar, elnök, Európai Minőségügyi Szervezet, Magyar Nemzeti Bizottság (EOQ MNB); University professor, University of Szeged Faculty of Engineering, chairman, European Organization for Quality, Hungarian National Committee (EOQ HNC)*
- NAGY Edit *Főtitkár, MAVÍZ; Secretary general, Hungarian Water Utility Association*
- POPOVICS Anett Dr. *Egyetemi adjunktus, Óbudai Egyetem, Keleti Károly Gazdasági Kar; Senior lecturer, University of Óbuda, Keleti Károly Faculty of Economics*
- SALGÓ András Dr. *Nyugalmazott egyetemi tanár, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem; Retired university professor, Budapest Technical University*
- SÁRDI Éva Dr. *Egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Genetika és Növénynevelés Tanszék; University professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS), Department of Genetics and Plant Breeding*
- SIMONNÉ SARKADI Livia Dr. *Habil. egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Élelmiszertudományi Kar; Habil. university professor, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences, (HUALS) Faculty of Food Sciences*
- SIPOS László Dr. *Egyetemi docens, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem (MATE), Árukezelési és Érzékszervi Minősítési Tanszék; University docent, Hungarian University of Agricultural and Life Sciences (HUALS), Department of Commodity Management and Sensory Qualification*
- SOHÁR Pálné Dr. *Nyugalmazott főosztályvezető, NÉBIH; Retired head of department, NFCSO*
- SZABÓ S. András Dr. *Tanár, Ward Mária Gimnázium; Professor, Ward Mária High School*
- SZALAY Anna *Szabványosító menedzser, Magyar Szabványügyi Testület (MSZT); Standardization manager, Hungarian Standards Institution (HSI)*
- SZEITZNÉ SZABÓ Mária Dr. *Nyugalmazott igazgatóhelyettes, Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági hivatal, Élelmiszerbiztonsági Kockázatértékelési Hivatal (NÉBIH, KÉI); Retired deputy director of National Food Chain Safety Office, Directorate of Risk Assessment (NFCSO, DRA)*
- SZIGETI Tamás János Dr. *Főszerkesztő, WESSLING Nonprofit Kft., Üzletfejlesztési igazgató, WESSLING Hungary Kft., Címzetes főiskolai docens, Szegedi Egyetem Mérnöki Kar; Editor in chief, WESSLING Nonprofit Ltd., Business developing manager, WESSLING Hungary Kft., Honorary docent, University of Szeged Faculty of Engineering*
- SZUNYOGH Gábor *Szerkesztő, WESSLING Nonprofit Kft., Osztályvezető, WESSLING Hungary Kft., Marketing osztály; Editor, WESSLING Nonprofit Ltd., Head of Marketing Department, WESSLING Hungary Ltd.*
- TÖMÖSKÖZI Sándor Dr. *Egyetemi docens, Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem; University docent, Budapest Technical University*
- VARGA László Dr. *Egyetemi tanár, Széchenyi István Egyetem Mezőgazdaság- és Élelmiszertudományi Kar, Élelmiszertudományi Tanszék Mosonmagyaróvár; University professor, Széchenyi István University, Faculty of Food and Agricultural Sciences, Department of Food Science, Mosonmagyaróvár*
- WESSLING, Diana *A családi vállalkozás képviselője, résztulajdonos, WESSLING Cégcsoport; Representative family business, shareholder, WESSLING Holding GmbH & Co. KG, Altenberge, Germany*
- ZANATHY László Dr. *Felelős kiadó, ügyvezető igazgató, WESSLING Nonprofit Kft., Ügyvezető igazgató, WESSLING Hungary Kft.; Responsible publisher, CEO, WESSLING Nonprofit Ltd. CEO, WESSLING Hungary Ltd.*

Grafika / Graphic design: Adworks Kft., info@adworks.hu

Elérhetőségeink / Contact: H-1045 Budapest, Anonymus utca 6., +36 1 87 23 662, www.eviko.hu
sziget.tamas@wessling.hu, +36 30 39 69 109; konecsny.timea@wessling.hu, +36 20 53 51 160

Kéziratok fogadása / Receiving manuscripts: sziget.tamas@wessling.hu, konecsny.timea@wessling.hu

Hirdetés / Advertising: Konecsny Tímea, +36 20 53 51 160, konecsny.timea@wessling.hu

A lap negyedévente, elektronikus formában jelenik meg. / This journal appears quarterly in a year, in electronic form.

Minden jog fenntartva! / All right reserved!

A kiadó írásbeli hozzájárulása nélkül tilos a kiadvány bármilyen eljárással történő sokszorosítása, másolása, illetve az így előállított másolatok terjesztése. / Without the written permit of the publisher, duplication, copying or dissemination of this paper by any way is prohibited.

Az Élelmiszervizsgálati Közleményeket a Wessling Nemzetközi Kutató és Oktató Központ Nonprofit Kft. adja ki a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatallal (NÉBIH) együttműködve. / This Journal of Food Investigation is issued by the Wessling International Research and Educational Centre Nonprofit Ltd. with cooperation the National Food Chain Safety Office (NÉBIH).

A szakfolyóiratot a következő figyelő szolgáltatások vették jegyzékbe és referálják / The Journal of Food Investigation is have been referred and listed by the next monitoring services: SCOPUS, SCIMAGO, MATARKA / *Hungarian Periodicals Table of Contents*, Magyar Tudományos Akadémia Könyvtár és Információs Központ, Magyar Tudományos Művek Tára / *Hungarian Academy of Sciences, Library of Information Centre, Hungarian Scientific Bibliography Database* / *Publishers International Linking Association Inc. (Crossref (DOI) Registration Agency)*