

Aktualności

bioMérieux



*Cytometry jako
część procesu produkcyjnego*



BIOMÉRIEUX
INDUSTRY

Spis treści

- 2 od wydawcy
- 3 Nowe wytyczne w zakresie wytwarzania i stosowania pożywek mikrobiologicznych
- 6 Czuła analiza w kilka minut
- 8 Oznaczanie liczby drożdży w wybranych fermentowanych produktach mleczarskich z wykorzystaniem systemu TEMPO® YM
- 11 bioMérieux wprowadza nowy test TEMPO® AC, do szybkiego liczenia ogólnej liczby drobnoustrojów w żywności
- 13 Enterotoksyny gronkowcowe – zagrożenie mikrobiologiczne i wykrywanie

wydawca: bioMérieux Polska Sp. z o.o.

Osoba odpowiedzialna: Elżbieta Wójcik

Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 15:

Dorota Pawluch
Artur Gąsior
Czesław Mitek
Jacek Charliński
Aneta Lesiuk (korekta)

Adres redakcji i wydawcy:

bioMérieux Polska
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajączka 9
tel. (22) 569 85 00 • fax (22) 569 85 54
www.biomerieux.pl

opracowanie graficzne i druk:

Agencja Wydawnicza SOWA
www.agencja-sowa.com.pl

od wydawcy

Szanowni Państwo!

Mam nadzieję, że artykuły, które zamieściliśmy w numerze 15. „Aktualności Industry”, spełnią Państwa oczekiwania. Bardzo prosimy o opinie, które będą dla nas wskazaniem, co powinniśmy zmienić w przyszłości i jakie tematy są dla Państwa ważne.

Przedstawiamy Państwu kolejne produkty firmy AESChemunex, które weszły do naszej oferty. Cytometry przepływowe przeznaczone do badania jałowości lub liczenia drobnoustrojów w żywności, farmaceutykach i kosmetykach. Wykorzystanie cytometrów: BactiFlow ALS, D-Count i ChemScan RDI jako część procesu produkcyjnego skraca czas oczekiwania na wyniki badań surowców i gotowych produktów do 24. godzin.

Prezentujemy nowe wytyczne w zakresie wykorzystania i stosowania pożywek mikrobiologicznych.

Mówimy na temat enterotoksyny gronkowcowej będącej przyczyną wielu zatruc pokarmowych.

W 15. numerze „Aktualności Industry” znajdziecie Państwo artykuł na temat wykorzystania systemu Tempo do oznaczania liczby drożdży w wybranych fermentowanych produktach mleczarskich.

Szanowni Państwo, uprzejmie informujemy, że od 01.06.2013 nie będą dołączane do przesyłek certyfikaty kontroli jakości w formie wydrukowanej.

Certyfikaty kontroli jakości dla naszych produktów są dostępne w formie elektronicznej na stronie

www.mybiomerieux.com.

Aby uzyskać dostęp do danych biblioteki, należy się zarejestrować na www.mybiomerieux.com:

- na stronie głównej w prawym górnym rogu można wybrać język polski,
- kliknąć w „ZAŁÓŻ KONTO”.

Po wypełnieniu wszystkich wymaganych pól, otrzymacie Państwo wiadomość elektroniczną z potwierdzeniem loginu i hasła.

Dorota Pawluch



Dyrektor ds. Marketingu i Sprzedaży
Mikrobiologia Przemysłowa

Nowe wytyczne w zakresie wytwarzania i stosowania pożywk mikrobiologicznych

Krzysztof Kwiatek¹, Dorota Pawluch²

¹ Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

² bioMérieux Polska Sp. z o.o

Jakość pożywk mikrobiologicznych stosowanych w różnego rodzaju badaniach laboratoryjnych, a więc i wiarygodność otrzymanego wyniku, uzależniona jest od wielu czynników, a w szczególności od jakości poszczególnych składników i substancji stosowanych, poprawności procedur przygotowania czy odpowiedniego procesu pakowania i przechowywania. Wytwórca pożywk lub laboratorium je przygotowujące muszą zapewnić, że gotowa do użycia pożywka odpowiada pod względem cech fizycznych, chemicznych i biologicznych określonej standardowi. Zatem wdrożony system jakości w laboratorium powinien zapewniać otrzymanie odpowiednich cech wytworzonej i używanej w badaniach pożywki w zakresie parametrów ogólnych i hodowlanych. Stąd obecne dążenie w skali międzynarodowej do standaryzacji metod badań mikrobiologicznych. Chodzi bowiem o opracowanie, a następnie zastosowanie w praktyce laboratoryjnej jednolitych metod badań mikrobiologicznych, odpowiednich dla różnego rodzaju matryc, dających powtarzalne oraz wiarygodne wyniki. W efekcie pozwoli to, aby były one porównywalne w przypadku wykonywania badań tej samej próbki w różnych laboratoriach niezależnie od miejsca czy kraju. W rezultacie powinno to pozwolić na wiarygodną, pełną i szybką identyfikację czynników zagrożeń mikrobiologicznych występujących w żywności, paszach i wodzie oraz ułatwiać podejmowanie coraz bardziej obiektywnych decyzji producenckich i administracyjnych przez organy kontrolne.

Standaryzacja metod wytwarzania, stosowania i kontroli jakości pożywk

Wyrazem dążenia do dalszej optymalizacji wytwarzania i harmonizacji metod kontroli jakości stosowanych pożywk jest ostatnio opracowany oraz poddany procedurze głosowania projekt normy ISO/DIS 11133-1:2012 pt.: Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. „Mikrobiologia żywności i pasz – Przygotowywanie, wytwarzanie, przechowywanie i kontrola jakości pożywk”. Głosowanie nad niniejszym projektem trwało do 2 stycz-

nia 2013 roku i zakończyło się przyjęciem projektu do publikacji. Norma ISO/DIS 11133 zawiera ogólną terminologię odnoszącą się do kontroli pożywk stosowanych w badaniach mikrobiologicznych żywności, pasz oraz wszystkich rodzajów wody. Ponadto podaje w sposób kompleksowy wytyczne systemu kontroli jakości i wymagań w procesie przygotowywania oraz stosowania pożywk w badaniach laboratoryjnych. Podobnie jak, w poprzednich wydaniach norm z tego zakresu, określono, że podane wymagania mają zastosowanie do kategorii pożywk wykorzystywanych w laboratoriach, które są przygotowywane i/lub używane podczas wykonywania analiz mikrobiologicznych, a mianowicie:

- gotowych do użycia pożywk wytworzonych w celach handlowych;
- pożywk wymagających upłynnienia, uzupełnienia i rozlania;
- pożywk przygotowanych z dostępnych na rynku suchych półproduktów;
- pożywk przygotowanych z pojedynczych składników.

Dla celów niniejszej normy podano szereg ujednoczonych terminów i definicji związanych z wytwarzaniem i kontrolą pożywk. Na podkreślenie zasługuje fakt, że w omawianej normie podano szereg definicji dla różnych rodzajów pożywk, począwszy od definicji ogólnej co to jest pożywka, poprzez pożywki klasyfikowane na podstawie składu, konsystencji, sposobu użycia i przygotowania, a skończywszy na pożywce referencyjnej.

Terminologia pożywkarska

Omawiana norma w rozdziale 3 zawiera ogólną terminologię odnoszącą się do systemu zapewnienia jakości przygotowywanych pożywk stosowanych w badaniach mikrobiologicznych produktów spożywczych, pasz i wody.

Wart podkreślenia jest fakt, że w prezentowanej normie podano bardzo istotną z praktycznego punktu widzenia praktyczną klasyfikację i definicje dotyczące drobnoustrojów testowych, a mianowicie co to jest:

- organizm testowy (ang. test organism) – jest to drobnoustroj ogólnie stosowany do kontroli przydatności pożywk;

- szczep referencyjny – (ang. reference strain) - drobnoustroj otrzymany bezpośrednio z uznanej kolekcji szczepów, która znajduje się na liście Światowej Federacji Kolekcji Szczepów (ang. World Federation of Culture Collections) lub Europejskiej Organizacji Kolekcji Szczepów (ang. European Culture Collections Organisation), określony przynajmniej co do rodzaju i gatunku, skatalogowany i opisany pod względem cech, przy jednoczesnym wskazaniu preferowanego źródła pochodzenia, takiego jak żywność lub woda, jeżeli to ma zastosowanie;
- szczep macierzysty (ang. reference stock) – szczep macierzysty - zestaw odrębnych, identycznych szczepów, uzyskanych w laboratorium z pierwszego pasażu szczepu referencyjnego otrzymanego z laboratorium lub też od dostawcy;
- kultura macierzysta (ang. stock culture) - pierwsza kultura otrzymana ze szczepu referencyjnego;
- kultura robocza (ang. working culture) – jest to kultura uzyskana ze szczepu referencyjnego lub szczepu macierzystego lub materiału referencyjnego, certyfikowana lub nie certyfikowana.

Ponadto w omawianym dokumencie zdefiniowano, że materiał referencyjny to materiał zawierający określoną liczbę możliwych do ożywienia drobnoustrojów, równomiernie rozmieszczonych, o stabilnej liczbie. Certyfikowany materiał referencyjny to materiał, w którym liczba drobnoustrojów jest potwierdzona odpowiednim certyfikatem.

Pożywki gotowe do stosowania

W rozdziale 4 norma podaje wytyczne dotyczące zapewnienia jakości pożywek w czasie ich przygotowania i stosowania. W pierwszej kolejności określono, że w systemie zapewnienia jakości zaleca się, aby wytwórca lub producent pożywek udostępnił klientowi następujące dane:

- nazwę pożywki, pojedyncze składniki i suplementy oraz kody tych produktów;
- kartę specyfikacji technicznej;
- informacje o zasadach bezpieczeństwa i/lub zagrożeniach, o ile jest to konieczne;
- numer partii/serii;
- docelowy odczyn pH kompletnej pożywki przed zastosowaniem;
- informacje dotyczące przechowywania i przydatności do stosowania;
- certyfikat kontroli jakości i nazwę użytych organizmów testowych;
- wyniki testów kontrolnych w zakresie przydatności pożywki z uwzględnieniem kryteriów ich akceptacji.

W procesie akceptacji produktów przy dostawie dla każdej partii produktu (składnik lub pożywka) należy sprawdzić następujące dane: znaki identyfikacyjne produktu, integralność opakowania, datę ważności produktu i dołączoną dokumentację. Ponadto należy zapisać datę otrzymania produktu. W trakcie przechowywania pożywek we wszystkich sytuacjach postępować zgodnie z instrukcją producenta, dotyczącą warunków przechowywania, daty ważności i stosowania.

Zarządzanie jakością, kontrola gotowych do użycia i suchych pożywek oraz suplementów

W przypadku stosowania gotowych, dostępnych w handlu pożywek należy przestrzegać instrukcji producenta w zakresie warunków przechowywania, przydatności do użycia i stosowania.

Pożywki suche dostarczane są w szczelnie zamkniętych pojemnikach w postaci suchego proszku lub granulatu. Suplementy mające właściwości selektywne lub substancje diagnostyczne dostarczane są w postaci zliofilizowanej lub płynnej. Jednak zaleca się, aby zakupy były planowane w sposób zapewniający obrót w magazynie zgodnie z zasadą „pierwsze przyszło – pierwsze wyszło (first in – first out)”. W ramach prowadzonej gospodarki magazynowej pożywek należy sprawdzić szczelność opakowania, zapisać datę pierwszego otwarcia i ocenić wizualnie zawartość otwartego opakowania. Szczególnie po otwarciu nowego pojemnika jakość pożywki zależy od warunków przechowywania. Na utratę jakości suchej (odwodnionej) pożywki wskazuje zmiana konsystencji sproszkowanej pożywki, jej jednorodności, występujące zbrzylenia czy zmiana zabarwienia. Każda sucha pożywka, która wchłonęła wilgoć lub wykazuje jakiegokolwiek zmiany fizykochemiczne, powinna być wybrakowana.

Ogólne zasady przygotowania pożywek w laboratorium

W rozdziale 4.3 omawianej normy stwierdzono, że właściwe przygotowanie pożywki jest jednym z najważniejszych etapów badania mikrobiologicznego i należy zwracać na to baczną uwagę. W szczególności należy zadbać o przestrzeganie zasad dobrej praktyki laboratoryjnej (GLP) oraz zaleceń producenta pożywki w zakresie postępowania z suchymi pożywkami i innymi składnikami, zwłaszcza tymi zawierającymi niebezpieczne materiały, takie jak sole żółci czy inne selektywne czynniki.

Przygotowywanie suplementów stosowanych w procesie sporządzania pożywek

W normie podkreślono, że nie można stosować suplementów po upływie okresu trwałości określonym przez producenta. W przypadku roztworów roboczych antybiotyków należy zużyć je tego samego dnia. W pewnych warunkach roztwory antybiotyków mogą być przechowywane w stanie zamrożenia, ale po rozmrożeniu nie mogą być one ponownie zamrażane. Zaleca się, aby stopień potencjalnej utraty aktywności antybiotyków w trakcie mrożenia był ustalony z producentem lub określony przez użytkownika. Wyprodukowane suplementy zawierające substancje toksyczne, szczególnie antybiotyki, powinny być traktowane z ostrożnością w celu uniknięcia pylenia się, co może powodować reakcje alergiczne u personelu laboratorium podczas przygotowywania roztworów. Podczas przygotowywania roztworów należy zastosować wszelkie środki ostrożności i postępować zgodnie z zaleceniami producenta.

Zasady przechowywania i określania trwałości przygotowanych pożywek

Okres trwałości pożywek mikrobiologicznych jest zróżnicowany w zależności od rodzaju i warunków przechowywania. Określone warunki i okresy trwałości mogą być zawarte w odpowiednich normach międzynarodowych i krajowych. Pożywki należy przechowywać w warunkach zapobiegających wystąpieniu jakichkolwiek modyfikacji ich składu, chroniąc przede wszystkim przed światłem, odwodnieniem oraz – jeżeli to konieczne – przechowywać w lodówce w temperaturze $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$. Na ogół zaleca się, aby nie przechowywać płytek z rozlaną pożywką dłużej niż 2 do 4 tygodni, natomiast w przypadku pożywek rozlanych do butelek lub probówek okres ten wynosi od 3 do 6 miesięcy, jeżeli nie jest to inaczej podane w odpowiednich normach. Na podstawie wyników laboratoryjnych badań walidacyjnych trwałości czas przechowywania pożywek może być wydłużony. Zaleca się, aby pożywki, do których zostały dodane niestabilne suplementy, były użyte w dniu ich przygotowania. Inne okresy mogą być stosowane w przypadku istnienia zapisów w odpowiednich normach lub gdy wykazano w laboratoryjnych badaniach walidacyjnych dłuższy okres trwałości. Zaleca się, aby stałe pożywki zawierające chemicznie reaktywne i/lub niestabilne substancje nie były przechowywane na zapas w magazynie przed upłynięciem. Zaleca się, aby dla każdej pożywki przeznaczonej do przechowywania była ustalona zwalidowana data trwałości/przydatności. Obserwować należy również wszelkie zmiany zabarwienia pożywki, oznaki jej parowania/odwodnienia lub wzrost drobnoustrojów. Partie pożywek wykazujące takie zmiany nie powinny być stosowane w badaniach. Przed użyciem lub dalszą obróbką cieplną zaleca się wyrównanie temperatury pożywki z temperaturą otoczenia.

W przypadku pożywek gotowych należy przestrzegać zaleceń producenta w zakresie przechowywania, okresu trwałości i stosowania.

Przygotowanie stałych pożywek agarowych na płytkach Petriego

Agar rozlewać na płytki w taki sposób, aby grubość warstwy pożywki wyniosła przynajmniej 3 mm (do płytek Petriego o średnicy 90 mm zazwyczaj wlewa się od 18 do 20 ml agaru). Płytki przykryć wieczkami i pozostawić do zestalenia na wypoziomowanej chłodnej powierzchni. Jeżeli płytki są przechowywane lub inkubowane dłużej niż 72 h lub w temperaturze powyżej 40°C , rozlewać większą objętość pożywki. W czasie inkubacji posiewów dochodzi nieuchronnie do utraty wody z pożywki agarowej, co w pewnych sytuacjach może wpływać na wzrost drobnoustrojów. Ważnym elementem GLP jest to, aby natychmiast po przygotowaniu zużyć pożywkę agarową lub zapewnić takie warunki przechowywania, które chronią ją przed zmianą

składu, tj. przechowywać w ciemności i/lub w chłodniarce w temperaturze $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ w szczelnych torebkach.

Kontrola jakości pożywek

Do parametrów jakościowych o charakterze hodowlanym stosowanych w prowadzonych w zakresie tzw. kontroli szczegółowej zaliczyć należy: jałowość, żyźność, selektywność, specyficzność cech biochemicznych i fizjologicznych i cechy umożliwiające prowadzenie badań w kierunku obecności substancji hamujących.

Kontrola właściwości fizycznych pożywek w laboratorium obejmuje następujące parametry: pomiar odczynu pH w temperaturze $20\text{--}25^{\circ}\text{C}$, pomiar objętości rozlanej pożywki lub grubość warstwy agarowej, wygląd zewnętrzny, zabarwienie, stopień ujednoczenia składu, ocenę przejrzystości, występowanie optycznych artefaktów, zbadanie siły żelującej, konsystencji i wilgotności pożywek agarowych.

Dla oceny jakości pożywek i składników pożywkarskich w zakresie zapewnienia warunków do wzrostu stosuje się ocenę ilościową i ocenę jakościową. Dla metod ilościowych zaleca się, ażeby dodatkowo stosować specjalną, referencyjną pożywkę. Przy prowadzeniu oceny jakościowej stosowanie pożywki referencyjnej pomaga w interpretacji wyniku.

Wyrazem kompleksowego podejścia do kwestii zapewnienia jakości wytwarzanych pożywek są dołączone aneksy do normy ISO/DIS 11133/2012, a mianowicie:

1. Aneks A – Nazewnictwo składników pożywek w normach z zakresu badania żywności, pasz i wody.
2. Aneks B – Schemat przygotowywania szczepu macierzystego i kultury roboczej.
3. Aneks C – Schemat przepływowi metod jakościowych i ilościowych badania jakości pożywek.
4. Aneks D – Przykładowa karta do rejestrowania wyników kontroli pożywek w laboratorium.
5. Aneks E – Drobnoustroje testowe do oceny pożywek powszechnie stosowanych w mikrobiologii żywności.
6. Aneks E – Drobnoustroje testowe do oceny pożywek powszechnie stosowanych w mikrobiologii wody.
7. Aneks F – Stosowanie kart kontrolnych do monitorowania oceny ilościowej stałych pożywek.
8. Aneks H – Zapewnienie jakości pożywek.

Reasumując można stwierdzić, że proponowane do wdrożenia wytyczne stanowią dobrą podstawę do dalszego postępu w zakresie doskonalenia systemu zapewnienia jakości stosowanych pożywek mikrobiologicznych i podnoszenia poziomu wiarygodności wyniku badania laboratoryjnego.

Piśmiennictwo u Autora.



Czuła analiza w kilka minut

Zwolnienie napojów dzięki automatycznym cytometrom przepływowym

Obecnie w dobie szybkich analiz, bezpieczne i szybkie zwolnienie produktów staje się coraz bardziej znaczącym czynnikiem.

Z uwagi na to, że klasyczna mikrobiologia ograniczona jest stopniem wzrostu mikroorganizmów na podłożach hodowlanych, mikrobiologiczne systemy szybkich analiz w ciągu ostatnich pięciu lat cieszyły się coraz większym zainteresowaniem. GETRÄNKEINDUSTRIE przeprowadziło wywiad z Elke Karches, liderką działu mikrobiologii w Eckes-granini, w kontekście zastosowania automatycznych cytometrów przepływowych do zwalniania badanych wyrobów gotowych.

GETRÄNKEINDUSTRIE: *Jakie były powody, dla których Eckes-granini zakupiło szybki system mikrobiologicznych analiz w zapewnieniu jakości?*

Elke Karches: Z powodu nowej strategii marketingowej oraz zmieniających się wymagań klientów na początku 2004 roku zmieniono opakowania produktów Eckes-granini z tradycyjnych butelek na nowoczesne butelki PET.

Podstawą tej zmiany jest nowa technologia napełniania wymagająca aseptycznych warunków pracy. W przeciwieństwie do tradycyjnego, ciepłego napełniania, aseptyczne, zimne napełnianie nie zabezpiecza przeciw zanieczyszczeniom przez oddziaływanie termiczne.

Oznacza to, że każde zanieczyszczenie mikrobiologiczne może powodować zepsucie produktu. Oprócz kompleksowych badań kontrolnych w czasie produkcji, badania mikrobiologiczne procesu produkcyjnego oraz wyrobów gotowych odgrywają kluczową rolę w ocenie higieny zakładu produkcyjnego. Aby móc jak najszybciej wydawać atesty dotyczące jałowości, zdecydowaliśmy się na wdrożenie systemu szybkiej analizy mikrobiologicznej razem z instalacją linii PET.

GI: *Dlaczego zdecydowaliście się na wdrożenie systemu D-Count firmy Chemunex?*

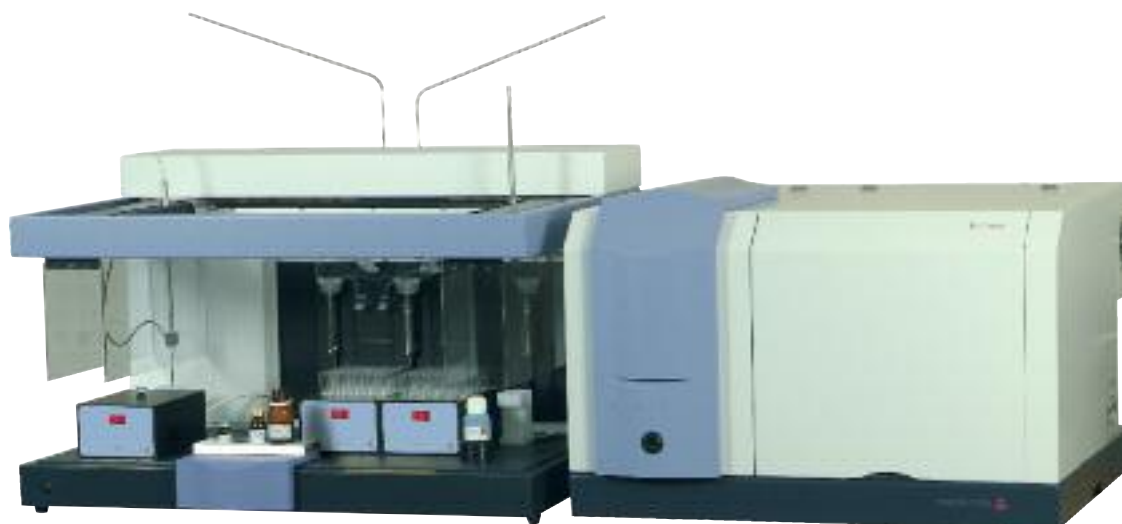
Karches: Chcieliśmy aby szybkie metody badań spełniały następujące wymogi:

- w pełni automatyczne badanie próbek,
- wykrywanie możliwie niskich poziomów zanieczyszczeń,
- wykrywanie wszystkich mikroorganizmów, które mogą powodować zepsucie produktu,
- pewność i odtwarzalność wyników.

Badania porównawcze różnych systemów dostępnych na rynku wykazały, że D-Count jest najlepszym systemem spełniającym nasze wymagania.

GI: *Jak przebiegał proces wprowadzenia systemu szybkich analiz mikrobiologicznych? Jakie aspekty należy rozważyć przed i w trakcie instalacji?*

Karches: W każdym przypadku metoda powinna być walidowana w porównaniu z metodą stosowaną wcześniej. W tym celu wykonano pracę badawczą w Eckes-granini. Badane produkty kontaminowano różnymi drobnoustrojami, następnie wykonano analizę polegającą na wykryciu wzrostu mikroorganizmów z zastosowaniem metod klasycznych oraz z użyciem cytometru. Ponieważ wykazano dobrą zgodność wyników, metoda mogła być wybrana jako standardowa w badaniach.



D-Count jest automatycznym cytometrem przepływowym przeznaczonym do laboratoriów o średniej i dużej przepustowości próbek.

W pełni zautomatyzowany cytometr przepływowy

Oferowany przez firmę Chemunex system D-Count® przeznaczony do mikrobiologicznego zwalniania napojów oraz wsadów owocowych, będąc w pełni zautomatyzowanym cytometrem przepływowym, zapewnia automatyczne przygotowanie próbki, prostotę obsługi, bardzo czułą analizę ilościową w czasie kilku minut. Zasadniczo czas zwalniania produktu jest zredukowany o dwa do pięciu dni.

Cytometry przepływowe umożliwiają badania wszystkich produktów gazowanych – napojów zawierających wsady owocowe, jak również napojów alkoholowych – zasadniczo bez interferencji pochodzącej od produktu. Poza tym metoda ta wykrywa również żywe mikroorganizmy, które nie wzrastają na odpowiednich podłożach hodowlanych (żywe, ale nie dające się hodować).

System automatycznie znakuje mikroorganizmy obecne w produkcie za pomocą opatentowanego markera Fluorassure, który zapewnia wiarygodne rozróżnienie pomiędzy żywymi a martwymi komórkami.

Po wyznakowaniu mikroorganizmów próbka jest automatycznie wstrzykiwana do przepływu w świetle lasera w automatycznym cytometrze przepływowym. Tutaj wyznakowane mikroorganizmy przepływają jeden po drugim w strumieniu światła lasera i są wykrywane przez czułe fotodetektory. Następnie wyniki analizy podawane są jako komórki na gram lub mililitr.

Obecnie w branży napojów w D-Count® stosowane są następujące aplikacje:
Zwolnienie po produkcji:

Wykrywanie drożdży i bakterii w napojach poddawanych filtracji	48 godzin
Wykrywanie drożdży w napojach poddawanych filtracji	22 godziny
Wykrywanie ogólnej liczby drobnoustrojów w napojach niepoddawanych filtracji	72 godziny
Wykrywanie ogólnej liczby drobnoustrojów w koncentratkach	48 godzin
Badania jałowości w produktach UHT	48 godzin
Wykrywanie ogólnej liczby drobnoustrojów w wodzie	30 minut
Specyficzne wykrywanie <i>Enterobacteriaceae</i> w wodzie	10 minut
Specyficzne wykrywanie <i>Alicyclobacillus</i> w wodzie i koncentratkach	48 godzin

Wydajność automatycznego cytometru przepływowego pozwala na wykonanie od 250 do 1000 analiz w ciągu jednej zmiany roboczej, zależnie od rodzaju aplikacji. System może być obsługiwany przez jedną osobę.

Dużą zaletą takiego podejścia było to, że badania z użyciem nowego urządzenia wykonywane były przez osobę, która na co dzień nie jest związana z pracą w laboratorium. Pozwoliło to na wysunięcie obiektywnych wniosków z doświadczeń, które mogły być następnie przekazane innym użytkownikom. Testowana metoda była walidowana, zanim dokonano instalacji linii PET. Dzięki temu początkowe problemy mogły być rozwiązane na samym początku badań, jak również możliwe było sprawdzenie cytometru w rutynowej pracy.

GI: W jakich sektorach produkcji D-Count posiada największe zalety?



BactiFlow, jest półautomatycznym, najlepszym rozwiązaniem dla małych i średnich serii.

Karches: Obecnie zastosowanie wspomnianych testów jest ograniczone do badania wyrobów gotowych. W kontekście przyszłego rozwoju testujemy bardzo dużą liczbę aplikacji.

GI: W jaki sposób metoda jest stosowana i jak wpływa ona na zwolnienie produktu?

Karches: Dzięki badaniom sprawdzającym, które zostały opracowane w kontekście wspomnianej wcześniej pracy naukowej, wykazano że nawet wolno-rosnące drobnoustroje mogą być wykryte. Próby są inkubowane w warunkach tlenowych przez 72 godziny, następnie poddawane są badaniom w D-Count i jeśli wyniki są ujemne, produkty mogą być natychmiast zwolnione. W ten sposób nasza firma zyskuje około pięciu dni w porównaniu z tradycyjną metodą płytkową.

GI: Czy stosujecie Państwo równoległe klasyczną metodę badań na podłożach hodowlanych?

Karches: Na początku wykonywane były badania porównawcze na płytkach i równoległe z użyciem cytometru. Z powodu zgodności wyników oraz zwiększającej się pewności wyników uzyskiwanych w badaniach z użyciem cytometru mogliśmy zrezygnować z badań klasycznych.

GI: Czy widzi Pani zalety nowej metody tylko w zapewnieniu jakości, czy są też zalety dla firmy jako całości?

Karches: Dzięki wynikom z szybkiej analizy mikrobiologicznej możliwa była redukcja czasu kwarantanny, co przyczyniło się do zwiększenia przestrzeni magazynowej, równocześnie zapewniając stały, krótki czas dostawy. Jednocześnie wyniki z analizy mikrobiologicznej, które mogą być traktowane jako czuły czujnik w czasie rzeczywistym, dostarczają informację odnośnie higieny procesu napełniania.

GI: Mrs. Karches, dziękuję bardzo za rozmowę.

Oznaczanie liczby drożdży w wybranych fermentowanych produktach mleczarskich z wykorzystaniem systemu TEMPO[®] YM

Alina Kunicka-Styczyńska¹, Jacek Charliński²

¹ Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej

² bioMérieux, Polska

Wprowadzenie

Maślanki są chętnie spożywane przez konsumentów, a ich udział w segmencie produktów mleczarskich jest coraz większy. W celu poprawy atrakcyjności producenci oferują maślanki smakowe, zawierające aromaty i wsady owocowe lub czekoladowe. Produkty tego rodzaju z punktu widzenia analizy mikrobiologicznej stanowią stosunkowo trudną matrycę. Typową, charakterystyczną mikrobiotę mlecznych napojów fermentowanych tworzą bakterie fermentacji mlekowej. Równocześnie mogą występować bakterie z grupy coli, a monitorowanie obecności tych ostatnich stanowi część oceny czystości sanitarnej żywności. Produkty te mogą także zawierać grzyby mikroskopowe. Drożdże i pleśnie wprowadzane są głównie z wsadami owocowymi, a dodatki słodzące i czekoladowe mogą być zanieczyszczone grzybami osmofilnymi lub osmotolerancyjnymi. Zarówno drożdże, jak i pleśnie, sta-

nowią niepożądane elementy tego układu mikroorganizmów, a ich obecność może ujawniać się nawet pod długim okresie przechowywania produktów w warunkach chłodniczych.

Poziom drożdży i pleśni w produktach spożywczych jest jednym z kluczowych wskaźników jakości mikrobiologicznej QI (ang. Quality Indicators). Ze względu na znacznie dłuższy czas generacji grzybów w porównaniu do czasu generacji bakterii, wykrycie ich obecności trwa od 3 do 5 dni. Standardowe płytkowe metody analizy mikrobiologicznej umożliwiają podanie osobno liczby drożdży i liczby pleśni, ale charakteryzują się dużą bezwładnością odczytu. W praktyce trwałość produktu zwykle determinowana jest rozwojem równocześnie obu tych grup drobnoustrojów i tylko nieliczni odbiorcy wymagają ich rozróżnienia. Skrócenie czasu analizy możliwe jest jedynie w przypadku monitorowania metabolitów tworzonych podczas wzrostu grzybów mikroskopowych.



Test YM systemu TEMPO® stanowi alternatywę dla metod konwencjonalnych. Test ten jest zgodny ze standardem ISO 21527 oraz BAM (Rozdział 1 Bacteriological Analytical Manual) [4] i zapewnia wiarygodność porównywalną z tymi metodami referencyjnymi. Zaletą testu jest nie tylko łatwość wykonania bez konieczności prowadzenia oddzielnych wysiewów dla określenia liczby drożdży i pleśni osmotolerancyjnych, ale również zapewnienie wiarygodnego odczytu już po 72 godzinach inkubacji. Zasada testu opiera się na odczycie sygnału fluorescencyjnego generowanego w obecności metabolitów grzybów przy braku interferencji enzymów zawartych w produkcie oraz niezależnie od pH badanej matrycy. Według zaleceń producenta test YM może być wykorzystywany w badaniach szerokiej gamy produktów, w tym produktów mleczarskich nie zawierających mikroorganizmów wprowadzanych jako element procesu technologicznego. Ponieważ maślanki nie spełniają tego założenia, konieczna jest modyfikacja procedury przygotowania próbki przed jej wprowadzeniem do karty systemu TEMPO®.

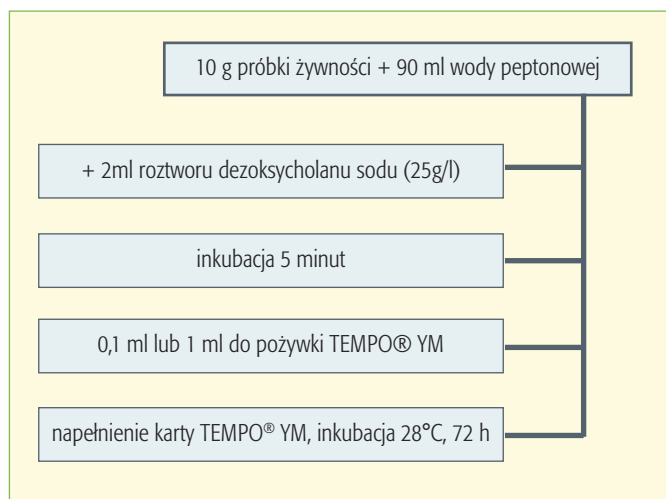
Celem prezentowanych badań była modyfikacja protokołu przygotowania próbek dla zapewnienia wiarygodnego oznaczenia liczby drożdży w maślankach. W badaniach, oprócz maślanki niezawierającej dodatków, badano matryce zawierające wsad owocowy lub czekoladowy. Dla wyeliminowania wpływu bakterii mlekowych podczas przygotowania próbek wprowadzano roztwór dezoksycholanu sodu lub nadtlenu wodoru.

Materiał i metody badań

Matryce żywności. W badaniach wykorzystano konfekcjonowane, pochodzące z handlu detalicznego maślanki w trzech asortymentach: bez dodatków smakowych, z dodatkiem wsadu owocowego oraz z dodatkiem wsadu czekoladowego. Wszystkie matryce kontaminowano poprzez wprowadzenie drożdży *Candida kefir*, pochodzących z Kolekcji Czystych Kultur Instytutu Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej ŁOCK 105.

Pożywki. Do oznaczenia liczby drożdży metodą płytkową stosowano pożywkę YGC (bioMérieux).

Płyny do rozcieńczeń. Zawiesiny drożdży oraz rozcień-



Rysunek 1. Procedura oznaczania liczby drożdży w maślance z wykorzystaniem systemu TEMPO® YM z dodatkiem dezoksycholanu sodu.

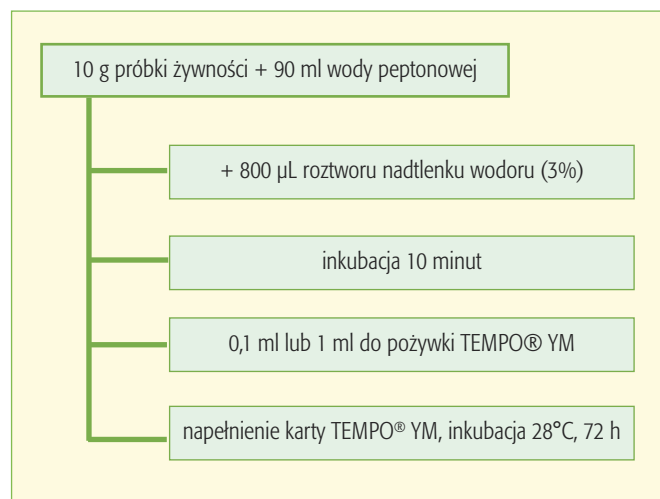
czenia próbek wykonywano w buforowanej wodzie peptonowej (bioMérieux).

Odczynniki. Bezpośrednio przed oznaczeniem do próbek dodawano 800 µL 3% roztworu nadtlenu wodoru (H₂O₂) lub 2 ml roztworu dezoksycholanu sodu. Roztwór dezoksycholanu sodu przygotowano przez rozpuszczenie 2,5 g związku (Sigma) w 100 ml sterylnej wody destylowanej.

Metody badań. Oznaczenia liczby drożdży prowadzono równoległe metodą płytkową oraz z wykorzystaniem systemu TEMPO® YM.

Wyniki i dyskusja

Oznaczenia poziomu mikroorganizmów saprofitycznych, w tym również drożdży i pleśni, dla wielu producentów mlecznych produktów fermentowanych stanowi jeden z kluczowych parametrów oceny nie tylko bezpieczeństwa produktu, ale również jego trwałości. Drożdże stanowią potencjalne zagrożenie dla trwałości maślanek, a producenci są zainteresowani wczesnym wykryciem ich obecności w gotowym produkcie. Proponowane przez nas modyfikacje protokołu oznaczenia liczby drożdży z wykorzystaniem testu TEMPO® YM mają na celu ułatwienie monitorowania czystości mikrobiologicznej maślanek. Pomimo, że pożywka przeznaczona do wykrywania grzybów zawiera składniki hamujące rozwój bakterii, nie można wykluczyć wpływu bakterii mlekowych wprowadzanych jako kultury starterowe i namnożonych podczas produkcji maślanek. W celu wzmocnienia efektu inhibicji bakterii wnoszonych z matrycą żywności przed napełnieniem karty do zawiesziny podstawowej dodawano roztwór dezoksycholanu sodu (Rysunek 1) lub nadtlenu wodoru (Rysunek 2) i inkubowano odpowiednio przez 5 lub 10 minut. Równoległe, oznaczenia liczby drożdży prowadzono metodą płytkową. Odniesienie stanowiła próbka maślanki bez dodatku dezoksycholanu sodu i nadtlenu wodoru. Dla sprawdzenia ewentualnego wpływu dodatków smakowych na wiarygodność oznaczenia do badań wykorzystano oprócz maślanki bez dodatków maślanki zawierające wsad owocowy i wsad czekoladowy. Ponieważ w produktach handlowych, w 1 g, stwierdzano obec-



Rysunek 2. Procedura oznaczania liczby drożdży w maślance z wykorzystaniem systemu TEMPO® YM z dodatkiem nadtlenu wodoru.

ność pojedynczych komórek drożdży, zatem wszystkie próbki dodatkowo zanieczyszczano drożdżami *Candida kefir*. Badania przeprowadzono dla maślanek niezanieczyszczanych, gdzie w 1 g produktu znajdowano do 10 komórek drożdży oraz zanieczyszczanych drożdżami do poziomów 10² komórek/g oraz 10³ komórek/g. Zgodność wyników pomiędzy metodą płytkową oraz metodą TEMPO® podano jako różnice liczby drożdży w jednostkach logarytmicznych.

Wyniki badań zostały zamieszczone w Tabeli 1 a ocena zgodności metod w Tabeli 2. Dla próbek niezanieczyszczonych stwierdzono pełną zgodność wyników, niezależnie od stosowanego protokołu badań. Wprowadzenie 3% roztworu nadtlenu wodoru do próbki skutkowało niedoszacowaniem liczby oznaczonych drożdży. Równocześnie wyniki uzyskane metodą TEMPO® oraz metodą płytkową różniły się od 0,4 do 2 jednostek logarytmicznych przy zanieczyszczeniu próbek drożdżami do poziomu 10² komórek w 1 g. Dziesięciokrotne zwiększenie poziomu zanieczyszczenia powodowało wzrost rozrzutu wyników do 3,18 jednostek logarytmicznych.

Dodatek dezoksyholanu sodu nie zakłócał odczytu systemu TEMPO® YM, a oznaczona liczba drożdży w porównaniu z metodą płytkową różniła się od 0,04 do 0,45 jednostki logarytmicznej i nie zależała od poziomu zanieczyszczenia drożdżami (Tabela 2). Biorąc pod uwagę, że w analizie mikrobiologicznej wyniki liczebności populacji drobnoustrojów różniące się poniżej 0,5 jednostki logarytmicznej uznawane są jako zgodne, proponowany protokół oznaczenia jest prawidłowy. Ponadto, dodany związek nie wpływał na żywotność populacji drożdży zanieczyszczających maślanek.

Przy zastosowaniu obu protokołów badań nie stwierdzono interferencji dodatków smakowych maślanek i sygnału fluorescencyjnego systemu TEMPO®. Zatem wprowadzenie wsadu owocowego lub czekoladowego nie miało wpływu na wiarygodność oznaczenia liczby drożdży testem TEMPO® YM.

Tabela 2. Różnice w odczycie liczby drożdży *Candida kefir* w maślanek w oznaczeniach metodą TEMPO® YM i metodą płytkową.

Maślanek		Protokół oznaczenia	
Rodzaj	poziom zanieczyszczenia*	z nadtlakiem wodoru	z dezoksyholanem sodu
Bez dodatków	0	± 0 log	± 0 log
	10 ²	± 0,40÷1,04 log	± 0,10÷0,25 log
	10 ³	± 0,65÷1,10 log	± 0,20÷0,43 log
Z wsadem 0 owocowym	± 0 log	± 0 log	
	10 ²	± 2,00 log	± 0÷0,06 log
	10 ³	± 1,50÷1,87 log	± 0,04÷0,10 log
Z wsadem czekoladowym	0	± 0 log	± 0 log
	10 ²	± 0,40÷0,90 log	± 0÷0,29 log
	10 ³	± 2,70÷3,18 log	± 0,03÷0,19 log

Oznaczenia: * zanieczyszczenie drożdżami *Candida kefir*

Przeprowadzone badania jednoznacznie wskazują na prawidłowość oznaczenia liczby drożdży zanieczyszczających maślanek za pomocą systemu TEMPO®, z zastosowaniem protokołu obejmującego wstępną inkubację roztworu podstawowego produktu z dodatkiem dezoksyholanu sodu.

Podsumowanie

System TEMPO® umożliwia monitorowanie wskaźników kontroli jakości mikrobiologicznej żywności w warunkach przemysłowych i przeznaczony jest do badania większości produktów spożywczych. Odczyt systemu może być jednak zakłócony obecnością tzw. mikroorganizmów technologicznych, stanowiących integralny element produktu, tak jak w przypadku mlecznych napojów fermentowanych. Wprowadzenie procedury uwzględniającej inkubację rozcieńczenia podstawowego próbki wraz z roztworem dezoksyholanu sodu pozwala na rozszerzenie wykorzystania systemu TEMPO® do oznaczania

liczby drożdży zanieczyszczających maślanek. Obecność dezoksyholanu sodu nie wpływa na żywotność i aktywność metaboliczną drożdży, a równocześnie eliminowana jest interferencja bakterii mlekowych znajdujących się w produkcie. Przeprowadzone badania wskazują na możliwość zastosowania takiej procedury również do badania maślanek z wsadem owocowym oraz czekoladowym.

Tabela 1. Porównanie metod oznaczenia obecności drożdży *Candida kefir* w maślanek.

Maślanek		Liczba komórek* [CFU/g]				
Rodzaj	Poziom zanieczyszczenia**	Próbka bezpośrednia		Próbka + H ₂ O ₂		
		YGC	TEMPO® YM	YGC	TEMPO® YM	YGC
Bez dodatków	0	0	<10	0	<10	0
	10 ²	1,9×10 ²	10	0	1,3×10 ²	1,9×10 ²
	10 ³	4,5×10 ³	1,5×10 ³	1,0×10 ²	2,9×10 ³	4,5×10 ³
Z wsadem owocowym	0	1	<10	1	<10	4
	10 ²	1,0×10 ²	<10	0	1,4×10 ²	1,0×10 ²
	10 ³	4,1×10 ³	3,2×10 ³	30	5,1×10 ³	4,1×10 ³
Z wsadem czekoladowym	0	4	<10	4	<10	4
	10 ²	80	43	1	55	80
	10 ³	5,0×10 ³	1,0×10 ²	0	5,5×10 ³	5,0×10 ³

Oznaczenia: * wynik podano jako średnią arytmetyczną 4 powtórzeń
** zanieczyszczenie drożdżami *Candida kefir*

Pismienictwo u Autorów

bioMérieux wprowadza nowy test TEMPO AC[®] do szybkiego liczenia ogólnej liczby drobnoustrojów w żywności

Marcy l'Etoile, France – Kwiecień 17, 2013 – bioMérieux, światowy lider w diagnostyce in vitro, wprowadza TEMPO[®] AC, nowy automatyczny test, który umożliwi liczenie ogólnej liczby drobnoustrojów w żywności i próbkach środowiskowych w ciągu 24. godzin. Dzięki w pełni automatycznemu odczytowi, nowy test TEMPO pozwoli laboratoriom sektora rolno-spożywczego zaoszczędzić czas oraz szybciej uwolnić ich produkty. Test TEMPO AC został już zwalidowany przez AOAC RI (Research Institute).

Innowacyjność testu TEMPO AC

Nowy test TEMPO AC umożliwia liczenie ogólnej liczby drobnoustrojów w ciągu jedynie 24. godzin. Dzięki takiemu rozwiązaniu laboratoria mogą znacznie szybciej udzielić informacji swoim klientom, szybciej zaplanować działania korekcyjne w przypadku wyników poza zakresem specyfikacji oraz znacznie skrócić czas uwolnienia produktu na rynek, gdzie pozytywne uwolnienie jest wymogiem.

"Automatyczny system TEMPO spełnia potrzeby naszych klientów w branży spożywczej zapewniając zmniejszenie kosztów przez redukcję czasu analizy oraz robocizny w porównaniu z metodami tradycyjnymi," twierdzi Jean-Marc Durano, Wiceprezes, Mikrobiologii Przemysłowej. *"Nowy test TEMPO obrazuje zobowiązanie bioMérieux, aby ciągle proponować rozwiązania, które wpływają na poprawę bezpieczeństwa żywności."*

W pełni zautomatyzowany system TEMPO, oparty na tradycyjnej metodzie NPL (Najbardziej Prawdopodobna Liczba), zapewnia optymalną wygodę dla użytkownika, redukcję czasu analizy oraz efektywne skrócenie czasu uzyskania dokładnych wyników. TEMPO AC (liczba mikroflory tlenowej) jest dopełnieniem systemu TEMPO, zapewniając spełnienie potrzeb w badaniach najczęstszych wskaźników jakości: TEMPO EC (*Escherichia coli*), TEMPO TC (Ogólna Liczba Coliform), TEMPO CC (Liczba Coliform), TEMPO STA (*Staphylococcus*), TEMPO EB (*Enterobacteriaceae*), TEMPO YM (Drożdże i Pleśnie) i TEMPO LAB (Bakterie Mlekowe).

TEMPO uzyskał już walidację AC AOAC RI do badania szerokiej gamy produktów żywnościowych, karmy dla zwierząt domowych i próbek środowiskowych.

Więcej informacji uzyskacie Państwo na stronie: www.biomerieux-industry.com/tempo

Ogólna mikroflora tlenowa

Analiza ilościowa ogólnej, tlenowej mikroflory stanowi 25% dziennych analiz w laboratoriach mikrobiologicznych. Pozwala ona na ogólną ocenę zanieczyszczenia produktu i dlatego stanowi handlowy i higieniczny wskaźnik jakości. Tradycyjna metoda, w której stosuje się płytki PCA jest pracochłonna, czasochłonna, wyniki uzyskuje się po 48 godzinach według BAM oraz po 72 godzinach według ISO. To powoduje, że metoda ta powoduje wysokie obciążenie pracą w laboratorium.





bioMérieux z przyjemnością zawiadamia, że nowy test

TEMPO® AC uzyskał walidację
ISO 16140

do liczenia tlenowej mezofilnej mikroflory w żywności i próbach środowiskowych

- TEMPO® AC pozwala na liczenie tlenowej mikroflory w czasie 24-48 godzin
- Wyniki w ciągu 24 godzin dla specyficznych matryc (surowe mięso, drób, wycinki z tusz, owoce, warzywa, żywność gotowa do spożycia)
- Szerki zakres badanych matryc (żywność, karma dla zwierząt domowych, próbki środowiskowe)
- Bardzo dobra zgodność wyników z ISO 4833



TEMPO® zapewnia

- • • optymalizację zarządzania personelem
- • • zmniejszenie pracochłonności
- • • uzyskanie dokładnych wyników w krótszym czasie
- • • efektywniejsze śledzenie zmian próbki

Enterotoksyny gronkowcowe – zagrożenie mikrobiologiczne i wykrywanie

Jolanta G. Rola, Weronika Korpysa-Dzirba

Enterotoksyczne szczepy gronkowców są jedną z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych u ludzi. Zdolność do wytwarzania enterotoksyn mają głównie koagulazo-dodatnie izolaty należące do rodzaju *Staphylococcus*, przede wszystkim *S. aureus*. Dotychczas poznano ponad 20 rodzajów enterotoksyn gronkowcowych. Największe znaczenie w patogenezie intoksykacji pokarmowych u ludzi ma enterotoksyna A (SEA – Staphylococcal Enterotoxin A), która jest odpowiedzialna za wystąpienie ponad 75% przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych (SFP – Staphylococcal Food Poisoning). W dalszej kolejności istotną rolę odgrywają również enterotoksyny B (SEB), C (SEC) i D (SED). Ilość enterotoksyny niezbędna do wywołania objawów chorobowych zależy od indywidualnej wrażliwości osobniczej, spożytej ilości oraz ogólnego stanu zdrowia osoby zakażonej. Przyjmuje się, że dawka wywołująca objawy zatrucia wynosi od 20 do 100 ng. Intoksykacje na tle gronkowcowym charakteryzują się krótkim okresem inkubacji wynoszącym już od 30 minut do około 8 godzin. Dominującymi objawami klinicznymi są: ból głowy, nudności i gwałtowne wymioty, którym towarzyszą bóle brzucha i biegunka. Objawy działania enterotoksyn zwykle samoistnie ustępują po kilku lub kilkunastu godzinach. Najcięższy przebieg SFP obserwuje się u małych dzieci, osób starszych lub przyjmujących leki immunosupresyjne. Enterotoksyny gronkowcowe, w przeciwieństwie do bakterii *S. aureus*, są odporne na wysoką temperaturę jak też na enzymy proteolityczne, odwodnienie, promieniowanie gamma oraz szeroki zakres pH. Dzięki tym cechom nie są dezaktywowane podczas termicznej obróbki żywności i pozostają aktywne, podczas gdy bakterie *S. aureus* są niszczone.

Organem zajmującym się oceną ryzyka w zakresie bezpieczeństwa żywności i pasz w Unii Europejskiej (UE) jest Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA). Od 2005 r. publikuje on corocznie raporty dotyczące występowania chorób odzwierzęcych (zoonoz) u ludzi oraz ich czynników etiologicznych. Opublikowany w bieżącym roku Raport EFSA obejmuje epidemie zatruc pokarmowych na tle toksyn bakteryjnych występujących na terenie UE w 2011 r. Według zawartych tam informacji, pochodzących z 25 krajów UE, toksyny bakteryjne były odpowiedzialne za 730 spośród 5648 zgłoszonych epidemii

zatruc pokarmowych (12,9%), co stawia je na drugim miejscu po epidemiach wywołanych przez *Salmonella* (26,6%). Dalej wysoki odsetek stanowiły zachorowania epidemiczne wywołane przez *Campylobacter* (10,6%) i wirusy (9,3%). Wśród toksyn bakteryjnych, enterotoksyny gronkowcowe, obok toksyn *Bacillus* i *Clostridium*, były odpowiedzialne za 345 spośród zidentyfikowanych epidemii zatruc pokarmowych (47,3%). Masowe zatrucia na tym tle stanowiły 6,1% wszystkich epidemii zatruc pokarmowych. Liczba zachorowań wzrosła o 25,9% w porównaniu z 2010 r., kiedy odnotowano 274 epidemie. Wśród odnotowanych epidemii 35 z nich (10,1%) poddano szczegółowej weryfikacji i stwierdzono 394 przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych, z czego 27,9% było hospitalizowanych. Nie odnotowano natomiast zgonów. Najwyższy odsetek epidemii wywołany był spożyciem żywności mieszanej zanieczyszczonej enterotoksynami gronkowcowymi. Drugą kategorią żywności powodującą zatrucia pokarmowe na tym tle były wyroby piekarnicze (Tabela 1).

Z danych Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego - Państwowego Zakładu Higieny wynika, że w Polsce można zaobserwować tendencję spadkową zarówno co liczby bakteryjnych zatruc pokarmowych, jak również w stosunku do intoksykacji gronkowcowych. Największą liczbę przypadków zatruc pokarmowych wywołanych przez enterotoksyny gronkowcowe w latach 2005 – 2012 odnotowano w 2005 r. i wynosiła ona 658 przypadków.

Tabela 1. Produkty związane z gronkowcowymi zatruciami pokarmowymi (N=35) – wg. raportu EFSA za 2011.

Rodzaje produktów	Udział w wywołaniu SFP (%)
Produkty mieszane	40,0
Produkty piekarnicze	11,4
Sery	8,6
Inne produkty, mieszane, mięso drobiowe i produkty pochodne	8,6
Produkty mleczne za wyjątkiem serów	5,7
Inne produkty np. mięso brojlerów (<i>Gallus gallus</i> i produkty pochodne, mięso i produkty pochodne, jaja, orzechy, migdały, warzywa i soki)	25,7

Tabela 2. Czulość, specyficzność i dokładność europejskiej metody skringowej – wykrywanie w mleku i produktach mlecznych wg. raportu, EU-RL CPS z 2011 r.

Badania międzylaboratoryjne		
Poziom zanieczyszczenia	DC + RidascreeN SET Total	DC + Vidas SET2
0 ng/g	Specyficzność SP=99%	Specyficzność SP=99%
0,04 ng/g	Czulość SE=52%	Czulość SE=99%
0,26 ng/g	Czulość SE=99%	Czulość SE=99%
Względna dokładność AC _{relative} =84%		
Badania wewnątrzlaboratoryjne		
Dokładność AC=97%		
Względna specyficzność SP _{relative} =97%		
Względna czulość SE _{relative} =97%		
DC – dializa/koncentracja		

Przez kolejne 4 lata liczba ta zmniejszała się, a w 2009 r. stwierdzono 146 przypadków zachorowań. W latach 2010 – 2011 liczba gronkowcowych zatruc pokarmowych wzrosła odpowiednio do 217 przypadków w 2010 roku i 283 w roku 2011. Wstępne dane za 2012 r. wskazują na odnotowanie 147 przypadków zachorowań. Największą ich liczbę stwierdza się w miesiącach letnich – w drugim, a szczególnie w III kwartale roku.

Metody wykrywania enterotoksyn gronkowcowych można podzielić na 3 grupy: próby biologiczne, techniki biologii molekularnej oraz testy immunologiczne. Próby biologiczne, ze względu na ograniczenia natury etycznej oraz niską czulość, nie są obecnie wykorzystywane do charakterystyki gronkowcowych zatruc pokarmowych. Metody biologii molekularnej zwykle opierają się na wykorzystaniu techniki PCR i umożliwiają wykrycie genów kodujących SE w szczepach wyizolowanych z zanieczyszczonej żywności. Najczęściej jednak do wykrywania SE w żywności stosuje się techniki immunologiczne, np. ELISA, ELFA (enzym-linked fluorescent assay), RPLA (reverse passive latex agglutination). Komercyjne testy ELISA i ELFA umożliwiają wykrycie pięciu odmian enterotoksyn: SEA – SEE, a w przypadku RPLA jedynie czterech: SEA – SED.

Zgodnie z obowiązującymi kryteriami mikrobiologicznymi,

zapisanymi w Rozporządzeniu Komisji (WE) Nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w produktach takich jak sery, mleko w proszku i serwatka w proszku, w przypadku gdy spodziewana liczba *S. aureus* w czasie procesu produkcji będzie wyższa niż 10⁵ jtk/g, istnieje obowiązek przeprowadzenia badań w kierunku obecności enterotoksyn gronkowcowych.

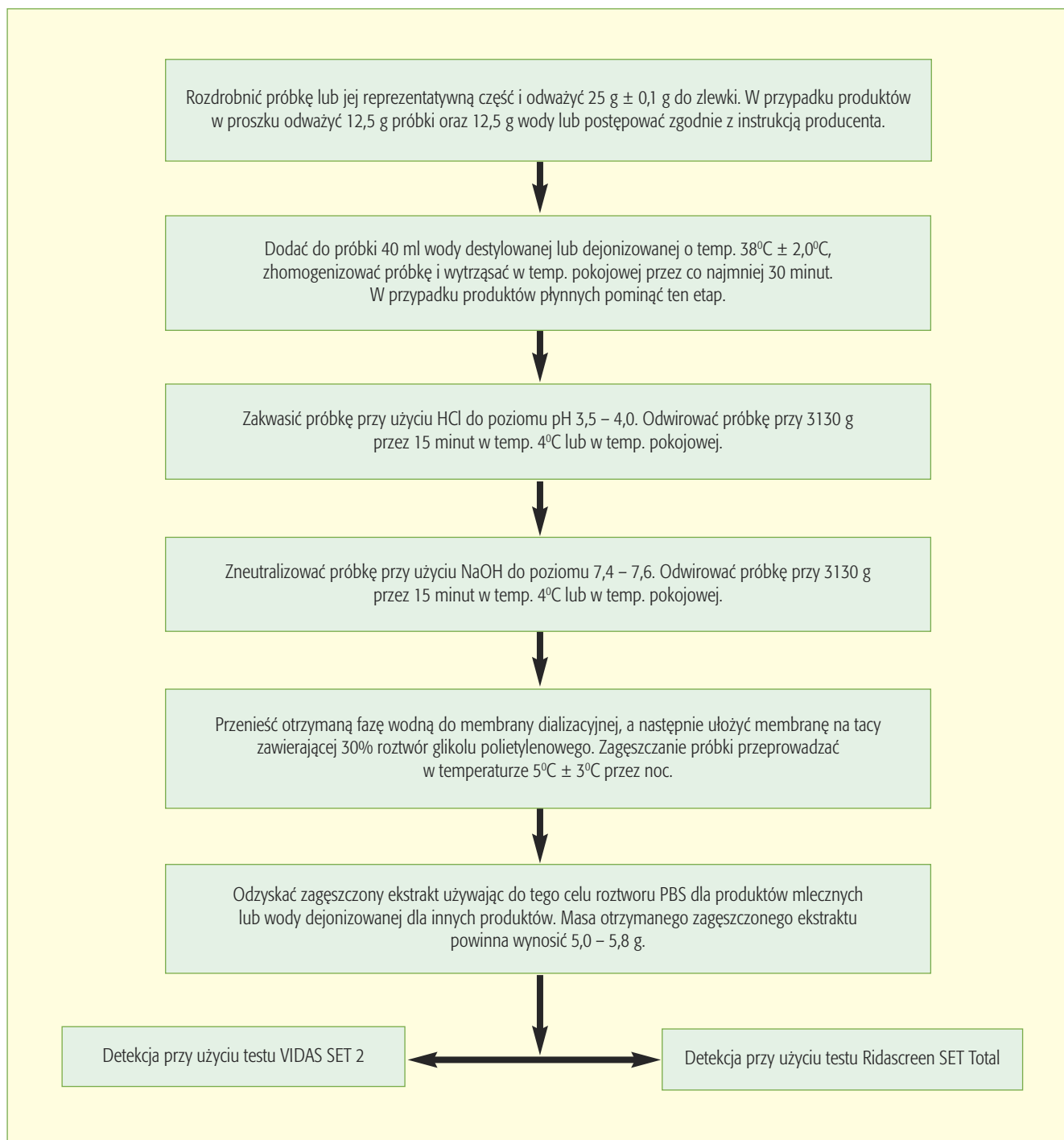
W rozporządzeniu tym metodą wskazaną jako referencyjna w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych jest Europejska Metoda Skringowa (ESM – European Screening Method). Aktualnie obowiązuje wersja 5. metody z września 2010 r. (Schemat 1).

W 2010 roku Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. gronkowców koagulazo-dodatnich w tym *S. aureus* (EU-RL CPS – European Screening Method) przeprowadziło walidację wewnątrzlaboratoryjną metody ESM wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w żywności prowadząc badania z zastosowaniem testu Vidas SET 2 (metoda odniesienia) i testu RidascreeN SET Total (metoda alternatywna). Uzyskano satysfakcjonujące wyniki oceny.

W celu potwierdzenia przydatności obu testów do detekcji enterotoksyn w 2011 roku przeprowadzono porównania międzylaboratoryjne. W porównaniach dotyczących wy-

Tabela 3. Czulość, specyficzność i dokładność europejskiej metody skringowej – wykrywanie w żywności innej niż mleko i produkty mleczne wg. raportu, EU-RL CPS z 2011 r.

Badania międzylaboratoryjne		
Poziom zanieczyszczenia	DC + RidascreeN SET Total	DC + Vidas SET2
Poziom zerowy	Specyficzność SP=96%	Specyficzność SP=100%
Poziom niski 0,5 ng/g	Czulość SE=93%	Czulość SE=100%
Poziom wysoki 1,25ng/g	Czulość SE=100%	Czulość SE=100%
Badania wewnątrzlaboratoryjne		
DC + RidascreeN SET Total		
Dokładność AC=91%		
DC + Vidas SET2		
Dokładność AC=96%		
Względna specyficzność SP _{relative} =89%		
Względna czulość SE _{relative} =97%		
DC – dializa/koncentracja		



Schemat 1. Wykrywanie enterotoksyn gronkowcowych w produktach żywnościowych – etapy postępowania (12)

krywania enterotoksyn w mleku i produktach mlecznych uczestniczyło 13 laboratoriów. Każdy z uczestników analizował 24 próbki sera z surowego mleka krowiego, naturalnie zanieczyszczonego enterotoksyną gronkowcową typu D (8 próbek na każdym z 3 poziomów zanieczyszczenia). Stężenie enterotoksyny określone własną metodą potwierdzającą wynosiło odpowiednio 0 ng/g, 0,04 ng/g i 0,26 ng/g. Walidację metody przeprowadzono zgodnie z normą EN ISO 16140 określając jej czułość, specyficzność i dokładność. Względna dokładność wyników uzyskanych metodą Ridascreen SET Total na niskim poziomie zanieczyszczenia wyniosła jedynie 52%. Ze względu na niezadowalające wyniki porównań ta metoda detekcji nie jest aktualnie zalecana przez Europejskie Laboratorium

Referencyjne do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w mleku i produktach mlecznych. W badaniach międzylaboratoryjnych obejmujących żywność inną niż mleko i produkty mleczne uczestniczyło 13 laboratoriów. Analogicznie badania przeprowadzono na 24 próbkach gotowanej szynki zanieczyszczonej enterotoksyną gronkowcową typu E (8 próbek na każdym z 3 poziomów zanieczyszczenia – 0 ng/g, 0,5 ng/g i 1,25 ng/g). W przypadku obu testów wyniki porównań były zadowalające. Czułość, specyficzność i dokładność przekraczała 90%. W oparciu o uzyskane wyniki badań EU-RL CPS wydało pozytywną opinię na temat ich zastosowania do detekcji enterotoksyn gronkowcowych w żywności innej niż mleko i produkty mleczne metodą ESM.

BIOMERIEUX
PERFORMANCE
SOLUTIONS



Automatyczne monitorowanie
i kontrola temperatury
oraz innych parametrów fizycznych

