

# Aktualności

## bioMérieux



KONTROLA MIKROBIOLOGICZNA



ULTRASZYBKIE ROZWIĄZANIA



BEZPIECZEŃSTWO ŻYWNOŚCI



DOŚWIADCZENIE W MIKROBIOLOGII

# Spis treści

- 2 od wydawcy
- 3 10 lat Tempo – zautomatyzowanej metody liczenia wskaźników czystości mikrobiologicznej produktów żywnościowych
- 5 Normy metodyczne w badaniach mikrobiologicznych próbek z łańcucha żywnościowego
- 11 Aktualne zagrożenia mikrobiologiczne w żywności – enterotoksyny gronkowcowe
- 14 Elementy kontroli czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji
- 18 Monitorowanie temperatury i innych parametrów fizycznych w laboratorium

**wydawca:** bioMérieux Polska Sp. z o.o.

**Osoba odpowiedzialna:** Dorota Pawluch

**Osoby biorące udział w przygotowaniu nr 17:**

Dorota Pawluch  
Artur Gąsior  
Czesław Mitek  
Jacek Charliński

**Adres redakcji i wydawcy:**

bioMérieux Polska  
01-518 Warszawa, ul. Gen. Józefa Zajęczka 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 17 „Aktualności Industry” spełnią Państwa oczekiwania.

Bardzo prosimy o opinie, które będą dla nas wskaźnikiem co powinniśmy zmienić w przyszłości i jakie tematy są dla Państwa ważne.

W tym roku mija 10 lat od wprowadzenia na rynek systemu Tempo. Firma bioMérieux opracowała zautomatyzowaną metodę liczenia wskaźników jakości czyli ogólnej liczby drobnoustrojów, bakterii z grupy coli, *Enterobacteriaceae*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, gronkowców koagulazo-dodatnich, drożdży i pleśni. Wskaźniki jakości odgrywają istotną rolę przy stosowaniu systemu HACCP oraz zapewnieniu handlowej jakości produktów żywności od chwili zejścia ich z linii produkcyjnej zakładu, aż do upływu terminu ich przydatności do spożycia.

W 2015 roku sukcesem jest oficjalne wyróżnienie uzyskane dla systemu TEMPO, zintegrowane z MLG (oficjalna instrukcja USDA) i potwierdzone przez NCIMS (oficjalny organ kontroli produktów mlecznych w USA).

System Tempo zyskał uznanie również na naszym rynku. Obecnie 30 aparatów Tempo pracuje w laboratoriach badających żywność.

W numerze 17 znajdą Państwo również artykuły poświęcone normom metodycznym w badaniach mikrobiologicznych próbek z łańcucha żywnościowego, kontroli środowiska produkcyjnego oraz więcej informacji na temat enterotoksyny gronkowcowej jako zagrożenia mikrobiologicznego żywności.

Przedstawiamy Państwu nową generację systemu do monitorowania parametrów fizycznych w laboratorium – Labguard 3D.

Dorota Pawluch



Dyrektor ds. Sprzedaży  
Mikrobiologia Przemysłowa



# 10 lat Tempo – zautomatyzowanej metody liczenia wskaźników czystości mikrobiologicznej produktów żywnościowych

**W końcu ubiegłego wieku na rynku dostępnych było wiele metod do wykrywania patogenów (Listeria, Salmonella, ...). Z drugiej strony, do liczenia wskaźników jakości (QI) istniały tylko żmudne metody manualne, które były powtarzalne i bardzo czasochłonne.**

Firma bioMérieux postanowiła opracować zautomatyzowaną metodę liczenia tych wskaźników (ogólnej liczby drobnoustrojów, bakterii z grupy coli, drożdży i pleśni, ...). Temu trudnemu przedsięwzięciu poświęcił się zespół R&D bioMérieux Industry.

Po krótkim okresie prób i błędów, nowy zespół zdecydował się wykorzystać mocne strony kart VITEK® z jednoczesnym dostosowaniem do ograniczeń w matrycach spożywczych.

Po realizacji projektu karty, zostały opracowane podłoża, a także aparaty: czytnik i napełniarka kart. Eksperti i klienci na całym świecie zostali poproszeni o pracę nad ergonomią TEMPO.

W 2005 roku został uruchomiony System TEMPO z 3 parametrami:

- TVC (ogólna liczba bakterii),
- TC (bakterii grupy coli),
- EC (Escherichia coli)

oraz zestaw TEMPO do kontroli jakości (karty QC).

Kolejne, wprowadzone na rynek testy to :

- W 2006 roku, TEMPO EB (Enterobacteriaceae),
- W 2007 roku, TEMPO CC (Bakterie z grupy coli); TEMPO LAB (bakterie kwasu mlekowego) i TEMPO STA (Staphylococcus aureus),
- W 2008 roku, TEMPO YM (drożdże i pleśnie).

W tym też roku, TEMPO zostało przyjęte jako oficjalna metoda badań żywności podczas Igrzysk Olimpijskich w Pekinie.

W 2009 roku zainstalowanych było 300 aparatów TEMPO. Od tego czasu, TEMPO umocniło swoją pozycję na świecie, włączając sukces na kongresie w Urugwaju na COLMIC





(Congresso Latino Americano de Mikrobiologia e Higiene de Alimentos) w 2009 roku, gdzie użytkownicy przedstawili uczestnikom kongresu główne zalety metody, lub w Szanghaju, w 2010 roku, podczas wystawy światowej.

Ze względu na wzrost wielkości produkcji, zdecydowano, że produkcja zliofilizowanych podłoży zostanie przeniesiona z Craonne do La Balme; po przeprowadzeniu licznych walidacji, projekt ten został skutecznie zrealizowany w 2011 roku.

Zespół TEMPO w 2013 roku przygotował drugą generację testu do liczenia ogólnej liczby drobnoustrojów TEMPO AC,

który zastąpił test TEMPO TVC. Ta zmiana zwiększyła naszą sprzedaż, o 5 milionów kart rocznie.

W 2014 roku do już szerokiej oferty dodano nowy test TEMPO BC (*Bacillus cereus*).

Zachęceni sukcesem, zespół TEMPO pracuje nad projektem kolejnego testu zwanego TEMPO EVO. Dzięki nowej wersji, będziemy mieli możliwość przedstawienia kart „combo”, która da 2 wyniki liczenia dwóch różnych gatunków bakterii, przy użyciu tylko jednego odczynnika, przynosząc istotne korzyści wydajności dla naszych klientów. Co więcej, możemy przetestować większe ilości próbek, zmniejszając jednocześnie minimalny próg dla liczenia (co umożliwi liczenie bardzo małych ilości bakterii). Projekt został zaakceptowany przez Nicolas Cartier i jest obecnie realizowany. Pod koniec 2014 roku przekroczono liczbę 1000 klientów, użytkowników TEMPO!

W 2015 roku sukcesem jest oficjalne wyróżnienie uzyskane dla systemu TEMPO, zintegrowane z MLG (oficjalna instrukcja USDA) i potwierdzone przez NCIMS (oficjalny organ kontroli produktów mlecznych w USA).

W tym roku obchodzimy 10-lecie TEMPO bioMérieux. Uroczystości zaplanowano najpierw we Florencji, gdzie produkowane są aparaty, następnie w Marcy, dla kluczowych klientów oraz w Portland na kongresie IAFF. I na koniec, będziemy świętować w La Balme, w miejscu, w którym są produkowane odczynniki.

Dziś TEMPO® reprezentuje ponad 1000 klientów, którzy zużywają 7 mln kart dla 9 zatwierdzonych przez ISO i AOAC parametrów.



# Normy metodyczne w badaniach mikrobiologicznych próbek z łańcucha żywnościowego

Krzysztof Kwiatek

Zakład Higieny Pasz, Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

Obecnie obowiązujące prawo żywnościowe Unii Europejskiej (UE) dotyczy wszystkich ogniw łańcucha żywnościowego i ma na celu utrzymanie na jak najniższym poziomie występowania czynników zagrożeń, będących przedmiotem kontroli laboratoryjnej prowadzonej w ramach nadzoru producenckiego i urzędowego. Dotyczy to również czynników zagrożeń typu mikrobiologicznego występujących w łańcuchu żywnościowym. W ramach przyjętych kryteriów z zakresu bezpieczeństwa dla produktu finalnego stwierdza się, że nie tylko środki spożywcze, ale i pasze nie powinny zawierać mikroorganizmów, ich toksyn ani metabolitów w ilościach stanowiących zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Warunek ten znajduje obecnie swoje umocowanie prawne dla żywności, w uchwalonym, a następnie nowelizowanym Rozporządzeniu Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Wśród zawartych w tym rozporządzeniu parametrów jakości mikrobiologicznej wyróżnić można parametry stanowiące o bezpieczeństwie żywności oraz kryteria o charakterze jakościowym i parametrycznym mające charakter wskaźników higieny.

W grupie kryteriów mikrobiologicznych służących jako parametr bezpieczeństwa żywności wymienić należy: kryterium obecności drobnoustrojów patogennych dla człowieka tj.: *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp., *Enterobacter sakazaki* i *E. coli* jako wskaźnik zanieczyszczenia kałowego. W grupie tej znalazły się również toksyny tj. enterotoksyna gronkowcowa i histamina. W zakresie kryteriów mikrobiologicznych o charakterze parametrycznym, określającej poziom higieny wyróżnić należy ogólną liczbę bakterii tlenowych, liczbę bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczkę *Salmonella*, *E. coli* i koagulazo-dodatnie szczepy *Staphylococcus aureus*. W odniesieniu do pasz istnieje zapis w Rozporządzeniu Parlamentu Europejskiego i Rady nr 183/2005 stwierdzający, że podmioty działające na rynku pasz powinny przestrzegać zgodności ze szczególnymi kryteriami mikrobiologicznymi.

W badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz oraz innych matryc łańcucha żywnościowego coraz większą rolę odgrywają metodyczne normy międzynarodowe (ISO) i europejskie (EN), które w zdecydowanej większości są

przyjmowane w naszym kraju jako normy polskie (PN) zharmonizowane z tymi normami. W związku z powyższym celowym wydaje się omówienie zakresu stosowania aktualnych wydań polskich norm (PN), które są zalecane do stosowania w badaniach mikrobiologicznych. Należy też dodać, że w ostatnim okresie przyjęty został nowy ogólny tytuł norm ISO opracowywanych w ramach Podkomitetu SC9 w brzmieniu: „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego” (Microbiology of the food chain) w zamian za „Mikrobiologia żywności i pasz” (Microbiology of food and animal feedingstuffs). Podobnie dotyczy to tytułu norm EN opracowanych w ramach CEN/TC 275 „Analiza żywności. Metody horyzontalne”. Oznacza to rozszerzenie zakresu badań i stosowania tych dokumentów o brakujące dotąd matryce oraz ogniwa łańcucha żywnościowego. W związku z tym celem opracowania jest także zwrócenie uwagi na poszerzenie się zakresu badanych matryc przy stosowaniu norm metodycznych używanych dotychczas głównie w analizie mikrobiologicznej żywności i pasz.

## Normy określające ogólne zasady badania mikrobiologicznego

Konieczność ujednoczenia warunków laboratoryjnych mających istotny wpływ na powtarzalność wyników badań i możliwie jak najwyższą ich jakość znalazła odzwierciedlenie w znowelizowanej ostatnio międzynarodowej normie EN-ISO 7218:2007/A1:2013 „Microbiology of food and feedingstuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations”. Na poziomie krajowym norma ta została zharmonizowana i oznaczona jako PN-EN ISO 7218:2008/A1:2013-10 „Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne wymagania i zasady badań mikrobiologicznych”. W nowej normie bardziej szczegółowo określono sposób wykonywania badań mikrobiologicznych żywności i pasz, zgodnie z wymaganiami i potrzebami systemu zapewnienia wiarygodności wyników



badań. W roku 2014 rozpoczęto w ramach prac PKN tłumaczenie tej normy na język polski.

W obrębie grupy polskich norm (PN) zharmonizowanych z normami ISO/EN, określających ogólne zasady i metody badań mikrobiologicznych należy wymienić, w pierwszej kolejności, te dotyczące przygotowania próbek żywności do badania w laboratorium. Pierwszą z tej grupy jest norma PN-EN ISO 6887-1:2000 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych”. Określony zakres tej normy wskazuje na ogólne zastosowanie na etapie przygotowania próbek do analiz mikrobiologicznych. Druga część omawianego dokumentu to norma PN-EN ISO 6887-2:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 2. Specyficzne zasady przygotowywania mięsa i przetworów mięsnych”. Norma powyższa ma zastosowanie do badania świeżego, surowego i przetworzonego mięsa, drobiu oraz przetworów drobiowych. Kolejny arkusz normatywny z tego zakresu to norma PN-EN ISO 6887-3:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 3: Specyficzne zasady przygotowywania ryb i przetworów rybnych”. Opisane tu zostały tylko te metody przygotowania próbek, które można wykorzystać głównie przy badaniu wielokierunkowym. Norma ma zastosowanie do badania surowych, przetworzonych, gotowanych lub mrożonych ryb, skorupiaków i mięczaków oraz produktów pochodnych. Czwarty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-4/A1:2011 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 4: Specyficzne zasady przygotowania produktów innych niż mleko i przetwory mleczne, mięso i przetwory mięsne oraz ryby i przetwory rybne”. Powyższy dokument ma zastosowanie w badaniach takich produktów jak: margaryna, mąka, produkty zbożowe, pasze, makuchy, żelatyna, produkty mleczne, jaja, produkty jajeczne, produkty fermentowane i produkty piekarnicze. Piąty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-5:2010 „Mikrobiologia żywności i pasz. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 5: Specyficzne zasady przygotowania mleka i przetworów mlecznych”. Niniejsza norma ma szerokie zastosowanie w badaniach mikrobiologicznych mleka i jego przetworów. Szósty arkusz to norma PN-EN ISO 6887-6:2013-06 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i roz-

cieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych. Część 6: Specyficzne zasady przygotowywania próbek pobranych na etapie produkcji pierwotnej”. Próbkę do badań mikrobiologicznych pobrane ze środków transportowych i/lub liczenie drobnoustrojów



pochodzących od żywych zwierząt lub z ich środowiska są w zakresie niniejszej normy, wyłączone są natomiast próbki pobierane do oceny jakości higienicznej mięsa. Niniejsza część ISO 6887, jako przykład poszerzania się zakresu badanych matryc, ma zastosowanie w przedmiotowej analizie laboratoryjnej próbek pobranych z narzędzi, gospodarstwa rolnego, ze środków transportu zwierząt lub z tusz zwierzęcych w ubojniach, jako wskaźnik stanu mikrobiologicznego.

## Mikrobiologiczne normy metodyczne o charakterze horyzontalnym

Prowadzone od szeregu lat prace normalizacyjne na poziomie zarówno europejskim jak i międzynarodowym mają również na celu ujednoczenie norm metodycznych dotyczących wykrywania drobnoustrojów patogennych, które w swoim zakresie rozciągają się na cały łańcuch żywnościowy. Czołowym zagadnieniem w tym obszarze jest metodyka wykrywania pałeczki *Salmonella*. Obecnie do wykrywania tego patogenu stosuje się powszechnie metodę opisaną w normie PN-EN ISO 6579:2003 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Salmonella* spp.”. Norma ta podaje metodę wykrywania pałeczek *Salmonella*, łącznie z *Salmonella* Typhi i *Salmonella* Paratyphi. Omawiana norma ma zastosowanie do produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi i pasz dla zwierząt oraz próbek środowiskowych z obszarów produkcji żywności i obrotu żywnością. Metoda ta jednak nie zapewnia wykrycia wszystkich szczepów *Salmonella* Typhi i Paratyphi. Z uwagi na zagrożenie osób wykonujących badania ważnym jest, aby wykrywanie *Salmonella* było prowadzone jedynie przez właściwie wyposażone laboratoria, pod kierunkiem wykwalifikowanych mikrobiologów i przy zachowaniu odpowiedniej ostrożności w czasie prowadzenia badań. W 2007 roku opublikowano załącznik normatywny „D” do normy ISO 6579:2002/Amd. 1:2007, który został oznaczony jako PN EN-ISO 6579:2003/A1:2007 „Wykrywanie *Salmonella* spp. w kale zwierząt i próbkach środowiskowych z etapu produkcji pierwotnej”. Procedura tu opisana ma zastosowanie do wykrywania *Salmonella* spp. w kale zwierząt (drobiu) i próbkach pobranych na poziomie produkcji pierwotnej. Warto dodać, że od kilku już lat trwa proces nowelizacji tej normy z podziałem na 3 arkusze metodyczne poświęcone wykrywaniu, oznaczeniu liczby i serotypizacji *Salmonella*.

Kolejnym ważnym, problemem badawczym w badaniu matrycy żywnościowej, paszowej oraz próbek środowiskowych jest wykrywanie i oznaczanie liczby *Listeria monocytogenes*. Aktualnie w laboratoriach do wykrywania *Listeria monocytogenes* stosuje się normę PN-EN ISO 11290-1:1999/A1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda wykrywania obecności”. Nowelizacja metody z 2005 roku wprowadziła modyfikację pożywki do izolacji



tego patogenu i testu na hemolizę, łącznie z precyzją wyników. Do oznaczania liczby bakterii z tego gatunku stosuje się obecnie drugą część normy PN-EN 11290-2:2000/A1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes*. Metoda oznaczania liczby”. Uwzględniając ograniczenia omówione we wprowadzeniu, norma ma zastosowanie do badania wszystkich rodzajów żywności i pasz oraz próbek środowiskowych, a próg wykrywalności metody wynosi 10 lub 100 jtk, odpowiednio: w 1 ml lub 1 g próbki.

Ważnym problemem w badaniu żywności jest również wykrywanie i oznaczanie liczby gronkowca złocistego - *Staphylococcus aureus*. Obecnie w badaniach mikrobiologicznych żywności i pasz stosowana jest norma PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 1. Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera”. Do oznaczania liczby *Staphylococcus aureus* można również stosować normę PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*Staphylococcus aureus* i innych gatunków). Część 2. Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem”. Dla próbek, w których spodziewany jest niski poziom kontaminacji przez gronkowce chorobotwórcze, zalecana jest norma PN-EN ISO 6888-3:2004/AC:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich. Część 3. Wykrywanie obecności i oznaczanie małych liczb metodą NPL”. Metoda ta ma zastosowanie w badaniach próbek produktów żywnościowych, próbek pobranych ze środowiska zakładów produkujących żywność i zajmujących się obrotem żywnością.

Do oznaczania liczby *Bacillus cereus* w żywności i paszach dedykowana jest norma PN-EN ISO 7932:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby przypuszczalnych *Bacillus cereus*. Metoda liczenia kolonii w temperaturze 30°C”, w której stosowane jest podłoże MYP.

Badania ukierunkowane na wykrywanie i oznaczanie liczby bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* są stosowane do oceny stanu sanitarno-higienicznego oraz stopnia zanieczyszczenia kałowego badanej matrycy. Do badań w tym zakresie ma obecnie zastosowanie norma PN-ISO 21528-1:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 1. Wykrywanie i oznaczanie liczby metodą NPL z przednamnażaniem”. Zawarta w normie procedura postępowania badawczego ma zastosowanie do produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych pobranych z obszaru produkcji i obrotu żywnością. Oznaczenie stopnia zanieczyszczenia wykonywane jest metodą NPL po inkubacji płynnej po-



żywki w temperaturze 30°C lub 37°C. Metoda powinna być stosowana w przypadku, gdy poszukiwane drobnoustroje wymagają ożywienia poprzez przednamnażanie oraz gdy szacowana liczba drobnoustrojów mieści się w zakresie od 1 do 100 jtk/gram (ml) badanej próbki. Ograniczenie zastosowania niniejszej części normy wynika z faktu dużego zakresu rozrzutu wyników otrzymywanych opisaną metodą. Drugi arkusz tego dokumentu to norma PN-ISO 21528-2:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania i oznaczania liczby *Enterobacteriaceae*. Część 2. Metoda płytkowa”. W niniejszym arkuszu normy opisano metodę oznaczania liczby *Enterobacteriaceae* bez etapu przednamnażania. Ma ona zastosowanie w badaniu produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych z obszaru produkcji i obrotu żywnością. Warto dodać, że trwają prace nad nowelizacją norm dotyczących *Enterobacteriaceae*, które wprowadzą m.in. podłoże Glucose OF Medium służące do badań potwierdzających.

W dniu 9 września 2004 r. Komisja Naukowa do spraw Zagrożeń Biologicznych (Komisja BIOHAZ) Europejskiego Urzędu ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA) wydała opinię na temat czynników zagrożeń typu mikrobiologicznego występujących w odżywkach dla niemowląt i preparatach pochodnych. W opinii stwierdzono, że mikroorganizmami wymagającymi największej uwagi w przypadku odżywek dla niemowląt, preparatów specjalnego przeznaczenia medycznego oraz preparatów pochodnych są *Salmonella* spp. i *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter sakazaki*). Obecność tych czynników chorobotwórczych stanowi znaczne ryzyko, jeśli warunki po przygotowaniu odżywki do spożycia umożliwiają ich namnażanie. Jako wskaźnik do oceny poziomu ryzyka mogą być wykorzystywane częściej występujące w tych produktach drobnoustroje z rodziny *Enterobacteriaceae*. Ponadto, EFSA zaleciła monitorowanie i badanie obecności *Enterobacteriaceae* zarówno w środowisku produkcyjnym jak i w gotowym produkcie. Ponieważ w rodzinie *Enterobacteriaceae*, oprócz gatunków chorobotwórczych, występują gatunki saprofityczne często obecne w środowisku produkcji żywności i nie stanowiące zagrożenia dla zdrowia, rodzina *Enterobacteriaceae* może być wykorzystywana do rutynowych badań, a w razie wykrycia ich obecności można rozpocząć badania w kierunku wykrywania obecności wybranych patogenów, w tym *Cronobacter sakazakii*. W chwili obecnej do wykrywania obecności tego zarazka proponuje się normę PKN/ISO/TS 22964:2008 „Mleko i przetwory mleczne. Wykrywanie *Enterobacter sakazaki*”.

W zakresie wykrywania i oznaczania liczby *E. coli* jako drobnoustroju wskaźnikowego poziomu higieny w produkcji żywności może być stosowana norma PN-ISO 7251:2006 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby przypuszczalnych *Escherichia coli*. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby”. W niniejszej normie oznaczenie liczby wykonywane jest z zastosowaniem inkubacji płynnej pożywki w temperaturze



35°C lub 37°C. Kolejną normą metodyczną w tym zakresie jest PN-ISO 16649-1:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 1. Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem membran i 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-glukuronidu”. W opisanej metodyce stosuje się pożywkę stałą zawierającą składnik chromogeny w celu wykrycia beta-glukuronidazy oraz specjalne membrany. Drugi arkusz tej normy to PN-ISO 16649-2:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 2. Metoda płytkowa w temperaturze 44°C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo-β-D-glukuronidu”. Do wykrywania patogennych szczepów *E. coli* ma również zastosowanie norma PN-EN ISO 16654:2002 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania *Escherichia coli* O157”. Opisana w normie metoda badania ma zastosowanie przede wszystkim w badaniu żywności.

Kolejną grupą drobnoustrojów ważną z punktu widzenia oceny stanu higienicznego w produkcji żywności i pasz są pałeczki z grupy coli. Warto dodać, że ten rodzaj badań był w przeszłości dosyć powszechnie prowadzony w produkcji i obrocie żywnością. Aktualnie do wykrywania i oznaczania liczby bakterii z grupy coli mogą być wykorzystywane dwie normy polskie zharmonizowane z normami ISO. Pierwsza z nich to PN-ISO 4831:2007 „Mikrobiologia żywności i pasz. Ogólne zasady oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda najbardziej prawdopodobnej liczby”. W niniejszej normie określono horyzontalną metodę oznaczania liczby bakterii z grupy coli techniką najbardziej prawdopodobnej liczby po inkubacji płynnej pożywki w temperaturze 37°C. Niniejsza norma ma zastosowanie do badania produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi lub zwierzęta. Druga z nich to norma PN-ISO 4832:2007 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii z grupy coli. Metoda płytkowa”. Norma opisuje metodę oznaczania liczby bakterii z grupy coli poprzez liczenie kolonii wyrosłych na stałych pożywkach po inkubacji w warunkach tlenowych. Norma może być stosowana do badania produktów przeznaczonych do spożycia przez ludzi i zwierzęta.

Stale rosnąca liczba przypadków kamylobakteriozy ludzi wiąże się z licznymi badaniami nad bakteriami z rodzaju *Campylobacter*. Służą do tego obecnie dwie normy, a mianowicie: PN-EN ISO 10272-1:2007 (AP1:2008) „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 1: Metoda wykrywania” oraz PKN-ISO/TS 10272-2:2008 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Campylobacter* spp. Część 2: Metoda liczenia kolonii”.

Ważną grupę drobnoustrojów w higienie żywności i pasz stanowią tzw. beztlenowe laseczki przetrwalnikujące rodzaju *Clostridium*. W obrębie tego rodzaju znajduje się gatunek *Clostridium botulinum* odpowiedzialny za produkcję

toksyn botulinowych oraz *Clostridium perfringens* ważny z punktu widzenia toksoinfekcji zwierząt i zatruc pokarmowych człowieka. Do norm metodycznych stosowanych w tym obszarze należą dwie normy, a mianowicie: PN-ISO 15213:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby bakterii redukujących siarczyn (IV) rosnących w warunkach beztlenowych” i PN-EN ISO 7937:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby *Clostridium perfringens*. Metoda płytkowa”. Obydwie normy mają zastosowanie do badania produktów spożywczych i pasz oraz próbek środowiskowych w obszarze produkcji i obrotu żywnością.

Do oznaczania ogólnej liczby drobnoustrojów zaleca się obecnie nową normę dwuarkuszową. Pierwszy arkusz to norma PN-EN ISO 4833-1:2013-12 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 1. Oznaczanie liczby metodą posiewu zalewowego w temperaturze 30°C” jest stosowany gdy w badanej próbce spodziewana jest niska liczba drobnoustrojów lub są obecne drobnoustroje rosnące zalewowo, co może utrudniać liczenie wyrosłych kolonii. Drugi arkusz to norma PN-EN ISO 4833-2:2013-12 „Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów. Część 2. Oznaczanie liczby metodą posiewu powierzchniowego w temperaturze 30°C”, która jest przeznaczona do badania próbek zawierających obligatoryjne tlenowce lub liczną populację drobnoustrojów wrażliwych na podwyższoną temperaturę pożywki agarowej. Ponadto ma zastosowanie do badania produktów, których cząstki lub zabarwienie mogą utrudniać liczenie kolonii, a także w sytuacji gdy potrzebne jest różnicowanie kolonii dla oceny jakości produktu. Normy mają zastosowanie do wszystkich matryc łańcucha żywnościowego.

Od 2009 roku obowiązuje w Polsce dwuczęściowa norma metodyczna do oznaczania grzybów w żywności i paszach tj. PN-ISO 21527-1:2009 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część I: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody wyższej niż 0,95” i PN-ISO 21527-2:2009 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drożdży i pleśni. Część 2: Metoda liczenia kolonii w produktach o aktywności wody niższej lub równej 0,95”. Należy wskazać, że aktywność wody ( $a_w$ ) w produkcie spożywczym jest definiowana jako ilość wody dostępnej dla drobnoustrojów. Wartość tę przyjęto w celu dokładniejszego określenia zapotrzebowania określonych mikroorganizmów na wodę. Czysta chemicznie woda posiada  $a_w = 1$ . Wraz z wzrostem stężenia związków rozpuszczalnych aktywność wody spada poniżej wartości 1. Większość drobnoustrojów może rosnąć w środowiskach, których aktywność wody wynosi powyżej 0,95, jednak wzrost niektórych z nich stwierdza się w środowiskach o aktywności wody wynoszącej nawet 0,6. Elementem różnicującym oba arkusze normy jest stosowana





pożywka. Wybór metodyki badawczej może tu budzić pewne wątpliwości, wynikające z nieznamośności bądź różnic w  $a_w$  różnego rodzaju matryc badawczych trafiających do laboratorium. Ułatwieniem w wyborze metodyki jest Załącznik A zawarty w drugiej części normy, uzupełniony przez autorów artykułu o wartości  $a_w$  najczęściej badanych pasz (tabela 1). Pomiar  $a_w$  pasz wykonano urządzeniem AquaLab (Decagon Devices, USA). W zależności od stopnia wysuszenia materiałów paszowych i warunków przechowywania  $a_w$  może się wahać w dość szerokim zakresie. Przykładem mogą tu być chociażby nasiona kukurydzy, których  $a_w$  mieści się w zakresie od 0,5 do 0,8.

Zastosowanie drugiego arkusza normy do badania pasz wyraźnie ogranicza zawarty w niej zapis brzmiący następująco: „Niniejsza część ISO 21527 nie ma zastosowania do produktów w proszku o aktywności wody niższej lub równej 0,60 (zboża w proszku, produkty oleiste, przyprawy, rośliny strączkowe, nasiona, napoje w proszku instant, produkty w proszku dla zwierząt domowych itp.)”. W tej sytuacji metodą oznaczania liczby grzybów w paszach pozostaje metoda opisana w normie PN-R-64791:1994 „Pasze. Wymagania i badania mikrobiologiczne”, gdzie stosowane jest podłoże DRBC. Warto też zaznaczyć, że wspomniana powyżej norma PN-R-64791:1994 jest nadal stosowana do badania mikrobiologicznego pasz, gdzie poza oznaczaniem liczby grzybów, stosuje się ją jeszcze do oznaczania liczby bakterii tlenowych mezofilnych i wykrywania beztlenowych laseczek przetrwalnikujących.

Do oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych zaleca się obecnie normę PN-ISO 17410:2004 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby drobnoustrojów psychrotrofowych”. Inkubacja posiewów w tej metodzie prowadzona jest w temperaturze 6,5°C.

W ocenie jakości pasz coraz częściej jest oznaczana liczba bakterii probiotycznych, zarówno w gotowych mieszankach paszowych jak i dodatkach paszowych zootechnicznych, definiowanych jako stabilizatory flory jelitowej. Do tego celu laboratorium ma do dyspozycji następujące metody normy metodyczne w randze PN, które są zharmonizowane z normami europejskimi (EN):

- PN-EN 15789:2009 „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby szczepów drożdży probiotycznych”.
- PN-EN 15788:2009 „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Enterococcus* (*E. faecium*) spp.”
- PN-EN 15784:2009E „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby przypuszczalnych *Bacillus* spp.”
- PN-EN 15785:2009E „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Bifidobacterium* spp.”
- PN-EN 15786:2009E „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Pediococcus* spp.”
  - PN-EN 15787:2009E „Pasze. Wykrywanie i oznaczanie liczby *Lactobacillus* spp.”

Do oznaczania liczby *Lactobacillus* spp. w żywności i paszach oraz innych matrycach łańcucha żywnościowego ma

zastosowanie norma PN-ISO 15214:2002 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby mezofilnych bakterii fermentacji mlekowej. Metoda płytkowa w temperaturze 30°C”. W metodzie tej liczba żywych mezofilnych bakterii kwasu mlekowego w analizowanej matrycy badana jest na stałej pożywce MRS inkubowanej w temperaturze 30°C przez 72h.

Do kontroli czystości środowiska zakładów produkujących żywność i pasze przeznaczona jest norma PN-ISO 18593:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalne metody pobierania próbek z powierzchni z użyciem płytek kontaktowych i wymazów”. W normie tej pod pojęciem „środowisko” rozumie się wszystko, co ma kontakt z produktem żywnościowym czy paszą i może być źródłem jego pierwotnego i/lub wtórnego zanieczyszczenia (np. materiały, pomieszczenia, personel).

W badaniu parametrów higieny tusz zwierząt rzeźnych w przemyśle mięsnym stosowana jest norma PN ISO 17604:2005 „Mikrobiologia żywności i pasz. Pobieranie próbek z tusz do badań mikrobiologicznych”. W dokumencie tym opisano metody próbobrania w celu wykrycia i oznaczenia liczby mikroorganizmów na powierzchni tusz zwierząt rzeźnych bezpośrednio po uboju. W wyniku kilkuletnich prac została opracowana znowelizowana wersja tej normy, która jest obecnie w dalszym ciągu procedowana i będzie zatwierdzona przez ISO do stosowania w 2015 roku.

Wyrazem dążenia do dalszej optymalizacji wytwarzania i harmonizacji metod kontroli jakości stosowanych pożywek jest ostatnio opracowana i zatwierdzona norma ISO 11133:2013 „Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media. (Mikrobiologia żywności, pasz i wody. Przygotowywanie, wytwarzanie, przechowywanie i kontrola jakości pożywek). Norma ISO 11133 zawiera ogólną terminologię odnoszącą się do kontroli pożywek 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 pożywek w badaniach laboratoryjnych w zakresie określonym w autorskim opracowaniu.

W laboratorium kwestie przygotowania próbek do badań reguluje m.in. norma PN - ISO 6498:2012 „Pasze. Wskazówki do przygotowania próbek do badań”. W niniejszej normie polskiej zharmonizowanej z normą międzynarodową podano metody przygotowania próbek do badań z próbek laboratoryjnych pasz, w tym karmy dla zwierząt domowych.

Reasumując należy stwierdzić, że wszystkie grupy, rodzaje i gatunki drobnoustrojów chorobotwórczych i wskaźnikowych mogą być wykrywane i/lub oznaczane w żywności, paszach i innych matrycach łańcucha żywnościowego przy zastosowaniu polskich norm (PN), które są na ogół zharmonizowane z normami europejskimi (EN) i/lub normami międzynarodowymi (ISO). Jednocześnie występuje silna tendencja do dalszej międzynarodowej harmonizacji i poszerzania zakresu stosowania norm z zakresu mikrobiologii łańcucha żywnościowego.

Piśmiennictwo u Autora



Tab. 1. Aktywność wody w zależności od rodzaju matrycy.

aktywność wody	rodzaj matrycy	
	żywność	pasze
> 0,95	owoce konserwowe, warzywa konserwowe,	-
≥ 0,95	świeże owoce, owoce konserwowe, warzywa, mięso, kielbasy gotowane, ryby, mleko, pieczywo, żywność zawierająca do 4% sacharozy lub 7% NaCl,	mleko dla zwierząt towarzyszących, kiszonka z kukurydzy
≥ 0,91	sery twarde (Cheddar, Szwajcarski), wędzone mięso, wędliny (szynka), niektóre koncentraty soków owocowych zawierające 55% sacharozy lub 12% NaCl,	sianokiszonka
≥ 0,87	kielbasy fermentowane (salami), sery suszone, margaryna, ciasta biszkoptowe, żywność zawierająca 65% sacharozy lub 15% NaCl,	kiszonka z lucerny
≥ 0,80	większość koncentratów soków owocowych, syropy: czekoladowy, owocowy, klonowy, ciasta o dużej zawartości cukru, ciasta owocowe, mleko zagęszczone, mąka, ryż, szynka wiejska, rośliny strączkowe o zawartości wody od 15% do 17%,	nasiona kukurydzy
≥ 0,75	dżemy, marmolady, owoce lukrowane, owoce kandyzowane, marcepan, ptasie mleczko, miękkie cukierki, ciasta,	nasiona kukurydzy
≥ 0,65	płatki owsiane o zawartości wody 10%, galaretki, melasa, orzechy, suszone owoce, miękkie cukierki (np. krówki), nierafinowany cukier trzcinowy,	nasiona soi, śruta sojowa, nasiona kukurydzy, mieszanki paszowe dla zwierząt domowych, sucha karma dla zwierząt towarzyszących
≥ 0,60	suszone owoce o zawartości wody od 15% do 20%, karmel, toffi, miód, batony zbożowe, żywność granulowana,	sucha karma dla zwierząt towarzyszących, zboża i produkty zbożowe, nasiona soi, śruta sojowa, śruta kukurydziana koncentraty dla zwierząt domowych
≥ 0,50	makarony, spaghetti o wilgotności 15% - 20%, przyprawy o zawartości wody 10%, zioła,	nasiona kukurydzy, karma dla ryb, koncentraty dla zwierząt domowych
≥ 0,40	proszek jajeczny o zawartości wody 5%, nugaty,	karma dla ryb
≥ 0,30	ciastka, krakersy, suchary i pieczywo chrupkie o zawartości wody od 3% do 5%, podstawa sosów w proszku,	mączka z krwi drobiowej, mączka drobiowa, mączka z piór, suszona plazma z krwi
≥ 0,20	-	suszona hemoglobina, mączka drobiowa, mączka z piór
≥ 0,10	-	mączka z krwi drobiowej
≥ 0,03	mleko pełne w proszku o zawartości wody od 2% do 3%, zupy w proszku, kawa instant, suszone owoce o wilgotności 5%, płatki kukurydziane o wilgotności 5%,	preparaty mlekozastępcze



# Aktualne zagrożenia mikrobiologiczne w żywności – enterotoksyny gronkowcowe

Jolanta G. Rola

W styczniu 2015 r. Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności (EFSA), wspólnie z Europejskim Centrum Zwalczania i Zapobiegania Chorób (ECDC), opublikował kolejny raport dotyczący występowania chorób odzwierzęcych (zoonoz) oraz ich czynników etiologicznych, zarówno u ludzi jak i u zwierząt, a także w żywności, obejmujący dane za 2013 r. Dane zoonotyczne zawarte w raporcie pochodzą z 28 krajów członkowskich UE oraz 4 krajów spoza UE. Obejmuje on 13 czynników i chorób zoonotycznych w tym *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, werotoksyczne *E. coli* czy *Campylobacter*. Zebrano również informacje dotyczące innych szkodliwych czynników w żywności takich jak koagulazo-dodatnie gronkowce i enterotoksyny gronkowcowe, a także odnotowanych epidemii pokarmowych. Na podstawie prezentowanych w raporcie EFSA danych, zatrucia pokarmowe wywołane przez toksyny bakteryjne znajdują się na trzecim miejscu po zachorowaniach wywołanych przez bakterie z rodzaju *Salmonella* spp. (22,5% wszystkich epidemii) i wirusy (18,1%). W ostatnich 6 latach zaobserwowano wyraźny wzrost ich liczby z 525 do 834 ognisk choroby (59,8%). Ten sam raport stwierdza, że w 2013 r. niemal połowę (46,3%) zatruc pokarmowych wywołanych przez toksyny bakteryjne (*Bacillus*, *Clostridium*, *Staphylococcus*), spowodowanych było przez enterotoksyny gronkowcowe, co stanowi 7,4% wszystkich raportowanych epidemii pokarmowych. Wskaźnik zapaadalności wyniósł 0,13 na 100 000 osób. Hospitalizacji wymagało 6,6% osób wykazujących objawy gronkowcowego zatrucia pokarmowego, natomiast nie odnotowano przypadków śmiertelnych. Najwyższy odsetek zatruc pokarmowych na tym tle, wywołany był spożyciem zanieczyszczonej toksynami żywności mieszanej. Kolejnymi kategoriami żywności powodującymi zatrucia pokarmowe na tym tle były warzywa i soki oraz produkty je zawierające, a następnie mięso wieprzowe i produkty z takim mięsem (Tabela 1).

Gronkowcowe zatrucia pokarmowe (staphylococcal food poisoning – SFP) charakteryzują się krótkim okresem inkubacji (do 8 godzin) oraz gwałtownym przebiegiem. Do głównych objawów zalicza się nudności, wymioty i ból brzucha. Objawy zwykle ustępują samoistnie po 24-48 godzinach. Powikłania, rzadko występujące, odnotowuje się głównie u osób starszych i dzieci.

Dotychczas opisano 23 enterotoksyny gronkowcowe. Enterotoksyny zdolne do wywołania wymiotów określa się jako właściwe (staphylococcal enterotoxin – SEs) w odróżnieniu

od tych nie posiadających właściwości wymiotnych lub o nie potwierdzonych jeszcze właściwościach. Pięć najwcześniej odkrytych enterotoksyn gronkowcowych (SEA – SEE) określanymi jest mianem klasycznych. Enterotoksyny gronkowcowe wykazują znaczną termostabilność, zachowując aktywność biologiczną nawet po przeprowadzeniu procesu pasteryzacji, który niszczy gronkowce znajdujące się w żywności. Charakteryzują się też dużą opornością na enzymy proteolityczne dzięki czemu nie tracą aktywności w układzie pokarmowym. Parametry fizykochemiczne wpływające na wzrost *Staphylococcus aureus* i produkcję enterotoksyn przedstawiono w tabeli 2. Intoksykację w przebiegu gronkowcowego zatrucia pokarmowego u ludzi wywołują przede wszystkim enterotoksyny A i D oraz w mniejszym zakresie B i C. Odnotowano, że szczepy *S. aureus* izolowane z mleka i serów w Szwajcarii i Włoszech posiadały głównie geny *sed* i *sea* odpowiedzialne za produkcję enterotoksyn SED i SEA w odróżnieniu od doniesień z Japonii, Austrii, Francji i Turcji, gdzie przeważały izolaty z genem *sec* kodującym toksynę SEC. W Polsce od 14,3% do 26,3% szczepów *S. aureus* izolowanych z przypadków *mastitis* u bydła wytwarzało enterotoksynę SEC, 10,8% – 71,4% enterotoksynę SEA, 4,8% – 14,3% SED i 1,2%, SEB. W przypadku izolatów



z mleka surowego krowiego najczęściej identyfikowano geny enterotoksyn SEC i SEA, odpowiednio 45% i 30%. Z drugiej strony, w innych badaniach dotyczących produkcji serów z mleka surowego w Polsce potwierdzano u wyizolowanych koagulazo-dodatnich gronkowców występowanie głównie genu enterotoksyny SED (60,7%).

Zgodnie z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 2073/2005 (z późn. zm.) wskazaniem do badania produktów na obecność enterotoksyn gronkowcowych jest liczba gronkowców koagulazo-dodatnich przekraczająca  $10^5$  jtk/g na różnym etapie produkcji w zależności od rodzaju produktu. Badaniami objęte są sery, mleko w proszku i serwatka w proszku. Produkt uważa się za bezpieczny dla zdrowia konsumenta jeżeli w każdej z 5 badanych próbek o masie 25 g nie wykryto enterotoksyn gronkowcowych. Jednocześnie jako referencyjną metodę wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w tych produktach wskazano Europejską metodę skринingową opracowaną przez Laboratorium Referencyjne Unii Europejskiej ds. gronkowców koagulazododatnich w tym *S. aureus* (Reference Laboratory for Coagulase Positive Staphylococci, including Staphylococcus aureus - EURL CPS). Obecnie trwają prace dotyczące standaryzacji i walidacji metody, prowadzące do zatwierdzenia jej jako normy EN ISO. Krajowe laboratoria referencyjne ds. gronkowców koagulazo-dodatnich (Laboratorium Zakładu Bezpieczeństwa Żywności Narodowego Instytutu Zdrowia Publicznego – Państwowego Zakładu Higieny i Laboratorium Zakładu Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego Instytutu Weterynaryjnego w Puławach) biorą udział w walidacji tej metody. Rutynowe badania obecności enterotoksyn gronkowcowych na zgodność z rozporządzeniem Komisji (WE) nr 2073/2005 wykonują laboratoria urzędowe Inspekcji Sanitarnej i Inspekcji Weterynaryjnej. Potwierdzeniem kompetencji tych laboratoriów jest udział i pozytywny wynik uczestnictwa w badaniach biełgłości organizowanych przez krajowe laboratoria referencyjne. Coraz częściej badania obecności enterotoksyn gronkowcowych dotyczą także produktów do żywienia psów i kotów.

Dokument EURL CPS przedstawiający Europejską skринingową metodę wykrywania enterotoksyn gronkowcowych, wersja 5 z września 2010 roku zawiera opis wykrywania enterotoksyn gronkowcowych typu od SEA do SEE w żywności. Obejmuje ona dwa etapy. Pierwszym z nich jest ekstrakcja i zagęszczanie próbki. próbka jest mieszana z wodą destylowaną i homogenizowana. Toksyny dyfundują do wody i są odzyskiwane w supernatancie po 2 wirowaniach. Faza wodna jest zagęszczana przez noc na drodze dializy. Kolejnym etapem jest detekcja metodą immunoenzymatyczną (Vidas SET 2, bioMerieux lub Ridascreen SET Total, R-Biopharm).

Test Vidas SET 2 jest szybką i w pełni zautomatyzowaną, jakościową metodą wykrywania enterotoksyn gronkowcowych typu A – E. W skład zestawu wchodzi pipetki SPR (Solid Phase Receptacle), których wnętrze opłaszczone jest przeciwciałami specyficznymi dla enterotoksyn gronkowcowych typu A, B, C, D i E. Kompleks immunologiczny powstaje między przeciwciałami opłaszczającymi wnętrze pipetki, enterotoksynami gronkowcowymi obecnymi w zagęszczonym ekstrakcie i przeciwciałami anty – SE znakowanymi fosfatazą alkaliczną. Wszystkie odczynniki niezbędne

do wykonania testu znajdują się w szczelnie zamkniętych studzienkach pasków testowych i są gotowe do użycia. Zagęszczony ekstrakt lub próbki kontrolne są wprowadzane do studzienek paska testowego i inkubowane w aparacie Vidas lub miniVidas. Analizator wykonuje dwa fluorescencyjne pomiary (fluorescencja próbki, fluorescencja tła). Stosunek (Relative Fluorescent Value - RFV) między tymi dwoma pomiarami pozwala na interpretację wyniku i stwierdzenie czy próbka jest dodatnia czy ujemna.

Zestaw Ridascreen SET Total jest jednym z handlowych testów przydatnych do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w żywności. Metoda wykrywania enterotoksyn gronkowcowych przy użyciu zestawu Ridascreen SET Total oparta jest na teście sandwich EIA. Fazę stałą stanowią studzienki opłaszczone przeciwciałami specyficznymi dla enterotoksyn gronkowcowych. Kompleks immunologiczny powstaje w wyniku łączenia się przeciwciał opłaszczających studzienki mikropłytki, enterotoksyn obecnych w badanej próbce i przeciwciał przeciw enterotoksynie gronkowcowej znakowanych peroksydazą. Obecność enterotoksyn stwierdza się na podstawie reakcji kolorymetrycznej przy długości fali 450/630 nm.

Immunologiczne metody wykrywania enterotoksyn gronkowcowych charakteryzują się wysoką specyficznością i czułością mają jednak pewne wady. Zaobserwowano niespecyficzne reakcje, które mogą być przypisane enzymom endogennym, takim jak fosfataza alkaliczna (Vidas SET 2) czy laktoperoksydaza (Ridascreen SET Total), pochodzącym z surowego mleka. W takim przypadku należy podjąć stosowne działania aby wykluczyć ich wpływ na wynik badania.

Przytoczone dane piśmiennictwa z walidacji metody i międzylaboratoryjnych badań porównawczych wskazują na odpowiednio wysoką czułość i specyficzność testów immunoenzymatycznych, pozwalającą z powodzeniem na ich wykorzystanie do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w żywności. Automatyzacja analiz, zastosowanie analizatora miniVidas/Vidas wydatnie upraszcza i skraca czas trwania badania oraz zapewnia standaryzację wykonanych badań i uzyskanych wyników (tabela 5).

*Piśmiennictwo u Autora*

**Tabela 1. Żywność związana z gronkowcowymi zatruciami pokarmowymi w UE w 2013 r. (N=94) – wg raportu EFSA.**

Rodzaje produktów	Udział w SFP (%)
Produkty mieszane	19,1
Warzywa i soki	12,8
Mięso wieprzowe i produkty z mięsa wieprzowego	10,6
Mięso wołowe i produkty z mięsa wołowego	6,4
Sery	6,4
Ryby i produkty rybne	6,4
Wyroby piekarnicze	5,3
Mięso i produkty mięsne (inne, np.: innych gatunków, mieszane,)	6,4
Inne produkty, np.: wyroby garmażeryjne, produkty zbożowe, jaja i produkty jajeczne, mleko i produkty mleczne inne niż sery, inne)	26,6

**Tabela 2. Parametry fizykochemiczne wpływające na wzrost *Staphylococcus. aureus* i produkcję enterotoksyn gronkowcowych – WE, 2003.**

Parametr	Wzrost <i>S. aureus</i>	Produkcja enterotoksyn		
	Wartości optymalne	Wartości graniczne	Wartości optymalne	Wartości graniczne
Temperatura (°C)	37	7 - 48	40 - 45	10 - 48
pH	6 - 7	4 - 10	7 - 8	4 - 9,6
NaCl (%)	0	0 - 20	0	0 - 10
Aktywność wody ( $a_w$ )	0,98	0,83 - >0,99 <sup>1</sup>	0,98	0,85 - >0,99 <sup>2</sup>
Atmosfera	tlenowa	beztlenowa - tlenowa	Tlenowa (5 - 20% rozpuszczonego O <sub>2</sub> )	beztlenowa - tlenowa

<sup>1</sup> Atmosfera tlenowa (beztlenowa) 0,90 - >0,99

<sup>2</sup> Atmosfera tlenowa (beztlenowa) 0,92 - >0,99

**Tabela 3. Czulość, specyficzność i dokładność europejskiej metody skringowej – wykrywanie w mleku i produktach mlecznych wg raportu EU-RL CPS z 2011 r..**

Badania międzylaboratoryjne		
Matryca: ser z mleka krowiego naturalnie zanieczyszczony enterotoksyną D		
Poziom zanieczyszczenia	DC* + Ridascreeen 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 <sub>relative</sub> = 84%		
Badania wewnątrzlaboratoryjne		
Dokładność AC = 97%		
Względna specyficzność SP <sub>relative</sub> = 97%		
Względna czulość SE <sub>relative</sub> = 97%		

\*DC – dializa/zagęszczanie

**Tabela 4. 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		
Matryca: ser z mleka krowiego naturalnie zanieczyszczony enterotoksyną E		
Poziom zanieczyszczenia	DC* + Ridascreeen 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 1,25 ng/g	Czulość SE = 100%	Czulość SE = 100%
Badania wewnątrzlaboratoryjne		
DC* + Ridascreeen SET Total		
Dokładność AC = 91%		
Względna specyficzność SP <sub>relative</sub> = 89%		
Względna czulość SE <sub>relative</sub> = 97%		
DC* + Vidas SET2		
Dokładność AC = 96%		
Względna specyficzność SP <sub>relative</sub> = 96%		
Względna czulość SE <sub>relative</sub> = 97%		

\*DC – dializa/zagęszczanie

**Tabela 5. Charakterystyka testów.**

Test	Technika badania	Wykrywane enterotoksyn	Czas badania	LOD (ng/ml)
Vidas SET 2	ELFA*	A - E	1 h 20 min	≥0,25 ng/ml
Ridascreeen SET Total	EIA**	A - E	2 h 45 min	0,25 ng/ml

\* – Enzyme Linked Fluorescent Assay

\*\* – Enzyme Immuno Assay

# Elementy kontroli czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji



Alina Kunicka-Styczyńska  
Instytut Technologii Fermentacji i Mikrobiologii Politechniki Łódzkiej

## Wprowadzenie

Zapewnienie prawidłowej czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji żywności jest jednym z podstawowych warunków właściwego prowadzenia procesu produkcyjnego. Procedury mycia i dezynfekcji linii technologicznej oraz utrzymywania odpowiedniego stanu higienicznego jej otoczenia obejmują monitorowanie nie tylko poziomu mikroorganizmów saprofitycznych, ale również drobnoustrojów wskaźnikowych. Wykorzystywanie w produkcji wysokiej jakości surowców oraz wody technologicznej nie jest gwarancją trwałego bezpieczeństwa mikrobiologicznego. Surowce stosowane do produkcji żywności są bogatym źródłem węglowodanów i białek, co w połączeniu zwykle z wysoką aktywnością wody tych matryc, stwarza doskonałe warunki do rozwoju mikroorganizmów. Nawet duży ładunek drobnoustrojów nie musi nieść ze sobą widocznych makroskopowo objawów zepsucia surowców. Wizualne oznaki działalności bakterii i grzybów obserwuje się zazwyczaj przy ich namnożeniu do poziomu dziesiątek lub setek milionów komórek w jednym gramie lub mililitrze. Wniesione drobnoustroje są zwykle niszczone podczas operacji technologicznych, a liczebność populacji mikroorganizmów zanieczyszczających maleje sekwencyjnie. Pojedyncze komórki stanowią jednak niebezpieczeństwo tworzenia biofilmów na wewnętrznych i zewnętrznych powierzchniach instalacji. Bakterie, drożdże i spory pleśni w strukturze biofilmu wykazują wielokrotnie wyższą oporność na niszczące czynniki fizyczne i chemiczne, w porównaniu z formami planktonicznymi tych samych szczepów. Szczególnie niebezpieczne są drobnoustroje chorobotwórcze lub potencjalnie chorobotwórcze. Bakterie chorobotwórcze są nieodłącznym elementem każdego ekosystemu w środowisku naturalnym i mogą być wnoszone zarówno z surowcem, jak i przez personel produkcyjny. Niebezpieczeństwo znacząco wzrasta w przypadku namnożenia komórek do osiągnięcia dawki infekcyjnej. Zagrożenie dla konsumenta stanowią nawet pojedyncze komórki w jednostkowym opakowaniu produktu w przypadku bakterii z rodzaju *Salmonella*, których dawka infekcyjna wynosi od 1 do 100 komórek. Niskie dawki infekcyjne zostały określone również dla innych patogenów wnoszonych drogą pokarmową, np.: *Escherichia coli* O157 (2-2000 komórek), *Campylobacter* spp. (500-800 komórek), *Listeria*

*monocytogenes* lub *Listeria ivanovii* (100-1000 komórek dla osobników z grup podwyższonego ryzyka). Na infekcje narażone są głównie kobiety w ciąży, noworodki, niemowlęta oraz dorośli z osłabionym systemem immunologicznym.

Należy także pamiętać, że jakiegokolwiek drobnoustroje wniesione do zakładu cyrkulują w środowisku produkcyjnym, a powietrze jest ośrodkiem gdzie nie tylko mogą one czasowo przebywać, ale są też przenoszone na cząstkach pyłu i kurzu. Ze względu na dużą wilgotność powietrza na niektórych etapach produkcji tworzą się bioaerozole, co znacznie zwiększa przeżywalność komórek wegetatywnych w powietrzu.

Produkcja żywności prowadzona jest zgodnie z zasadami Dobrej Praktyki Higienicznej (GHP, ang. Good Hygiene Practice), a kontrola jakości według ustalonych dla poszczególnych zakładów i linii technologicznych procedur HACCP (ang. Hazard Analysis and Critical Control Points). Ten system kontroli, określany polską nazwą Analiza Zagrożeń i Krytyczne Punkty Kontroli, pozwala na identyfikację ryzyka i zapobieganie zakłóceniom w produkcji skutkującym obniżeniem jakości i bezpieczeństwa wytwarzanych produktów. Jako zagrożenie uznaje się cechę produktu, powodującą że jego spożycie będzie niebezpieczne dla ludzi, a jego przyczyną może być czynnik biologiczny, chemiczny lub fizyczny zaistniały w produkcji. System HACCP został uznany przez Komisję wspólną FAO i WHO Codex Alimentarius za najbardziej skuteczny sposób kontroli patogenów przenoszonych drogą pokarmową. Prowadzone w zakładach przemysłu spożywczego monitorowanie stanu higienicznego warunków produkcji obejmuje: wewnętrzne i zewnętrzne powierzchnie maszyn, urządzeń oraz linii technologicznych; wodę stosowaną do produkcji; powietrze w halach produkcyjnych; pracowników pozostających w bezpośrednim kontakcie z produktem na wszystkich etapach jego wytwarzania. System kontroli wykracza poza zakład produkcyjny, wskazując na konieczność nadzorowania całego łańcucha produkcji żywności, włączając produkcję pierwotną (wytwarzanie surowców stosowanych w procesie technologicznym), magazynowanie gotowego produktu i jego transport, kończąc na sprzedaży. Określenie zagrożeń mikrobiologicznych w systemie ciągłego monitoringu na każdym etapie wytwarzania żywności od pola czy obory do

stołu konsumenta wymaga stosowania wiarygodnych i nowoczesnych technik analizy mikrobiologicznej. Najczęściej wykorzystywane do oceny czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji żywności i jej dystrybucji są techniki stanowiące modyfikacje metod hodowlanych. Użyteczne testy powinny również umożliwiać szybkie i wygodne pobranie próbek oraz bezpieczny transport do laboratorium mikrobiologicznego.

### Kontrola czystości mikrobiologicznej powierzchni

Zależnie od rodzaju produkcji i stosowanych surowców, wskazuje się grupy drobnoustrojów, których obecność świadczy o potencjalnym zagrożeniu dla bezpieczeństwa i trwałości mikrobiologicznej produktu. Najważniejsze wśród wskaźników jakości QI (ang. Quality Indicators) są oznaczenia ogólnej liczby drobnoustrojów mezofilnych, liczby drożdży i pleśni, liczby bakterii z grupy coli, bakterii *Escherichia coli*, bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae*, pałeczek bakterii mlekowych z rodzaju *Lactobacillus* oraz gronkowców koagulazo-dodatnich *Staphylococcus aureus*. Standardowo, w przypadkach monitorowania dużej liczby punktów krytycznych oznacza się ogólną liczbę drobnoustrojów mezofilnych oraz liczbę drożdży i pleśni. Monitorowanie nawet tych podstawowych wskaźników QI zapewnia kontrolę mikrobiologiczną w czasie procesu produkcji i ustalenie poziomu higieny produkcji. Istotny jest również dobór stosowanej w monitoringu mikrobiologicznym metody oznaczania poziomu mikroorganizmów zanieczyszczających.

Rutynową metodą określania liczby drobnoustrojów rezydujących na powierzchniach produkcyjnych jest technika wymazów (polegająca na przeniesieniu drobnoustrojów z badanej powierzchni do rozcieńczalnika), w połączeniu z wysiewem tej zawiesiny zwykle na pożywki agarowe. Chociaż metoda płytkowa jest złotym standardem analiz mikrobiologicznych, nie jest ona pozbawiona wad. Posiew na pożywkach agarowych wykonuje się przynajmniej w 2 powtórzeniach dla jednego rozcieńczenia, a rozcieńczenia powinny być tak dobrane aby uzyskać od 30 do 300 kolonii na płytce. Często prognozowanie poziomu zanieczyszczenia środowiska produkcji może być trudne, a uzyskanie dokładnego wyniku wymaga posiewu dwóch lub trzech kolejnych rozcieńczeń. Oznaczenia metodą płytkową obarczone są błędem; i tak przy liczbie 2700 wyrosłych kolonii błąd wynosi 5%, dla 700 policzonych kolonii błąd wzrasta do 10%, a dla 200 kolonii błąd metody wynosi 20%. Stosowanie klasycznej techniki posiewu płytkowego jest również czasochłonne i pracochłonne, co przy konieczności kontroli dużej liczby punktów krytycznych generuje znaczne koszty. Wprowadzenie płytek kontaktowych istotnie usprawnia przeprowadzenie analizy, a zmniejszenie liczby operacji (pobranie próbki następuje przez bezpośrednie zetknięcie powierzchni pożywki z badaną powierzchnią) redukuje błędy podczas rozcieńczania i wysiewu. Wykorzystanie płytek kontaktowych jest zgodne z normą PN-ISO 18593 dotyczącą badania powierzchni przemysłowych.

Bezpośrednie pobranie materiału do kontroli higieny powierzchni umożliwiają **płytki Count-Tact™** (bioMérieux). Płytki z pożywkami agarowymi mają menisk wypukły, co



ułatwia pobranie materiału. Wygodny w użyciu, ergonomiczny aplikator zapewnia standaryzację poboru próbki. Stosowanie aplikatora zapewnia pobór próbki przy nacisku na powierzchnię 500 gram i 10-sekundowym czasie ekspozycji. Na podkreślenie zasługuje szeroki zakres pożywek.

Do monitoringu higieny powierzchni w pomieszczeniach niejałowych przeznaczona jest pożywka Count-Tact Agar zawierająca 4 neutralizatory (lecytynę, polisorbitat 80, L-histydynę i tiosiarczan sodu), co zapewnia równoczesną inaktywację pozostałości większości stosowanych w przemyśle środków myjących i dezynfekcyjnych. Zależnie od sposobu higienizacji powierzchni, może być użyty Count-Tact GTS Agar bez neutralizatorów. Zakres wskaźników jakości QI uzupełnia Agar Count-Tact VRBG do wykrywania obecności i poziomu bakterii z rodziny *Enterobacteriaceae* i Agar Count-Tact YGC do określania liczby drożdży i pleśni.

Monitoring higieny powierzchni w pomieszczeniach jałowych można prowadzić z zastosowaniem pożywek Agar Count-Tact sterylizowanych radiacyjnie, również w paczkach potrójnie opakowanych. Trzy warstwy opakowania pozwalają na zachowanie bezpieczeństwa sterylności pomieszczeń podczas pobierania próbek. Do określania liczby grzybów przeznaczona jest pożywka Agar Count-Tact Sabouraud Dekstroza Chloramfenikol z neutralizatorami, sterylizowana radiacyjnie. Dostępne są też pożywki Count-Tact i Tryptase Soy Agar z dodatkiem  $\beta$ -laktamazy, neutralizującej antybiotyki. Uzupełnieniem systemu Count-Tact jest jałowy, plastikowy pojemnik BI-BOX, zapewniający

bezpieczny transport do laboratorium i przechowywanie płytek po pobraniu materiału. Wykorzystanie pojemników BI-BOX znacznie ułatwia przeprowadzenie poboru materiału do badań, szczególnie gdy istnieje konieczność monitorowania kilku lub kilkunastu punktów krytycznych rozmieszczonych w różnych miejscach zakładu produkcyjnego.

System Count-Tact może być z powodzeniem wykorzystywany do kontroli czystości mikrobiologicznej ubrania, rękawic i rąk personelu produkcyjnego. Flora rąk jest szczególnie bogata, a drobnoustroje tam bytujące przenoszone są na powierzchnię rękawic, ubrania i następnie wnoszone na powierzchnie produkcyjne stanowią zagrożenie dla produktu. Mikroorganizmy znajdujące na powierzchni rąk klasyfikowane są w dwóch kategoriach: (i) przejściowe, występujące tylko okresowo na powierzchni skóry, niespecyficzne dla danego człowieka, charakterystyczne dla otoczenia; (ii) osiadłe, które mają charakter osobniczy, są to zwykle ziarniaki i gronkowce koagulazododatnie, występują na powierzchni i w szczelinach skóry oraz w zachyłkach gruczołów łojowych. Drobnoustroje zaliczane jako przejściowe można łatwo usunąć podczas mycia rąk, natomiast do usunięcia mikroorganizmów osiadłych konieczne jest mycie i szczotkowanie oraz stosowanie środków bakterioobójczych.

Przykładowo, na powierzchniach w pokojach jałowych znajdowane były przede wszystkim gronkowce *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus hominis* i *Staphylococcus haemolyticus* i pleśnie z rodzaju *Aspergillus*. O ile wyniki badań czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji zakładów spożywczych nie są ujawniane, to w literaturze znajdują się opracowania dotyczące stanu higieny pomieszczeń i urządzeń w miejscach dystrybucji żywności i ośrodkach żywienia zbiorowego. Dobry przykład stanowią badania przeprowadzone w stołówkach 120 brazylijskich szkół publicznych. Na podstawie poziomu mikroorganizmów saprofitycznych stołówki 33% szkół sklasyfikowano jako środowiska o wysokim ryzyku dla zdrowia konsumentów, a 64 i 3% odpowiednio jako niosące średnie i niskie ryzyko. Interesujące jest, że poziom zanieczyszczenia mikrobiologicznego (TVC, ang. Total Viable Count) wyrażony jako mediana wynosił 27,3 jtk/cm<sup>2</sup> powierzchni blatów; 15 jtk/cm<sup>2</sup> powierzchni desek do krojenia; 14,5 jtk/cm<sup>2</sup> powierzchni wewnętrznej blenderów i 2 jtk/cm<sup>2</sup> powierzchni umytych naczyń.

Przy wyborze techniki wymazu, ważny jest dobór narzędzia służącego do zebrania drobnoustrojów z powierzchni. Polska norma PN-ISO 18593 definiuje wymazówkę jako łatwo łamiącą się pałeczkę z przędzą bawełnianą lub materiałem syntetycznym, podając przykład materiałów: alginianu lub sztucznego jedwabiu. Materiał oraz sposób jego naniesienia na pałeczkę determinuje zarówno efektywność zbierania komórek drobnoustrojów z powierzchni, jak i stopień ich odmycia do rozcieńczalnika. Główna wymazówki QUANTISWAB oferowanej przez firmę bioMérieux jest wytwarzana z nylonu i utworzona w kształcie szczoteczki. Takie rozwiązanie zapewnia odzysk 60% komórek, trzykrotnie wyższy w porównaniu z tradycyjną główką wykonaną z bawełny. Dodatkowym udogodnieniem jest załączona w zestawie probówka transportowa.

## Badanie czystości mikrobiologicznej powietrza

System HACCP nakłada na producenta konieczność badania czystości mikrobiologicznej powietrza w punktach krytycznych, w których dochodzi do kontaktu produktu z powietrzem. Wiarygodna ocena jego stanu mikrobiologicznego możliwa jest jedynie przy właściwym próbkowaniu, zapewniającym zbadanie reprezentatywnej próbki o ściśle określonej objętości. Spośród dostępnych komercyjnie technik poboru, najczęściej wybierana jest metoda zderzeniowa, polegająca na zderzeniu zdefiniowanej objętości strumienia powietrza z powierzchnią pożywki hodowlanej. Ta wygodna w stosowaniu technika zapewnia równoczesny pobór próbki powietrza i posiew znajdujących się w nim mikroorganizmów i nie wymaga dodatkowych wysiewów w laboratorium mikrobiologicznym.

Do oceny poziomu mikroorganizmów znajdujących się w powietrzu firma bioMérieux proponuje **próbnik air IDEAL 3P™**. Oznaczenie jest odmianą metody zderzeniowej. Dzięki wbudowanej turbinie, powietrze o określonej przez analityka objętości, jest zasysane i po przejściu przez perforowaną przegrodę zderza się z powierzchnią pożywki. Drobnoustroje niesione wraz ze strumieniem powietrza przyklejają się do powierzchni pożywki, a ich liczba odczytywana jest po inkubacji płytek, jako jednostki tworzące kolonie. Liczbę komórek zawartych w 1 m<sup>3</sup> powietrza odczytuje się z tablic dołączonych do aparatu. Zaletą aparatu jest jego niska masa (1,2 kg) oraz pełna automatyzacja poboru próbki (programowany czas pobrania i objętość powietrza), z możliwością opóźnienia startu do 60 minut. Pięć wymiennych ekranów, które mogą być sterylizowane, umożliwia pobór próbek z miejsc o zróżnicowanym zanieczyszczeniu bez konieczności dezynfekcji pomiędzy kolejnymi pomiarami. Aparat wyposażony jest w ekran do poboru próbek o średnicy 90 mm i 65/70 mm. Elastyczność, automatyzacja oraz łatwość obsługi pozwala na szybki i właściwy pobór próbki powietrza nawet przez osoby spoza laboratorium mikrobiologicznego. Próbnik charakteryzuje się wysoką skutecznością fizyczną, definowaną jako zdolność do pochłaniania znajdujących się w powietrzu cząstek o różnej wielkości. Przeprowadzona przez Agencję Ochrony Zdrowia (Anglia) walidacja aparatu pod kątem zgodności z wymaganiami normy ISO 14698-1 stwierdza, że *Air IDEAL 3P* pochłania cząstki o wielkości powyżej 5 µm ze skutecznością równą 100% w porównaniu do metody referencyjnej. Ponadto, próbnik pochłania spory bakterii o wielkości równej i większej niż 2,1 µm ze skutecznością 85-139% w porównaniu z metodą referencyjną. Wskazano również, że próbnik zbiera bakterie *Staphylococcus epidermidis* ze skutecznością 92,1%. Powyższe parametry dowodzą nie tylko zgodności z wymogami normy ISO 14698, ale również stawiają aparat w czołówce komercyjnych próbników powietrza dostępnych na rynku.

Skład jakościowy i ilościowy mikroorganizmów znajdujących się w powietrzu warunkowany jest wieloma czynnikami środowiskowymi, takimi jak: klimat, pora roku, obecność roślinności i zwierząt, gleba, promieniowanie UV i IR oraz fizjologia mikroorganizmów (kształt komórki, zdolność do tworzenia form przetrwalnych, tolerancja niskiej aktywności wody, tworzenie pigmentów karotenoi-



dowych). Chociaż uznaje się, że w powietrzu przeważają zwykle konidia pleśni, to skład jakościowy mikroorganizmów powietrza może być znacznie zróżnicowany, zależnie od miejsca poboru próbki. W powietrzu najczęściej znajdowane są: ziarniaki z rodzajów *Micrococcus*, *Sarcina* i *Staphylococcus*; pałeczki z rodzajów *Alcaligenes* i *Bacillus*; konidia pleśni z rodzajów *Cladosporium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Alternaria*, *Botrytis*, *Rhizopus* i *Mucor*. Wśród izolowanych drożdży najczęściej identyfikuje się gatunki z rodzajów *Rhodotorula*, *Torulopsis* i *Candida*. W powietrzu mogą być również przenoszone drobnoustroje chorobotwórcze takie jak: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Clostridium* spp.. Patogeny mogą również cyrkulować w powietrzu na farmach hodowlanych i w ubojniach bydła. Bakterie *Salmonella Typhimurium* oraz *Listeria monocytogenes* izolowano z powietrza pobranego z obór dla bydła i owiec, a *Salmonella Derby* z chlewni.

### Identyfikacja bakterii *Legionella* izolowanych z wody

W ostatnich latach szczególną uwagę zwraca się na niebezpieczeństwo zanieczyszczenia bakteriami z rodzaju *Legionella* w systemach dystrybucji wody. Bakterie te powszechnie występują w wodach powierzchniowych, jeziorach oraz łatwo wnikają do systemów dystrybucji wody. Namnażają się w komórkach pierwotniaków i stanowią powszechny element heterogennych biofilmów w środowiskach wodnych. Znajdowane są w domowych i publicznych instalacjach wodnych, systemach rozprowadzania ciepłej wody do celów sanitarnych oraz wieżach chłodniczych. Ze względu na wysokie ryzyko zakażenia bakteriami z rodzaju *Legionella* zaleca się prowadzenie regularnej kontroli obiegów wody w środowisku przemysłowym, szpitalach, hotelach, szkołach i przedszkolach oraz innych sieciach wodnych dostarczających wodę użytkową. Zestaw pożywek i testów do wykrywania i liczenia *Legionella*

i *Legionella pneumophila* w środowisku wodnym firmy bioMérieux obejmuje pożywkę GVPC przeznaczoną do wykrywania i liczenia przypuszczalnych *Legionella* oraz pożywkę BCYE z dodatkiem L-cysteiny lub bez służącej do potwierdzenia rodzaju *Legionella*. Uzupełnienie systemu stanowi **Slidex Legionella Kit**, szybki, lateksowy test aglutacyjny do identyfikacji wszystkich grup serologicznych bakterii *Legionella pneumophila* i *Legionella anisa*.

Wśród szczepów bakterii z rodzaju *Legionella* znajdujących w wodzie, 75% stanowi *Legionella pneumophila*, przy czym dominuje grupa serologiczna 1. *Legionella pneumophila* grupa serologiczna 1 reprezentuje od 91 do 95% szczepów w próbkach klinicznych i około 30% w próbkach środowiskowych. Bakterie *Legionella anisa* stanowią 14% szczepów wśród izolatów identyfikowanych jako gatunki inne niż *Legionella pneumophila*.

### Podsumowanie

Stałe monitorowanie czystości mikrobiologicznej środowiska produkcji stało się nie tylko obowiązkiem producentów, ale również stanowi użyteczne narzędzie w procesie kontroli jakości. Wczesne wykrycie zagrożenia mikrobiologicznego daje możliwość szybkiej reakcji i podjęcia natychmiastowych środków zaradczych, minimalizując lub nawet eliminując straty ekonomiczne. Prawidłowa kontrola środowiska produkcji wymaga jednak ciągłego poboru próbek często w kilkunastu czy kilkudziesięciu punktach linii technologicznej. Zastosowanie wiarygodnych i wygodnych w użyciu systemów testów mikrobiologicznych dedykowanych do kontroli środowiska mikrobiologicznej produkcji znacznie usprawnia pobór próbek i skraca czas poświęcony na wykonanie analiz. Elastyczność proponowanych przez firmę bioMérieux systemów pozwala na zaprojektowanie indywidualnej dla każdego zakładu ścieżki kontroli stanu higienicznego linii technologicznej, personelu, powietrza i wody technologicznej.

*Piśmiennictwo u Autora*



# Monitorowanie temperatury i innych parametrów fizycznych w laboratorium

Mgr Marta Warowny-Krawczykowska

**Labguard 3D to automatyczny system nowej generacji do monitorowania temperatury oraz innych parametrów fizycznych w laboratorium. System został zaprojektowany specjalnie z myślą o laboratoriach, tak aby ułatwić proces kontroli warunków w jakich przechowywane są odczynniki oraz materiały biologiczne. Bogata oferta sond pomiarowych oraz elastyczność oprogramowania sprawia, że system Labguard 3D znajduje zastosowanie nie tylko w wielu gałęziach przemysłu (przemśle spożywczym, farmaceutycznym, kosmetycznym), ale również w laboratoriach klinicznych czy weterynaryjnych. System znajduje zastosowanie wszędzie tam, gdzie potrzebna jest kontrola parametrów fizycznych.**

System Labguard 3D pomaga spełniać wszelkie wymagania zawarte w normach: ISO 17025 – *Wymagania dotyczące laboratoriów badawczych i wzorcujących*, ISO 15189 *Laboratoria medyczne, Szczególne wymagania dotyczące jakości i kompetencji* czy PN-EN ISO 7218 *Mikrobiologia żywności i pasz – Wymagania ogólne i zasady badań mikrobiologicznych* a także wymagania FDA 21 CFR część 11. Posiadanie automatycznego systemu do monitorowania ułatwia procesy związane z akredytacją oraz audytami i kontrolami zewnętrznymi.

Cztery podstawowe funkcje systemu Labguard 3D to mierzenie parametrów fizycznych ich monitorowanie, zapisywanie oraz alarmowanie w trybie rzeczywistym. Funkcja alarmowania gwarantuje otrzymanie informacji w

momencie kiedy doszło do awarii monitorowanego urządzenia. Dzięki temu użytkownik może wprowadzić działania naprawcze i zapobiec stracie odczynników czy materiałów biologicznych przechowywanych w monitorowanym urządzeniu.

Działanie systemu Labguard 3D opiera się na bezprzewodowej technologii radiowej przekazywania sygnału z nadajnika do odbiornika. Do nadajnika podłączone są sondy pomiarowe, które umieszczone są w komorze monitorowanego urządzenia. Odbiornik, który podłączony jest bezpośrednio do sieci internetowej przekazuje dane do komputera.

Nowoczesne nadajniki oferowane w systemie Labguard 3D posiadają wbudowane cyfrowy wyświetlacz. Dzięki czterem rodzajom nadajników: jedno-, dwu-, trzy- i cztero-kanalowym możliwe jest podłączenie od jednej do czterech różnych sond pomiarowych. Uniwersalność nadajników to istotna zaleta systemu. Dzięki niej możliwe jest podłączenie do jednego nadajnika sond różnego rodzaju np. do pomiaru temperatury, wilgotności względnej oraz stężenia CO<sub>2</sub>. Wyświetlacz cyfrowy nadajnika prezentuje szereg istotnych dla użytkownika informacji. Poza nazwą monitorowanego urządzenia, aktualną wartością danego parametru fizycznego wyświetlane są również informacje o stopniu zużycia baterii oraz jakości łączności radiowej. Nadajniki wyposażone są w kolorowe diody alarmowe z projekcją 360°. Do każdego rodzaju alarmu (przekroczenie wymaganej wartości parametru fizycznego, problem z łącznością, problem z zasilaniem) przypisany jest odpowiedni kolor. Poza alarmami, które wyświetlane są na obudowie nadajnika jest też alarm w postaci czerwonej diody z projekcją pionową, który umożliwia obserwowanie sygnału świetlnego na suficie. Zasilanie nadajników może odbywać się na trzy sposoby: klasyczny zasilacz elektryczny, kabel USB oraz baterie litowe.

Spośród bogatej oferty sond pomiarowych najbardziej popularne są sondy do pomiaru temperatury. Z systemem Labguard 3D możliwe jest jej monitorowanie w zakresie od -196°C do ponad 1000°C. Dwie najczęściej instalowane sondy to: sonda pracująca w zakresie -30°C do + 80°C oraz sonda PT100 pracująca w zakresie -90°C do + 130°C. Umożliwiają one monitorowanie temperatury w praktycznie wszystkich urządzeniach laboratoryjnych: niskotemperaturowych zamrażarkach, zamrażarkach klasycznych,



lodówkach, chłodniach, ciepłarkach. W ofercie systemu Labguard 3D są także sondy: monitorujące jednocześnie temperaturę i wilgotność względną oraz sondy mierzące stężenie CO<sub>2</sub>, ciśnienie oraz przetworniki umożliwiające podłączenie praktycznie dowolnej sondy analogowej (przetworniki analogowo-cyfrowe 0-20mA i 0-10V).

W ofercie systemu Labguard 3D dostępne są także niezależne rejestratory danych, przeznaczone do monitorowania warunków transportu. Zapewniają kontrolę nad właściwymi warunkami przewożonych materiałów biologicznych, a raport z informacjami o warunkach transportu może być przekazywany automatycznie do systemu w momencie, w którym nadajnik będzie w zasięgu odbiornika. Raport taki jest idealnym dokumentem do przedstawienia w razie kontroli z zewnątrz.

Kolejną zaletą a systemu Labguard 3D jest fakt, że oprogramowanie instalowane jest na serwerze lub serwerze wirtualnym. Dzięki temu wszelkie aktualizacje wykonywane są w jednym miejscu, a dostęp do oprogramowania możliwy jest przez przeglądarkę internetową. W zależności od potrzeb dostępne są trzy wersje oprogramowania, które można rozbudowywać stopniowo uruchamiając poszczególne jego funkcje. Dostęp do oprogramowania mają tylko użytkownicy którzy posiadają indywidualny login i hasło. Dodatkowo możliwe jest przypisanie użytkownikom wybranych poziomów dostępu m.in. użytkownika, który może analizować informacje o alarmach i odbierać alerty oraz administratora, który zarządza kontami innych użytkowników, może wprowadzać zmiany do konfiguracji oprogramowania, tak aby dopasować system do lokalnych potrzeb. Oprogramowanie systemu Labguard 3D umożliwia analizę graficzną oraz tabelaryczną gromadzonych danych. Możliwy jest także export danych do programu Microsoft Excel lub do formatu PDF. Dane można analizować retrospektywnie. W dowolnym momencie można wygenerować raport za wybrany okres z przeszłości dla konkretnego wybranego urządzenia lub grupy urzą-

dzeń. Dzięki temu ogranicza się do minimum drukowanie zbędnych dokumentów oraz ich magazynowanie. Ponadto zainstalowanie automatycznego systemu do monitorowania środowiska w znacznym stopniu odciąża pracowników laboratorium. Obowiązek systematycznego spisywania temperatur z urządzeń laboratoryjnych może zostać wyeliminowany, a dzięki temu zyskają Państwo czas, który będzie można wykorzystać na inne zadania i obowiązki.

Kolejną zaletą systemu Labguard 3D to zapewnienie bezpieczeństwa dla przechowywanych odczynników i materiałów 24h na dobę, czyli także w nocy oraz w weekendy i dni wolne od pracy, kiedy nie ma personelu w laboratorium. Komunikowanie alarmów możliwe jest na wiele sposobów: mogą to być maile wysyłane na wybrane adresy, widget – „wyskakujące” kolorowe okienko na pulpicie komputera czy możliwość otrzymywania wiadomości SMS, faxu oraz wiadomości głosowych. Dzięki temu mogą Państwo „zapomnieć” o manualnej kontroli parametrów fizycznych. Pomiary oraz ich kontrola odbywają się w sposób automatyczny, a Państwo są informowani wyłącznie w przypadku zaistniałej awarii.

Dodatkowo odpowiednie moduły oprogramowania umożliwiają wykonanie samodzielnie kalibracji i mapowania. Na życzenie klienta z sondami dostarczamy świadectwa kalibracji producenta lub certyfikaty wzorcowania wydane przez laboratoria wzorcujące posiadające akredytację Polskiego Centrum Akredytacji (PCA). Możliwy jest także zakup urządzeń do przeprowadzania kalibracji na miejscu w Państwa laboratorium.

Warto zaznaczyć fakt, że Labguard 3D jest systemem modułowym. Oznacza to, że zakupioną dziś wersję systemu można rozbudować o kolejne sondy, nadajniki, odbiorniki. Możliwy jest również upgrade oprogramowania do wyższej wersji, uruchomienie dodatkowych jego funkcji, tak aby dopasować system Labguard 3D do zmieniających się potrzeb użytkownika.





*10 LAT RAZEM*