

Wytyczne w sprawie pobierania próbek wymazów sanitarnych w celu wykrycia *Listeria monocytogenes* w środowisku produkcyjnym na podstawie dokumentu pt. „Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*” wersja 3 – 20/08/2012, ANSES

1. Zakres

Wytyczne te określają, gdzie, jak i kiedy należy pobierać próbki wymazów w celu wykrycia *L. monocytogenes* na powierzchniach, na których przetwarzana jest żywność gotowa do spożycia i urządzeniach, z którymi ma ona kontakt.

UWAGA 1: Powierzchnie obszaru przetwarzania i sprzętu nie są jedynymi miejscami do monitorowania. Pobieranie próbek powinno również obejmować środki ułatwiające przetwarzanie (takie jak sprężone powietrze, lód, roztwór solanki, woda, spustowa woda), dla których techniki pobierania próbek nie są omówione w tym dokumencie.

UWAGA 2: W tym miejscu nie będą podawane żadne wskazówki dotyczące częstotliwości pobierania próbek, liczby punktów poboru próbek, znaczenie łączenia próbek lub konieczności rotowania punktów pobierania próbek, ponieważ należy je wybierać indywidualnie dla każdego przypadku, na podstawie analizy ryzyka.

UWAGA 3: Te wytyczne nie zostały przygotowane w celu oceny skuteczności czyszczenia i dezynfekcji.

2. Odniesienia normatywne

Następujące dokumenty odniesienia powinny być brane pod uwagę w celu stosowania tych wytycznych:

ISO 6887-1 - Mikrobiologia łańcucha żywnościowego -- Przygotowanie próbek do badań, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych do badań mikrobiologicznych -- Część 1: Ogólne zasady przygotowania zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń dziesięciokrotnych

ISO 7218 - Mikrobiologia żywności i pasz -- Ogólne zasady badań mikrobiologicznych

ISO 11290-1 - Mikrobiologia żywności i pasz -- Horyzontalna metoda wykrywania obecności i oznaczania liczby *Listeria monocytogenes* -- Metoda wykrywania obecności

ISO/TS 11133 - Mikrobiologia żywności i pasz -- Wytyczne przygotowania i sporządzania pożywek

3. Wybór miejsc poboru próbek

L. monocytogenes można znaleźć na wizualnie czystych powierzchniach, ale najczęściej jest wykrywana w wilgotnych i zabrudzonych miejscach, w których bakteria może rosnąć i przetrwać. Trudno dostępne miejsca, takie jak dziury lub szczeliny w materiałach włóknistych, porowatych, rdzewiejących i pustych, źle czyszczone urządzenia stanowią potencjalne miejsca, w których należy pobrać próbki. Pobranie próbek z powierzchni trudnodostępnych, w których mogą zbierać się resztki żywności, może być trudne. Próbki z tych miejsc należy pobrać po demontażu sprzętu przez zespół obsługi technicznej. Nie zaleca się pobierania próbek przez płukanie takich obszarów, ponieważ płukanie nie ma takiej samej skuteczności jak wymaz w uwolnieniu drobnoustrojów z powierzchni.

Pobieranie próbek powinno odbywać się często w obszarach, w których produkt spożywczy jest narażony na zanieczyszczenie, ale istotne może być także pobranie próbki, z mniejszą częstotliwością, w miejscach, gdzie produkt nie jest narażony (miejscza przechowywania).

Wybór miejsca pobierania próbek musi być zgodny z historycznymi danymi powiązаныmi z konkretnym zakładem produkcyjnym i po szczegółowej analizie procesu. Otwarta lista miejsc, z których może być pobrana próbka wymazu jest podana poniżej:

- Powierzchnie nie mające kontaktu z żywnością:

odpływy, podłogi, zbiorniki wodne na podłodze, narzędzia czyszczące, obszary do mycia, wagi podłogowe, węże, rolki do przenośników, przenośniki, szkielety konstrukcyjne, wewnętrzne panele wyposażenia, miseczki ociekowe kondensatu, wózki widłowe, wózki ręczne, wózki, koła wózkowe, kosze na śmieci, zamrażarki, maszyny do robienia lodu, żebra chłodzące w kondensatorach, fartuchy, ściany, sufity, zimne miejsca, gdzie woda skrapla się jako mokra izolacja w ścianach lub wokół rur i urządzeń chłodzących, gumowe uszczelki wokół drzwi, szczególnie w chłodnicach, zawartość odkurzaczy, klamki i krany.

- Powierzchnie mające kontakt z żywnością:

przenośniki taśmowe, krajalnice, deski do krojenia, kostkownice, leje, rozdrabniacze, blendery, obieraczki, kolektory, urządzenia do napełniania i pakowania, pojemniki, inne przybory, rękawiczki wielorazowe.

4. Kiedy należy pobierać próbkę

Wykrywanie *L. monocytogenes* może być trudne, jeśli próbki są pobierane natychmiast lub wkrótce po czyszczeniu i dezynfekcji. Komórki, z powodu uszkodzeń spowodowanych przez środki chemiczne używane do czyszczenia i dezynfekcji, mogą nadal być żywe, ale mogą być niehodowane, a zatem nie są łatwo wykrywalne. Ponadto komórki pozostające w miejscach trudnodostępnych pomimo czyszczenia i dezynfekcji również mogą pozostać niewykryte, podczas gdy w trakcie produkcji możliwość ich pobrania razem z próbką po rozmontowaniu maszyn jest większa, ponieważ sprzęt wibruje i / lub ponieważ żywność i płyny wchodzą w kontakt z miejscami trudnodostępными.

Dlatego, aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia drobnoustrojów mogących przetrwać w środowisku przetwarzania żywności, pobieranie próbek powinno być wykonywane podczas procesu technologicznego, po co najmniej dwóch godzinach produkcji lub na koniec produkcji danej partii, tj. przed czyszczeniem i dezynfekcją. Na liniach technologicznych, na których produkty spożywcze są wytwarzane z surowców, które nie są poddawane obróbce, która obniża poziom mikroorganizmów (na przykład sery surowe), *L. monocytogenes* w próbce wymazu pobranej podczas cyklu przetwarzania może pochodzić z tych surowców, a także z miejsc, w których komórki *L. monocytogenes* mogą przetrwać w środowisku przetwarzania żywności. W zakładach, w których przetwarzane są pasteryzowane produkty lub surowce rzadko zanieczyszczone (np. ser pasteryzowany), *L. monocytogenes* w próbce wymazu należy badać jako *Listeria* pochodząca ze środowiska przetwarzania żywności.

Gdy środki spożywcze wchodzące do pomieszczeń przetwórstwa są surowe lub zostały poddane obróbce w celu zmniejszenia ich zanieczyszczenia mikrobiologicznego (przez pasteryzację, mikrofiltrację itp.), podmioty prowadzące przedsiębiorstwa spożywcze powinny, w ramach swojego planu HACCP, ustalić dopuszczalną liczbę próbek dodatnich, która może być ustalona inaczej dla wykrywania *L. monocytogenes* na powierzchniach stykających się z żywnością i na powierzchniach, które nie mają kontaktu z żywnością. Należy wdrożyć działania korygujące, zgodnie z planem HACCP podmiotu, gdy zostanie przekroczona ustalona liczba próbek dodatnich. Oczywiście, gdy przetwarzana jest surowa żywność, pobieranie próbek po czyszczeniu i dezynfekcji lub na początku produkcji może być wykonywane oprócz pobierania próbek podczas obróbki. Może to jednak prowadzić do fałszywego poczucia bezpieczeństwa. Natomiast wykrycie *L. monocytogenes* na powierzchniach mających kontakt z żywnością po czyszczeniu i dezynfekcji wskazuje na poważne niepowodzenia w procedurach czyszczenia i dezynfekcji.

Jeśli nie pobiera się prób codziennie, nie należy ich pobierać zawsze w tym samym dniu tygodnia. Właściwe może być pobranie próbek po serwisowaniu sprzętu, napraw sprzętu, konstrukcji i zwiększonej produkcji, ponieważ mogą one zwiększać ryzyko skażenia *L. monocytogenes*.

5. Rozcieńczalniki do zwilżania przyborów do pobierania wymazów

5.1 Rozcieńczalniki proste

W miejscach łatwo dostępnych, z których pobierane są próbki podczas lub po zakończeniu przetwarzania, do zwilżania patyczków wymazowych i innych przyborów do pobierania próbek należy używać zwykłych rozcieńczalników nie zawierających neutralizatora.

Zalecane rozcieńczalniki to: roztwór peptonowy o stężeniu 1 g/l, sól fizjologiczna peptonu lub ¼ stężony lub 0,25 stężony roztwór Ringera (quarter-strength Ringer's solution), dostępny w probówkach lub butelkach i sterylizowany przez 15 minut w temperaturze 121 °C.

Nie zaleca się stosowania rozcieńczalników buforowanych fosforanem do komórek bakteryjnych obciążonych niesprzyjającymi warunkami w pomieszczeniach przetwórstwa żywności (sól, kwas, produkty do czyszczenia i dezynfekcji itp.), ponieważ mogą one mieć szkodliwy wpływ na ich zdolność do hodowli.

Podobnie zaleca się, aby nie stosować neutralizującego rozcieńczalnika, gdy nie oczekuje się resztkowego środka dezynfekującego. Neutralizator użyty do zatrzymania pozostałości środka dezynfekującego może mieć nieznacznie szkodliwy wpływ na komórki bakteryjne i jest prawdopodobne, że taki wpływ byłby większy, gdy komórki są poddane warunkom stresowym. Wykazano, że neutralizatory zmniejszają izolację *Salmonella* z próbek.

Bulion Frasera lub bulion pół-Frasera nie powinny być stosowane zamiast rozcieńczalnika, ponieważ mogą sprzyjać wzrostowi *L. monocytogenes* w miejscu przetwarzania.

5.2 Rozcieńczalniki neutralizujące

W miejscach, w których spodziewane są pozostałości środków dezynfekujących lub gdy próbki są pobierane natychmiast po dezynfekcji, do zwilżania patyczków wymazowych i innych przyborów do pobierania próbek należy użyć rozcieńczalników neutralizujących.

Gdy stosuje się chlor lub związki uwalniające chlor, należy wybrać tiosiarczan sodu jako neutralizator. W przypadku innych substancji czynnych dostępnych jest wiele neutralizatorów (patrz EN 1276, EN 1650, EN 13697 i EN 13704), ale żaden z nich nie jest odpowiedni dla wszystkich środków dezynfekujących ("uniwersalny"). Neutralizujący rozcieńczalnik, który można stosować w większości sytuacji, opisano w tabeli 1. Należy go przechowywać w probówkach lub butelkach i sterylizować przez 15 minut w temperaturze 121 °C.

Tabela 1: Rozcieńczalnik neutralizujący, który można użyć w większości sytuacji (na podstawie ISO 18593)

Składnik	Stężenie
Monooleinian sorbitolu (Polisorbat 80)	30 g/l
Lecytyna	3 g/l
Tiosiarczan sodu	5 g/l
L-Histydyna	1 g/l
Saponina	30 g/l
Pepton	1 g/l
Chlorek sodu	8.5 g/l

6. Pożywka

Wymagania dla pożywki są określone w normie EN ISO 11290-1

7. Aparatura i naczynia szklane

Wymagania ogólne, patrz EN ISO 7218.

Wymagania dotyczące *L. monocytogenes*, patrz EN ISO 11290-1 i zmiany.

Zwykły mikrobiologiczny sprzęt laboratoryjny, a w szczególności:

7.1. Narzędzia do pobierania wymazów

Patyczek do wymazów, wysterylizowany patyczek zakończony bawełną lub materiałem syntetycznym pojedynczo zawarty w sterylizowanej probówce. Zastosowany materiał powinien mieć potwierdzenie (udokumentowane) braku substancji hamujących.

UWAGA W przypadku niektórych rodzajów powierzchni resztki bawełny mogą zanieczyścić wewnętrzne części tych powierzchni po pobraniu próbek.

Gąbka, tkana lub nietkana ściereczka lub gaziki, sterylizowane i pakowane pojedynczo w sterylizowane torby plastikowe. Zastosowany materiał powinien mieć potwierdzenie (udokumentowane) braku substancji hamujących.

7.2. Jednorazowe sterylizowane rękawice (opcjonalnie)

7.3. Chłodzony pojemnik, z pakietami lodowymi, izolowany, zdolny do utrzymywania próbek w temperaturze od 1 do 8 °C podczas transportu do laboratorium (patrz EN ISO 7218)

7.4. Sterylizowany papier absorpcyjny, zdolny do pochłaniania stojącej wody (np. wody na podłogach)

7.5. Mieszalnik do mieszania cieczy w probówkach

7.6. Homogenizator perystaltyczny do przygotowania początkowych zawiesin za pomocą ruchu perystaltycznego

8. Obszar poboru próbki

Całkowity obszar objęty próbą podczas pobierania próbek powinien być jak największy, aby zwiększyć prawdopodobieństwo wykrycia *L. monocytogenes*. W związku z tym zaleca się pobieranie próbek o powierzchni od 1000 cm² do 3000 cm² (to jest od 0,1 m² do 0,3 m²), o ile to możliwe, to znaczy gdy obszary są otwarte i płaskie (przenośniki, półki itp.).

Do wymazania trudnodostępnych małych obszarów (np. wnętrza pustych wałków, obudowy silnika) należy użyć patyczka do wymazów.

Do badania dużych powierzchni należy użyć gąbki, tkanej lub nietkanej ściereczki lub gazy. W przeciwieństwie do patyczków wymazowych można je bardziej energicznie potrząsnąć na powierzchniach i są bardzo chłonne. Nie zaleca się stosowania szablonów lub linijek miarowych, mogą przenosić zanieczyszczenia i / lub ich dezynfekcja może zakłócać badanie, jednak wielkość obszaru pobierania próbki powinna być znana w przybliżeniu. W tym celu próbkobiorca powinien pamiętać, że długość przedramienia, od czubka palca środkowego do łokcia, wynosi około 45 cm. Podobnie, gdy palce są rozłożone, odległość między czubkami kciuka a małego palca (rozpiętość) wynosi około 20 cm.

Rozmiar obszaru objętego próbą powinien być stały, aby tendencje mogły być monitorowane w czasie.

9. Przygotowanie narzędzi do pobierania próbek

Żaden sprzęt znajdujący się w laboratorium mikrobiologicznym nie powinien być wprowadzany do obszaru produkcji żywności ze względu na ryzyko wprowadzenia zanieczyszczeń.

Narzędzia do pobierania próbek i odzież ochronna powinny być przechowywane i używane w oddzieleniu od działań laboratoryjnych, w szczególności odseparowane od pomieszczeń laboratoryjnych zajmujących się analizą patogenu.

Próbkobiorcy powinni upewnić się, że żaden przedmiot wykorzystywany do pobierania próbek nie pozostaje w obszarze produkcji. W tym celu zaleca się zliczanie tych elementów przed i po pobraniu próbek.

9.1 Patyczki wymazowe

Patyczek wymazowy może być używany na sucho lub zwilżony. W przypadku, gdy powierzchnia do pobrania próbki jest mokra, należy użyć suchego patyczka, a w przypadku, gdy obszar do badania jest suchy, należy użyć zwilżonego patyczka. W przypadku, gdy pobieranie próbek musi odbywać się w wilgotnym lub suchym miejscu, gdzie spodziewane są pozostałości środków dezynfekcyjnych (które często występują w trudno dostępnych miejscach), wymaz należy zwilżyć rozcieńczalnikiem neutralizującym (5.2).

Nawilżone patyczki można przygotować aseptycznie w laboratorium przed rozpoczęciem pobierania próbek. Końcówka patyczka powinna lekko dotknąć powierzchni rozcieńczalnika (5.1 lub 5.2), tak aby z patyczka nie skapywało. Następnie należy włożyć patyczek do próbówki zabezpieczającej aby utrzymać zarówno sterylność, jak i wilgotność.

9.2 Gąbka, tkana lub nietkana ściereczka lub gaziki

Przed rozpoczęciem pobierania próbek zwilżone narzędzie do pobrania próbki można przygotować w laboratorium za pomocą odpowiedniej i odnotowanej objętości wysterylizowanego rozcieńczalnika (5.1 lub 5.2), tak aby nie ściekały. Po zwilżeniu narzędzia zamknij plastikową torebkę w sposób zapewniający sterylność i utrzymanie wilgotności.

Jeśli zwilżanie narzędzi do pobierania próbek odbywa się w obszarze przetwarzania, rozcieńczalnik nie powinien być przechowywany w szklanej butelce.

10. Pobieranie próbek

10.1 Metoda z patyczkiem wymazowym

Wyjmij patyczek z tuby, potrzyj energicznie, na tyle aby nie uległ uszkodzeniu i obróć wewnątrz urządzenia lub w innym trudnodostępnym obszarze, z którego pobierane są próbki. Umieść patyczek w oryginalnej probówce; zamknij, aby wymaz był chroniony przed zanieczyszczeniem, a jego koniec pozostał nadal wilgotny w czasie analizy.

Po pobraniu próbki, obszar z którego pobrano próbkę powinien zostać wytarty ściereczką z alkoholem.

10.2 Metoda z gąbką / materiałem / gazikiem

W przypadku, gdy obszar, który ma być pobrany, jest zbyt mokry (tj. woda na podłodze), nadmiar płynu należy najpierw usunąć delikatnie z zastosowaniem sterylnego papieru chłonnego. Otwórz plastikową torebkę zawierającą narzędzie do wymazu. Wyjmij aseptycznie narzędzie do wymazu za pomocą dłoni w sterylnej rękawiczce. Alternatywnie, narzędzie może zostać uchwycone przez plastikową torebkę z jednoczesnym naciągnięciem zewnętrznej strony torebki na dłoń. Wytrzyj energicznie ruchem „zygzaka” całą wybraną powierzchnię w dwóch prostopadłych kierunkach, zmieniając powierzchnię narzędzia do wymazu. Odłóż narzędzie do wymazu do plastikowej torebki i zamknij, aby chronić je przed zanieczyszczeniem i aby pozostało wilgotne w czasie analizy.

Po pobraniu próbki, obszar z którego pobrano próbkę powinien zostać wytarty ściereczką z alkoholem.

11. Transport próbek, przechowywanie i rozpoczęcie analizy

Transportuj próbki w chłodzonym pojemniku (7.3) między 1 a 8 °C.

Jeśli to konieczne, przechowuj próbki w laboratorium w temperaturze 3°C ± 2°C. Zbadaj próbki tak szybko, jak to możliwe, najlepiej nie później niż 24 godziny po dostarczeniu do laboratorium, a w każdym razie nie później niż 36 godzin po pobraniu, zgodnie z normą EN ISO 7218 (punkt 8.3, akapit trzeci od końca i następny akapit dot. produktów łatwo psujących się). Czas od pobrania próbki do analizy powinien być zapisany w sprawozdaniu z badań.

12. Analiza próbek

12.1 Metoda z patyczkiem wymazowym

Dodaj do tuby zawierającej wymaz wystarczającą objętość, co najmniej 9 ml, bulionu pół-Frasera (patrz EN ISO 11290-1), aby końcówka była całkowicie zanurzona w bulionie.

Dokładnie wymieszaj zawartość probówek zawierających wymazy za pomocą mieszalnika (7.5) przez 30 sekund.

Następnie wykonaj wykrywanie *L. monocytogenes* zgodnie z metodą standardową EN ISO 11290-1 lub zwalidowaną metodą alternatywną.

12.2 Metoda z gąbką / ściereczką / gazikiem

Dodaj 9-krotność ciężaru zwilżonego narzędzia wymazowego, przygotowanego zgodnie z punktem 9.2, bulionu pół-Frasera (patrz EN ISO 11290-1) do plastikowej torebki zawierającej narzędzie wymazowe, które musi być całkowicie namoczone w bulionie.

Zastosuj homogenizator perystaltyczny (7.6) przez 1 minutę do wymieszania zawartość torebki.

Następnie należy wykonać wykrywanie *L. monocytogenes* zgodnie z metodą standardową EN ISO 11290-1 lub zwalidowaną metodą alternatywną.

13. Wyrażanie wyników

Wyniki należy podawać jako: obecność lub brak *L. monocytogenes* w miejscu pobierania próbek. Należy podać, jeśli jest znany, rozmiar obszaru objętego próbą.