

KRYTERIA MIKROBIOLOGICZNE JAKOŚCI ŻYWNOSCI (MLEKO I PRODUKTY MLECZNE)



dr Weronika Korpysa-Dzirba
Zakład Higieny Żywności
Pochodzenia Zwierzęcego
PIWet - PIB

Zagadnienia

- Kryteria mikrobiologiczne
- Metody badań
- Dodatkowe informacje

Legislacja

Rozporządzenie Komisji (WE) NR 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz.U.L 338 z dnia 22.12.2005, str.1.)

Rozporządzenie Komisji (WE) NR 1441/2007 z dnia 5 grudnia 2007 r. - zmieniające rozporządzenie (WE) NR 2073/2005 w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych (Dz.U.L 322z dnia 7.12.2007, str.1.)

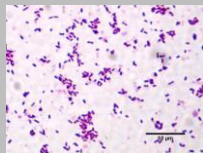


KRYTERIA BEZPIECZEŃSTWA ŻYWNOCICI

- ⊙ *Listeria monocytogenes*
- ⊙ *Salmonella*
- ⊙ *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter*)
- ⊙ Enterotoksyny gronkowcowe

Listeria monocytogenes

Rodzaj żywności	Mikroorganizacja/obciążenie maksymalne	Plan pobierania próbek (1)		Limity (2)		Metoda badania referencyjna (3)	Inne informacje techniczne
		n	m	g	M		
1.1. Żywności gotowa do spożycia przeznaczona do konsumpcji oraz gotowa do spożycia (zwłaszcza spożyciego niedługiego przechowania (4))	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Nieobecna w 25 g		ISO 11290-4	Profilaktyczny wyznacznik do obciążenia w ciągu okresu przydatności do spożycia
1.2. Żywności gotowa do spożycia, w której nieobecny jest wzrost <i>L. monocytogenes</i> . Niebezpieczna żywność przeznaczona do konsumpcji oraz żywność spożywczą niedługiego przechowania	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 plg (5)		ISO 11290-2 (5)	Profilaktyczny wyznacznik do obciążenia w ciągu okresu przydatności do spożycia
		5	0	Nieobecna w 25 g (6)		ISO 11290-4	Przed spożyciem żywności przed rozpoczęciem konsumpcji należy przeprowadzić kontrolę produkcyjną i higieny szklarni spożywczych, które jest jego produkcją



Listeria monocytogenes

- ⊙ *Listeria monocytogenes* jest warunkowo chorobotwórczym drobnoustrojem wywołującym u człowieka oraz u wielu gatunków zwierząt chorobę zakaźną zwaną listeriozą



Charakterystyka *L. monocytogenes*

Właściwości morfologiczne

- Krótkie pałeczki, 0,4 - 0,5 x 0,5 - 2 μm
- Gram dodatnie
- Nie wytwarzają otoczki
- Nie wytwarzają przetrwalników
- Wytwarzają nieliczne rzęski
- Wykazują ruch w 20°C - 25°C



Charakterystyka *L. monocytogenes*

Właściwości hodowlane i biochemiczne

- Wzrost w warunkach tlenowych i względnie beztlenowych
- Optymalny wzrost w temperaturze 30°C - 37°C
- Wzrost w zakresie temperatur 4°C - 45°C
- Aktywność hemolityczna
- Katalazo dodatnie
- Oksydazo ujemne

Występowanie

L. monocytogenes jest drobnoustrojem szeroko rozpowszechnionym w środowisku. Obecność zarazka wykazano w glebie, próbkach roślin, odchodach wielu gatunków zwierząt, ściekach oraz zbiornikach wodnych. Kiszonki przygotowane z zanieczyszczonych przez *L. monocytogenes* roślin są źródłem zakażenia dla zwierząt. Zwierzęta karmione takimi kiszonkami ulegają zakażeniu i zaczynają chorować, inne stają się bezobjawowymi nosicielami zarazka.

Chorobotwórczość *L. monocytogenes* dla zwierząt

- Zwierzęta domowe: owce, kozy i bydło
- Postacie kliniczne listeriozy zwierząt:
- listerioza ośrodkowego układu nerwowego
- listerioza okresu ciąży przebiegająca z poronieniem
- przewlekła listerioza narządowa
- listerioza posocznicowa
- zakażenie bezobjawowe

Chorobotwórczość *L. monocytogenes* dla ludzi

- Postacie kliniczne listeriozy u ludzi:
- zapalenie opon mózgowych i mózgu
 - bakteriemia
 - listerioza u kobiet ciężarnych i noworodków
 - zapalenie wsierdza
 - zapalenie i ropień wątroby
 - zapalenie otrzewnej
 - zapalenie żołądka i jelit
 - infekcje skórne i mięśniowo szkieletowe

Mikrobiologia żywności i pasz Wykrywanie obecności *Listeria monocytogenes* wg PN - EN ISO 11290 - 1:2017-07

NAMNAŻANIE

Badana próbka 25 g / 25 ml + 225 ml selektywnej pożywki namnażającej (pół Fraser)
Inkubacja w temp. 30°C przez 25 ± 1h

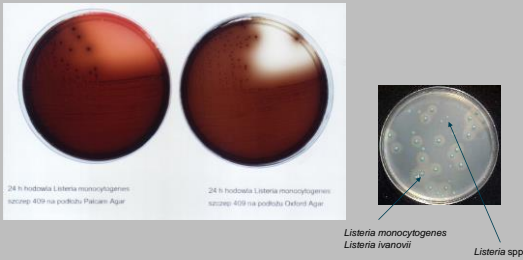
posiew 0,1 ml hodowli do 10 ml pożywki namnażającej (Fraser) posiew na — agar *Listeria* wg Ottaviani Agosti
— druga pożywka selektywna inkubacja 24-48 godz w 37°C

Inkubacja w temperaturze 37°C przez 24 h ± 2h (przy wykrywaniu *L. monocytogenes*)
kolejne 24 h ± 2h (przy wykrywaniu *Listeria* spp.)

posiew na — agar *Listeria* wg Ottaviani Agosti
— druga pożywka selektywna
inkubacja 24 - 48 ± 2 h w 37°C

• DAJSZE BADANIA IDENTYFIKACYJNE
Badania morfologiczne, hodowlane i biochemiczne

Kolonie *Listeria* sp.



Mikrobiologia żywności i pasz Wykrywanie obecności *Listeria monocytogenes* wg. PN - EN ISO 11290 - 1:2017-07

- Posiewy na pożywkach Fräsera i pół-Fräsera mogą być przechowywane przez max. 72 h w 5°C przed przesiewem na pożywki stałe
- Po inkubacji na pożywkach stałych, posiewy mogą być przechowywane w 5°C przez 48 h przed odczytem
- W celu potwierdzenia *L. monocytogenes* i *Listeria* spp. wystarczy potwierdzenie 1 kolonii/próbkę

Mikrobiologia żywności i pasz Oznaczenie liczby *Listeria monocytogenes* wg. PN - EN ISO 11290 - 2

Badana próbka x g / x ml + 9 x g / 9 x ml rozcieńczalnika (zbuforowana woda peptonowa lub pożywka podstawowa pół-Fraser (bez dodatków selektywnych))

10⁰ 10¹ 10² posiew powierzchniowy 0,1 ml zawiesiny wyjściowej

lub

posiew 1 ml na 3 płytki (z powtórzeniem)

Inkubacja w temp. 37°C przez 24 h ±2h; 24 h ±2h

Potwierdzenia dla *Listeria monocytogenes* i *Listeria spp.*

Potwierdzenia dla <i>Listeria monocytogenes</i>	
obligatoryjne	opcjonalne
Badanie mikroskopowe (Gram)	Katalaza (+)
Hemoliza (+)	Ruch (+)
Ramnoza (+)	Test CAMP(+)
Ksyloza (-)	

Potwierdzenia dla <i>Listeria spp.</i>	
obligatoryjne	opcjonalne
Badanie mikroskopowe (Gram)	Test VP (+)
Katalaza (+)	Ruch (+)

Identyfikacja

Potwierdzenie przynależności do rodzaju *Listeria sp.*

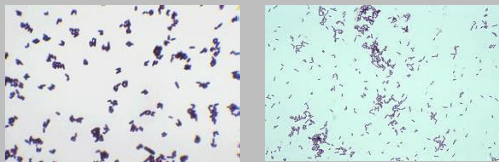
- > posiew na pożywkę TSYEA (charakterystyczne kolonie)



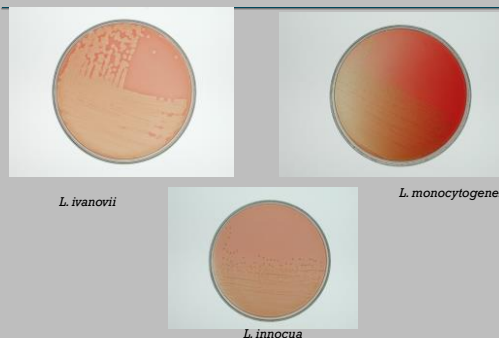
test na wykrywanie katalazy (katalaza +)



Barwienie metodą Grama



Aktywność hemolityczna Listeria



Zdolność rozkładu węglowodanów

- Ramnoza
- Ksyloza

fioletowy – wynik „-”

żółty – wynik „+”

Zdolność ruchu



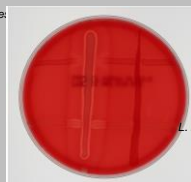
Wzrost w formie parasola

Próba CAMP



L. ivanovii

L. monocytogenes



L. innocua

L. monocytogenes

Reakcja VP (Voges - Proskauera)



Wynik ujemny

Wynik dodatni

Cechy identyfikacyjne poszczególnych gatunków drobnoustrojów rodzaju *Listeria sp.*

Gatunek	Hemoliza	Wytwarzanie kwasu		Test CAMP	
		Ramnoza	Ksyloza	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

Salmonella

1.11. Sery małe i średnie wyprodukowane z mleka sterylnego lub mleka podlegającego obróbce termicznej w aparaturze domowej lub przemysłowej (*)	Salmowidła	5	0	Miechocze w 25 g	ISO 6579	Próbki wprowadzone do obrotu w ciągu czasu przydatności do spożycia
1.12. Mleko w proszku i serwatka w proszku (*)	Salmowidła	5	0	Miechocze w 25 g	ISO 6579	Próbki wprowadzone do obrotu w ciągu czasu przydatności do spożycia
1.13. Lody (L) z wyjątkiem produkcji w przepływie ciągłym (praca produkcyjna lub ich skład elementów sągotowane od razu)	Salmowidła	5	0	Miechocze w 25 g	ISO 6579	Próbki wprowadzone do obrotu w ciągu czasu przydatności do spożycia

PN-EN ISO 6579



Enterobacter sakazakii

1.23. Poprawny w proszku dla niemowląt i powoli skrzepający w proszku specjalnie przeznaczonym do karmienia niemowląt, zgodnie z wytycznymi dla żywności dla niemowląt, zgodnie z trytemem dla wprowadzania seryjnego w rozdziale 2.2 niniejszego załącznika	Enterobacter sakazakii	30	0	Miechocze w 10 g	ISO 22944	Próbki wprowadzone do obrotu w ciągu czasu przydatności do spożycia
--	------------------------	----	---	------------------	-----------	---



Enterobacter sakazakii

- początkowo jako gram-ujemne, tlenowe lub względnie beztlenowe pałeczki, wytwarzające żółto-żółty pigment na agarze odżywczym i nazwano **Enterobacter cloacae**
- Ponad 30 lat temu mikroorganizmy te wyodrębniono jako nowy gatunek - **Enterobacter sakazakii** a następnie ponownie sklasyfikowano
- Według aktualnej systematyki należą do rodzaju **Cronobacter**.

Enterobacter sakazakii

- Zakażenia tymi bakteriami są szczególnie niebezpieczne dla wcześniaków oraz noworodków i niemowląt z niską masą urodzeniową i obniżoną odpornością.
- W grupie ryzyka znajdują się również osoby dorosłe z zaburzeniami układu immunologicznego.



Enterobacter sakazakii

- E. sakazakii mogą być obecne w surowcach wykorzystywanych do produkcji tych preparatów, dlatego szczególnie ważna jest właściwa kontrola mikrobiologiczna zarówno surowca jak i gotowego produktu.
- Do zanieczyszczenia może dojść również podczas produkcji, najczęściej w czasie suszenia oraz napełniania opakowań, w związku z tym powinno być stale monitorowane środowisko produkcyjne oraz przestrzegane wymagania technologiczne.



Enterobacter sakazakii

Przygotowanie zawiesiny wyjściowej: x g badanej próbki do 9-krotnej objętości pożywki przednamnażającej (ZWP)

37° ±1°C przez 18h ±2h

Przenieść 0,1 ml z hodowli w ZWP do 10 ml pożywki mLST z wankomycyną

44° ±1°C przez 24h ±2h

Przenieść jedno oczko z hodowli na pożywe mLST z wankomycyną na powierzchnię chromogennej pożywki agarowej

Typowe kolonie wyrosłe na chromogennej pożywie agarowej mogą być uznane za przypuszczalne *E. sakazakii*

Potwierdzenie: posiew 5 typowych kolonii na pożywkę TSA (żółte kolonie), identyfikacja biochemiczna



Enterotoksyny gronkowcowe

1.2% Sery mleko w proszku i serwatka w proszku, zgodnie z kriteriami dla gronkowców koagulazo-dodatnich, zawieszony w roztworze 2,2 ninowego siarczanu

Enterotoksyny gronkowcowe

3

0

Stwierdzonych 23 g

Metodyka metoda: CEI & Miki (*)

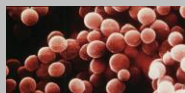
Próbki wprowadzone do składu w ciągu okresu próbnego do spożycia



Enterotoksyny gronkowcowe

Enterotoksyny gronkowcowe wytwarzane są głównie przez **koagulazo-dodatnie** szczepy:

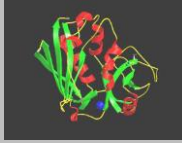
- > *Staphylococcus aureus* (33%)
- > Rzadko przez *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus hyicus*



Enterotoksyny gronkowcowe

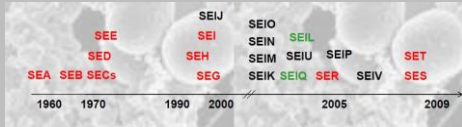
- Wytwarzane głównie przez koagulazo-dodatnie gronkowce
- Białka o masie 26-30 kDa
- Oporne na działanie wysokiej temperatury (Wędzenie, gotowanie) i enzymów proteolitycznych
- 23 odmiany enterotoksyn gronkowcowych

Stabilność enterotoksyn gronkowcowych zależy od rodzaju i ilości enterotoksyn oraz od rodzaju matrycy w której znajdują się enterotoksyny



Enterotoksyny gronkowcowe

- ⦿ 11 rodzajów enterotoksyn - udowodnione działanie wymiotne
- ⦿ 8 - nieznanne działanie (SE-like)
- ⦿ 2 - nie wywołują objawów zatrucia pokarmowego (SEIL, SEIQ)



Enterotoksyny gronkowcowe wywołują:

GRONKOWCOWE ZATRUCIA POKARMOWE

- > jedna z najczęstszych przyczyn zatruc pokarmowych na świecie
- > dawka 0,1- 1ul/kg ciała człowieka może wywołać objawy zatrucia (SEA - 0,2ug/kg, SEB - 0,3ug/kg)
- > namnożenie bakterii w żywności 10^5 - 10^6 komórek/g produktu spożywczego

Patogenność

- ⊙ mały: 5 (SEA, SEB, SEC) do 20 µg (SED)
- ⊙ gołębie: 20 µg
- ⊙ ryjówki: 200 ng
- ⊙ człowiek: 1 do 10 µg (20 to 40 ng dla osób wrażliwych)

OBJAWY (po 30min. - 8 godz.)

- > gwałtowne wymioty
- > biegunka
- > nudności



Czas trwania objawów : 24 - 48h

KOMPLIKACJE

- > Odwodnienie
- > Niskie ciśnienie krwi
- > Ogólne osłabienie



Charakterystyka bakteryjnych zatruc pokarmowych

	<i>Shigella</i>	<i>E. coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>S. aureus</i>
Czas inkubacji (godz.)	24 - 72	24 - 72	8 - 48	1 - 6	1 - 6
Czas trwania (godz.)	48 - 120	24 - 48	12 - 24	6 - 12	6 - 12
Bolesne kurcze brzucha	++++	++++	+	++	++
Wymioty	++	+	+	++	++++
Gorączka	++	++	++++	++	-

Udział poszczególnych rodzajów enterotoksyn w wywoływaniu zatruc pokarmowych

- > Enterotoksyna A - 75% przypadków
- > Enterotoksyny D, C, B
- > Enterotoksyny E i H - b. rzadko
- > Enterotoksyny od I do U (zidentyfikowano geny kodujące te enterotoksyny)

Skąd enterotoksyny gronkowcowe biorą się w produktach żywnościowych

- > *S. aureus* może znajdować się na skórze zwierząt i ludzi
- > Mleko i nie pasteryzowane produkty mleczne mogą zawierać dużą liczbę gronkowców przy gronkowcowym zapaleniu wymion (mastitis)
- > Zakażenie przez osobę przygotowującą żywność



Produkty najczęściej związane z zatruciami gronkowcowymi:

- > Mięso (wołowina, wieprzowina)
- > Wędliny (szynka, salami, parówki)
- > Produkty mleczne (4,8% zatruc w Europie)
 - > mleko w proszku
 - > sery
 - > lody
- > Majonez
- > Wyroby cukiernicze z kremem



Obecność enterotoksyn gronkowcowych nie powoduje zmian smaku, zapachu ani wyglądu produktów.

Przyczyny gronkowcowych zatruc pokarmowych:

- > Niewłaściwe postępowanie przy przygotowywaniu lub produkcji żywności
- > Przetrzywanie produktów żywnościowych w nieodpowiednich warunkach



Warunki wzrostu i produkcji enterotoksyn *S. aureus*

Warunki	Wzrost		Produkcja toksyn	
	optimum	zakres	optimum	zakres
Temperatura (°C)	37	7 - 48	40 - 45	10 - 48
pH	6 - 7	4 - 10	7 - 8	4,5 - 9,6
NaCl (%)	0	0 - 20	0	0 - 10
Aktywność wodna	0,98	0,83- >0,99	0,98	0,87->0,99
Atmosfera	Tlenowa	Beztlenowo - tlenowa	Tlenowa	Beztlenowo - tlenowa

Czynniki niezbędne do wywołania zatrucia pokarmowego

- > enterotoksygeniczny szczep gronkowca
- > warunki sprzyjające (pH, temperatura) dla wzrostu gronkowców i wytwarzania toksyn
- > dostanie się do organizmu dawki wystarczającej aby wywołać objawy

Dostępne metody wykrywania enterotoksyn gronkowcowych

- Doświadczenia na zwierzętach
- Metody biologii molekularnej
- Testy immunologiczne



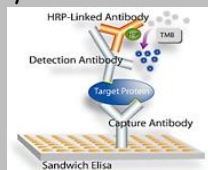
PCR

- Daje informację o obecności lub nieobecności genów enterotoksyn gronkowcowych ale nie daje informacji co do ekspresji tych genów podczas przetwarzania i przechowywania żywności
- Metoda PCR może być stosowana do charakterystyki szczepów odpowiedzialnych za zatrucia pokarmowe



Metody immunologiczne

- Podwójna immunodyfuzja płytkowa
- Metoda radioimmunologiczna (RIA)
- Testy lateksowe (RPLA)
- Testy immunoenzymatyczne



Testy lateksowe

- Opierają się one na reakcji odwróconej, biernej aglutynacji, która zachodzi między cząsteczkami lateksu pokrytymi przeciwciałami a obecną w badanym materiale enterotoksyną
- Pozwalają na otrzymanie wyniku po 20 - 24 godzinach
- ✓ Gotowy test lateksowy SET RPLA pozwala na wykrycie enterotoksyny gronkowcowej w próbkach żywności i w filtratach z hodowli *Staphylococcus aureus*
- ✓ Jest to jedyny gotowy zestaw, który nie wykrywa enterotoksyny E
- ✓ Czułość testu w przypadku badania żywności wynosi 1 ng/g produktu

Sandwich ELISA

- Pozwala na wykrycie już 0,1 ng w 1 g produktu
- W metodzie tej do studzienek optaszczonych przeciwciałami wprowadza się badany materiał. Jeżeli enterotoksyna jest obecna w próbce to łączy się z zaadsorbowanymi przeciwciałami oraz z dodanymi przeciwciałami znakowanymi enzymem. Po dodaniu substratu następuje reakcja, którą mierzy się kolorymetrycznie


Europejska metoda skiningowa wykrywania enterotoksyn gronkowcowych

- ⦿ opracowana w 2000 roku przez EU Community Reference Laboratory for milk & milk products = AFSSA (Agence Française de sécurité sanitaire des Aliments)




Nazwa metody	Wersja	Nazwa laboratorium referencyjnego
Detection of staphylococcal enterotoxins in milk & milk products. Reference method of the CRL "Milk & milk products"	Version 1, December 2000	EU Community Reference Laboratory for milk and milk products
Detection of staphylococcal enterotoxins in milk & milk products. European Screening method of the CRL "Milk & milk products"	Version 2, September 2005	EU Community Reference Laboratory for milk and milk products
Detection of staphylococcal enterotoxins in milk and milk products. European screening method of the CRL "Milk and milk products"	Version 3, May 2006	EU Community Reference Laboratory for milk and milk products
Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk & milk products. European screening method of the CRL "Coagulase positive staphylococci including <i>Staphylococcus aureus</i> "	Version 1, 19 November 2007	EU Community Reference Laboratory for coagulase positive staphylococci including <i>Staphylococcus aureus</i>
Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products and other food matrices. European screening method of the CRL "Coagulase positive staphylococci including <i>Staphylococcus aureus</i> "	Version 2, 1 April 2008	EU Community Reference Laboratory for Coagulase positive staphylococci
Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products and other food matrices. European screening method of the CRL "Coagulase positive staphylococci including <i>Staphylococcus aureus</i> "	Version 3, September 2009	EU Community Reference Laboratory for Coagulase positive staphylococci
Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in milk and milk products and other food matrices. European screening method of the EU - RL "Coagulase positive staphylococci including <i>Staphylococcus aureus</i> "	Version 4, 21 April 2010	European Union – Reference Laboratory for Coagulase Positive staphylococci

Wersja ESM	Zmiany	Wersja ESM
Wersja 1, grudzień 2000	Dodano etap traktowania zagęszczonego ekstraktu króliczymi przeciwciałami IgG	Wersja 2, wrzesień 2005
Wersja 2, wrzesień 2005	Wprowadzono możliwość detekcji zestawem Vidas SET 2	Wersja 3, maj 2006
Wersja 3, maj 2006	Dodano punkt dotyczący interferencji	Wersja 1, październik 2007
Wersja 1, październik 2007	Poszerzono procedurę o część B odnosząc się do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych A do E w produktach innych niż mleczne	Wersja 2, kwiecień 2008
Wersja 2, kwiecień 2008	Procedurę uzupełniono o załączniki: - formularz/ankieta do wypełnienia przy przesyłaniu próbek do CRL do badań potwierdzających - formularz/ankieta j.w. odnoszący się do produktów nie zawierających mleka	Wersja 3, wrzesień 2009
Wersja 3, wrzesień 2009	Zmiana testu ELISA Transia Plate SE → Ridascreen SET Total Usunięto etap wstępnego traktowania ekstraktu króliczymi przeciwciałami IgG	Wersja 4, kwiecień 2010



ANSES
Agence nationale de sécurité
sanitaire, alimentaire,
environnementale et rurale



EUROPEAN UNION REFERENCE
LABORATORY FOR
COAGULASE POSITIVE
STAPHYLOCOCCI

Wolfgang Albert Laboratory
for Food Safety

Detection of staphylococcal enterotoxins types SEA to SEE in all types of food matrices

European screening method of the EU-RL for "COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI INCLUDING STAPHYLOCOCCUS AUREUS"

Version 5, September 2010

→

PN-EN ISO 19020:2017-08
Mikrobiologia łańcucha żywnościowego. Horyzontalna metoda immunoenzymatycznego wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w żywności

ANSEL GUYON, Anne-Laure PREFFER, Stéphane BARDALAT,
Pascale SIVIERE REYNOLDS
Takt C characterization of milk

Adrian ANTEJ, Bernard LINDNER
Co-authors of PN-EN ISO 19020:2017-08
including English version

Metoda referencyjna

- Metoda referencyjna wykrywania enterotoksyny gronkowcowej w mleku i produktach mlecznych obejmuje 2 etapy:

1. ekstrakcję i koncentrację poprzez dializę
2. detekcję metodą immunoenzymatyczną

Europejska metoda screeningowa CRL Milk,
Hennekinne et al., Journal of AOAC
International, Vol. 86, No 2, 2003

Zasada metody

- Próbka jest mieszana i homogenizowana z wodą destylowaną. Toksyny dyfundują do wody i są odzyskiwane w supernatancie po 2 wirowaniach. Wodna faza jest zagęszczana przez dializę. Enterotoksyny są wykrywane w ekstrakcie metodą immunoenzymatyczną.

PROCEDURA

- **PRZYGOTOWANIE PRÓBKII**
 - całą próbkę lub jej reprezentatywną część (w przypadku serów zawierającą około 10% skórki) zmieszać mikserem
 - odważyć 25 g zmieszanej próbki i przenieść tę porcję do zlewki

PROCEDURA

• Etap ekstrakcji

- do testowanej porcji dodać 40 ml ciepłej wody destylowanej i zhomogenizować mieszaninę
- wytrząsać próbkę przez 30 minut (wg normy 30 - 60 minut) w temperaturze pokojowej w celu ułatwienia dyfuzji toksyny

PROCEDURA

- Doprowadzić pH do poziomu 3,5 (dodając HCl)
- odwirować przez co najmniej 15 minut przy prędkości 3 100 g w 4°C
- przenieść supernatant do zlewki i zneutralizować pH do poziomu 7,3 (dodając NaOH)
- ponownie odwirować w tych samych warunkach
- odzyskać fazę wodną

PROCEDURA

• Etap koncentracji (dializa)

- dla każdej próbki przygotować 50 cm membrany do dializy
- zamknąć jeden koniec membrany zamknięciem
- napęlić otrzymanym wcześniej roztworem używając lejka
- zamknąć drugi koniec membrany



PROCEDURA

- Wypełnione membrany ułożyć na tacy zawierającej 30% roztwór PEG (glikol polietylenowy)
- zostawić na noc w temp 4°C w celu zagęszczenia
- następnego dnia wyjąć membrany z roztworu PEG i spłukać zewnętrzną część membrany wodą

(przygotowanie roztworu PEG wg normy 30 g PEG + 70 ml wody destylowanej)

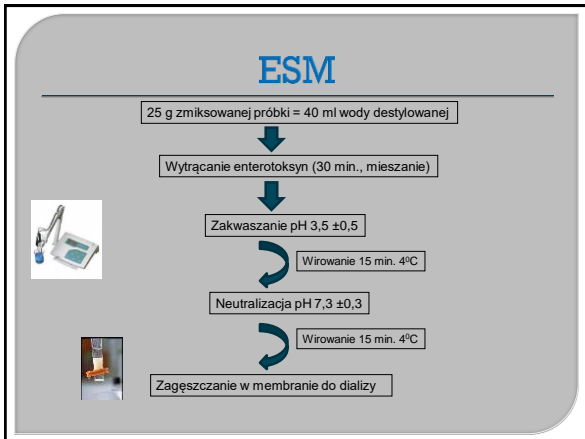
PROCEDURA

- pozostałą w membranie część ekstraktu spłukać taką ilością roztworu PBS (tylko dla próbek mleka i produktów mlecznych) lub wody destylowanej/demineralizowanej aby otrzymać 5,0 - 5,5 ml zagęszczonego ekstraktu
- jeżeli ekstrakt ma być poddany analizie w ciągu 48 godzin, należy go przechowywać w temp 2-8°C, jeżeli nie to próbki należy zamrozić w temp. - 18°C

Punkty krytyczne metody - analiza

1. Odzyskiwanie toksyn po dializie
2. Zakwaszanie (pH < 4)
3. Prędkość wirowania
4. Temperatura wirowania
5. Czas wirowania
6. Zagęszczanie próbki

Bufor do ekstrakcji	H ₂ O	To nie jest krytyczny parametr
	PBS	Woda jest łatwiejsza do użycia ze względów technicznych i ekonomicznych
Zakwaszanie ekstraktu	tak	Zakwaszanie jest konieczne aby uniknąć fałszywie dodatnich wyników
	nie	
Prędkość wirowania	12 500 g	Nie ma większego znaczenia ale wymagana jest minimalna prędkość 3 130 g
	3 130 g	
Temperatura wirowania	20°C	Nie ma większego znaczenia jednak temperatura 4°C ułatwia łączenie cząsteczek tłuszczu i pozwala łatwiej wytrącić tłuszcz
	4°C	
Czas wirowania	30 min	Nie ma większego znaczenia, jednak wymagany jest czas min. 15 minut
	15 min	
Zagęszczanie w glikolu polietylenowym	tak	Drugi punkt krytyczny – ekstrakt musi być zagęszczony aby uniknąć wyników fałszywie ujemnych
	nie	



Zestawy do detekcji enterotoksyn gronkowcowych

Unijne Laboratorium Referencyjne zaleca zestaw **Ridascreen SET Total** lub **Vidas SET 2** do wykrywania enterotoksyny gronkowcowej w mleku i produktach mlecznych.

PROCEDURA

◉ DETEKCJA - test Ridascreen SET Total

→ metoda oparta jest na sandwich ELISA. Fazę stałą stanowią studzienki optaszczone specyficznymi dla enterotoksyn przeciwciałami. Pomiedzy tymi przeciwciałami a enterotoksynami obecnymi w badanej próbce tworzy się kompleks. Obecność enterotoksyn stwierdza się na podstawie reakcji kolorymetrycznej przy dł. fali 450/630 nm.

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Absorbancja kontroli pozytywnej powinna być wyższa lub równa 1,0
Absorbancja kontroli negatywnej powinna być niższa lub równa 0,2

OKREŚLANIE WARTOŚCI CUT-OFF

Należy przeprowadzić przy użyciu wzoru :

$$\text{CUT OFF VALUE} = \frac{\text{WARTOŚĆ ABSORBANCJI KONTROLI UJEMNEJ}}{\text{WARTOŚĆ ABSORBANCJI KONTROLI POZYTYWNEJ}} + 0,15$$

INTERPRETACJA WYNIKÓW

Należy przyjąć, że enterotoksyny gronkowcowe są wykryte w badanej próbce jeżeli absorbancja próbki będzie wyższa lub równa wartości cut - off

Jeżeli absorbancja będzie niższa niż wartość cut - off oznacza to, że enterotoksyny są nieobecne w badanej próbce

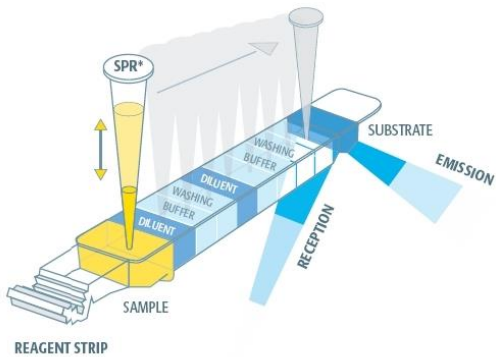
VIDAS Staph enterotoxin II

Oznaczenie enzymoimmunofluorescencyjne (ELFA) do wykrywania enterotoksyn gronkowcowych za pomocą automatycznego systemu VIDAS



Vidas Staph enterotoxin II





* SPR: Solid Phase Receptacle

WYNIKI I INTERPRETACJA

Odczyt fluorescencji w kuwecie pomiarowej wykonywany jest dwukrotnie;

Pierwszy odczyt dotyczy tła kuwety z substratem, drugi odczyt po inkubacji substratu z enzymem pozostającym wewnątrz pipetki SPR

RFV (Relative Fluorescence Value) = różnica wartości końcowej i tła

Interpretacja:

Wartość Testu (TV) = RFV próby / RFV standardu

WYNIKI I INTERPRETACJA

Próg wartości testu	Interpretacja
< 0,13	ujemny
≥ 0,13	dodatni



Vidas Staph enterotoxin II

- Granica wykrywalności:
- badana z oczyszczonymi toksynami A, B, C1, C2, C3, D i E:
- ≤ 0,25 ng/ml
- Badana z produktami zawierającymi toksyny:

	Stężenie toksyny (ng toksyny na g produktów)			
	0,1 ng/g	0,25 ng/g	0,5 ng/g	1,0 ng/g
Toksyna A	75%	93%	100%	-
Toksyna B	80%	98%	100%	-
Toksyna C2	-	84%	95%	100%
Toksyna D	-	48%	82%	95%
Toksyna E	-	66%	93%	100%

Vidas Staph enterotoxin II

Międzylaboratoryjne badania porównawcze - marzec 2005
21 laboratoriów (18 Krajowych Laboratoriów Unijnych,
8 laboratoriów francuskich)

- 6 liofilizowanych próbek sera (nie zakażone enterotoksyną, sfortyfikowane na poziomie 0,1ng/g i 0,25ng/g)
- Specyficzność 100%
- Czulość 100%
- Dokładność 100%

Wnioski: metoda Vidas SET2 może być wykorzystywana do detekcji enterotoksyn gronkowcowych

Vidas Staph enterotoxin II

- Porównania międzylaboratoryjne w Stanach Zjednoczonych
- w celu ustalenia limitu detekcji dla różnych produktów żywnościowych

- 19 laboratoriów
- 5 rodzajów produktów żywnościowych (gotowany kurczak, szynka, sałatka ziemniaczana, pasteryzowane pełne mleko, pieczarki w puszkach)
- Enterotoksyny A, B, C1, D lub E na 2 poziomach
- zanieczyszczenia (0,25 ng/g i 0,5 ng/g)
- Specyficzność 100%

- Wnioski: metoda Vidas SET2 powinna być oficjalnie metodą pierwszego wyboru podczas wykrywania enterotoksyn gronkowcowych w żywności

Vidas Staph enterotoxin II

- Kwiecień 2008 - międzylaboratoryjne badania porównawcze zorganizowane przez PIWet-PIB, Zakład Higieny Żywności Pochodzenia Zwierzęcego - **KRAJOWE LABORATORIUM REFERENCYJNE ds. GRONKOWCÓW**

- Cel: ocena kompetencji laboratoriów badawczych w zakresie wykrywania enterotoksyn gronkowcowych
- 5 laboratoriów
- 2 próbki nie zanieczyszczone enterotoksyną, 2 próbki
- 0,5 ng/g, 2 próbki 0,25 ng/g
- Wybrana przez wszystkie laboratoria metoda detekcji - Vidas SET2
- Wyniki: w 100% zgodne z wynikiem poprawnym w całym zakresie badań
- Powtarzalność, odtwarzalność = 100%

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

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.

Ma zastosowanie do :

- mleka i płynnych przetworów mlecznych
- produktów mlecznych suszonych
- serów
- kazeiny i kazeinianów
- masła
- lodów
- kremów, deserów i słodkiej śmietanki
- mleka fermentowanego i śmietany
- żywności na bazie mleka przeznaczonej dla niemowląt

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

Laboratorium powinno otrzymywać próbki reprezentatywne, nieuszkodzone ani niezmięcone podczas transportu lub przechowywania

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

- Produkty mrożone (przechowywać przed badaniem w temperaturze od 18 do 27°C przez max. 3h lub w temperaturze 3 ±2°C przez max 24h)
- Produkty twarde i suszone (próbkę z rozpuszczalnikiem mieszać w mieszalniku typu perystaltycznego)
- Produkty płynne i nielepkie (próbkę wymieszać ręcznie lub mechanicznie)
- Produkty niejednorodne (pobierać próbki w sposób zapewniający pobranie poszczególnych składników w ilości odpowiadającej proporcji tego składnika w produkcie wyjściowym)

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

Zawiesina wyjściowa -

zawiesina, roztwór lub emulsja otrzymana w wyniku wymieszania odważonej lub odmierzonej określonej ilości badanego produktu (lub próbki do badań przygotowanej z produktu) z użyciem, jeśli to konieczne mieszalnika i zachowaniem określonych środków ostrożności, z dziewięciokrotną ilością płynu do rozcieńczeń (rozcieńczalnika) po osadzeniu się dużych cząstek, jeśli są obecne

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

Rozcieńczalniki do ogólnego stosowania:

- Roztwór soli z peptonem
- Płyn Ringera rozcieńczony czterokrotnie
- Roztwór peptonu
- Roztwór buforu fosforanowego
- Zbuforowana woda peptonowa (szczególnie polecana do wykrywania obecności *Salmonella* sp. lub oznaczania liczby *L. monocytogenes*)

Przygotowanie próbek, zawiesiny wyjściowej i rozcieńczeń

Rozcieńczalniki do specjalnego stosowania:

- Roztwór cytrynianu sodu (do serów, mleka w proszku suszonego metodą walcową i niektórych kazeinianów)
- Roztwór wodorofosforanu (V) dipotasu (do serów, mleka suszonego metodą walcową, mleka fermentowanego, niektórych kazeinianów, suszonej serwatki kwasowej i śmietany)
- Roztwór wodorofosforanu (V) dipotasu z substancją przeciwpieniącą (do kazeiny kwasowej, wytrąconej kwasem mlekowym i podpuszczkowej)
- Roztwór tripoli fosforanu sodu (do kazeiny podpuszczkowej)
- Rozcieńczalnik do ogólnego stosowania z roztworem α -amylazy (do żywności zawierającej skrobię)
- Zbuforowana woda peptonowa z purpurą bromokrezolową (do produktów kwaśnych)

KRYTERIA HIGIENY PROCESU

- ⊙ Gronkowce koagulazo-dodatnie
- ⊙ *E. coli*
- ⊙ *Enterobacteriaceae*

Gronkowce koagulazo-dodatnie

2.2.3. Sery wyprodukowane z młoka pasteryzowanego	Gonkowca koagulazo-dodatnie	5	2	10 ⁷ j.j.k/g	10 ⁸ j.j.k/g	ENISO 6888-2	W czasie procesu produkcji, w szczególności w okresie produkcji sera per sebrzywa kilka gronkowców	Poprawa higieny produkcji sera młocą surowicę. W razie wykrycia wadliwej 10 ⁷ j.j.k/g próba ma służyć jako zaobserwowanie entrobakteri gronkowcowych.
2.2.4. Sery wyprodukowane z młoka poddługiego, ośrodku mlecznego w temperaturze niższej niż pasteryzacja (tzw. sery długoprężone, wyprodukowane z młoka lub serwa) poddługich pasteryzacji lub ośrodku (tępliny w wyższej temperaturze) (1)	Gonkowca koagulazo-dodatnie	5	2	10 ⁷ j.j.k/g	1 000 j.j.k/g	ENISO 6888-1 lub 2		
2.2.5. Sery niedojrzywające (tępliny) wyprodukowane z młoka lub serwa poddługich pasteryzacji lub ośrodku (tępliny w wyższej temperaturze) (1)	Gonkowca koagulazo-dodatnie	5	2	10 ⁷ j.j.k/g	100 j.j.k/g	ENISO 6888-1 lub 2	Entrobakterie podczas	Poprawa higieny produkcji. W razie wykrycia wadliwej 10 ⁷ j.j.k/g próba ma służyć jako zaobserwowanie entrobakteri gronkowcowych.

Gronkowce koagulazo-dodatnie

- ⊙ PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*S. aureus* i innych gatunków)
Część 1: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej Baird-Parkera
- ⊙ PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004 Mikrobiologia żywności i pasz. Horyzontalna metoda oznaczania liczby gronkowców koagulazo-dodatnich (*S. aureus* i innych gatunków)
Część 2: Metoda z zastosowaniem pożywki agarowej z plazmą króliczą i fibrynogenem

PN-EN ISO 6888-1:2001/A1:2004

Na powierzchnię dwóch jałowych płytek Petriego - z pożywką Baird-Parkera przenieść pipetą po 0,1 ml zawiesiny wyjściowej, następnie do kolejnych dwóch płytek Petriego przenieść po 0,1 ml kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń

Inkubacja w 35 °C lub w 37 °C, przez 18 – 24 h. W razie potrzeby przedłużyć inkubację o 18 – 24h.

Czarne lub szare, błyszczące, wypukłe kolonie

Inkubacja 24 h +/- 2 h w 35 °C lub w 37 °C

Potwierdzenie:

0,5ml BHI + 0,5ml plazmy króliczej

Inkubacja w 35 °C lub w 37 °C

Obliczenie liczby gronkowców koagulazo-dodatnich w ml produktu na podstawie liczby potwierdzonych kolonii wyrosłych na kolejnych rozcieńczeniach wybranych do liczenia

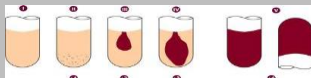


Test na zdolność wytwarzania koagulazy

0,5 ml plazmy króliczej

+

0,5 ml 24 h hodowli na BHI



KOAGULAZO-DODATNIE (COAGULASE POSITIVE STAPHYLOCOCCI – CPS)

S. aureus ssp. *aureus*
S. aureus ssp. *anaerobius*
S. intermedius
S. hyicus ssp. *hyicus*
S. schleiferi ssp. *coagulans*

Interpretacja

Ujemny - brak oznak tworzenia fibryny

1- dodatni - małe, nieuporządkowane skrzepy

2- dodatni - mały nieuporządkowany skrzep

3- dodatni - duży, uporządkowany skrzep

4- dodatni - cała zawartość próbki zakrzepła i nie przemieszcza się po odwróceniu próbki

PN-EN ISO 6888-2:2001/A1:2004

Do każdej z dwóch jałowych płytek Petriego przenieść pipetą po 1 ml zawiesiny wyjściowej, następnie do kolejnych dwóch płytek Petriego przenieść po 1 ml kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń, zalet: pożywką Baird-Parkera RPF.

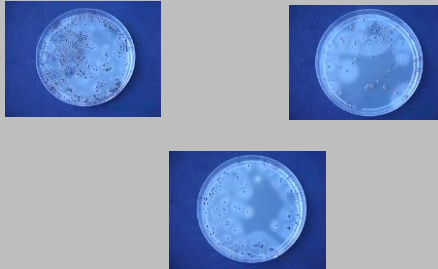
Inkubacja w 35 °C lub w 37 °C przez 18 – 24 h. W razie potrzeby przedłużyć inkubację o 18 – 24 h.

Czarne, szare lub białe kolonie otoczone strefą zmętnienia wskazującą na aktywność koagulazy

Obliczenie liczby gronkowców koagulazo-dodatnich w ml produktu na podstawie liczby kolonii wyrosłych na kolejnych rozcieńczeniach wybranych do liczenia



Wzrost *S. aureus* na pożywce Baird-Parkera z plazmą króliczą i fibrynogenem






S. aureus w serach

- Serki świeże 
- Sery miękkie i półtwarde  
- Sery z niebieską pleśnią 
- Sery twarde 
- Sery typu „Pasta filata”  

Serki świeże

np. Serek wiejski, ricotta

- Ograniczony wzrost *S. aureus* ze względu na kwaśne pH 
- Wytwarzanie enterotoksyn gronkowcowych możliwe jest tylko w mleku surowym przeznaczonym do produkcji sera 
- SEA i SED gdy liczba CPS $\geq 10^6$ jtk/g 

Sery miękkie* i półtwarde**

np.* Camembert, Brie, Limburger, Feta; **Edam, Gouda

- Bardzo dobre warunki do wzrostu *S. aureus* i wytwarzania enterotoksyn
- W tego rodzaju serach wartość M jest często przekroczona ponieważ CPS nie są eliminowane podczas produkcji
- Odnotowano przypadki wykrycia enterotoksyn gronkowcowych jeżeli liczba CPS była $> 10^6$ jtk/g



Sery twarde

np. Cheddar, Parmiggiano Regiano, Grana, Asiago

- Łatwe namnażanie się *S. aureus* podczas pierwszych 48 godzin procesu
- Zakwaszenie i obróbka termiczna hamuje eliminuje *S. aureus*



Sery z niebieską pleśnią

np. Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Danablu

- Dobre warunki do namnażania się *S. aureus* podczas pierwszych 48 godzin procesu
- Wzrost pleśni (*Penicillium roqueforti*) hamuje wzrost *S. aureus*
- Obecność enterotoksyn gronkowcowych możliwa jeżeli liczba CPS $> 10^6$ jtk/g



Sery typu „pasta filata”

np. Mozzarella, Provolone,
Kaskaval

- Sprzyjające warunki do wzrostu gronkowców i wytwarzania enterotoksyn
- Nie odnotowano przypadków gronkowcowych zatruc pokarmowych po spożyciu tego rodzaju serów



Epidemia z Japonii w roku 2000

- > 13,420 przypadków zachorowań
- > odtłuszczone mleko w proszku używane do wyrobu mleka i jogurtów o niskiej zawartości tłuszczu
- > w produktach tych wykryto jedynie enterotoksyny gronkowcowe w ilości 0,05 - 1,6ng/ml
- > w odtłuszczonym mleku w proszku wykryto enterotoksyny gronkowcowe w ilości 4ng/g
- > dawki wywołujące objawy : 0,02 - 0,1ug/kg

Epidemia z Japonii w roku 2000

PRZYCZYNY:

- > Awaria prądu podczas produkcji mleka w proszku



- > Niestarannie umyte tanki na mleko
- > Niedostateczne dbanie o higienę osób pracujących przy produkcji

Epidemia z Japonii w roku 2000

- zamknięcie fabryki na 15 dni
- Spadek sprzedaży o ponad 76%
- Straty szacowane na około 6 milionów Euro
- Zamknięcie 5 fabryk
- Zwolnienie 1700 pracowników



Epidemia z Norwegii (2003)

- ⦿ 8 osób zachorowało (pięcioro dzieci i dwoje dorosłych)
- ⦿ gwałtowne wymioty, biegunka po 1 godzinie od spożycia posiłku
- ⦿ SEH
- ⦿ przyczyna: puree ziemniaczane zrobione z nie pasteryzowanego mleka
- ⦿ geny dla enterotoksyny wykryto przy użyciu reakcji multiplex PCR

Japonia

- ⦿ Zatrucie pokarmowe po spożyciu jaj
- ⦿ U 53 osób wystąpiły typowe objawy gronkowcowego zatrucia pokarmowego
- ⦿ 8 osób wymagało hospitalizacji
- ⦿ Czas inkubacji 1,5-4h, wymioty, biegunka
- ⦿ 20 - 40ng SEA, $3,0 \times 10^9$ koagulazoujemnych gronkowców

Francja 2009

- ⊙ 6 epidemii SFPO
- ⊙ Źródło: serek miękki produkowany z niepasteryzowanego mleka
- ⊙ Enterotoksyna E
- ⊙ Pierwsze odnotowane we Francji zatrucia pokarmowe spowodowane przez SEE
- ⊙ U 23 osób spośród 26 wystąpiły objawy
- ⊙ Objawy wystąpiły po 1,5 do 8 h po spożyciu serka
- ⊙ CPS $>1,5 \times 10^5$ jtk/g

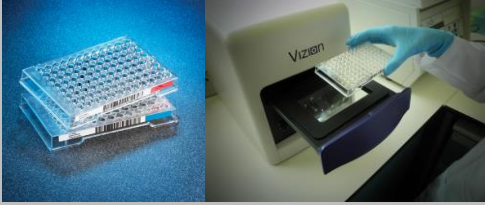
Charakterystyka szczepów koagulazododatnich gronkowców - dane z Francji

- Najczęściej wykrywane w serach są enterotoksyny D (*sed*)
- W produktach po spożyciu których stwierdzano objawy gronkowcowego zatrucia pokarmowego (SFPO) najczęściej wykrywano enterotoksynę A (*sea*)
- Szczepy izolowane z produktów odpowiedzialnych za wywołanie SFPO zawierały geny: *sea*, *sec*, *sed*, *seg*, *seh*, *się*, *sej*, *sep*, *ser*

Epidemie gronkowcowych zatruc pokarmowych

Rok	Lokalizacja	Rodzaj żywności	Rodzaj SE	Liczba przypadków
2000	Japonia	Mleko, jogurt pitny	A	13420
2007	Austria	Mleko smakowe	A, D	166
2009	Francja	Ser z surowego mleka	E	23
2012	Stany Zjednoczone	Potrąwka z kurczaka	A	22
2013	Niemcy	Lody	A	13
2014	Luksemburg	Salatka z makaronem	A	31
2014	Australia	Sushi	A, D	12
2014	Szwajcaria	Ser z surowego mleka krowiego	A, D	14

Antybiotykooporność gronkowców



Antybiotykooporność gronkowców

MIC - najmniejsze stężenie hamujące (Minimal Inhibitory Concentration). Najmniejsze stężenie antybiotyku (wyrażone w mg/l), które w określonych warunkach uniemożliwia uzyskanie widocznego wzrostu bakterii.

Stężenie graniczne - określona wartość MIC, na podstawie której badany izolat bakteryjny zaliczany jest do kategorii „wrażliwy” lub „oporny”.

MRSA

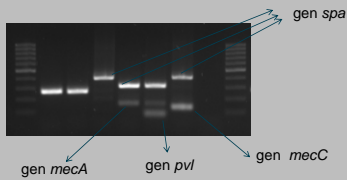
- **MRSA** (methicillin resistant *Staphylococcus aureus*).
- oporność na metycylinę, oznacza oporność na wszystkie stosowane antybiotyki b-laktamowe
- Ulegają one selekcji przede wszystkim na skutek niewłaściwego i bardzo szerokiego stosowania b-laktamów
- Szczepy MRSA stanowią poważny problem, ponieważ niezależnie od oporności na b-laktamy wykazują oporność na wiele innych antybiotyków oraz środków przeciwbakteryjnych, a niejednokrotnie mogą być przyczyną epidemii.

MRSA

PROTOCOL FOR PCR AMPLIFICATION
OF *mecA*, *mecC* (*mecA*_{LG251}), *spa*
AND *pvl*
RECOMMENDED BY THE EURL-AR
2ST VERSION, SEPTEMBER 2012,
DTU Food, National Food Institute

MRSA

- Metoda ma zastosowanie do badania szczepów gronkowców, w celu stwierdzenia występowania u nich genów *mecA* i *mecC* - warunkujących oporność gronkowców na metycylinę, oraz genów *spa* i *pvl*.



E. coli

2.2.2. Sery wyprzedzająca z odniesienia lub serowki produkcyjnych odniesienia serotypu	E. coli (?)	5	2	100 j/kg	1 000 j/kg	ISO 16649-1 lub 2	W czasie procesu produkcyjnego, w szczególności w którym podjęto działania zapobiegawcze (tj. E. coli?)	Przebieg higieny produkcji oraz odniesienia serowek
2.2.6. Metoda (monitoring wyprzedzająca z odniesienia serowki) (tj. odniesienia produkcyjnych odniesienia) w tym samym odniesieniu (tj. E. coli?)	E. coli (?)	5	2	10 j/kg	100 j/kg	ISO 16649-1 lub 2	dotyczy procesu produkcyjnego	Przebieg higieny produkcji oraz odniesienia serowek

PN-ISO 16649-1 Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 1: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem membran i 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu

PN-ISO 16649-2 Horyzontalna metoda oznaczania liczby beta-glukuronidazo-dodatnich *Escherichia coli*. Część 1: Metoda płytkowa w temperaturze 44 stopni C z zastosowaniem 5-bromo-4-chloro-3-indolilo beta-D-glukuronidu

E. coli

1 ml próbki lub zawiesiny wyjściowej przenieść do 2 jałowych płytek Petriego następnie do kolejnych dwóch płytek Petriego przenieść po 1 ml kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń

+

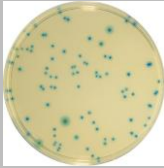
Zalać 15 ml pożywki TBX o temperaturze 44-47°C.

↓

Inkubacja nie może przekroczyć 24 h

↓

Odczyt
(policzyć kolonie typowe na każdej płycie zawierającej poniżej 150 kolonii lub wszystkie kolonie typowe i nietypowe na płytkach zawierających poniżej 300 kolonii)



W przypadku podejrzewania obecności uszkodzonych komórek, należy wstępnie inkubować przez 4 h w temperaturze 37°C, a następnie podwyższyć temperaturę inkubacji do 44°C.

Temperatura inkubacji nie może przekroczyć 45°C

Enterobacteriaceae

Rodzaj (synonim)	Mikroorganizm	Plan próby (proba 1)		Limity (1)		Metoda badania odwołania (1)	Typ stosowanej techniki	Działanie w wyjątko szczególnych przypadkach
		n	z	in	mg			
2.2.2. Mleko w proszku i serwała w proszku (1)	Enterobacteriaceae	5	0	10 j/kg		ISO 21528-1	Kontrola procesu produkcji	Kontrola skuteczności obrotów czepności i drożności zapobiegających wtórnemu zanieczyszczeniu
2.2.3. Mleko pasteryzowane i inne pastyżowane płyny produkcyjne mleczne (1)	Enterobacteriaceae	5	2	< 1 j/kg	5 j/kg	ISO 21528-1	Kontrola procesu produkcji	Kontrola skuteczności obrotów czepności i drożności zapobiegających wtórnemu zanieczyszczeniu, a także jakości serwatki
2.2.4. Łoś (1) i niektóre drożdże mleczne	Enterobacteriaceae	5	2	10 j/kg	100 j/kg	ISO 21528-2	Kontrola procesu produkcji	Poprawa higieny produkcji.
2.2.5. Przepisy w proszku dla niemowląt i proszki dietetyczne w proszku specjalnego przeznaczenia medycznego (determinacja dla sterowności w wieku do 6 miesięcy)	Enterobacteriaceae	80	0	Wzrostowa w 10 g		ISO 21528-1	Kontrola procesu produkcji	Poprawa higieny produkcji w celu zapobieżenia zanieczyszczeniu. W celu weryfikacji zanieczyszczenia w produkcji przeprowadzonej przez personel należy badać na obecność E. sakazakii i Salmonella.

Enterobacteriaceae

PN-EN ISO 21528-2:2017-08


1 ml próbki lub zawiesiny wyjściowej przenieść do jałowej płytki Petriego następnie do kolejnych płytek Petriego przenieść po 1 ml kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń

+

Zalać 15 ml pożywki agarowej z fioletem, czerwienią, solami żółci i glukozą (VRBG) o temperaturze 47 - 50°C.

+

Po całkowitym zestaleniu mieszaniny wlać do płytek po 5 - 10 ml pożywki VRBG w celu utworzenia drugiej warstwy. Inkubacja w temperaturze 37°C przez 24h



Testy potwierdzające:

- Przesiew na pożywkę nieselektywną
- test na fermentację glukozy (+)
- obecność oksydazy (-)

Inne zagrożenia - *Bacillus cereus*

0,1 ml próbki lub zawiesiny wyjściowej przenieść do 2 jałowych płytek Petriego z pożywką agarową następnie do kolejnych dwóch płytek Petriego przenieść po 0,1 ml kolejnych dziesięciokrotnych rozcieńczeń. Wykrywalność można zwiększyć 10x badając 1 ml próbki lub zawiesiny wyjściowej posiewając na 3 płytki Petriego



Rozprowadzić inokulum i inkubować płytki przez 18-24h w temperaturze 30°C. Inkubację przedłużyć o kolejne 24h jeżeli kolonie nie są wyraźnie widoczne

Testy potwierdzające
-pożywka agarowa MYP
- hemoliza

Wybrać do liczenia płytki zawierające mniej niż 150 kolonii, najlepiej z dwóch kolejnych rozcieńczeń

Dziękuję za uwagę
