



Maisons-Alfort laboratory for
food safety

Smernice na odber vzoriek z potravinárskych spracovateľských priestorov a zariadenia na detekciu *Listeria monocytogenes*

Verzia 3-20/08/2012

*Brigitte CARPENTIER and Léna BARRE, EURL for Listeria monocytogenes,
Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, ANSES, France*

V spolupráci s:

S. Barbuti	SSICA	Taliansko
J. Canet Noguera	FECIC	Španielsko
H. da Silva Mateus Fernandes Guedes	INRB/LINIA/UITA(NRL Lm)	Portugalsko
C. Dufour	SLLIKER SAS	Francúzsko
E. Español Pueyo	Laboratório de Salud Pública de Huesca	Španielsko
A.L. Ferreira Tavares	Laboratório Tomaz	Portugalsko
L. Gram	Danish Technical Univesity	Dánsko
T. Grégori	FICT	Francúzsko
B. Hickey	Dairy Science laboratory (NRL Lm)	Írsko
J. Lago	ANFACO-CECOPECA	Španielsko
P. Leglise	Laboratoire Départemental de la Cote d'Or	Francúzsko
A.S. Orfao Ferraz	Globalab- Ensaios Químicos e Microbiológicos S.A	Portugalsko
J. Pardos Bosch	Laboratori de l'Agencia de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la generalitat de Catalunya	Španielsko
C.M. Pires Gomes	INRB/LINIA/UITA (NRL Lm)	Portugalsko
N. Sanches	SOREDAB	Francúzsko
J. Samches Hernandez	Laboratorio de salud Pública de Salamanca	Španielsko
M. Sol	INRB-LINIA-UITA (NRL Lm)	Portugalsko
V. Stahl	Aérial Technical Institute for Food Industry	Francúzsko
M.M. Tenreiro dos Santos Monteiro Saraiva	National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge	Portugalsko
J. Toomas Kramarenko	Veterinary and Food Laboratory (NRL Lm)	Estónsko

1 Obsah.....	2
Predhovor.....	3
Úvod.....	4
2 Predmet.....	5
3 Normatívne odkazy.....	5
4 Výber miest odberu vzoriek.....	5
5 Čas, kedy odber vzoriek treba vykonávať.....	6
6 Roztoky na zvlhčenie stieracích odberových pomôcok.....	7
6.1. Jednoduché roztoky.....	7
6.2. Neutralizačné roztoky.....	7
7 Kultivačné médiá.....	8
8 Prístroje a sklo.....	8
9 Plocha odberu vzoriek.....	8
10 Príprava pomôcok na odber vzoriek.....	9
10.1 Paličkové stery.....	9
10.2 Hubkové/ utierkové/gázové vankúšikové metódy.....	9
11 Odber vzoriek.....	9
11.1 Metóda paličkovými stermi.....	9
11.2 Metóda hubkovými / utierkovými stermi/ gázovými vankúšikmi.....	10
12. Preprava vzoriek, uchovanie a začiatok analýz.....	11
13. Analýza vzoriek.....	11
13.1 Paličková sterová metóda.....	11
13.2 Metóda hubkovými / utierkovými stermi / gázovými vankúšikmi.....	11
14 Vyjadrovanie výsledkov.....	11
15 Odkazy.....	12

Podľa prehľadu literatúry, ktorý vykonalo Referenčné laboratórium EÚ pre *Listeria monocytogenes* (EURL Lm), súhlasilo EURL Lm a sieť národných referenčných laboratórií (NRL), že medzinárodná norma ISO 18593, ktorá opisuje metódy odberu vzoriek z povrchov na detekciu alebo stanovenie počtov baktérií v potravinárskych priestoroch a na zariadeniach, nedáva dostatočné usmernenie špecifické pre detekciu *L. monocytogenes* (pozri tiež úvod). Súhlasilo sa preto s tým, že EURL Lm by mohlo v spolupráci s pracovnou skupinou (WG) napísať usmerňovací dokument o tejto problematike. Táto WG zahŕňala 20 členov zo 7 členských štátov EÚ, ktorí patrili k 3 NRL a iným organizáciám (pozri čelnú stranu).

Odhliadnuc od prehľadu literatúry a príspevkov od členov WG, toto usmernenie sa zakladá na veľkom prieskume vykonanom v roku 2010 o praktikách odberu vzoriek z povrchov (137 respondentov z 15 ČŠ EÚ, patriacich medzi PPP, poskytovateľov služieb v kontrole hygieny, úradné kontrolné služby...), ktorý ukázal veľkú rozmanitosť praktík a niektoré nesprávne, čo zdôraznilo potrebu Európskeho dokumentu.

Bolo pripravených viacero návrhov, každý bol predložený na konzultácie, v prvom stupni NRL, ktoré ho konzultovali na národnej úrovni s prevádzkovateľmi, ktorí praktikuju odber vzoriek z povrchov a potom s členmi WG.

Súčasná 3.verzia je výsledkom súhlasu všetkých NRL na ich výročnom seminári 28.-30 . marca 2012 a zohľadňuje pripomienky získané od 3 ČŠ EÚ (UK, NL, DE) v rámci konzultácie s ČŠ vykonanej DG SANCO. S touto verziou súhlasil Stály výbor pre potravinový reťazec a zdravie zvierat EÚ (SCOFCAH) na svojom stretnutí 18.7. 2012 a ďalšej 2 týždňovej písomnej konzultácii.

V súčasnosti je stanovené, že potraviny na priamu spotrebu môžu byť počas spracovania kontaminované subtypmi *Listeria monocytogenes*, ktoré perzistujú v spracovateľských závodoch /1/. Preto je v rámci nariadenia (ES) č. 2073/2005 o mikrobiologických kritériách pre potraviny /2/ potrebný a povinný odber vzoriek zo spracovateľských priestorov a zariadenia na *L. monocytogenes* na rutinnom základe podľa schémy odberu vzoriek. Takéto schémy odberu vzoriek majú za cieľ detekciu a elimináciu perzistentných kmeňov alebo, ak je eliminácia nemožná, implementovať nápravné opatrenia na predchádzanie kontaminácii týmito patogénnymi mikróbmi. V tomto smere boli publikované viaceré usmerňovacie dokumenty /3-5/. Program neúčinného odberu vzoriek alebo neúčinné spôsoby odberu vzoriek môžu mať za následok nedokázanie *L. monocytogenes*, hoci je prítomná. Toto neumožní zavedenie nápravných opatrení a dáva falošný pocit bezpečnosti.

Medzinárodný štandard ISO 18593 /6/, ktorý opisuje metódy odberu vzoriek z povrchov na detekciu a zisťovanie počtov živých mikróbov nedáva dostatočné usmernenie alebo pokyny na detekciu osobitne *L. monocytogenes*. Sterové metódy (stery / hubkové/ utierkové metódy) sú jedinými vhodnými metódami pre *L. monocytogenes*. ISO norma neopisuje, kedy treba odber vzoriek vykonávať alebo, z akých miest treba vzorky odoberať. Toto usmernenie má za úlohu vyplniť túto medzeru pri implementácii článku 5.2 nariadenia (ES) č. 2073/2005 /2/. Okrem toho sa rozhodlo nevenovať sa tomu, ako stanovovať počet *L. monocytogenes* na povrchoch z nasledujúcich dôvodov. Po prvé stieranie neodoberie všetky bakteriálne bunky a podiel odoberatých buniek nie je známy a kolíše. Po druhé bunky *L. monocytogenes* nie sú rovnomerne distribuované na povrchu a porovnania výsledkov medzi veľkými a malými plochami preto môže byť nesprávne.

Po odbere vzoriek sa analýza vykonáva podľa EN ISO 11290-1 alebo podľa validovaných alternatívnych metód podľa článku 5 Nariadenia (ES) č. 2073/2005 ¹). V prípade, že sa pri po sebe idúcich odberoch vzoriek na rovnakom spracovateľskom mieste, kde už boli vykonané preventívne opatrenia, zistia exesívne vzorky pozitívne na *L. monocytogenes* (pozri oddiel 5), je potrebné vykonať subtypizáciu izolátov *L. monocytogenes* molekulárnou metódou (ako je pulzná gélová elektroforéza, alebo Multi-locus tandemová repetícia s variabilným počtom alebo Fluorescenčnou AFLP), aby sa zistilo, či tieto izoláty patria k jednému a preto rezistentnému klonu.

¹ Podľa požiadaviek nariadenia (ES) č. 2073/2005, tento dokument je len venovaný detekcii *L. monocytogenes*. Je zaujímavé vedieť, že ako navrhuje Codex Alimentarius (3) „účinné monitorovacie programy môžu tiež zahŕňať testovanie na *Listeria* spp; ich prítomnosť je dobrým indikátorom podmienok podporujúcich prítomnosť *L. monocytogenes*“.

2 PREDMET

Tieto usmernenia špecifikujú, kde, ako a kedy treba vykonávať sterový odber vzoriek na detekciu *L. monocytogenes* na povrchoch potravinárskych spracovateľských oblastí a zariadenia pre potraviny na priamu spotrebu.

POZNÁMKA 1: Povrchy spracovateľských priestorov a zariadení nie sú jedinými miestami na monitorovanie, schéma odberu vzoriek by mala obsahovať aj spracovateľské pomocné látky (ako je stlačený vzduch, ľad, láky a roztoky, voda, odtoková voda), ktorých vzorkovanie nie je pokryté týmto dokumentom.

POZNÁMKA 2: Nebude tu poskytnutý žiadny návod na frekvenciu odberu vzoriek, počet odberových miest, validitu skladania (spájania) vzoriek alebo potrebu rotovať vzorkované miesta, pretože toto sa zvolí na báze „od prípadu k prípadu“ s prístupom na základe rizika.

POZNÁMKA 3 : Tieto usmernenia nie sú určené na posudzovanie účinnosti čistenia a dezinfekcie.

3 NORMATÍVNE ODKAZY

Pri uplatňovaní tohto dokumentu treba používať nasledujúce referenčné dokumenty:

ISO 6887 – 1 Mikrobiológia potravín a krmív. Úprava analytických vzoriek, príprava základnej suspenzie a desaťnásobných riedení na mikrobiologické skúšanie. Časť 1: Všeobecné pokyny na prípravu základnej suspenzie a desaťnásobných riedení

ISO 7218 Mikrobiológia potravín a krmív. Všeobecné pravidlá mikrobiologického skúšania

ISO 11290-1 Mikrobiológia potravín a krmív. Horizontálna metóda na dôkaz a stanovenie počtu baktérií *Listeria monocytogenes*. Časť 1: Metóda dôkazu

ISO/TS 11133 Mikrobiológia potravín a krmív. Pokyny na prípravu a výrobu kultivačných médií

4 VÝBER MIEST ODBERU VZORIEK

L. monocytogenes sa môže nájsť na vizuálne čistých povrchoch, ale častejšie sa nachádza na vlhkých a znečistených miestach, kde táto baktéria môže rásť a perzistovať / 1,7/. Vzorky treba odoberať z ťažko dosiahnuteľných miest, ako sú diery alebo trhliny vo vláknitých, poréznych, hrdzavých a dutých materiáloch, zo zle čistiteľného zariadenia a možných miest na usídľovanie. Odoberať vzorky z nedosiahnuteľných oblastí, kde sa môže zhromažďovať detritus, môže byť obtiažne. Tieto miesta treba vzorkovať po demontáži zariadenia údržbárskym tímom. Neodporúča sa odoberať vzorky oplachom týchto miest, lebo oplach nemá na oddelenie týchto mikróbov z týchto povrchov rovnaký účinok ako stieranie.

Odber vzoriek sa musí vykonávať často v miestach, kde je potravinársky výrobok vystavený kontaminácii, ale môže byť tiež zaujímavé odoberať menej často vzorky tam, kde to tak nie je (skladovacie priestory).

Voľba miest odberu vzoriek sa vykonáva podľa historických údajov spojených s každým závo- dom a vyhodnotením procesu krok za krokom. Nevýčerpávajúci zoznam miest na odber vzoriek je nasledujúci /4,5,8/ :

- Povrchy nekontaktné s potravinami: Odtoky, podlahy, mláky vody na podlahe, čistiace pomôcky, umývárne náradia, váhy zapustené v podlahe, hadice, duté rúry a duté súčasti prepravíkov, prepravníky, rámy zariadení, vnútorné panely zariadení, odkvapy kondenzu, vysokozdvížné vozíky, ručné vozíky, dráhy, kolieska dráh, odpadkové koše, zmrazovače, výrobníky ľadu, rebrá v chladičoch a kondenzátoroch, zástery, steny stropy, chladné body,

kde kondenzuje voda, ako sú mokrá izolácia stien alebo okolo potrubí, alebo chladiacich jednotiek, gumové tesnenia okolo dvier hlavne v chladiarňach, obsah vysávačov, kľučky dvier a kohútiky.

- Povrchy kontaktné s potravinami: Pásky prepravňíkov, krájače, krájacie dosky, rezačky, násypníky, vyklápače, miešačky, lúpacie zariadenia, zakladače, plničky a baliace zariadenia, kontajnery a iné pomôcky, rukavice na viacero použití.

5 ČAS, KEDY TREBA ODBER VZORIEK VYKONÁVAŤ

Ak sa vzorky odoberajú bezprostredne po alebo skoro po čistení a dezinfekcii môže byť detekcia *L. monocytogenes* problematická. Kvôli poškodeniu spôsobenému chemickými činidlami používanými na čistenie a dezinfekciu môžu byť bunky stále živé, ale nekultivovateľné, a preto nie ľahko detekovateľné /8/. Okrem toho bunky, ktoré zostali v miestach usídlenia bez ohľadu na čistenie a dezinfekciu môžu byť tiež nedetegované, pretože pre odber vzoriek sú dostupnejšie, ak sú vypudené počas spracovania, lebo zariadenie vibruje a/alebo preto, že potraviny a kvapaliny prichádzajú do styku s miestom usídlenia. /9/.

Na zvýšenie pravdepodobnosti detekcie perzistentného kmeňa treba preto odoberať vzorky počas spracovania alebo najviac 2 hodiny po výrobe alebo na konci výrobných smeny, tzn. pred čistením a dezinfekciou /4,8-11/. Na výrobných linkách, kde sa potraviny vyrábajú zo surovín, ktoré nepodliehajú ošetrovaniu, ktoré redukuje množstvo mikróbov (napr. surové syry), môže *L. monocytogenes* vo vzorke z povrchu odobratej počas spracovania pochádzať zo surovín, rovnako ako z miest, kde bunky *L. monocytogenes* perzistujú v prostredí na spracovanie potraviny. V závodoch, kde sa spracúvajú pasterizované produkty alebo suroviny, ktoré nie sú často kontaminované (napr. syry z pasterizovaného mlieka) *L. monocytogenes*, sa vo vzorkách z povrchov zisťuje ako perzistentná *Listeria*.

Ak sú potraviny vstupujúce do spracovateľských priestorov surové alebo boli ošetrované na zníženie ich mikrobiálnej záťaže (pasterizáciou, mikrofiltráciou atď.)², prevádzkovatelia potravinárskych podnikov (PPP) musia, ako súčasť plánov HACCP, určiť akceptovateľný počet pozitívnych vzoriek, ktoré môžu byť určené odlišne pre dôkaz *L. monocytogenes* na povrchoch kontaktných s potravinami a na povrchoch nekontaktných s potravinami. Ak je určený počet pozitívnych vzoriek prekročený³, musia sa vykonať nápravné opatrenia podľa plánu HACCP prevádzkovateľa. Pravdaže, ak sa spracúvajú surové potraviny, môže sa okrem odberu vzoriek počas spracovania vykonávať aj odber vzoriek po čistení a dezinfekcii alebo na začiatku výroby. Ale toto môže viesť k falošnému pocitu bezpečia. A obrátene- dôkaz *L. monocytogenes* na povrchu kontaktnom s potravinami po čistení a dezinfekcii poukazuje na závažné chyby v postupoch čistenia a dezinfekcie.

Ak sa odber vzoriek nevykonáva denne, nesmie sa vykonávať v rovnakom dni(dňoch) týždňa. Je vhodné odoberať vzorky po údržbe zariadení, oprave zariadenia, rekonštrukcii alebo rozšírení a zvýšení výroby, lebo toto môže zvýšiť riziko kontaminácie *L. monocytogenes*.

6 ROZTOKY NA ZVLHČENIE STIERACÍCH ODBEROVÝCH POMÔCOK

6. 1. JEDNODUCHÉ ROZTOKY

²) Potraviny a zložky sa musia analyzovať podľa plánu HACCP

³) Akceptovateľný počet pozitívnych vzoriek môže byť nula, ak boli potraviny vstupujúce do spracovateľského priestoru ošetrované na zníženie ich mikrobiálnej záťaže.

Na navlhčenie paličkových (*tampónových*) sterov alebo iných stieracích pomôcok používaných v ľahko dosiahnuteľných miestach, kde sa odoberajú stery počas alebo na konci spracovania, možno použiť jednoduché roztoky, ktoré neobsahujú žiadny neutralizátor.

Odporúčané roztoky sú: peptónový roztok s 1g/l, peptón so soľou alebo štvrtinový Ringerov roztok rozdelený do skúmaviek alebo fľašiek a sterilizovaný pri 121°C / 15 minút.

Fosfátové pufované roztoky sa neodporúča používať na bunky stresované hostiteľskými podmienkami v potravinárskych spracovateľských priestoroch (soľ, kyseliny, čistiace a dezinfekčné prípravky atď.), pretože môžu mať škodlivý účinok na ich kultivovateľnosť /12/.

Obdobne sa odporúča nepoužívať neutralizačný roztok, ak sa neočakáva žiadny reziduálny dezinfikant. Neutralizátor používaný na tlmenie reziduálneho dezinfikantu môže mať mierny škodlivý dopad na bakteriálne bunky a je možné, že tento dopad môže byť väčší, ak sú bunky stresované. Skutočne, ukázalo sa, že neutralizátory znižujú počet izolácií salmonel z terénnych vzoriek /13/.

Kultivačné médiá Fraser bujón alebo polovičný Fraser bujón sa nemajú používať ako dilutent, lebo môžu podporovať rast *L. monocytogenes* v spracovateľskom prostredí.

6.2. NEUTRALIZUJÚCE ROZTOKY

V každom prostredí, kde sa očakávajú rezíduá dezinfekčných prostriedkov, alebo sa odoberajú vzorky bezprostredne po dezinfekcii, treba používať neutralizačné roztoky na zvlhčenie paličkových (*tampónových*) sterov alebo na iné stieracie pomôcky.

Ak sú používané chlórové alebo chlór uvoľňujúce zložky, ako neutralizér treba zvoliť tiosíran sodný. Pre iné aktívne látky je dostupných veľa neutralizátorov (pozri EN 1276/14/, EN 1650/15/, EN 13697/16/ a EN 13704 /17/), avšak doteraz žiaden z nich nie je vhodný pre všetky dezinfekčné prostriedky („univerzálny“) /18/. Neutralizačný roztok, ktorý možno použiť vo väčšine situácií, je opísaný v Tabuľke 1. Treba ho rozdeliť do skúmaviek alebo fľaštičiek a sterilizovať pri 121°C / 15 min.

Tab. 1.: neutralizačný roztok, ktorý možno použiť vo väčšine situácií (adaptované podľa ISO 18593 /6/)

Komponent	Konc.
Sorbitan monooleát (Polysorbát 80)	30 g/l
Lecitín	3 g/l
Tiosíran sodný	5 g/l
L-histidín	1 g/l
Saponín	30 g/l
Peptón	1 g/l
Chlorid sodný	8,5 g/l

7 KULTIVAČNÉ MÉDIÁ

Pozri EN ISO 11290-1 Štandard pre kultivačné médiá.

8 PRÍSTROJE A SKLO

Pre všeobecné požiadavky pozri EN ISO 7218.

Pre požiadavky špecifické pre *L. monocytogenes* pozri EN ISO 11290-1 v platnom znení.

Bežné mikrobiologické laboratórne vybavenie a najmä nasledujúce.

8.1. Stieracie odberové pomôcky

Paličkové (tampónové) stery, sterilizované paličky obalené vatovým alebo syntetickým materiálom individuálne zabalené do sterilizovanej skúmavky. Použitý materiál musí byť dokumentovane bez inhibičných látok.

POZNÁMKA: pri niektorých druhoch povrchov môže vata kontaminovať vnútorné časti týchto povrchov po odbere vzoriek.

Hubkové, tkané alebo netkané utierky alebo gázové štvorce, sterilizované a individuálne balené v sterilných plastových vreckách. Použitý materiál musí byť dokumentovaný ako bez inhibičných látok.

8.2. Jednorazové sterilné rukavice (dobrovoľné)

8.3. Chladiaci box s chladiacimi vreckami, izolovaný, schopný uchovávať vzorky pri teplote medzi 1 a 8 °C počas prepravy do laboratória (pozri EN ISO 7218)

8.4. Sterilizovaný absorpčný papier, schopný absorbovať stojatú vodu (napr. mláky vody na podlahe)

8.5. Mixér na mixovanie tekutín v skúmavkách

8.6. Peristaltický homogenizátor, na prípravu iniciálnej suspenzie peristaltickým pohybom.

9 PLOCHA ODBERU VZORIEK

Celková plocha, z ktorej sa odoberajú vzorky, má byť taká veľká, ako je to možné, aby sa zvýšila pravdepodobnosť dôkazu *L. monocytogenes*. S ohľadom na to sa odporúča odoberať vzorky z plochy medzi 1000 cm² až 3000 cm² (tzn. od 0,1 m² do 0,3 m²), kde je to možné, tzn. tam, kde sú miesta otvorené a ploché (prepravné pásy, police atď.)

Paličkové /tampónové/ stery sa majú používať na odber vzoriek z ťažko dostupných malých miest (napr. vnútri dutých rúrok, spod krytov strojov atď.)

Hubkové stery, tkané alebo netkané utierky alebo gázové štvorce/vankúšiky treba používať na odber vzoriek z veľkých plôch. Na rozdiel od paličkových sterov s nimi možno stierať povrchy ráznejšie a sú vysoko absorpčné. Neodporúča sa používať šablóny alebo pravítka, lebo môžu prenášať kontamináciu a /alebo ich dezinfekcia môže interferovať s testom. Avšak približne

treba poznať vzorkovanú plochu. Na tento účel si prevádzkovateľ môže pamätať, že dĺžka predlaktia od prostredníka po lakeť je okolo 45 cm. Podobne, keď sa rozťahnu prsty, vzdialenosť medzi špičkou palca a malíčka (rozpätie) je asi 20 cm.

Veľkosť plochy odberu vzoriek by mala byť zhodná, aby sa dali monitorovať trendy v čase.

10 PRÍPRAVA POMÔCOK NA ODBER VZORIEK

Kvôli riziku kontaminácie sa do výrobných priestorov nesmie priniesť žiadne vybavenie, ktoré bolo vo vnútri v mikrobiologickom laboratóriu.

Vybavenie na odber vzoriek z povrchov a ochranné odevy treba skladovať a manipulovať s nimi oddelene od laboratórných činností, najmä laboratórných priestorov zaoberajúcich sa analýzami patogénov.

Prevádzkovatelia sa musia presvedčiť, že žiaden predmet používaný na odber vzoriek nezostal vo výrobných priestoroch. Na tento účel sa odporúča spočítanie týchto predmetov pred a po odbere vzoriek.

10.1. PALIČKOVÉ/TAMPÓNOVÉ/ STERY

Paličkové stery možno použiť suché alebo zvlhčené. V prípade, ak je oblasť na odber vzorky vlhká, treba použiť suchý ster, a ak je suchá, treba použiť navlhčený ster. V prípade, ak sa odber vzoriek vykonáva na suchom alebo vlhkom mieste, kde sa očakávajú rezíduá dezinfekčných látok (čo je časté v ťažko dosiahnuteľných miestach), ster treba navlhčiť neutralizačným roztokom (6.2.).

Vlhčené stery možno pred odberom vzoriek asepticky pripraviť vopred v laboratóriu. Koniec steru sa má ľahko dotýkať povrchu dilutentu (6.1. alebo 6.2.) tak, aby zo steru nekvapkalo /8/. Potom sa ster vráti do skúmavky, ktorá sa pevne uzavrie, aby sa zachovala sterilita aj vlhkosť.

10.2. HUBKOVÉ, TKANÉ ALEBO NETKANÉ UTIERKOVÉ STERY ALEBO GÁZOVÉ VANKÚŠIKY

Pred začatím odberu vzoriek možno zvlhčené sterové vybavenie pripraviť v laboratóriu pomocou vhodného a zaznamenaného objemu sterilizovaného dilutentu (6.1. alebo 6.2.) tak, aby zo steru nekvapkalo /8/. Po navlhčení sa sterové vybavenie uzavrie do plastového vrečka tak, aby sa zabezpečila sterilita a uchovala vlhkosť.

Ak sa zvlhčovanie vybavenia vykonáva v spracovateľskom mieste, dilutent sa nesmie uchovávať v sklenenej fľaši.

11 ODBER VZORIEK

11. 1 METÓDA ODBERU PALIČKOVÝM STEROM

Vyberte ster zo skúmavky a stierajte ním tak rázne, ako je to možné bez toho, aby sa rozpadol (rozmotal) a rotujte sterom vo vnútri kusa zariadenia alebo cez iné ťažko dosiahnuteľné miesto, kde treba odobrať vzorky.

Vložte ster do originálnej skúmavky; uzavrite ju, aby bol ster chránený pred kontamináciou a aby jeho koniec zostal až do analýzy stále vlhký.

Po odbere vzoriek treba vzorkovaný povrch utrieť utierkou namočenou v alkohole.

11.2. HUBKOVÁ/UTIERKOVÁ/GÁZOVÁ METÓDA

V prípade, ak je miesto, kde sa odoberajú vzorky príliš mokré (tzn. mláky vody na podlahe), prebytočná tekutina sa musí najprv odstrániť zľahka priloženým sterilizovaným absorpčným papierom.

Otvorte plastové vrečko obsahujúce stieraciu pomôcku. Vyberte rukou v sterilnej rukavici asepticky stieraciu pomôcku. Alternatívne možno stieraciu pomôcku uchopiť pomocou plastového vrečka s pretiahnutím obráteného vrečka cez ruku, ako je vidno na obrázku 1.

Stierajte rázne cikcakovitým pohybom celý zvolený povrch v dvoch na seba kolmých smeroch, meniac plochy stieracej pomôcky. Vráťte stieraciu pomôcku do plastového vrečka a uzavrite ho tak, aby bola chránená pred kontamináciou a zostala až do analýzy stále vlhká.

Obrázok 1: Stieracia pomôcka uchopená cez plastové vrečko



Po odbere vzoriek treba vzorkovaný povrch utrieť utierkou namočenou v alkohole.

12 PREPRAVA VZORIEK, UCHOVANIE A ZAČIATOK ANALÝZY

Prepravujte vzorky v chladiacom boxe (8.3.) pri teplote medzi 1 až 8°C.

Ak treba, skladujte vzorky v laboratóriu pri 3°C± 2°C . Vyšetrite vzorky čo najskôr, najlepšie najneskôr do 24 hod po prijíme do laboratória a v každom prípade najneskôr do 36 h od odberu vzoriek podľa EN ISO 7218 normy (klauzula 8.3, 3. odsek od konca a nasledujúci odsek o produktoch podliehajúcich skaze). Dĺžka času pred analýzou sa musí zaznamenať a zapísať v správe z analýzy.

13 ANALÝZA VZORIEK

13.1. METÓDA S PALIČKOVÝMI STERMI

Pridajte dostatočný objem, najmenej však 9 ml polovičného Fraser bujónu (pozri EN ISO 11290-1) do skúmavky so sterom tak, aby bol jeho koniec úplne ponorený do bujónu.

Dôkladne zmixujte obsah skúmaviek obsahujúcich stery s použitím mixéra (8.5) po dobu 30 s.

Potom vykonajte dôkaz *L. monocytogenes* podľa štandardnej metódy podľa EN ISO 11290-1 alebo validovanej alternatívnej metódy.

13.2 HUBKOVÁ/UTIERKOVÁ/GÁZOVÁ METÓDA

Pridajte 9- násobok polovičného Fraser bujónu (pozri EN ISO 11290-1) k hmotnosti navlhčenej stieracej pomôcky pripravenej podľa 10.2. do plastového vrečka so stieracou pomôckou, ktorá musí byť úplne presiaknutá bujónom.

Ošetríte obsah vreciek v peristaltickom homogenizátore (8.6.) po 1 min.

Potom vykonajte dôkaz *L. monocytogenes* podľa štandardnej metódy podľa EN ISO 11290-1 alebo validovanej alternatívnej metódy.

14 VYJADRENIE VÝSLEDKOV

Výsledky treba hlásiť ako: prítomnosť alebo neprítomnosť *L. monocytogenes* v danom mieste odberu vzorky. Vyznačte, ak je známy rozmer plochy odberu vzorky.

- [1] Carpentier B, Cerf O (2011). Review -- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145:1-8.
- [2] Anonymous (2005). Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:EN:PDF> accessed 5 July 2012:26pp.
- [3] Codex alimentarius commission (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61-2007. http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=10740 accessed 23 March 2012.
- [4] FDA (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm> accessed 31 January 2011.
- [5] Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food and Environmental Sanitation*, 19:551-62.
- [6] Anonymous (2004). ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
- [7] Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, 210:271-5.
- [8] NSW (2008). Food Authority for meat processors and retail meat licensees. *Listeria Management Program NSW/FA/FI034/0809*. http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/industry_pdf/listeria-management-program.pdf accessed 27 January 2011:40 pp.
- [9] Tompkin RB (2004). Environmental sampling: A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95:45-51.
- [10] Mc Namara AM (2007). Maîtrise des contaminations *Listeria* spp des surfaces: expérience aux USA dans le secteur des produits carnés. Colloque Sécurité et qualité des aliments Paris, France, 4 décembre <http://sillikeratcommunications.com/france/html/actualities/programme07.php>, accessed 6 April 2010.
- [11] Anonymous (2011). Sampling and Testing (Chapter 5) in *Meat Hygiene Manual of Procedures of the Canadian Food Inspection Agency*. <http://www.inspection.gc.ca/food/meat-and-poultry-products/meat-hygiene-manual-of-procedures/eng/1300125426052/1300125482318> accessed 10 February 2012.
- [12] Billaux F, Boubetra A, Denis C, Garry P, Jehanno D, Kobilinsky A. Recommendation for the revival of injured microbes with intent to detect and count them (unpublished results).
- [13] Davies RH, Wray C (1996). Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella* Enteritidis in the environment of poultry units. *Veterinary Microbiology*, 50:117-27.
- [14] Anonymous (1997). EN 1276: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension tests for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the food, industrial, domestic and institutional areas - Test methods and requirements (phase 2, step 1).

- [15] Anonymous (1997). EN 1650. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic, and industrial areas - Test method and requirements (phase 2 step 1).
- [16] Anonymous (2001). EN 13697. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2).
- [17] Anonymous (2002). EN 13704. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test and requirements (phase 2, step 1).
- [18] Espigares E, Bueno A, Fernández-Crehuet M, Espigares M (2003). Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 55:137-40.