

Spis treści

WSTĘP	4
WYBRANE DEFINICJE Z NORMY ORAZ EA-04/10	5
ZAKUP POŻYWEK	6
PRZECHOWYWANIE POŻYWEK	7
PRZYGOTOWYWANIE POŻYWEK W LABORATORIACH	8
JAKOŚĆ SKŁADNIKÓW	10
PRZYGOTOWANIE POŻYWEK DO UŻYCIA	13
Rozpuszczanie pożywek agarowych	13
Odpowietrzanie pożywek	13
Dodawanie suplementów	13
Przygotowanie pożywek stałych na płytkach Petriego	13
Przygotowanie płytek do posiewów	14
Inkubacja pożywek stałych na płytkach Petriego	14
ORGANIZMY TESTOWE DO KONTROLI POŻYWEK	16
Mikroorganizmy testowe	17
Szczepy macierzyste	21
Kultury robocze	21
Przygotowanie zasobów kultur w laboratorium	21
Przygotowanie zawiesiny do testów	22
Objętość inokulum	22
Poziom inokulum	22
KONTROLA JAKOŚCI	23
Kontaminacja	24
Ogólne wytyczne do testów mikrobiologicznych	24
Podłoża gotowe do użycia	24
PRZEDSTAWIANIE WYNIKÓW I INTERPRETACJA	25
Podłoża potwierdzające i odczynniki	26
METODY PRZEPROWADZANIA TESTÓW POŻYWEK	27
Metody ilościowe - podłoża stałe	31
Używanie wykresów kontrolnych	31
Metoda ilościowa dla podłoży stałych	35
TESTOWANIE POŻYWEK DO METOD FILTRACJI MEMBRANOWEJ	36
Metody jakościowe	37
METODY PRZEDSTAWIENIA WYNIKÓW I OCENY DLA PODŁÓŻ PŁYNNYCH	38
Badanie pożywek płynnych	38
Żyzność dla pożywek płynnych wzbogaconych	38

METODA JAKOŚCIOWA PROBÓWEK SELEKTYWNYCH PŁYNNYCH.....	43
Obliczanie i interpretacja wyników.....	43
METODA JAKOŚCIOWA (MĘTNOŚĆ) DLA PODŁÓŻ PŁYNNYCH.....	44
Pożywki do przednamnażania	44
Podłoże potwierdzające.....	44
METODY KONTROLI ROZCIENICZALNIKÓW I PODŁÓŻ TRANSPORTUJĄCYCH.....	45
Metody kontroli podłoży transportujących	45
Metody ilościowe - procedura.....	45
Odczyt i interpretacja wyników	45
Metoda jakościowa - procedura.....	46
Odczyt i interpretacja wyników	46
DOKUMENTOWANIE WYNIKÓW	47
Identyfikowalność	47
Zmiany do normy PN-EN ISO 11133:2014-07 z listopada 2014 roku	48
Załącznik E - żywność.....	48
Załącznik F - woda.....	49
LITERATURA.....	50
Załącznik 1	

Opracowanie w całości ani we fragmentach nie może być powielane ani rozpowszechniane za pomocą urządzeń elektronicznych, mechanicznych, kopiujących, nagrywających i innych, w tym również nie może być umieszczane ani rozpowszechniane w postaci cyfrowej, zarówno w Internecie, jak i w sieciach lokalnych, bez pisemnej zgody autorów.

Norma w zał. D podaje przykład karty kontroli podłoża w oparciu o sposób przygotowania, cechy fizyczne i mikrobiologiczne.

Nazwa podłoża:	Przygotowana objętość:	Data rozlania:	Wewnętrzny nr serii/partii:	
Pożywka sucha (nazwa, nr):	Dostawca:	Partia/Lot:	Ilość:	Data i podpis:
Suplement:	Dostawca:	Partia/Lot:	Ilość:	Data i podpis:
Szczegóły procesu:				
Kontrola fizyczna				
Oczekiwany wygląd pożywki suchej	Normalny kolor, brak zbryleń	Tak Nie	defekty:	Data i podpis:
Oczekiwane pH	Wartość zmierzona:	Dobra Zła	defekty:	Data i podpis:
Oczekiwana ilość (napełnianie) /grubość warstwy	obserwacja:	Dobra Zła	defekty:	Data i podpis:
Oczekiwany kolor	obserwacja:	Dobry Zły	defekty:	Data i podpis:
Oczekiwana klarowność / obecność wizualnych zanieczyszczeń	obserwacja:	Dobra Zła	defekty:	Data i podpis:
Oczekiwana stabilność żelu/konsystencja/wilgotność	obserwacja:	Dobra Zła	defekty:	Data i podpis:
Zakażenie mikrobiologiczne				
Liczba testowanych płytek/probówek: Inkubacja:	Wynik:	Dobra Zła	Liczba zakażonych płytek/probówek:	Data i podpis:
Wzrost mikrobiologiczny - żywność		Metoda kontroli: jakościowa ilościowa		
Szczep: Inkubacja: Podłoże referencyjne:	Kryteria:	Wynik:	Dobra Zła	Data i podpis:
Wzrost mikrobiologiczny - selektywność		Metoda kontroli: jakościowa ilościowa		
Szczep: Inkubacja: Podłoże referencyjne:	Kryteria:	Wynik:	Dobra Zła	Data i podpis:
Wzrost mikrobiologiczny - specyficzność		Metoda kontroli: jakościowa ilościowa		
Szczep: Inkubacja: Podłoże referencyjne:	Kryteria:	Wynik:	Dobra Zła	Data i podpis:
Zwolnienie pożywki partii/serii				
Warunki przechowywania:	Zwolnienie partii/serii	TAK	NIE	Data i podpis:

Roztwory do regulacji pH - najczęściej stosowane	
NaOH 40 g/L	[C (NaOH = 1 mol/L)]
HCl 35,5 g/L	[C (HCl ~ 1 mol/L)]

Zgodnie z ISO 7218 i ISO 8199:

Do autoklawowania należy nalać do butelek tyle pożywki, żeby pozostawić wolną przestrzeń. Norma zwraca uwagę, iż można nie zostawiać tej wolnej przestrzeni, jeśli podczas chłodzenia w autoklawie zachowane jest ciśnienie.

Sterylizacja powinna odbywać się w dniu przygotowania pożywki. Można zastosować 2 techniki:

a) Sterylizacja mokra

W autoklawie – tu może nastąpić przegrzanie pożywki, jeśli w autoklawie jest więcej niż 1000 ml. Należy dobrze dobrać parametry pracy autoklawu.

Do sterylizacji parą wodną serwisanci autoklawów zalecają stosowanie rękawów do sterylizacji zamiast owijania w folię aluminiową, która jest dla pary wodnej nieprzepuszczalna.

b) Filtracja

Z wykorzystaniem próżni lub podciśnienia, średnica porów filtra to 0,2 µm. Należy dobrze dobrać rodzaj filtrów.

Suplementy należy przygotowywać z zachowaniem środków bezpieczeństwa oraz instrukcji producenta, ponieważ mogą wywoływać reakcje alergenne!

Warunki ogólne:	
Należy zachować identyfikowalność pożywki na wszystkich etapach postępowania/użycia.	
Wszystkie pożywki przed użyciem należy doprowadzić do temperatury pokojowej.	
Pożywki gotowe	Pożywki przygotowywane w laboratorium
Przechowywanie i termin ważności zgodnie z instrukcją producenta	• Zabezpieczyć przed utratą wilgoci
	• Zabezpieczyć przed światłem
	• Zapewnić temp. 5 ± 3°C (lodówka)
	Termin ważności pożywek
	pożywki na płytkach w lodówce można przechowywać od 2 do 4 tygodni
	pożywki w butelkach i probówkach można przechowywać od 3 do 6 miesięcy
Warunki inne:	
- jeśli laboratorium stwierdziło inaczej	
- jeśli inaczej nakazuje norma ISO 8199	

Ocena terminu ważności powinna opierać się na ocenie cech: fizycznych, chemicznych i mikrobiologicznych, czyli: zmianie koloru, wysychaniu, zmianie pH, specyficzności, selektywności – wszystkie te cechy muszą być spełnione.

Przygotowanie płytek do posiewów

Podsuszanie

Ważne jest aby podsuszać płytki chwilę, żeby usunąć kropelki na powierzchni. Czas suszenia należy dobrać w zależności od stopnia zawilgocenia pożywki, jednak należy go w miarę możliwości ograniczyć do minimum.

Jeśli laboratorium będzie badać bakterie, które hodoją się w długim okresie czasu np. bakterie z rodzaju *Legionella* (a pożywka po wcześniejszym wyjęciu wygląda na suchą), podsuszanie można pominąć, aby nie przesuszyć pożywki.

UWAGA: zbytne podsuszenie może prowadzić do wzrostu właściwości hamujących w pożywkach selektywnych i zmniejszać aktywność wody (a_w) na powierzchni płytki.

Podsuszanie	Podczas suszenia należy zabezpieczyć płytki przed kontaminacją, dlatego należy suszyć je w komorze laminarnej, albo skierowane pożywką ku dołowi	
Gdzie?	Komora laminarna	Cieplarka
Jak?	Otwarte w laminarnym przepływie powietrza	Odwrócone agarem ku dołowi, oparte na wpół otwartych wieczkach
W jakiej temperaturze?	Temperatura pokojowa	Temp.: od 25°C do 50°C
Przez jaki czas?	Od 30 minut do 60 minut lub przez całą noc z zamkniętymi wieczkami	Tak długo, aby nie było kropli na wieczku

Inkubacja pożywek stałych na płytkach Petriego

Na rynku dostępnych jest wiele rodzajów inkubatorów i cieplarek z dodatkowymi drzwiczkami szklanymi, wyposażonymi w wiatraki do równomiernego ogrzewania powietrza wewnątrz komory. Zadaniem laboratorium jest tak dobrać wyposażenie, aby zabezpieczyć pożywki przed przesuszeniem w cieplarce poprzez umieszczenie np.:

- maksymalnie 6 płytek w sztaplu, umieszczonych w worku otwartym od góry (zabezpiecza to z kolei przed nadmierną kondensacją),
- ustawienie na dnie cieplarki butelki z wodą (należy często ją zmieniać, żeby zabezpieczyć przed pleśnią).

Inkubatory przed użyciem w laboratorium powinny zostać sprawdzone na równomierne rozprowadzanie ciepła i utrzymanie temperatury w wymaganym zakresie w różnych częściach komory (rozkład temperatur). Jeśli cieplarka uległa poważnemu uszkodzeniu i była naprawiana czynność tę należy powtórzyć.

Czas inkubacji	
Dla organizmów typowych (target)	Najkrótszy czas z normy ISO
Dla selektywności	Najdłuższy czas z normy ISO

KONTROLA JAKOŚCI

Podrozdziały określają wymagania dla pożywek w zależności od wielkości Batcha. W warunkach normalnych próbki mogą zawierać mikroorganizmy zestresowane. Należy dobrać odpowiednie podłoża i wziąć pod uwagę zdolności regeneracji.

Kontrola jakości podłóż zależy od:	Składników podstawowych
	Właściwego składu
	Jakości przygotowania
	Eliminacji zakażenia
	Odpowiedniego pakowania i przechowywania

Ważną informacją podaną w normie jest zezwolenie, że jeśli nie można wykonać kontroli jakości pożywki przed użyciem, można zrobić to równoległe z badaniem. Suplementy i dodatki odżywcze też powinny przechodzić proces kontroli.

Cechy fizyczne i chemiczne	Ocena wizualna
	Objętość/grubość warstwy
	Wygląd, kolor, jednorodność
	Konsystencja żelowa
	Wilgotność
Dodatkowo oceniana wartości pH	

Cechy mikrobiologiczne	Wielkość partii oceniana powinna zależeć od wielkości partii otrzymanej
	Kontrola podłóż referencyjnych (zazwyczaj TSA):
	Muszą być wysokiej jakości
	Najlepiej użyć materiału odniesienia (RM) o znanej liczbie drobnoustrojów
	Należy zastosować określony proces produkcji-przygotowania podłoża, włącznie z rozpuszczaniem
	Tego podłóż tego samego producenta/źródła dostarczania pożywki/składników
	Należy użyć większego zakresu mikroorganizmów dla ostatecznego zatwierdzenia pożywki aby pokryć zakres organizmów szukanych
	Wybór podłoża referencyjnego odpowiedniego do celów
Odpowiednie procedury postępowania dla zapewnienia jakości, kiedy podłoża będą używane jako podłoża referencyjne	
Nie ma konieczności brania pod uwagę tych aspektów dla oszacowania tego, czy podłoże zostało właściwie dobrane	
Laboratorium powinno uzasadnić procedurę wyboru	

Zestawić też \bar{X} obecnego wykresu ze średnią poprzednich obserwacji \bar{X}_{tot} .

2.

$$|\bar{X} - \bar{X}_{tot}| < 2 \sqrt{\frac{S^2}{n} + \frac{S_{tot}^2}{n_{tot}}}$$

Jeśli to założenie nie zgadza się z wynikami należy dojść jaka jest tego przyczyna.

Należy rozpocząć nowy wykres.

Obecny wykres	Parametr	Wszystkie poprzednie wykresy
\bar{X}	Liczba obserwacji	\bar{X}_{tot}
S	Odchylenie standardowe	S_{tot}
n	Wartość średnia	n_{tot}

3. Wartości średnie do ustalenia nowych limitów kontroli pożywek wyliczane są arytmetycznie.

Dla przeprowadzenia oceny 3 wykresów zawierających wyniki z 30 obserwacji każdy, norma odwołała się do NEN 6603.

Na podstawie wartości uzyskanych z kontroli pożywek zostały wyliczone dla każdego wykresu:

Parametr	Wykres 1	Wykres 2	Wykres 3
\bar{X}	84,4	81,6	81,1
S	11,1	12,3	12,1
S^2	122,7	150,8	147,5

Oraz dwóch pierwszych

Parametr	Z wykresu 1 i 2
X_{tot}	83,0
S_{tot}	11,7
S_{tot}^2	136,1

Ad. 1

Korzystając ze wzoru uzyskano wartość $\frac{S^2}{S_{tot}^2} = \frac{147,5}{136,1} = 1,084$

Dla $F(0,975; 29,58) = 1,83$

Uzyskana wartość nie przekracza wartości krytycznej w tym przypadku, a więc test nie wykazał znaczącej różnicy pomiędzy wariancjami wykresu 3 i dwóch pozostałych.

Ad. 2

Wartość bezwzględna dla danych z tabel wynosi 1,9, a wyliczenia wariancji z uwzględnieniem ilości obserwacji wynoszą 5,4.

Ad. 3

W związku z tym, iż nie zauważono znaczących zmian pomiędzy wartością średnią i odchyleniem standardowym wykresu 3 i dwóch poprzednich za pomocą średniej arytmetycznej wyznaczono nową wartość średnią $(84,4+81,6+81,1)/3 = 82,4$

oraz odchylenie standardowe $s = \sqrt{\frac{122,7 + 150,8 + 147,5}{3}} = 11,84$.

Ponieważ $1,9 < 5,4$ dlatego nie stwierdza się statystycznej różnicy wartości średnich z ostatniego wykresu w porównaniu do dwóch poprzednich.