

# 1. Odběr a příprava vzorků k mikrobiologickému vyšetření

Každé vyšetření, fyzikální, chemické či mikrobiologické, začíná odběrem vzorků. Na odběr vzorků bezprostředně navazuje jeho přeprava, uchovávání a zpracování v laboratoři. Vždy je třeba mít na paměti, že způsob odběru a přípravy vzorků může významně ovlivnit výsledky provedeného vyšetření.

## 1.1. Odběr vzorků

*Vzorek* představuje jednotku výrobku, suroviny nebo jiného zkoušeného materiálu. Může jím být originální spotřebitelské balení, určitý počet kusů u kusových výrobků nebo určitá hmotnost (objem) u nekusových výrobků a surovin. Pro mikrobiologické vyšetření se nejčastěji odebírají vzorky výchozích surovin, pomocných látek, fázové vzorky v průběhu výroby, dále stěry z provozní zařízení, hotové výrobky či skladované potraviny.

Za *vzorkovanou jednotku* se považuje:

- 1 velkoobchodní originální balení (karton, bedna, balík, pytel, paleta atd.),
- 1 upravený celek, jde-li o kusové produkty,
- celá zásilka, jde-li o sypané či jiné volně ložené produkty (odebírání se 5 vzorků z různých částí zásilky),
- 1 nádrž, tank, konev či jiná nádoba, jde-li o produkty tekuté.

### 1.1.1. Obecné zásady

Odběr vzorků provádí tzv. oprávněná osoba, která je seznámena se zásadami správného vzorkování a nese zodpovědnost za správnost provedení odběru.

Před vlastním odběrem se zkoušené výrobky rozdělí podle senzorických vlastností (vzhledu a vůně) do následujících skupin:

- **1. skupina** – výrobky, u kterých nejsou navenek patrné změny způsobené mikroorganismy,
- **2. skupina** – výrobky, které jsou podle vzhledu podezřelé, že v nich nastaly změny v důsledku nežádoucí mikrobiální činnosti, příp. chemickými či biochemickými pochody,
- **3. skupina** – výrobky, které jsou zjevně zkažené v důsledku činnosti mikroorganismů (např. oslznutí, hnití, plesnivění, kysání). Tato skupina vzorků se běžně pro kontrolní účely mikrobiologicky nevyšetřuje.

U každé skupiny vzorků se provede odběr vzorků odděleně, a to takovým způsobem, aby nemohlo dojít ke kontaminaci a nežádoucím změnám v mikrobiálním složení.

Pokud se současně odebírají vzorky k mikrobiologickému i chemickému vyšetření, odebírají se zásadně nejprve vzorky k vyšetření mikrobiologickému. Jestliže se odebírá pouze jeden vzorek pro mikrobiologické i chemické vyšetření, přepravuje se do laboratoře za podmínek stanovených pro mikrobiologické vyšetření. V laboratoři se v tomto případě provádí nejdříve mikrobiologické vyšetření, pak smyslové a nakonec chemické.

Pokud není odebíráno celé spotřebitelské balení, musí být ke vzorkování použito výhradně sterilní náčiní z korozi-vzdorné oceli (sondy, nebozezy, naběračky, lžíce, nože, pinzety, atd.) či skla (pipety), které se předem balí do hliníkové fólie a sterilizují v horkovzdušném

sterilizátoru či autoklávu. Kovové nástroje lze při odběru průběžně sterilizovat 70% etanolem a opálením v plameni. Vzorky se odebírají do sterilních, dostatečně velkých vzorkovnic se zabroušenou zátkou, sterilních fólií, polyetylenových sáčků nebo sterilního nepropustného papíru.

Odebrané vzorky musí být řádně označeny pořadovým číslem, kódem kontrolované dodávky či číslem odběrového protokolu tak, aby nemohlo dojít k jejich záměně. V některých případech se vzorek opatří pečetí nebo plombou a označí razítkem organizace, která za výrobky odpovídá. Majitel zboží smí žádat o odběr souběžného vzorku, a to ve stejném počtu a složení jako vzorky odebírané kontrolním orgánem. O odběru musí být vyhotoven protokol o odběru vzorků, v němž jsou uvedeny údaje o době a místu odběru vzorků, jejich druhu a množství, způsobu vzorkování, smyslovém posouzení, konzervaci, atd. Protokol musí být opatřen podpisem osoby provádějící odběr i zástupcem majitele vzorků. Současně se vyplní žádanka o laboratorní vyšetření, ve které je nutno specifikovat, jaká konkrétní vyšetření mají být u vzorku provedena (viz. obr. 2).

### 1.1.2. Množství odebraného vzorku

Odebraný počet vzorků musí vystihovat celou vyšetřovanou partii tak, aby bylo možno posoudit povahu, stupeň a rozsah mikrobiálního znečištění. Při odběru vzorků pro mikrobiologické vyšetření se neodebírají vzorky průměrné (tj. směsné).

Při úřední kontrole – tj. hodnocení, zda daná šarže (dávka) odpovídá stanoveným mikrobiologickým požadavkům, se odebírá zpravidla 5 vzorků. U vybraných skupin výrobků může být tento počet ještě vyšší (upravuje platná evropská legislativa týkající se mikrobiologických kritérií pro potraviny).

**Hmotnost odebraného vzorku** musí být dostatečná pro provedení všech předepsaných vyšetření (viz. tab. 1). Odebíráme-li vzorek výrobku ve spotřebitelském balení, potom:

- odebereme 1 spotřebitelské balení, pokud jeho hmotnost (objem) dosahuje požadované hmotnosti;
- pokud hmotnost (objem) spotřebitelského balení výrazně převyšuje potřebné množství, stačí odebrat jako vzorek poměrnou část spotřebitelského balení, nesmí tím však být ohroženo dosažení účelu vyšetření;
- pokud hmotnost (objem) spotřebitelského balení je nižší než požadované množství, odebereme potřebný počet spotřebitelských balení.

Tabulka 1: *Potřebná množství vzorků pro mikrobiologické vyšetření.*

Druh vzorku	Množství	Druh vzorku	Množství
tekuté	300 ml	koncentráty	150 g
kašovitě	250 g	vejce	3 ks
pevné	300 g	drůbež	1 ks
sušené	150 g	pitná voda	500 ml

### 1.1.3. Způsoby odběru vzorků

Vzorky v originálním spotřebitelském balení se u všech druhů vzorků odebírají vcelku. V ostatních případech se způsob vzorkování liší podle povahy odebíraného materiálu, počtu odebíraných vzorků a charakteru zařízení, ze kterého se odběr provádí. **Při odběru vzorků do sterilních vzorkovnic je nutno její hrdlo předem opálit plamenem.**

### 1.1.3.1. Kusové materiály

Drobné kusové výrobky se odebírají po několika kusech z různých míst a hloubek (včetně míst styku s obalem) pomocí sterilní lžice, naběračky, pinzety, atd. Ukládají se do sterilní vzorkovnice nebo se balí do sterilní fólie.

Středně velké a velké kusové výrobky se vzorkují jedním z následujících způsobů:

- výkrojem** – pomocí sterilního nože či pilky se z kusů bochníkového tvaru odebírá výkroj klínovitého tvaru, u kusů čtvercového půdorysu se vedou řezy kolmo na hrany, u výrobků podlouhlého tvaru se vede řez kolmo na podélnou osu. Odebrané vzorky se zabalí do sterilní fólie.
- z vnitřních řezných ploch** – výrobek se sterilně rozkrojí nožem na několik částí a z různých řezných ploch se odeberou v potřebném úhrnném množství dílčí vzorky a přenesou se do sterilní vzorkovnice;
- vzorkovačem** – po odkrojení povrchové vrstvy (0,5 – 1 cm) se z několika míst odebere vývrt sterilním vzorkovačem (nebozezem, sondou) a vytlačí do sterilní vzorkovnice. Výrobky se navrtávají na různých místech do poloviny jejich výšky nebo z jednoho místa různými směry. U tvrdých sýrů se povrch otře etanolem, odebere se vývrt a z něj se odkrojí povrchová vrstva, která se použije k uzavření vzniklého otvoru.

### 1.1.3.2. Tekuté a kašovitě materiály

Při odběru jednoho vzorku se obsah v nádobě důkladně promíchá a sterilní pipetou nebo sterilní kovovou naběračkou se odpovídající množství přenesou do sterilní vzorkovnice.

Při odběru většího počtu vzorků z velké nádoby nebo nádrže obsah nepromícháváme a vzorky odebereme z různých míst a hloubek nádrže (nejméně ze tří vrstev). Podle účelu vyšetření se vzorky přenesou buď do jedné, nebo do samostatných vzorkovnic.

Dalším způsobem je odběr pomocí vypouštěcího ventilu. Ventil nejprve dezinfikujeme 70% etanolem a opálíme plamenem, poté odpustíme 10 – 100 ml tekutiny a následně napustíme potřebné množství vzorku do sterilní vzorkovnice.

### 1.1.3.3. Sypké materiály

Dovoluje-li to balení výrobku, obsah nejdříve promícháme sterilním míchadlem nebo naběračkou a sterilní lžicí či naběračkou odebereme z různých míst potřebné množství vzorku, který přeneseme do sterilní vzorkovnice.

Vzorky z velkých balení nebo nebalené (volně ložené) se odebírají z různých míst a hloubek speciálním vzorkovačem. Mimo to se odebírá i vzorek z povrchových vrstev či vrstev, které se přímo dotýkají obalu výrobku.



Obr. 1: Vzorkovač na pevné a pastovité materiály.

### 1.1.3.4. Materiály smíšené konzistence

Odebírají se všechny složky výrobku, a to v poměru, v jakém jsou ve výrobku zastoupeny. Podle povahy vyšetření se umísťují do jedné nebo do více samostatných sterilních vzorkovnic.

## 1.2. Přeprava, příjem a uchovávání vzorků

Při přepravě a uchovávání vzorků musí být vytvořeny takové podmínky, aby nemohlo dojít k jejich záměně, poškození a znečištění obalů a nežádoucímu působení atmosférických vlivů. Dále je třeba zajistit, aby nenastaly změny v mikrobiálním složení vzorků, tj. aby se mikroorganismy ve vzorku nerozmnožovaly, neodumíraly, aby si podržely životaschopnost a původní početní a druhové zastoupení. Toho lze docílit šetrným omezením nebo zastavením metabolismu mikroorganismů, a to snížením teploty pod růstové minimum nebo ve specifických případech některými chemickými látkami (např. konzervační činidla používaná pro vzorky syrového kravského mléka určeného k vyšetření v centrálních laboratořích).

### 1.2.1. Přeprava vzorků

Zvláštní pozornost musí být věnována zachování doporučených teplot úchovy v průběhu přepravy jednotlivých druhů vzorků:

- stabilní výrobky – okolní teplota
- čerstvé a chlazené výrobky – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- zmrazené a hlubokozmrazené výrobky – teploty pod -18 °C
- pasterované a podobné výrobky – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- zkažené jednotky stabilních výrobků – rozmezí teplot 0 – 4 °C
- rychle se kazící potraviny (např. vnitřnosti, čerstvé ryby) – musí být při přepravě uchovávány při teplotě v rozmezí 0 – 2 °C.

K přepravě vzorků se používají různé izotermické obaly s chladícími vložkami nebo s pevným CO<sub>2</sub> (suchý led), dále přenosné chladničky, mrazicí boxy, atd. Transportní teplota musí být dodržena po celou dobu přepravy do laboratoře. Vzorky konzerv se přepravují v podmínkách, které vylučují zmrznutí obsahu nebo porušení hermetičnosti obalu. Zkažené jednotky stabilních výrobků musí být přepravovány v ochranných uzavřených obalech. Doba transportu vzorků by neměla přesáhnout 6 hodin.

### 1.2.2. Příjem a uchovávání vzorků v laboratoři

Při příjmu vzorků v laboratoři se posoudí jejich stav, zkontroluje se, zda souhlasí údaje uvedené v průvodní dokumentaci a provede se záznam o příjmu vzorků do laboratorního deníku. Je-li stav vzorků neuspokojivý, nebo je-li jejich nedostatečné množství, musí laboratoř takové vzorky odmítnout. Obecně musí být o vzorcích přijatých do laboratoře vedena dokumentace tak, aby byl monitorován jejich postup od okamžiku přijetí až do doby zpracování protokolu o výsledku zkoušení.

Zápis do laboratorního deníku musí obsahovat zejména: pořadové číslo záznamu, datum a hodinu příjmu vzorků, druh a množství vzorků, jejich charakteristiku, údaje o vzorkování (datum, způsob vzorkování, konzervace atd.), jméno a adresu majitele vzorků, datum a hodinu zahájení rozboru, způsob přípravy vzorků k rozboru, hmotnost navážek a stupeň ředění, zjištěné mikrobiologické ukazatele, jméno osoby, která vyšetření provedla a případně další nezbytné údaje.

Zpracování vzorků v laboratoři by mělo být zahájeno co nejdříve po příjmu vzorků. Po celou dobu před započatím zkoušení musí být vzorky uchovávány v podmínkách, které brání jakékoli změně v počtu a složení mikroorganismů přítomných ve vzorcích.

Pro jednotlivé druhy vzorků jsou přípustné následující teploty a doby úchovy:

- **stabilní výrobky** – zpracovat co možná nejdříve a před datem ukončení trvanlivosti, uchovávat je lze při okolní teplotě na suchém a chladném místě;
- **čerstvé a chlazené výrobky** – zpracovat nejpozději do 24 hodin po příjmu, uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C; je-li nutné dobu úchovy prodloužit, vzorky se co nejrychleji zamrazí na teplotu -18 °C a tato skutečnost se uvede do protokolu o výsledku zkoušení;
- **pasterované a podobné výrobky** – zpracovat co možná nejdříve a před ukončením trvanlivosti, uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C;
- **zkažené jednotky stabilních výrobků** – zpracovat co možná nejdříve (nejpozději do 48 hodin), uchovávat v rozmezí teplot 0 – 4 °C. Vyšetření zkažených výrobků se provádí pouze ve zvláštních případech, nikoli v rámci běžné kontroly.

### 1.3. Zpracování vzorků v laboratoři

Laboratorní zpracování vzorků se skládá z řady na sebe navazujících pracovních kroků, začínajících otevřením obalů vzorků, navážením (odměřením) množství potřebného k vyšetření, homogenizací vzorku, jeho naředěním, očkovaním do živných půd a kultivací. Při stanovení termorezistentních mikroorganismů je součástí zpracování také tepelná inaktivace vzorku. Obecně platí, že doba mezi ukončením přípravy výchozí suspenze a okamžikem, kdy dojde ke kontaktu inokula s živnou půdou nesmí přesáhnout 45 minut.

Aby nedošlo ke kontaminaci okolí a zkušebního vzorku je vhodné pracovat ve zvláštních provozních místnostech nebo v bezpečnostních boxech. Jako první v pořadí se zkouší výrobky obsahující velmi málo mikroorganismů (např. pasterované výrobky) a teprve po nich výrobky s kontaminací vyšší.

#### 1.3.1. Otevírání obalů vzorků

Obal, v němž je výrobek uložen, se musí otevřít tak, aby bylo možno odebrat navážku odpovídající průměrným hodnotám celého vzorku a současně aby nemohlo dojít ke kontaminaci vzorku. Není-li možno pracovat v bezpečnostním boxu, provádějí se všechny pracovní operace v blízkosti plamene.

Před vlastním otevřením se hermeticky uzavřené obaly omyjí detergentem, opláchnou čistou vodou a osuší. Dále je vhodné provést i zkoušku hermetičnosti obalu, a to úplným ponořením konzervy do vody o teplotě 85 °C na dobu 5 – 7 minut, kdy pozorujeme tvorbu vzduchových bublinek na obale. Jinou možností je využití na vývěvu napojeného anaerostatu či exikátoru, do kterého vložíme zkoušený výrobek. Při netěsnosti obalu dochází při podtlaku k unikání obsahu konzervy. Nehermetické obaly se otrou vatovým tamponem namočeným v 70% etanolu, je-li to možné opálí se plamenem. Vzorky tekutých nebo sypkých materiálů se před otevřením promíchají desetinasobným převrácením dnem vzhůru nebo kruhovým pohybem. Vzorky zmrazených výrobků se nechají rozmrazit při teplotě 2 – 5 °C, navážka se zhotoví ihned po rozmrazení, nejdéle do 18 hodin od počátku rozmrazování. Všechny nástroje, které se použijí k otevření obalu (otvírač plechovek, nůžky, nůž, atd.), musí být sterilní.

Vzorkovnice, láhve či původní spotřebitelské balení (mimo konzerv) se v místě styku s uzávěrem otrou tamponem namočeným v 70% etanolu, ožehnou v plameni (dovoluje-li to materiál obalu) nebo se etanol nechá samovolně odpařit. Obal se otevře (odtrhnutím,

sterilním otvíračem na lahve, atd.) hrdlo se znovu opálí a odebere se potřebné množství vzorku.

Při otvírání sáčků a jiných obalů z různých fólií či papíru se obal v místě otevření potře tampónem namočeným do 70% etanolu. Potom se rozstříhne sterilními nůžkami nebo rozřízne sterilním skalpem či nožem a odebere se potřebné množství.

Vzhledově nezměněné konzervy se před otevřením dekontaminují některým z následujících způsobů:

- **víčko sklenice** nebo **horní čelo plechovky** (protilehlé výtlači) se potře tamponem namočeným v 70% etanolu, tampon se nechá na povrchu a před otevřením konzervy se zapálí. Plechové víčko se otvírá sterilním otvíračem nebo probíjí sterilním průbojníkem v bezprostřední blízkosti hořícího tamponu, průměr nebo délka otvoru musí činit 1 – 3 cm.
- **gumové a plastové uzávěry** se rovněž dezinfikují 70% etanolem, ale tampon se nezapaluje;
- při otvírání **lahví a tub se šroubovacím uzávěrem** se uzávěr nejprve opálí v plameni, poté odšroubuje a sejme, okraje lahví nebo membrána tuby se opálí, membrána se prorazí sterilním skalpelem.

Vzhledově defektní konzervy se ukládají do kovového koše, povrch víčka dekontaminujeme 70% etanolem, ale **tampon nikdy nezapalujeme**. Po odpaření etanolu se víčko překryje sterilní nálevkou, která musí pokrývat celý povrch. Otvorem nálevky se opatrně sterilním průbojníkem prorazí víčko a vytvoří se velmi malý jehlový otvor. Až z konzervy přestane vycházet plyn a její obsah, odstraníme nálevku, víčko otřeme sterilním tamponem a průbojníkem rozšíříme otvor. Ihned odebereme potřebnou navážku. Místo nálevky lze použít polyetylenový sáček, do kterého dekontaminovanou konzervu vložíme a sáček u dna konzervy pevně zavážeme. Další postup je shodný.

### 1.3.2. Navážka vzorku

Odběr navážky se provádí ihned po otevření vzorkovnice nebo obalu vzorku, v bezprostřední blízkosti plamene kahanu, sterilními nástroji (lžíce, pinzeta, skalpel, pipeta atd.) do sterilní nádoby či sterilního homogenizačního sáčku. Nádoby či sáčky se pečlivě označí údaji o analytickém vzorku. Navážka se odebírá tak, aby v ní byly zastoupeny všechny složky vzorku v takovém poměru, v jakém se v něm vyskytují.

Pokud nebylo možno tekuté, kašovitě či sypké vzorky dokonale promíchat před otevřením obalu, musí se asepticky promíchat po jeho otevření, a to sterilní skleněnou tyčinkou či lžící. Tekuté vzorky se odměňují sterilní pipetou z hloubky vzorkovnice, roztok ulpívající na povrchu pipety se nechá stéci k jejímu hrotu a odstraní se otřením o vnitřní stěnu vzorkovnice. Viskózní tekutiny se odstraní otřením povrchu pipety sterilní buničinou.

Hmotnost nebo objem navážky je konkrétně stanoven v příslušných normách pro určitý výrobek nebo metodu rozboru. Obvykle to bývá pro kvantitativní vyšetření 10 g nebo 10 ml, pro přímé očkování tekutého vzorku 1 ml. Pro kvalitativní vyšetření se obvykle odebírá 25 g nebo 25 ml zkoušeného vzorku.



Obr. 3: Navážování vzorku.