

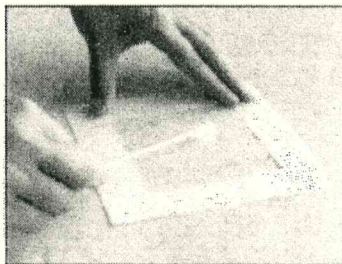
2.1.4. Stěrová metoda

Stěrová metoda se používá při zjišťování mikrobiální kontaminace na povrchu předmětů (různého tvaru i nerovného povrchu), kterými mohou být výrobní plochy a zařízení, další pomůcky, ale i ruce pracovníků, obaly či některé výrobky. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu pomocí zvlhčeného tamponu do živného prostředí. Podle účelu vyšetření lze provádět stěr kvantitativní nebo kvalitativní.

2.1.4.1. Kvantitativní stěr

Kvantitativní stěr provádíme z přesně definované plochy, k jejímu ohraničení použijeme sterilní šablonu. Do sterilní zkumavky připravíme 10 ml ředícího roztoku (např. sterilní fyziologický roztok). Sterilní tampon namočíme do ředícího roztoku a přitisknutím ke stěně zkumavky odstraníme přebytečnou tekutinu.

Na vyšetřovanou plochu přiložíme šablonu a stíráme ji v několika směrech zvlhčeným tamponem, kterým postupně otáčíme. Poté vložíme tampon zpět do zkumavky a horní část špejle odломíme o hrdlo zkumavky. Zkumavku intenzivně protřepeme na třepačce až dojde k uvolnění jednotlivých vláken tamponu. Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů.



Obr. 10: Kvantitativní stěr.

Po ukončení inkubace Petriho misek se spočítají narostlé kolonie a stanoví se počet mikroorganismů na vyšetřované ploše. Pokud stíráme mikroorganismy z celého povrchu vyšetřovaného předmětu a neznáme jeho přesnou plochu, vyjádříme výsledek jako počet mikroorganismů na vyšetřovanou plochu předmětu (např. vnitřní plochu kelímku).

Příklad 14:

Dvě po sobě jdoucí ředění (10^{-2} , 10^{-3}), v každém jedna počítatelná miska, metoda roztěru:

$$N = \frac{68 + 7}{0,2 \cdot (1 + 0,1) \cdot 10^{-2}} = \frac{75}{0,2 \cdot 1,1 \cdot 10^{-2}} = 34\,090 = 34\,000 = 3,4 \cdot 10^4$$

Výsledek vyjádříme ve tvaru $3,4 \cdot 10^4$ KTJ na vyšetřovanou plochu, např. 100 cm^2 .

2.1.4.2. Kvalitativní stěr

Jestliže chceme vyločit nebo potvrdit přítomnost některého druhu nebo skupiny mikroorganismů ve vzorku používáme stěr kvalitativní, v tomto případě není potřeba znát velikost vyšetřované plochy. Často se tímto způsobem vyšetřují špatně přístupná místa, jako jsou kohouty, ventily, rohy, spoje, atd. Provedení je stejné jako u kvantitativní metody, pouze se pro ohraničení vyšetřovaného místa nepoužívá šablona. Tampon se nejprve kultivuje v neselektivním či selektivním tekutém médiu a následně se provádí vyočkování na selektivně diagnostickou pevnou půdu.

2.1.5. Metoda seškrabu

Účinnější než stěrová metoda je metoda seškrabu, která se používá např. při hodnocení povrchové kontaminace drůbeže. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu pomocí sterilního skalpelu do živného prostředí. Podle účelu vyšetření lze seškrab opět provádět kvantitativně nebo kvalitativně.

Kvantitativní seškrab provádíme z přesně definované plochy, k jejímu ohraničení použijeme sterilní šablonu. Do sterilní zkumavky připravíme 10 ml sterilního ředícího roztoku, na vyšetřovanou plochu přiložíme šablonu a vymezený prostor seškrábneme sterilním skalpelem v několika směrech. Poté opatrně opláchneme čepel skalpelu v ředícím médiu ve zkumavce a zkumavku intenzivně protřepeme na třepačce, skalpel odložíme do desinfekčního roztoku. Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10^{-1}), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace spočítáme narostlé kolonie a výsledek vyjádříme na vyšetřovanou plochu (např. 25 cm²).

2.1.6. Otisková metoda

Další metodou využitelnou při kvantitativním hodnocení mikrobiální kontaminace povrchů, zařízení či potravin je otisk. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů z vyšetřovaného povrchu lehkým přitlačením přímo na povrch živného média. Optimální doba kontaktu živného média s vyšetřovaným povrchem je 10 sekund.

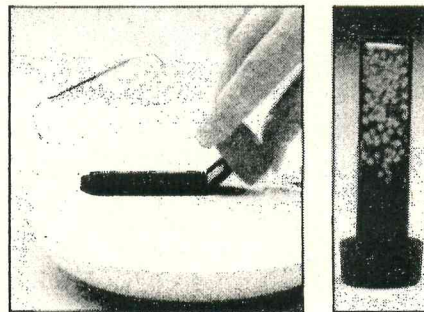
Pro otisk je živné médium nanášeno na speciální nosiče umožňující přímý kontakt celé plochy média s vyšetřovaným povrchem. Jednou z možností jsou tzv. kontaktní Petriho misky, ve kterých je živné médium nalito ve vrstvě převyšující hranu spodního dílu misky a překryto speciálně upravených víčkem. V praxi se často používají sklopné otiskové nosiče oboustranně pokryté živným médiem a uzavřené ve sterilních zkumavkách, jedná se např. o systém Hygicult®.

2.1.6.1. Sklopný otiskový nosič - Hygicult®

Hygicult® je sklopný nosič z umělé hmoty po obou stranách pokrytý agarovou živnou půdou a uzavřený ve sterilní plastové zkumavce. Jedna zkumavka umožňuje odběr a kultivaci dvou vzorků. Používá se pro mikrobiologickou kontrolu provozní hygieny, a to zejména v potravinářském průmyslu. Hygicultem lze rychle a spolehlivě testovat suroviny, výrobní zařízení i hotové výrobky.

Odběr vzorků a inokulace se provádí jedním z následujících způsobů:

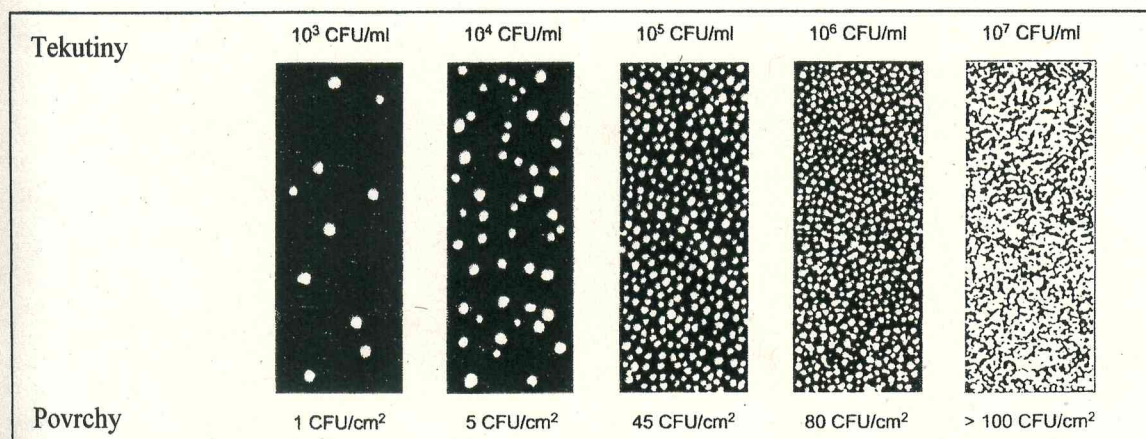
- přitlačením obou stran proužku na testovaný vzorek (povrchy a pevné vzorky),
- přenosem vzorků stěrovým tamponem, který se lehce otře o povrch agarů na proužku (těžko dostupná místa),
- několikasekundovým ponořením proužku do testované tekutiny.



Obr. 11: Hygicult®.

Po inkubaci (živné médium, délka a podmínky se odvíjí dle vyšetřovaného ukazatele) se výsledky získají buď přímo spočítáním kolonií narostlých na povrchu živného média (standardní rozměr 2 x 5 cm, tj. 10 cm²) nebo v případě masivnějšího nárůstu srovnáním

četnosti kolonií na agarovém proužku s četností kolonií na přiložené obrazové tabulce (viz obr. 12).



Obr. 12: Hygicult[®]TPC - šablona pro vyhodnocení.

TPC – CPM, tj. celkový počet mikroorganismů

Otiskové nosiče jsou určeny pro stanovení indikátorových mikroorganismů, např. celkový počet mikroorganismů, počet bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií, *E. coli* či počet kvasinek a plísní.

2.1.7. Metoda oplachu

Při mikrobiologickém vyšetření obtížně homogenizovatelných potravin (např. celé koření, sušené těstoviny) či některých typů obalů se používá metoda oplachu. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů přítomných na povrchu vyšetřovaného vzorku opláchnutím do živného média. Uvolňování mikroorganismů z povrchu vzorku je podpořeno kontinuálním protřepáváním po dobu nejméně 10 minut.

Vzorek navážíme do vhodné sterilní nádoby a zalijeme desetinásobným množstvím sterilního ředícího roztoku (10 g vzorku + 100 ml fyziologického roztoku). Nádoby asepticky uzavřeme, umístíme na třepačku a třepeme při cca 300 rpm po dobu 10 – 20 minut (dle povahy vzorku). Tím máme připravenou výchozí suspenzi (10⁻¹), kterou můžeme dále obvyklým způsobem ředit. Výchozí suspenzi či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace vyhodnotíme obvyklým způsobem a výsledek vyjádříme na 1 g vyšetřovaného vzorku.

2.1.8. Metoda výplachu

Výplach používáme při vyšetření uzavíratelných obalů, zejména různých druhů skleněných či plastových lahví, krabic atd., dále také při kontrole mikrobiální čistoty různých potrubních systémů, úchovných tanků či přepravek. Princip metody spočívá v přenesení mikroorganismů přítomných na vnitřní ploše obalu vypláchnutím do živného média.

Do vyšetřovaného obalu asepticky odměříme vhodné množství sterilního ředícího roztoku, abychom zlepšili smáčitelnost vyšetřovaného povrchu, přidáváme do ředícího roztoku několik kapek Tweenu 80. Použité množství ředícího roztoku závisí na velikosti vyšetřovaného obalu, při objemu do 1 l použijeme k výplachu 10 ml ředícího média. Obal uzavřeme a krouživým pohybem postupně smočíme celou vnitřní plochu. Necháme asi minutu odstát a poté celý postup několikrát zopakujeme (celková doba cca 10 minut). Po

ukončení výplachu výplachový roztok slijeme do sterilní nádoby či zkumavky a můžeme jej dále obvyklým způsobem ředit. Výplachový roztok či zvolená ředění kultivujeme zalitím nebo roztěrem, živné médium a podmínky inkubace jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Po ukončení inkubace spočítáme narostlé kolonie a výsledek přepočítáme na původní množství výplachového roztoku.

Při hodnocení mikrobiální čistoty technologických systémů a přepravních obalů lze k vyšetření využít přímo vodu použitou k poslednímu výplachu po ukončení čištění a desinfekce. Pro zhodnocení výsledků je nutno znát množství vzorkované tekutiny. Její celkový objem se proto po odebrání vzorku odměří vhodným způsobem.

Příklad 15:

Výplachová tekutina – objem 10 ml, neředěno, 2 počítatelné misky, metoda zalití:

$$N = \frac{68 + 74}{2} = \frac{142}{2} = 71 \text{ v } 1 \text{ ml}$$

Hodnotu převedeme na celkový objem výplachové tekutiny: $71 \cdot 10 = 710 = 7,1 \cdot 10^2$

Výsledek vyjádříme ve tvaru $7,1 \cdot 10^2$ KTJ/10 ml výplachového roztoku.

2.1.9. Metoda spadu

Nezbytnou součástí hodnocení mikrobiologické čistoty prostředí výrobních podniků či laboratoří je vyšetření ovzduší. Nejčastěji je stanovován celkový počet mikroorganismů, v odůvodněných případech lze vyšetření zaměřit také na stanovení počtu kvasinek a plísní.

K objektivnímu vyšetření ovzduší lze použít aeroskop, přístroj umožňující vyšetřit přesně definovaný objem vzduchu. Ten je přístrojem aktivně nasáván odběrovou hlavicí, ve které je umístěna Petriho miska s živnou půdou. Po ukončení expozice se Petriho miska vyjme a nechá inkubovat.



Při provozní kontrole čistoty ovzduší se běžně používá metoda spadu. Princip metody spočívá v pasivním přenesení mikroorganismů přítomných v ovzduší spadem na povrch živného média v Petriho misce.

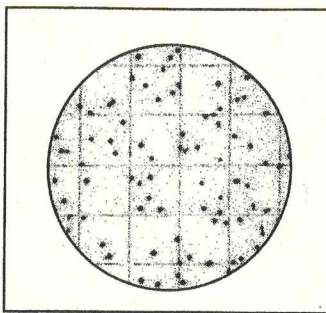
Obr. 13: Aeroskop.

Otevřenou Petriho misku naplněnou živným médiem umístíme na klidném bezprašném místě a necháme exponovat nejméně po dobu 10 minut. Po ukončení expozice misku uzavřeme a inkubujeme, podmínky inkubace (teplota, doba) jsou závislé na druhu prokazovaných mikroorganismů. Následně spočítáme počet kolonií narostlých na celé ploše Petriho misky, který vydělíme dobou expozice v minutách. O dobré mikrobiální čistotě ovzduší svědčí hodnota maximálně 10 KTJ/Petriho miska/10 minut expozice, tj. 1 KTJ za 1 minutu.

2.1.10. Kultivační destičky Petrifilm™

Petrifilm jsou počítací destičky s kultivačním médiem připraveným pro inokulaci vzorku. Použití nachází při stanovení počtu různých druhů a skupin mikroorganismů a pro detekci mikrobiální kontaminace prostředí. U řady Petrifilm™ systémů již byla provedena příslušná validace a jsou proto rovnocennou náhradou klasickému kultivačnímu vyšetření.

Při stanovení počtu mikroorganismů se zkoušený vzorek naředí 1:10 a homogenizuje. Poté se sterilní pipetou napipetuje 1 ml takto upraveného vzorku do středu destičky. Vrchní film se opatrně roluje tak, aby se zabránilo zachycení vzduchových bublin. Následně se vzorek roztláčovačem rovnoměrně rozprostře po celé kruhové ploše destičky. Destičky Petrifilm™ se inkubují vrchní stranou nahoru ve sloupcích po max. 20 kusech, podmínky inkubace se liší podle metodiky stanovení. Po ukončení inkubace se spočítají charakteristické kolonie, které mohou být dále izolovány pro další identifikaci.



Obr. 14: Petrifilm™

V případě Petrifilmů používaných pro testování hygieny prostředí se nejprve provede hydratace destiček přidáním 1 ml vhodného sterilizovaného rozpouštědla (např. fyziologický roztok), které se roztláčí po celém povrchu destičky. Takto připravené destičky lze použít pro metodu otiskovou, stěrovou či hodnocení spadu z ovzduší.

Destičky Petrifilm™ jsou určeny např. pro stanovení celkového počtu mikroorganismů, počtu bakterií čeledi *Enterobacteriaceae*, koliformních bakterií a *E. coli*, dále pro stanovení počtu *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp. či počtu kvasinek a plísní.

Cvičení – kontrola hygieny prostředí

Úkol č. 1 Kvantitativní stěr

Provést stěr prostředí z přesně definované plochy (šablona 5x5 cm) pomocí stěrového tamponu.

Z ředění 10^{-1} a 10^{-2} stanovit celkové počty mikroorganismů (CPM) metodou zalití médiem PCA (Plate Count Agar).

Výpočet

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$

- N počet mikroorganismů ve vzorku
 $\sum C$ součet kolonií ze všech Petriho misek vybraných pro výpočet ze dvou po sobě následujících ředěních (nejméně jedna z misek obsahuje 10 kolonií)
V objem inokula v ml očkovaného na každou z misek
 n_1 počet misek vybraných k výpočtu z prvního zvoleného ředění
 n_2 počet misek vybraných k výpočtu z druhého zvoleného ředění
d faktor ředění odpovídající prvnímu pro výpočet zvolenému ředění (např. 10^{-2})

Úkol č. 2 Otisková metoda – Hygicult

Provést stanovení CPM metodu otisku pomocí sklopného nosiče Hygicult (5x2 cm).

Hodnocení úkolu č. 1 a č. 2 podle tabulky 1

Vyhláška č. 289/2007 Sb. o veterinárních a hygienických požadavcích na živočišné produkty, které nejsou upraveny přímo použitelnými předpisy Evropských společenství

Stěry z povrchu výrobního zařízení, odebrané z plochy 10 cm² po skončení čištění a dezinfekce, nesmí obsahovat

- a) více než 10² aerobních a fakultativně anaerobních mikroorganismů,
- b) salmonely.

Tabulka 1: Kritéria hodnocení kvantitativního stěru a otisku

Hodnocení čistoty	Hygicult (KTJ/plocha)	Stěrová metoda (KTJ /10 cm ²)
Velmi dobrá	< 20	< 20
Přijatelná	20 -100	20 -100
Nepřijatelná	> 100	> 100

Úkol č. 3 Kontrola bakteriální kontaminace ovzduší (aeroskop)

Odběr vzduchu pomocí aeroskopu (Spin Air Merck, Německo).

Objem odebíraného vzorku vzduchu 100 litrů při rychlosti nasávání vzduchu 100 litrů/min. Použité médium – PCA (stanovení CPM/100 L vzduchu).

Úkol č. 4 Kontrola bakteriální kontaminace ovzduší metodou spadu

Otevřít Petriho misku s krevním agarem na frekventovaném místě v místě odběru vzorků pro úkol č. 1-3 po dobu odebírání vzorků (zapsat čas v minutách).

Hodnocení úkolu č. 4

Vyhovující výsledek v přepočtu 1 KTJ/1 min.

Úkol č. 5 Kvalitativní stěr k průkazu bakterií *Staphylococcus aureus* a MRSA

Po otevření odběrové soupravy se stěrovou houbičkou provést stěr z co největší plochy (i členité povrchy). Houbičku vložit zpět do sáčku a odlomit plastové držadlo, sáček uzavřít, přenést do laboratoře k dalšímu zpracování. V laboratoři přidat 20 ml pufrované peptonové vody (PPV) a zhomogenizovat na Stomacheru.

Úkol č. 6 Kontrola hygieny rukou (kvantitativní stanovení)

Vložit ruku do latexové rukavice, nalít do rukavice 20 ml PPV, promnout (cca 1 min), opatrně sundat rukavici a slít tekutinu do jednoho prstu a z toho pipetovat 200 µl na povrch selektivních médií (Baird-Parker agar, Manitol salt agar, Koliformní/*E. coli* agar) – metoda roztěru.

Výpočet

$$N = \frac{\sum C}{V (n_1 + 0,1n_2) d}$$