

Metodika odběru vzorků z prostředí pro mikrobiologické analýzy

1. Všeobecně

Při odběru vzorků je důležité, aby laboratoř obdržela vzorek, který je skutečně reprezentativní (podíly jednotlivých sledovaných složek materiálu a rozdělení hodnot sledovaného znaku odpovídají poměrům ve vzorkovaném celku) a který nebyl během přepravy a uchovávání poškozen nebo změněn.

Vzorky smí odebírat pouze osoba k tomu pověřená a způsobilá.

Odběr vzorků z prostředí se provádí dle ČSN ISO 18 593 - Mikrobiologie potravin a krmiv - Horizontální metody specifikující techniky vzorkování z povrchů pomocí kontaktních ploten a stěrů, ČSN ISO 13690 - Obiloviny, luštěniny a mlýnské výrobky - Odběr vzorků ze statických dávek, dále dle návodu výrobce odběrových tamponů, dle ČSN EN ISO 6497 – krmiva – odběr vzorků. Postup vzorkování a pomůcky k tomu lze získat v ústavu, který bude provádět analýzy.

2. Předmět metodiky

klíšťová encefalitida, *Staphylococcus* ssp. (vč. Koagulázy negativních stafylokoků), *Staphylococcus aureus*, *KoNS*, *Streptococcus* (*dysgalactiae*, *agalactiae*, *uberis*), *Enterobacteriaceae* (koliformní – *Escherichia coli* O157, *Klebsiella*, *Enterobacter* a nekoliformní – *Proteus*, *Serratia marcescens*, *Yersinia*), *Enterococcus* sp. (vč. *E. faecalis*, *E. faecium*), *Mycoplasma bovis*, *Klebsiella* sp. (vč. *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*), *Corynebacterium bovis*, *Arcanobacterium pyogenes* a *Peptoniphilus indolicus*, *Staphylococcal* β -lactamase gen, *Pseudomonas* sp. (*P. aeruginosa*), kvasinky, plísně, *Prototheca* sp., *Corynebacterium* sp., „*Corynebacterium-like*“ bakterie, *Listeria monocytogenes*, aerobní mezofilní mikroorganismy, *Salmonella* sp.

Možná místa odběrů vzorků – mléčné filtry, pracovní personál (ruce, nos, nosohltan), dojnice (vemeno, nozdry), dojírna, podestýlka, stáj, krmivo

3. Pomůcky a vzorkovnice

Tampon odběrový a výtěrový, sterilní je zhotoven z dacronové stříže a upevněn na dřevěné tyčince. Tampon je netoxický i pro velmi náročné bakteriální druhy. Dacronové tampony jsou baleny v zataveném PE sáčku a délkou přizpůsobeny délce umělohmotné zkumavky s transportními půdami, takže tyčinku není nutno odlamovat.

Sterilní stěrky s drsným povrchem pro dokonalejší sběr mikroorganismů

Transportní půda Amies obsahuje v polotuhém úchovném základu navíc i aktivní uhlí. Je vhodná pro obecné použití.

Sterilní jednorázové rukavice, houbičky s peptonovou vodou, sterilní vzorkovnice (zkumavky) odpovídající velikosti vzorku, sterilní sáčky, ředící roztok.

Trubkový vzorkovač pro odběr jádra, lopatka, naběračka, nádoba na směsný vzorek.

Ruční vrták s odběrovou rourou o průměru 7 cm.

4. Konzervace a maximální doba zpracování vzorků

Zchlazené vzorky (1 až 4°C) je nutno zpracovat do 24 hodin.

5. Postup odběru vzorků

5.1. odběr vzorků z prostředí pomocí stěrů

5.1.1. použití transportních půd

Polyethylenový sáček s tamponem odstříhnete na opačném konci tamponu, tampon vysuňte na opačném konci smotku, proveďte odběr/stěr tamponem ve dvou směrech na sebe kolmými tahy na ploše 20 cm² až 100 cm² za stálého otáčení tamponu mezi palcem a ukazováčkem a ihned zanořte do zvolené transportní půdy.

5.1.2. použití ředících roztoků

Tampon se vyjme ze sterilního obalu a navlhčí se ponořením do ředícího roztoku ve zkumavce. Přebytečná kapalina se odstraní tlakem tampónu proti stěně zkumavky. Plocha 20 cm² až 100 cm² povrchu určeného ke zkoušení se stírá tampónem ve dvou směrech na sebe kolmými tahy, a to za stálého otáčení tamponu mezi palcem a ukazováčkem. Tampon se vnese do zkumavky s ředícím roztokem a nosič tampónu se asepticky odlomí.

5.2. odběr mléčných filtrů

Odběr se provádí asepticky, je nutné zamezit kontaminaci filtru dotykem nesterilních předmětů a ploch. K odběru se používají sterilní rukavice a filtr se vloží do sterilního sáčku.

5.3. odběr vzorků krmiva

Je nutné při odebírání vzorků jednotlivých druhů rostlinného materiálu postupovat co nejpřísněji podle zásady stejnoměrnosti (odebírání dílčích vzorků z různých míst a různých vrstev) a poměrnosti (závislost počtu odebraných dílčích vzorků na jeho hmotnosti).

Získané dílčí vzorky shromažďujeme na suchém čistém místě a důkladně promícháme. Teprve z tohoto většího vzorku odebereme předepsané množství, které vložíme do čistého suchého sáčku, řádně označíme a co nejrychleji dopravíme do laboratoře.

Jednotlivé vzorky odebrané z různých míst vzorkovaného materiálu se spojí ve vhodné nádobě do směsného vzorku. Směsný vzorek (8 kg) se důkladně promíchá a oddělí se množství materiálu potřebné pro redukovaný vzorek, nejméně však 2kg. Redukovaný vzorek se co nejdůkladněji promísí a rozdělí se podle požadavku na tři až čtyři laboratorní vzorky o přibližně stejné hmotnosti (min. 0,5 kg).

5.3.1. odběr jádra

5.3.1.1. odběr vzorků z pytlů

Dílčí vzorky se musí odebírat trubkovým vzorkovačem z různých částí pytle (např. z vrchní, střední a spodní části) a z počtu pytlů dle celkového počtu pytlů:

- do 10 pytlů se vzorkuje z každého pytle,
- 10 – 100 pytlů – vzorkuje se z 10 náhodně vybraných pytlů,
- nad 100 pytlů – vzorkuje se z druhé odmocniny z celkového počtu pytlů

5.3.1.2. odběr vzorků volně loženého jádra

Dílčí vzorky odebíráme vzorkovačem nebo lopatkou z celého profilu hloubky dávky, bereme jednotlivé podíly nejméně z 10 různých míst a vrstev, stejnoměrně rozdělených na celé ložné ploše.

Odebrané dílčí vzorky se po promíchání rozprostřou ve stejně silné vrstvě, z níž dělením připravíme průměrný vzorek (0,5-1,0kg)

5.3.2. odběr suché píce (sláma, seno apod.)

Při odebírání dílčích vzorků suché píce je nutno dbát zvýšené opatrnosti, aby při odběru a promíchávání materiálu nedocházelo k odrolu lístků. Suchou píci ve stozích nebo ve skladech vzorkujeme tak, ze z různých míst a vrstev odebereme nejméně 10 dílčích vzorků, z nichž po promíchání vytvoříme průměrný vzorek o váze asi 2kg, který po zvážení, zabalení a označení doručíme do laboratoře.

5.3.3. odběr zelené píce

Dílčí vzorky se odebírají nejméně z 10 různých míst na povrchu i v hloubce. Odebrané dílčí vzorky se shromáždí na čisté suché podložce a po promíchání a případném zmenšení hrubého vzorku se z konečného vzorku odebere laboratorní vzorek o hmotnosti 2-5kg.

5.3.4. odběr siláže

U siláže s otevřeným žlabovým silážním prostorem se dílčí vzorky odebírají z profilu po odstranění 20 cm oxidované vrstvy konzervované hmoty z 5 až 10 charakteristických míst z hloubky 150 až 180cm ručním vrtákem s odběrovou rourou o průměru 7 cm, tak, aby po promíchání mohl být odebrán laboratorní vzorek o hmotnosti 2 až 3 kg. Jednotlivé vzorky se vyberou náhodně z celého materiálu a je třeba zajistit, aby všechny vrstvy byly zastoupeny rovnoměrně.

5.4. odběr vzorků podestýlky

Při odběru vzorků podestýlky z lože pro mikrobiologické rozbory je třeba dbát na to, aby nedošlo ke kontaminaci vzorku.

Jednotlivé vzorky se odebírají z 10 různých míst lože sterilními pomůckami (např. lopatkou). Tyto vzorky se smíchají ve směsné nádobě a z ní se odebere konečný vzorek, který se vloží do vzorkovnice (sterilního sáčku).

6. přeprava a uchování vzorků

Vzorky se přepravují v chladicím boxu s teplotou udržovanou v rozmezí 1 až 4°C a pokud možno během 4 hodin.