

Metodika odběru vzorků mléka 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 uchování poškozen nebo změněn.

Vzorky pro účely stanovení hygienické kvality a ceny mléka smí odebírat pouze osoba k tomu pověřená a způsobilá, která úspěšně absolvovala školení vzorkařů a je držitelem platného osvědčení.

Odběr vzorků se provádí dle normy ČSN EN ISO 707 - Mléko a mléčné výrobky - Návod pro odběr vzorků a dle metodik ČMSCH a.s.

Pokud jsou odděleně odebírány vzorky pro mikrobiologické a chemické analýzy, pak vzorky pro mikrobiologické zkoušení mají být odebrány nejdříve a za použití aseptických metod a sterilizovaných pomůcek a vzorkovnic.

2. Předmět metodiky

Tento postup vzorkování platí pro stanovení reziduí inhibičních látek a tyto mikroorganismy: celkový počet mikroorganismů (CPM), koliformních bakterií (Coli), 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.

3. Pomůcky a vzorkovnice

Pomůcky pro odběr vzorků mají být čisté, suché a nemají ovlivňovat vlastnosti a složení výrobku.

Zařízení pro odběr vzorků pro mikrobiologické zkoušení má být před použitím čisté a **vysterilizované**. Jednorázové plastové zařízení má být sterilní.

3.1. přístroje pro ruční a mechanické míchání

Pro míchání mléka jsou vhodná ponorná míchadla (plunžry), délka má být přizpůsobena hloubce nádoby, nejsou-li součástí nádoby s mlékem, je nutné mléko promíchat ručně.

3.2. pomůcky pro odběr vzorků

Pro ruční odběr vzorků je vhodná naběračka s dostatečně dlouhou rukojetí a kónického tvaru, směsná nádoba na mléko (cca 0,5-1l), vhodné vzorkovnice, popisovače vzorkovnic (např. lihový fix), vhodné oblečení a protokol o odběru vzorků.

3.3. vzorkovnice

Kapacita vzorkovnic má být taková (min. 25ml), aby byly téměř úplně (cca do $\frac{3}{4}$) naplněny vzorkem a bylo umožněno správné promíchání vzorku před zkoušením, ale aby bylo zabráněno víření vzorku během přepravy.

Vzorkovnice i jejich uzávěry mají být z takového materiálu a takové konstrukce, aby přiměřeně chránily vzorek a aby nezpůsobily změnu vzorku, která by ovlivnila výsledky následných analýz. Mezi vhodné materiály patří sklo, korozivzdorná ocel a některé plasty např. polypropylen.

Vzorkovnice i jejich uzávěry mají být suché, čisté a sterilní.

4. Konzervace a maximální doba zpracování vzorků

Dle druhu požadovaného rozboru lze vzorky konzervovat a tím prodloužit dobu jejich zpracování viz. tabulka 1.

Přehled předepsaných požadavků na vzorky mléka

pro jednotlivé druhy rozborů:

Druh rozboru	Minimální teplota (°C)	Maximální teplota (°C)	Doba zpracování	Druh konzervace
CPM - s konzervací	5	10	až 10 dnů	Azidiol
- bez konzervace	1	10	24 hod	nebo Heschenovo čínidlo
Coli - s konzervací	1	10	48 hod	Azidiol
- bez konzervace	1	10	24 hod	nebo Heschenovo čínidlo
RIL - s konzervací	Neuvedeno	10	48 hod	Azidiol
- bez konzervace	Neuvedeno	10	10 hod	nebo Heschenovo čínidlo

Pokud je možné vzorky konzervovat, konzervaci dodá laboratoř.

Vzorky pro ostatní mikrobiologické zkoušky (nestanoví-li laboratoř jinak) se nekonzervují, zchladí se co nejdříve na teplotu do 5°C a musí se zpracovat do 24 hodin.

5. Postup odběru vzorků

Před odběrem vzorků se mléko důkladně promíchá převrácením, mícháním, přeléváním z jedné nádoby do druhé o stejném objemu, dokud není dosaženo **úplné homogenity**, ale tak, aby se nevytvořila pěna.

5.1. míchání mléka

Pro dosažení pokud možno rovnoměrné distribuce mikroorganismů se analytický vzorek důkladně promíchává rychlým 25násobným převrácením nádoby, která jej obsahuje. Je třeba zabránit pění nebo ponechat pěnu rozptýlit. Interval mezi promícháváním a odběrem zkušební vzorku nesmí přesáhnout 3 minuty.

5.1.1. malé nádoby, vědra, konve

Mléko se důkladně míchá přeléváním mezi 2 nádobami, mícháním například naběračkou vertikálními pohyby (ne krouživými horizontálními, protože vyvstalý tuk by se nerozptýlil po celém objemu nádoby).

5.1.2. tanky nebo nádrže na mléko

Mléko se mechanicky míchá nejméně po dobu 5 minut, dokud není dosaženo dostatečné homogenity. Pokud je nádrž vybavena časově programovaným periodicky provozovaným míchacím systémem, je možné odebírat vzorky po pouze krátkém promíchání (1-2 min). V případech, kdy je vrtule míchadla blízko povrchu mléka, nemá být míchadlo použito, protože by se snadno mohla vytvořit pěna.

5.2. ruční odběr mléka

5.2.1. ruční odběr individuálních vzorků

Ruční odběr individuálních vzorků mléka probíhá stejně jako bazénových, pokud jde nádoj do konví. Je-li dojírna vybavena měřiči nádoje, probíhá odběr individuálních vzorků dle kap. 5.3.1.

5.2.1.1. ruční odběr individuálních vzorků mléka odstříkem mléčné žlázy

Vzorky mohou být odebírány individuálně z každé čtvrti mléčné žlázy, nebo jako směsný vzorek ze všech 4 struků.

Při odběru vzorku vždy pracujte v jednorázových vydezinfikovaných rukavicích! Vzorky mléka vždy odebírejte po toaletě mléčné žlázy před začátkem dojení. Odstraňte nečistoty s povrchu struku a otřete vlhkou individuální utěrkou.

Oddojte 6-7 stříků mléka z každé čtvrti do oddojovací nádoby. Otřete struk jednorázovou utěrkou s dezinfekcí (nebo aplikujte predipp) a otřete suchou utěrkou. Pro každý struk zvlášť proveďte důkladnou dezinfekci povrchu kůže struku tamponem namočeným v alkoholu s důrazem na hrot struku resp. vyústění strukových kanálků.

Vezměte sterilní zkumavku, odzátkujte a uchopte tak, aby se zátky nemohla kontaminovat. Zkumavku držte v náklonu 45 stupňů a v co nejkratším čase po odběru ji uzavřete. (Vyvarujte se jakékoli kontaminace nabraného obsahu, pokud k němu přeci došlo, odběr provedte znovu do nové sterilní zkumavky)

Vzorkovnici označíme stejným číslem jako na protokol o odběru vzorků. Dále vyplníme do protokolu o odběru vzorků číslo chovu, adresu a místo odběru, datum příp. hodinu odběru, požadavek na rozbor, okolnosti odběru a číslo dojnice.

5.2.2. ruční odběr bazénových vzorků mléka

Naběračkou nabere mléko z nádoby, ze které budeme odebírat vzorek a jím vypláchneme směsnou nádobu, dále nabere větší množství mléka do směsné nádoby a z ní po promíchání odebereme vzorek do připravené sterilní vzorkovnice. Zbytek mléka vylijeme zpět.

Vzorkovnici označíme stejným číslem jako na protokol o odběru vzorků. Dále vyplníme do protokolu o odběru vzorků číslo chovu, adresu a místo odběru, datum příp. hodinu odběru, požadavek na rozbor a okolnosti odběru.

5.3. odběr mléka automatickými vzorkovači

5.3.1. odběr individuálních vzorků

5.3.1.1. odběr individuálních vzorků pomocí mlékoměru (měřiče nádaje)

Objem mléka, ze kterého se bude odebírat vzorek, musí být bezprostředně před odběrem vzorků mléka dostatečně promíchán dle pokynů výrobce měřiče; pokud není měřič konstruován k automatickému odběru vzorků, mléko se přelije do jiné nádoby odpovídající velikosti a odtud je vzorek odebrán.

Pokud je měřič konstruován k odběru individuálních vzorků mléka, odběr probíhá dle návodu výrobce průtokového měřiče mléka a vzorkovacího zařízení.

Pověřený pracovník je povinen maximálně omezit styk mléka určeného k odběru vzorků se stájovým prostředím a musí zajistit identifikovatelnost vzorku.

5.3.1.2. odběr individuálních vzorků při robotickém dojení

Odběr vzorků je řízen softwarovým vybavením robotické jednotky bez zasahování lidského faktoru. Po ukončení vzorkování jsou vzorky vyjmuty ze vzorkovacího zařízení.

5.3.2. odběr bazénových vzorků

Vzorkovací zařízení pro odběr bazénových vzorků mléka je umístěno na svozných cisternách. Odběr vzorků probíhá dle návodu výrobce a provádí ho oprávněná osoba (řidič cisterny).

5.4. Vzorky pro stanovení mikroorganismů metodou real-time PCR:

Ke stanovení mikroorganismů metodou real-time PCR lze použít i vzorky odebírané k jiným analýzám (vzorky, odebrané k mikrobiální kultivaci, ke stanovení počtu SB nebo jiných mléčných parametrů – KU)

Vzorky jsou odebírány do sterilních jednorázových polypropylenových vzorkovnic.

Mohou být odebírány vzorky mléka syrového (čerstvého) i konzervovaného chlazením, mražením, konzervačními činidly (bronopol, dvojchroman draselný).

K real-time PCR mohou být bazénové (tank) i individuální vzorky, odebírány ručně i automatickými vzorkovači.

K detekci patogenů, které způsobily zánět lze odebrat vzorky od krav léčených antibiotiky, nebo jinak inhibovaným růstem mikroorganismů.

6. přeprava a uchování vzorků

Úchova a odeslání vzorků má být prováděno tak, aby stav vzorku v době odběru zůstal nezměněn až do zahájení zkušebního postupu.

Teploty úchovy vzorků (viz. tabulka 1) po odběru by se mělo dosáhnout co nejrychleji.

Pokud laboratoř nestanoví jinak, vzorky odebrané do sterilních vzorkovnic se zchladí na maximální teplotu 5°C a dopraví do laboratoře co nejdříve.

K přepravě vzorků se používají takové nádoby, aby se teplota vzorků udržela v daném rozmezí po celou dobu přepravy. Používají se např. chladicí boxy s chladícími vložkami.

Romana Dunovská, LRM Brno

23.10.2012