

EINFALDAR AÐFERÐIR TIL ÖRVERUTALNINGA Á SLÉTTU YFIRBORÐI

Hannes Magnússon
Guðmunda Birna Guðbjörnsdóttir

ÚTDRÁTTUR

Kynntar eru þrjár einfaldar aðferðir til örverutalninga á sléttu yfirborði og þær bornar saman við hefðbundna penslun. Þessar aðferðir eru: Einföld penslun með penslunarsetti (Swab Test Kit), stimplun með RODAC skálum og stimplun með HYGICULT plötum. Ennfremur er í skýrslunni greint frá samanburðartilraunum þar sem gerðar voru heildargerlatalningar og kóligerlatalningar með þessum aðferðum.

EFNISYFIRLIT

1. INNGANGUR	bls. 1
2. LÝSING Á AÐFERÐUM	" 1
2.1. Hefðbundin penslun	" 1
2.2. Penslunarsett (Swab Test Kit)	" 2
2.3. Skálastimplun (RODAC skálar)	" 3
2.4. "Hygicult" plötustimplun	" 4
3. FRAMKVÆMD SAMANBURÐARTILRAUNA	" 5
3.1. Heildargerlatalningar (tilraun 1a og 1b)	" 5
3.2. Kóligerlatalningar (tilraun 2)	" 6
4. NIÐURSTÖÐUR	" 7
5. LOKAORÐ	" 9
6. HEIMILDASKRÁ	" 10

I. INNGANGUR.

Ýmsar aðferðir hafa verið þróaðar til þess að ákvarða fjölda örvera á sléttu yfirborði. Notagildi þessara aðferða felst aðallega í því að kanna hversu vel hafi til tekist með hreinsun á tilteknu yfirborði innan vinnslusvæðisins. Eitt af grundvallaratriðum við framleiðslu matvæla er að halda vinnslusvæðinu hreinu svo unnt sé að framleiða boðlega vöru. Ekki nægir að fjarlægja eingöngu sjáanleg óhreinindi heldur þarf að tryggja að ósýnileg óhreinindi séu einnig í lágmarki. Hér er að sjálfsögðu átt við örverurnar en oft getur fjöldi þeirra á yfirborði verið mikill þó að flöturinn sýnist hreinn. Því er augljóst að ákvarðanir á örverufjölda eru í reynd eina leiðin til þess að „sjá“ hin ósýnilegu óhreinindi. Ekki þarf að deila um notagildi slíkra örverutalninga þegar haft er í huga að meðal örveranna finnast ýmsir sýklar sem geta verið stórhættulegir heilsu manna.

Að undanfögnu hafa nokkur matvælafyrirtæki leitað upplýsinga hjá okkur um einfaldar aðferðir til örverutalninga, sem hægt væri að framkvæma án meiriháttar fyrirhafnar og kunnáttu. Þörfin fyrir slíkar talningar sem liður í reglubundnu innan-hússeftirliti hlýtur að vera nokkur, sérstaklega þegar haft er í huga að fyrirtæki hér á landi eru mörg smá í sniðum og hafa ekki á að skipa rannsóknastofum, þar sem hægt er að framkvæma hefðbundnar örverutalningar. Því var ákveðið að gefa út stutta skýrslu á formi Tæknitíðinda þar sem þrjár einfaldar aðferðir til örverutalninga á yfirborði eru kynntar og bornar saman við hefðbundna aðferð til slíkra talninga; penslun..

2. LÝSING Á AÐFERÐUM.

2.1. Hefðbundin penslun.

Þessi aðferð hefur verið notuð á gerladeild R.f. í áraraðir. Aðferðin byggir í stuttu máli á því að flötur af þekktu flatarmáli er penslaður með gerileyddum bómullarpensli.

Pensillinn er settur í glas með þynningarvatni af ákveðnu rúmmáli og síðan er glasið hrist u.þ.b. 30 sinnum til þess að losa örverur úr penslinum yfir í þynningarvatnið. Ákveðnu rúmmáli af þynningarvatni er síðan pípetterað á skálar í viðeigandi þynningum og næringaræti (Plate Count Agar) blandað saman við. Oftast er ræktað við 22°C í 72 klst. Þá eru kólóniur taldar og niðurstöður birtar sem fjöldi örvera pr. 1 cm² yfirborðs.

Helstu kostir þessarar aðferðar eru m.a. þeir að hægt er að reikna út örverufjölda á mjög menguðum flötum með því að nota margfaldar þynningar við sáningu á skálar. Ennfremur má í reynd nota hvaða valæti sem er og opnast því möguleikar á að finna fjölda ákveðinna örveruhópa. Aðferðin krefst hins vegar bæði nokkurrar-þjálfunar framkvæmenda og aðstöðu á gerlarannsóknastofu.

2.2. Penslunarsett (Swab Test Kit).

Penslunarsettið er framleitt af Millipore Corporation (U.S.A.) og samanstendur af tveimur gerileyddum plasthylkjum með loki. Í öðru hylkinu er pensill (er fastur við lokið) og þynningarvatn en í hinu er þunn plata (áföst við lokið), sem hefur að geyma 0.45 µm síu og þurrkað næringaræti. Ekki er ástæða til þess að lýsa hér framkvæmd við sýnatöku þar sem mjög góðar leiðbeiningar fylgja hverju setti (1). Sé flötur af þekktu flatarmáli penslaður er hægt að reikna út fjölda örvera pr 1 cm² yfirborðs. Æskilegast er að útbúa lykkju úr stífum vír með þekktu flatarmáli. Fyrir notkun verður að gerileyða lykkjuna og er það best gert með því að dýfa henni í spritt og bregða síðan í loga. Eftir sýnatöku er hylkið með næringarætinu sett í ræktun og oftast ætti að nægja að rækta við herbergishita (u.þ.b. 22°C) í 48-72 klst. Sé óskað eftir ræktun við hærri hita (t.d. 35°C) þarf hitaskápur að vera fyrir hendi. Að afloknu ræktunartímabilinu eru kólóniur taldar og fást þannig upplýsingar um örverafjöldann, sem var á yfirborðinu þegar sýnið var tekið. Ekki er alltaf nauðsynlegt að telja kólóniur, því frá framleiðanda fylgir viðmiðunarkort en með samanburði við kortið má áætla fjöldann á ræktunarplötunni.

Helstu kostir þessarar aðferðar felast m.a. í einfaldri framkvæmd og fjölbreyttu notagildi en hægt er að kaupa þessi sett með næringarætum fyrir heildargerlatalningar, ger-og myglusveppatalningar og kólígerlatalningar. Einnig fást sérstök þynningarglös ásamt gerileyddum pípettum þannig að hægt er að gera háar þynningar sé um mjög mengaða fleti að ræða. Þessi aðferð hentar því t.d. ágætlega þegar þarf að fá nákvæman samanburð á örverufjölda fyrir og eftir hreinsiaðgerðir. Penslunarsettin eru mjög dýr í innkaupum og er það helsti ókostur þessarar aðferðar.

2.3. Skálastimplun (RODAC skálar).

RODAC (Replicate Organism Detection and Counting) skálar eru ætlaðar til örverutalninga á sléttum flötum. Framleiðandi er Falcon, Cockeysville, MD., U.S.A. Skálar eru úr plasti og því nýtist hver skál aðeins til einnar talningar. Algengast er að kaupa skálar án ætis og eru þær þá fylltar á gerlarannsóknastofu. Einnig er hægt að kaupa tilbúna skálar frá framleiðanda. Aðferðin byggir á því að skálin er barmafyllt af æti (t.d. Plate Count Agar) þannig að þegar stimplun er gerð kemst allur flötur ætisins í snertingu við yfirborðið sem rannsaka skal. Mikilvægt er að þrýsta létt á botn skálarinnar til að tryggja að allur ætisflöturinn snerti yfirborðið. Mjög skal varast að skálin renni til þegar þrýst er á botninn. Slík hliðarhreyfing gæti hæglega eyðilaggt talninguna. Eftir stimplun er skálinni strax lokað og hún sett í ræktun (á hvolfi). Að afloknu ræktunartímabili (24-48 klst) eru kólóniur taldar og fást þannig upplýsingar um örverufjöldann á yfirborðinu, sem stimplað var (2). Auðvelt er að finna örverufjölda pr. 1 cm^2 með því að reikna út flatarmál ætisflatarins.

Ef stimpla á yfirborð sem nýlega hefur verið sótthreinsað með gerileyðandi efni, verður ætið að innihalda bindiefni, sem gera þessi efni óvirk. Hafi t.d. klór verið notaður við sótthreinsun þarf ætið að innihalda klórbindiefni (Natrium thiosulfat) til þess að upphefja áhrif klórsins á ætisfletinum. Hægt er að kaupa tilbúin æti sem innihalda bindiefni fyrir flest algeng gerileyðandi efni.

Eitt slíkt æti heitir D/E Neutralizing Agar og er framleitt af Difco, Inc. Detroit (3, 4).

Stimplun með RODAC skálum er mjög einföld og ódýr aðferð til talninga. Með þessari aðferð er einnig hægt að áætla fjölda ákveðinna örveruhópa eins og t.d. kóligerla með því að nota valæti til ræktunar. Aðalókostur þessarar aðferðar er sá að ekki er hægt að útbúa þynningar og því getur verið erfitt að áætla örverufjöldann á mjög menguðum flötum. Þessi aðferð er því ekki heppileg þurfi að gera nákvæmar samanburðarathuganir á örverufjölda fyrir og eftir hreinsiaðgerðir.

2.4. "Hygicult" plötustimplun.

"Hygicult" plötustimplun er ætluð til örverutalninga á yfirborði og í vökvum. Framleiðandi er Orion Diagnostica, Helsinki, Finnlandi. Hver eining samanstendur af plasthólk með loki en við lokið er áföst ræktunarplata. Á ræktunarplötunni er afmarkaður flötur sem inniheldur Plate Count Agar með bindiefnum. Þegar sýni er tekið er ætisfletinum þrýst að yfirborðinu sem rannsaka skal (5). Þessi aðferð er því í reynd sú sama og stimplun með RODAC skálum. Með því að reikna út flatarmál ætisflatarins má finna örverufjöldann á 1 cm².

"Hygicult" plötustimplun er mjög einföld og fjölhæf aðferð en hægt er að kaupa einingar til iðragerlatalninga (Enterobacteriaceae) og talninga á ger- og myglusveppum auk heildargerlatalninga. Verðið er einnig tiltölulega hagstætt en hver eining er aðeins dýrari en RODAC skál með æti. Aðalókostur þessarar aðferðar er sá að ekki er hægt að útbúa þynningar við sýnatökur.

3. FRAMKVÆMD SAMANBURÐARTILRAUNA.

3.1. Heildargerlatalningar (tilraun 1a og 1b).

Í þessari tilraun var gerður samanburður á heildargerlatalningum með hefðbundinni penslun, penslunarsetti (Swab Test Kit: total count) og skálastimplun (RODAC). Fjórar plastplötur voru notaðar sem yfirborð (0.13m^2 hver plata). Plöturnar fjórar voru smurðar jafnþykku lagi af fiskhakki og geymdar þannig við herbergishita í 5-5 1/2 klst. Hakkið var þá skafið af og plöturnar skrúbaðar undir köldu rennandi vatni í 1-1 1/2 mín. Að þessum hreinsiaðgerðum loknum voru plöturnar hreinar að sjá. Fjögur sýni voru tekin af hverri plötu með sérhverri sýnatökuaðferð, þ.e. 16 sýni. Með aðferðunum þremur voru því samanlagt tekin 48 sýni. Tækni við sýnatökurnar var í samræmi við lýsingu á aðferðum hér að framan. Plate Count Agar var notaður í hefðbundinni penslun og skálastimplun en ætið í penslunarsettinu var M - SPC agar samkvæmt upplýsingum frá framleiðanda. Ræktun var gerð við 22°C og voru kólóniur taldar eftir 24, 48 og 72 klst. Gerlafjöldi á 1cm^2 var fundinn á eftirfarandi hátt:

(1) Penslun.

$$\text{Fjöldi/cm}^2 = \frac{\text{kólóniufjöldi} \times \text{magn þynningarvatns}}{\text{flatarmál yfirborðs}}$$

Með báðum penslunaraðferðum voru 50cm^2 penslaðir. Magn þynningarvatns í hefðbundinni penslun var 10 ml og 18 ml í penslunarsetti.

(2) Skálastimplun.

$$\text{Fjöldi/cm}^2 = \frac{\text{kólóniufjöldi}}{\text{flatarmál agaryfirborðs (24.6 cm}^2\text{)}}$$

Tilraun 1 var framkvæmd í tvisgang (tilraun 1a og 1b).

Í upphafi var einnig ætlunin að gera talningar með "Hygicult"-plötustimplun í tilraun 1. Töf varð á að plöturnar kæmu til landisins þannig að ákveðið var að framkvæma þessa tilraun án plötustimplunar. Sendingin barst okkur síðan stuttu eftir að tilraun 1 var lokið. Til þess að fá hugmynd um notagildi "Hygicult"-plötustimplunar var gerður samanburður á talningum með þessari aðferð og RODAC stimplun, en þessar aðferðir eru í eðli sínu þær sömu. Notuð var ein plastplata sem var meðhöndluð á sama hátt og lýst var hér að framan. Sex sýni voru tekin með hvorri aðferð. Flatarmál agarflatarins á "Hygicult"-ræktunarplötunni er 10.4 cm^2 . Með því að deila flatarmálinu í kólóniufjöldann fékkst gerlafjöldinn á 1 cm_2 yfirborðs.

3.2. Kólígerlatalningar (tilraun 2).

Í tilraun 2 var gerður samanburður á kólígerlatalningum með hefðbundinni penslun, penslunarsetti og skálastimplun (RODAC). Hreinrækt af Escherichia coli var blandað saman við fiskhakk áður en því var smurt á plastplöturnar. Sýni voru tekin á sama hátt og lýst er í tilraun 1 (3.1.). Við kólígerlatalningar með RODAC skálum og hefðbundinni penslun var ætíð Violet Red Bile Agar notað en kólóniur kólígerla verða dökkrauðar á þessu æti. Samsetning kólígerlaætis í penslunarsetti er ekki þekkt þar sem engar upplýsingar eru þar að lútandi frá framleiðanda. Kólóniur kólígerla verða blágrænar. Ræktun var gerð við $35 \text{ }^\circ\text{C}$ og voru einkennandi kólóniur taldar eftir 24 og 48 klst.

4. NIÐURSTÖÐUR

Niðurstöður heildargerlatalninga með hefðbundinni penslun, penslunarsetti og skálastimplun eru sýndar í töflum 1 (tilraun 1a) og 2 (tilraun 1b). Í tilraun 1a voru kolóniur taldar eftir 24,48 og 72 klst ræktun við 22°C. Sýni tekin með hefðbundinni penslun er æskilegast að telja eftir 72 klst. ræktun enda hefur þessi ræktunartími verið notaður á gerladeild R.f. um árabil. Eftir 24 klst. ræktun voru heimtur lélegar með penslunarsetti og eftir 72 klst. var gerlagróðurinn orðinn allþéttur þó enn væri hægt að aðgreina kolóniur. Af þessum sökum var heppilegasti ræktunartími 48 klst. með þessari aðferð. Eftir 72 klst. var útilokað að aðgreina kolóniur á RODAC skálum vegna yfirvaxtar og fengust því engar niðurstöður eftir þann ræktunartíma. Samkvæmt okkar reynslu er heppilegast að telja kolóniur á RODAC skálum eftir 24-48 klst. Í tilraun 1b voru kolóniur aðeins taldar eftir 48 klst. ræktun við 22°C.

Hefðbundin penslun var næmest aðferðanna þriggja. Talningar með skálastimplun og penslunarsetti voru mun lægri en svipaðar niðurstöður fengust með þessum tveimur aðferðum.

Niðurstöður samanburðartalninga með RODAC skálum og "Hygicult" ræktunarplötum voru sem hér segir (ræktun við 22°C í 48 klst.):

RODAC skálar, fjöldi/cm²: 3.9 (meðaltal 6 talninga)

"Hygicult"plötur, fjöldi cm²: 3.5 (meðaltal 6 talninga)

Þegar kolóniur voru taldar (48 klst.) var gerlagróðurinn orðinn allþéttur þó enn væri hægt að aðgreina kolóniur. Aðferðirnar gáfu svipaðar niðurstöður eins og við var að búast.

Einföldu aðferðirnar þrjár sem hér voru prófaðar reyndust allar vera álíka næmar. Aðferðaval byggist á ýmsum þáttum t.d. kostnaði, mengun sýnis, einfaldleika í framkvæmd og fl.. Þurfi t.d. að finna gerlafjölda á mjög gerlamenguðu

yfirborði kemur penslunarsettið aðeins til greina þar sem hægt er að framkvæma þynningar við sýnatökur með þessari aðferð. Aðferðin er hins vegar nokkuð kostnaðarsöm. Sýnatökur af lítt gerlamenguðu yfirborði er æskilegt að gera með RODAC skálum eða "Hygicult" plötum þar sem þessar aðferðir eru mun ódýrari en penslunarsettið.

Niðurstöður kóligerlatalninga með hefðbundinni penslun, penslunarsetti og skálastimplun eru sýndar í töflu 3 (tilraun 2). Kóloníur voru taldar eftir 24 og 48 klst. en ræktað var við 35°C. Niðurstöður gefa því miður lítið til efni til ályktana þar sem mjög fáir kóligerlar komu fram. Þó má sjá á plötu nr. 1 að hefðbundin penslun var næmasta aðferðin sem fyrr. Ennfremur reyndist 24 klst. ræktunartími nægjanlegur enda er vaxtarhraði kóligerla mikill við hagstæð ræktunarskilyrði.

5. LOKAORÐ

Við erum sannfærð um að mörg matvælafyrirtæki hérlendis gætu bætt gæði framleiðslu sinnar með því að gera reglubundnar örverutalningar á "viðkvæmum" stöðum í framleiðslurásinni. Við slíkt eftirlit er nauðsynlegt að vinna eftir ákveðnu kerfi þar sem m.a. er gert ráð fyrir ákveðnum aðgerðum til úrbóta fari örverufjöldinn upp fyrir sett mörk. Þó svo aðferðirnar, sem hér hefur verið lýst, séu í eðli sínu einfaldar krefjast þær allar nokkurrar þjálfunar framkvæmanda. Einhver þekking í örverufræði er einnig æskileg eigi notkun þessara aðferða að skila tilætluðum árangri.

6. HEIMILDASKRÁ

- (1) Millipore Swab Test Kit Operating Instructions (1975).
Millipore Corporation, Bedford, MA 01730, USA
- (2) Falcon RODAC plate (1977). Falcon, division of Becton,
Dickinson and Company, Cockeysville, MD 21020, USA
- (3) Speck, M.L. (1976). Compendium of Methods for the
Microbiological Examination of Foods, 3. kafli.
American Public Health Association, Washington, D.C.
- (4) Technical Information 0686 (1976). Difco laboratories
Detroit, MI 48232, USA.
- (5) Hygicult: En forenklet metode til hygiejnekontrol
(1981). Orion Diagnostica, SF-00101 Helsinki 10,
Finland.

TAFLA 1. Niðurstöður heildargerlatalninga (fjöldi/cm²) við 22°C með hefðbundinni penslun, penslunarsetti (swab test kit) og skálastimplun (RODAC): Tilraun la

Nr.	<u>Penslunarsett (swab test kit)</u>		<u>Skálastimplun (RODAC)</u>		<u>Hefðbundin penslun</u>				
	24 klst.	48 klst.	72 klst.	24 klst.	48 klst.	72 klst.			
I	3.3(2.8)	11.2(5.4)	12.4(4.7)	5.2(3.4)	6.2(2.9)	*	228(384)	420(434)	446(412)
II	2.2(4.1)	6.6(10.5)	8.0(11.2)	3.6(1.8)	7.0(1.4)	*	45.1(51.7)	84(94)	103(115)
III	3.8(3.4)	5.5(2.5)	6.5(3.5)	3.2(1.8)	4.4(2.0)	*	23.9(44.1)	26.3(42.5)	30.5(49.1)
IV	0.3(0.5)	0.4(0.4)	0.5(0.7)	3.2(3.5)	3.9(3.5)	*	0.7(0.5)	7.4(5.9)	10.2(6.5)

Ath.: Hver tala er meðaltal fjögurra talninga.

*Tölur í sviga eru staðalfrávik.

* Ekki hægt að telja.

TAFLA 2. Niðurstöður heildargerlatalninga við 22°C (fjöldi/cm²) með hefðbundinni penslun, penslunarsetti (swab test kit) og skálastimplun: Tilraun 1b

<u>Nr. Plötu</u>	<u>Penslunarsett (swab test kit)</u>	<u>Skálastimplun (RODAC)</u>	<u>Hefðbundin penslun</u>
	48 klst.	48 klst.	48 klst.
I	24.5 (25.8)	6.0 (2.9)	94.3 (153.2)
II	0.1 (0.2)	6.1 (2.3)	11.3 (18.9)
III	14.7 (9.1)	15.6 (15.0)	108 (57.5)
IV	15.8 (3.6)	10.4 (3.0)	194.9 (168.9)

Ath.: Hver tala er meðaltal fjögurra talninga
Tölur í sviga eru staðalfrávik.

TAFLA 3. Niðurstöður kóligerlatalninga við 35°C (fjöldi/cm²) með hefðbundinni penslun, penslunarsetti (swab test kit) og skálastimplun (RODAC): Tilraun 2.

<u>Nr. Plötu</u>	<u>Penslunarsett (swab test kit)</u>	<u>Skálastimplun (RODAC)</u>	<u>Hefðbundin penslun</u>
	24 klst.	24 klst.	24 klst.
	48 klst.	48 klst.	48 klst.
I	0.09 (0.18)	0.15 (0.23)	0.55 (0.38)
II	0.0	0.0	0.0
III	0.0	0.05 (0.1)	0.1 (0.2)
IV	0.0	0.0	0.0

Ath.: Hver tala er meðaltal fjögurra talninga.
Tölur í sviga eru staðalfrávik.