

***Listeria monocytogenes*’e tuvastamiseks toidutöötlemisaladelt ja seadmetelt proovide võtmise juhend¹**

Versioon 3- 20/08/2012

Brigitte CARPENTIER ja Léna BARRE, Ühenduse referentlaboratoorium *Listeria monocytogenes*’e jaoks, Maisons-Alfort Toiduohutuse Laboratoorium, ANSES, Prantsusmaa

Koostöös:

S. Barbuti	SSICA	Itaalia
J. Canet Noguera	FECIC	Hispaania
H. da Silva Mateus Fernandes Guedes	INRB / LINIA / UITA (riiklik referentlabor <i>Listeria monocytogenes</i> ’e jaoks)	Portugal
C. Dufour	SILLIKER SAS	Prantsusmaa
A. Español Pueyo	Laboratorio de Salud Pública de Huesca	Hispaania
A. L. Ferreira Tavares	Laboratório Tomaz	Portugal
L. Gram	Danish Technical University	Taani
T. Grégori	FICT	Prantsusmaa
B. Hickey	Dairy Science Laboratory (riiklik referentlabor <i>Listeria monocytogenes</i> ’e jaoks)	Iirimaa
J. Lago	ANFACO-CECOPECA	Hispaania
P. Leglise	Laboratoire Départemental de la Côte d'Or	Prantsusmaa
A. S. Orfão Ferraz	Globalab-Ensaíos Químicos e Microbiológicos S.A.	Portugal
J. Pardos Bosch	Laboratori de l'Agència de Protecció de la Salut del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya	Hispaania
C. M. Pires Gomes	INRB / LINIA / UITA (riiklik referentlabor <i>Listeria monocytogenes</i> ’e jaoks)	Portugal
N. Sanchez	SOREDAB	Prantsusmaa
J. Sanchez Hernandez	Laboratorio de Salud Pública de Salamanca	Hispaania
M. Sol	INRB-LINIA-UITA (riiklik referentlabor <i>Listeria monocytogenes</i> ’e jaoks)	Portugal
V. Stahl	Aérial Technical Institute for Food Industry	Prantsusmaa
M. M. Tenreiro dos Santos Monteiro Saraiva	National Institute of Health Dr. Ricardo Jorge	Portugal
J. Toomas Kramarenko	Veterinaar- ja Toidulaboratoorium (riiklik referentlabor <i>Listeria monocytogenes</i> ’e jaoks)	Eesti

¹ Tegemist on dokumendi [„Guidelines on sampling the food processing area and equipment for the detection of *Listeria monocytogenes*“](#) tõlkega (koostajad French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety – Maisons-Alfort Laboratory for Food Safety, European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*)

1. SISUKORD

1. SISUKORD	2
EESSÕNA	3
SISSEJUHATUS	4
2. KÄSITLUSALA	5
3. NORMIVIITED	5
4. PROOVIVÕTUKOHTADE VALIMINE	5
5. PROOVIVÕTU TEGEMISE AEG	6
6. LAHJENDID PROOVIVÕTUTARVIKUTE NIISUTAMISEKS	6
6.1 LIHTSAD LAHJENDID	6
6.2. NEUTRALISEERIVAD LAHJENDID	7
7. SÖÖDE	7
8. SEADMED JA KLAASTARVIKUD	7
9. PROOVIVÕTUALA	8
10. PROOVIVÕTUVAHENDITE ETTEVALMISTAMINE	8
10.1. TAMPOON	9
10.2. KÄSN, KOOTUD VÕI LAUSRIIDEST LAPP VÕI MARLIPADJAND	9
11. PROOVIVÕTT	9
11.1. TAMPOONIMEETOD	9
11.2. KÄSNA/LAPI/MARLIPADJANDI MEETOD	9
12. PROOVIDE TRANSPORT, SÄILITAMINE JA ANALÜÜSIDE ALUSTAMINE	10
13. PROOVI ANALÜÜSIMINE	10
13.1. TAMPOONIMEETOD	10
13.2. KÄSNA/LAPI/MARLIPADJANDI MEETOD	10
14. TULEMUSTE AVALDAMINE	10
15. KIRJANDUS	11

EESSÕNA

Ühenduse referentlaboratooriumi *Listeria monocytogenes*’e jaoks (ingl k EURL *Lm*) poolt ette võetud kirjanduse ülevaatus tulemusena nõustusid EURL *Lm* ja riiklike referentlaboratooriumite (ingl k NRLs) võrgustik, et rahvusvaheline standard ISO 18593, mis kirjeldab toidutöötlemisalade ja seadmete pindadelt proovide võtmise meetodeid bakterite tuvastamiseks või loendamiseks, ei anna piisavalt konkreetseid juhiseid *L. monocytogenes*’e tuvastamiseks (vaata ka sissejuhatust). Seega lepiti kokku, et EURL *Lm* kirjutab selleteemalise juhendi koostöös töörühmaga, millesse kuulus 20 liiget seitsmest ELi liikmesriigist, kes tegutsevad kolmes riiklikus referentlaboratooriumis ja teistes organisatsioonides (vaata esilehte).

Lisaks kirjanduse läbivaatamisele ja töörühma liikmete panusele tugineb käesolev juhend ulatuslikul uurimisel, mis korraldati 2010. aastal pindade proovivõtupraktikate kohta (137 vastanut 15 ELi liikmesriigist, kes on käitlejad, hügieenikontrolli eest vastutavad teenusepakkujad, ametlikud kontrollteenuste pakkujad,...), millest selgusid väga mitmesugused, muuhulgas ka mõned valed praktikad, tõstes esile vajaduse Euroopa dokumendi järele.

Koostati mitu juhendi kavandit, millest igaüks esitati esialgu konsulteerimiseks kõikidele riiklikele referentlaboratooriumitele, kes omakorda konsulteerisid vastava riigi käitlejatega, kes tegelevad pinnaproovide võtmisega, ning seejärel töörühma liikmetega.

Käesolev 3. versioon on kõigi NRLide kokkuleppe tulemus, mis saavutati nende 28.–30. märtsil 2012 toimunud iga-aastaselt töötoal, ja võtab arvesse kolme ELi liikmesriigi (Ühendkuningriigi, Madalmaade, Saksamaa) tervise ja tarbijaküsimuste peadirektoraadi (ingl k DG SANCO) korraldatud liikmesriikide konsultatsiooni raames tehtud märkusi. ELi liikmesriikide toiduahela ja loomatervishoiu alaline komitee nõustus käesoleva versiooniga oma 18. juulil 2012 toimunud kohtumisel ja järgnenud kahepäevase kirjalikul konsultatsioonil.

SISSEJUHATUS

Nüüdseks on vaieldamatult kindlaks tehtud, et valmistoidud võivad töötlemise ajal saastuda *Listeria monocytogenes*’e alltüüpidega, mis elutsevad püsivalt töötlemisettevõtetes [1]. Seega on vajalik ja kohustuslik korrapäraselt korraldada *L. monocytogenes*’e tuvastamiseks proovide võtmine töötlemisaladelt ja seadmetelt proovivõtukava kohaselt ELi määruse nr 2073/2005 järgi, milles määratletakse toidu mikrobioloogilised kriteeriumid [2]. Selliste proovivõtukavade eesmärgiks on avastada ja kõrvaldada püsivad tüved, või kui nende kõrvaldamine pole võimalik, siis rakendada korrigeerivaid tegevusi, mis aitaksid vältida toidu saastumist patogeensete bakteritega. Selle kohta on avaldatud mitmeid juhendeid [3–5]. Ebatõhusa proovivõtukava või sobimatute proovivõtumeetodite tõttu võib *L. monocytogenes* jääda avastamata. Nii jäävad korrigeerivad tegevused rakendamata ja tekib vale turvatunne.

Rahvusvaheline standard ISO 18593 [6], milles kirjeldatakse elujõuliste mikroorganismide tuvastamiseks või loendamiseks kasutatavaid pinna proovivõtumeetodeid, ei anna piisavalt konkreetseid juhiseid või nõuandeid *L. monocytogenes*’e kohta. *L. monocytogenes*’e avastamiseks sobivad ainult tamponimeetodid (proovivõtt tamponiga või käsna/lapiga). ISO standard ei selgita, millal või millistelt aladelt tuleks proov võtta. Käesoleva juhendi eesmärgiks on seda lünka täita ELi määruse nr 2073/2005 artikli 5 lõike 2 rakendamisel [2]. Peale selle tehti allpool toodud põhjustel otsus mitte käsitleda pindadel *L. monocytogenes*’e loendamist. Esiteks, pinnalt proovi võtmisega ei saada kätte kõiki bakterirakke ning võetud rakkude hulk ei ole teada ja see on muutuv. Teiseks, *L. monocytogenes*’e rakud ei ole pinnal ühtlaselt jaotunud ning suurtelt ja väikestelt pindadelt saadud tulemuste võrdlemine oleks seega ebatõene.

Pärast proovivõttu analüüsitakse proovi vastavalt standardile EN ISO 11290-1 või valideeritud alternatiivse meetodiga määruse nr 2073/2005² artikli 5 kohaselt. Kui samas toidutöötlemiskohas, kus preventiivseid tegevusi on juba rakendatud, leitakse järjestikustel proovivõttudel normi ületavas arvus *L. monocytogenes*’e positiivseid proove (vaata 5. punkti), on vaja määrata *L. monocytogenes*’e isolaatide alltüüp molekulaarmetodil (nt impulssvälja geelelektrofoores või mitme lookuse varieeruvuse analüüs või fluorestseeruv amplifitseeritud fragmentide pikkuse polümorfism), et välja selgitada, kas isolaadid kuuluvad ühte ja seega püsivasse kloonu.

¹Vastavalt ELi määruse nr 2073/2005 nõuetele käsitleb käesolev dokument ainult *L. monocytogenes*’e tuvastamist. Samas on ehk huvitav teada, et Codex Alimentariuses [3] on soovitatud järgmist: „Tõhusad seireprogrammid võivad sisaldada *Listeria spp.* testimist; nende esinemine peegeldab hästi tingimusi, mis toetavad *Listeria monocytogenes*’e võimalikku olemasolu“.

2. KÄSITLUSALA

Käesolev juhend täpsustab kus, kuidas ja millal võtta proove *L. monocytogenes*’e avastamiseks valimistoidu töötlemisalade ja seadmete pindadelt.

MÄRKUS 1. Töötlemisala ja seadmete pinnad ei ole ainsad kohad, mida jälgida. Proovivõtukava peaks hõlmama ka töötlemise abivahendeid (nagu suruõhk, jää, soolalahus, vesi, äravooluvesi), millest proovide võtmise meetodeid käesolevas dokumendis ei käsitleta.

MÄRKUS 2. Käesolevas juhendis ei anta nõu proovivõtu sageduse, proovivõtupunktide arvu, proovide koondamise lubatavuse või proovivõtupunktide roteerimise vajaduse kohta, sest need tuleb valida igal konkreetsel juhul eraldi lähtudes riskidest.

MÄRKUS 3. Käesolev juhend ei ole mõeldud koristamise ja desinfitseerimise tõhususe hindamiseks.

3. NORMIVIITED

Käesoleva dokumendi rakendamisel tuleb kasutada allpool loetletud dokumente.

ISO 6887-1 Toiduainete ja loomasöötade mikrobioloogia. Katseproovide, algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamine mikrobioloogiliseks uuringuks. Osa 1, Üldeeskirjad algsuspensiooni ja kümnendlahjenduste valmistamiseks.

ISO 7218 Toidu ja loomasöötade mikrobioloogia. Üldnõuded ja juhised mikrobioloogilisteks uuringuteks.

ISO 11290-1 Toidu ja loomasööda mikrobioloogia. Horisontaalmeetod *Listeria monocytogenes*’e tuvastamiseks ja loendamiseks. Osa 1: Tuvastamismeetod.

ISO/TS 11133 Toidu ja loomasööda mikrobioloogia. Söötmete ettevalmistamise ja valmistamise juhend.

4. PROOVIVÕTUKOHTADE VALIMINE

L. monocytogenes’t leidub visuaalselt puhastel pindadel, kuid kõige sagedamini niisketes ja määrdunud kohtades, kus bakterid saavad kasvada ja elada [1, 7]. Proove tuleks võtta raskesti ligipääsetavatest potentsiaalsetest elupaikadest, nagu augud või praod kiulistest, poorsetes, roostetavates ja õõnsates materjalides. Proove tuleks võtta ka halvasti puhastatavatelt seadmetelt, mis on samuti bakterite potentsiaalsed pesitsuspaigad. Proove võib olla raske võtta halvasti juurdepääsetavatest võimalikest toidujäätmete kogunemise kohtadest. Sellistest kohtadest tuleb proov võtta pärast seda, kui hooldustöötajad on seadme lahti võtnud. Nimetatud kohtadest ei soovitata proovi võtta seda loputades, sest loputamine ei ole pinnalt mikroorganismide kätte saamisel sama tõhus kui tampooni või käsnaga proovi võtmine.

Proove tuleb võtta sageli kohtadest, kus toiduaine võib kergesti saastuda, kuid samas võib olla huvitav võtta aeg-ajalt ka proove kohtadest, kus see ei ole saastumisele avatud (ladustamisaladelt).

Proovivõtukoht tuleb valida vastava tehase ajalooliste andmete ja protsessi sammsammulise uurimise põhjal. Allpool on esitatud mittetäielik loetelu võimalikest proovivõtukohtadest [4, 5, 8]:

- Toiduga mittekokkupuutuvad pinnad: äravool, põrandad, põrandal olevad veeloigud, puhastustarvikud, pesemisalad, põrandas olevad kaalumisseadmed, voolikud, konveierite õõnsad rullikud, konveierid, seadmete raamid, seadmete siseküljed, kondensaadi tilkumisvannid, kahveltõstukid, käsikäru, kärud, kärurattad, prügikastid, külmikud, jäämasinad, kondensaatori jahutusribid, katted, seinad, laed; külmad kohad, kus vesi

kondenseerub, nagu märg isolatsioon seintes või torude ümber või jahutuseadmed; kummist isolatsioon uste ümber, eelkõige jahutites; tolmuimejate sisu, uksekingid ja kraanid.

- Toiduga kokkupuutuvad pinnad: konveierilindid, viilutajad, lõikelauad, tükeldajad, purustajad, peenestussegurid, koorijad, kogujad, täitmis- ja pakendamisseadmed, konteinerid, muud vahendid, korduvkasutatavad kindad.

5. PROOVIVÕTU TEGEMISE AEG

L. monocytogenes e tuvastamine võib olla raske, kui proovid võetakse kohe või natuke aega pärast koristamist ja desinfitseerimist. Rakud võivad olla ikka veel elus, kuid need ei kasva söötmes vigastuste tõttu, mille on põhjustanud puhastamisel ja desinfitseerimisel kasutatavad kemikaalid, mistõttu ei ole nad kergesti tuvastavad [8]. Samuti ei pruugita avastada rakke, mis jäävad varjupaika hoolimata puhastamisest ja desinfitseerimisest, kuid nendest on proovi võimalik paremini võtta töötlemise ajal, sest seadmed vibreerivad ja/või sest toiduained ja vedelikud puutuvad kokku varjupaikadega [9].

Seega, et suurendada püsiva tüve tuvastamise tõenäosust, tuleb proove võtta töötlemise ajal vähemalt kaks tundi pärast tootmise algust või tootmistsükli lõpus, st enne koristamist ja desinfitseerimist [4, 8–11]. Tootmisliinidel, kus toitu toodetakse toorainetest, mis ei läbi mikroorganismide arvu vähendavat eeltötlust (nt toorjuustud), võib tootmise ajal võetud pinnaproovis leiduv *L. monocytogenes* pärineda nendest toorainetest, aga ka kohtadest, kus *L. monocytogenes* e rakud võivad püsivalt elutseda toidutöötlemise keskkonnas. Tehastes, kus töödeldakse mitte sageli saastunud pastöriseeritud tooteid või toorainet (näiteks pastöriseeritud juustud), tuleb pinnalt võetud proovides uurida *L. monocytogenes* t kui püsivat *Listeria* t.

Kui töötlemiskohtadesse toodavad toiduained on toored või neid on töödeldud nende mikrobioloogilise koormuse vähendamiseks (pastöriseerimine, mikrofiltrimine jms)³, peab käitleja (ingl k FBO) oma enesekontrolli plaani (ingl k HACCP) osana kehtestama vastuvõetava positiivsete proovide arvu, mis võib olla erinev *L. monocytogenes* e tuvastamiseks toiduga kokkupuutuvatel pindadel ja toiduga mittekokkupuutuvatel pindadel. Kui positiivsete proovide arv on ette nähtust suurem⁴, tuleb käitlejal rakendada enesekontrolli plaanis korrigeerivaid tegevusi. Loomulikult võib toortoidu töötlemisel lisaks töötlemise ajal tehtavale proovivõtule võtta proove ka pärast puhastamist ja desinfitseerimist või tootmise alguses. Samas võib see tekitada vale turvatunde. *L. monocytogenes* e tuvastamine toiduga kokkupuutuvatel pindadel pärast puhastamist ja desinfitseerimist viitab tõsisele puudusele koristamise ja desinfitseerimise protseduurides.

Kui proove ei võeta iga päev, ei tohiks neid võtta alati nädala sama(de)l päeva(de)l. Proove on sobiv võtta pärast seadmete hooldust, seadmete remonti, ehitamist ja suurenenud tootmist, kuna need võivad suurendada *L. monocytogenes* ega saastumise riski.

6. LAHJENDID PROOVIVÕTUTARVIKUTE NIISUTAMISEKS

6.1 LIHTSAD LAHJENDID

Kergesti ligipääsetavatel aladel, kust võetakse proove töötlemise ajal või lõpus, tuleks kasutada tampoonide ja muude proovivõtutarvikute niisutamiseks lihtsaid lahjendeid, mis ei sisalda neutraliseerijat.

² Toitu ja koostisained tuleb analüüsida vastavalt enesekontrolli plaanile.

³ Positiivsete proovide vastuvõetav arv võib olla null, kui töötlemisalale viidavaid toiduained on töödeldud mikrobioloogilise saastumise vähendamiseks.

Soovituslikud lahjendid on katseklaasidesse või pudelitesse villitud ja 15 minutit 121 °C juures steriliseeritud peptoonilahus 1 g/l-s, peptoonsoolalahus või neljandik-kangusega Ringeri lahus.

Ei soovitata kasutada fostaatpuhverlahjendeid rakkude puhul, mis on stressis toidutöötlemise ruumide ebasoodsate tingimuste tõttu (sool, hape, puhastus- ja desinfitseerimisvahendid jne), sest need võivad mõjuda kahjulikult nende kultiveeritavusele [12].

Samuti ei soovitata kasutada neutraliseerivat lahjendit, kui ei eeldata desinfitseeriva vahendi jääkide olemasolu. Desinfitseeriva vahendi jäägi allasurumiseks kasutataval neutraliseerijal võib olla nõrk kahjustav mõju bakterirakkudele ja on tõenäoline, et selline mõju on stressis rakkude korral tugevam. On tõestatud, et neutraliseerijad vähendavad *Salmonella* isoleerimise kvaliteeti võetud proovides [13].

Lahjendi asemel ei tohiks kasutada Fraseri puljongit või pool-Fraseri puljongit, sest need võivad soodustada *L. monocytogenes* e kasvu töötlemiskohas.

6.2. NEUTRALISEERIVAD LAHJENDID

Kõikidel aladel, kus võib eeldada desinfitseeritavate ainete jääke või proove võetakse kohe pärast desinfitseerimist, tuleks tamponide või muude proovivõtutarvikute niisutamiseks kasutada neutraliseerivaid lahjendeid.

Kui kasutatakse kloori või kloori eraldavaid ühendeid, tuleks neutraliseerijaks valida naatriumtiosulfaat. Teistele aktiivsetele ainetele sobivad mitmesugused neutraliseerijad (vaata EN 1276 [14], EN 1650 [15], EN 13697 [16] ja EN 13704 [17]), kuid ükski neist ei sobi kõigile desinfitseerivatele ainetele („universaalne“) [18]. Tabelis 1 on kirjeldatud neutraliseerivat lahjendit, mida võidakse kasutada enamikes olukordades. See peab olema katseklaasi või pudelisse villitud ja steriliseeritud 15 minutit 121 °C juures.

Tabel 1. Neutraliseeriv lahjend, mida võib kasutada enamikes olukordades (adapteeritud ISO 18593 [6])

Komponent	Kontsentratsioon
Sorbitaanmonooleaat (Polüsorbaat 80)	30 g/l
Letsitiin	3 g/l
Naatriumtiosulfaat	5 g/l
L-histidiin	1 g/l
Saponiin	30 g/l
Peptoon	1 g/l
Naatriumkloriid	8,5 g/l

7. SÖÖDE

Vaata söötme kohta standardit EN ISO 11290-1.

8. SEADMED JA KLAASTARVIKUD

Vaata üldnõuete kohta standardit EN ISO 7218.

L. monocytogenes e kohta kehtivaid spetsiifilisi nõudeid vaata standardist EN ISO 11290-1 ja selle muudatus(t)est.

Tavalised mikrobioloogialaboratooriumi seadmed ja eelkõige allpool loetletud tarvikud.

8.1. Proovivõtutarvikud

Tampoon, steriliseeritud varrele kinnitatud puuvill või sünteetiline materjal, mis on pakendatud steriilsesse katseklaasi. Kasutatud materjal peab olema inhibeerivate aineteta ja see tuleb dokumenteerida.

MÄRKUS. Puuvilla jäägid võivad mõnede pinnatüüpide korral saastada pärast proovivõttu nende pindade sisemisi osi.

Käsn, kootud või lausriidest lapid või marlipadjandid, mis on steriliseeritud ja individuaalselt pakendatud steriliseeritud kilekottidesse. Kasutatud materjal peab olema inhibeerivate aineteta ja see tuleb dokumenteerida.

8.2. Steriliseeritud ühekorrakindad (valikuline)

8.3. Isoleeritud jääpakkidega jahutuskest, mis suudab hoida proove temperatuurivahemikus 1...8 °C laborisse transportimise ajal (vaata EN ISO 7218).

8.4. Steriilne absorbeeriv paber, mis suudab absorbeerida seisvat vett (st põrandal olevaid veeloike).

8.5. Segaja katseklaasides vedelike segamiseks.

8.6. Peristaltiline homogenisaator alguspensionide valmistamiseks.

9. PROOVIVÕTUALA

Proovivõtu ajal peab kogu proovivõtuala olema nii suur kui võimalik, et suurendada *L. monocytogenes* e tuvastamise tõenäosust. Selleks soovitatakse võimaluse korral võtta proov 1000 cm² kuni 3000 cm² (st 0,1 kuni 0,3 m²) suuruselt alalt [6, 10, 11], st, kui tegemist on avatud ja tasapinnalise alaga (konveier, riul jt).

Tampoone tuleks kasutada võtmaks proove halva juurdepääsuga väikestelt aladelt (nt õõnsate rullikute seest, mootori kerest).

Käsna, kootud või lausriidest lappe või marlipadjandeid tuleks kasutada suurtelt pindadelt proovide võtmiseks. Vastupidiselt tampoonidele on need väga absorbeerivad ja nendega saab pindu tugevalt hõõruda. Šabloone või mõõteskaalaga joonlaudu ei ole soovitatav kasutada, sest need võivad kanda saastatust edasi ja/või nende desinfektsioonivahend võib segada analüüsi tegemist, kuid proovivõtuala suurus peab olema ikkagi ligikaudu teada. Selleks võib käitleja meeles pidada, et käsivarre pikkus keskmisest sõrmest küünarnukini on umbes 45 cm. Kui ajada näpud harali, on vahemaa põidla otsast väikese sõrme otsani umbes 20 cm.

Proovivõtuala suurus peab olema järjepidevalt ühesugune, mis võimaldaks aja jooksul trende jälgida.

10. PROOVIVÕTUVAHENDITE ETTEVALMISTAMINE

Ühtki tarvikut, mis on olnud mikrobioloogilaboratooriumis, ei tohi võtta toidutöötlemisalale saastamise riski tõttu.

Pindadelt proovide võtmise tarvikuid ja kaitserõivaid tuleb hoida ja käsitseda eraldi laboratooriumi toimingutest, eriti laboratooriumi ruumides, kus toimub patogeeni analüüsimine.

Käitlejad peavad tagama, et ühtki proovivõtuks kasutatavat tarvikut ei jäeta tootmisalale. Selleks soovitatakse tarvikud enne ja pärast proovivõttu üle lugeda.

10.1. TAMPOON

Tampooni võib kasutada kuivalt või niisutatult. Kui proovivõtuala on märg, tuleb kasutada kuiva tampooni, ning kui proovivõtuala on kuiv, tuleb kasutada niisutatud tampooni. Kui proovivõttu tehakse kuivast või märjast kohast, kus eeldatakse desinfitseerivate ainete jääkide olemasolu (mis on sageli raskesti ligipääsetavatel aladel), tuleb tampooni niisutada neutraliseeriva lahjendiga (6.2).

Niisutatud tampoone saab aseptiliselt ette valmistada laboratooriumis enne proovivõttu. Tampooni otsaga tuleb kergelt puudutada lahjendi pinda (6.1 või 6.2) nii, et tampoon ei tilguks [8]. Seejärel pange tampoon katseklaasi, sulgege see tihedalt, et säilitada nii steriilsus kui ka niiskus.

10.2. KÄSN, KOOTUD VÕI LAUSRIIDEST LAPP VÕI MARLIPADJAND

Enne proovivõtuga alustamist saab niisutatud proovivõtutarvikuid ette valmistada laboratooriumis sobiva ja registreeritud steriliseeritud lahjendi (6.1 või 6.2) kogusega. Pärast proovivõtutarviku niisutamist sulgege kilekott nii, et oleks tagatud steriilsus ja niiskus.

Kui proovivõtutarvikuid niisutatakse töötlemisalal, ei tohi lahjendit hoida klaaspudelil.

11. PROOVIVÕTT

11.1. TAMPOONIMEETOD

Võtke tampoon katseklaasist välja ja hõõruge seda pinnal nii tugevalt kui võimalik seda lõhkumata ja pöörake tampooni seadme siseküljel või mõnel muul proovivõtuks valitud halvasti juurdepääsetaval alal.

Pange tampoon selle originaalkatseklaasi, sulgege see nii, et tampoon oleks saastumise eest kaitstud ja selle ots oleks veel analüüsimisel niiske.

Pärast proovivõttu tuleb proovivõtuala alkoholilapiga puhastada.

11.2. KÄSNA/LAPI/MARLIPADJANDI MEETOD

Juhul kui ala, millelt soovitakse proovi võtta, on märg (st veeloigud põrandal), tuleb liigne vedelik kõigepealt ettevaatlikult eemaldada, kasutades selleks steriilset absorbeerivat paberit.

Avage proovivõtutarvikut sisaldav kilekott. Võtke proovivõtutarvik kotist aseptiliselt välja steriilses kindas käega. Teiseks võimaluseks on võtta proovivõtutarvikust kinni läbi kilekoti, tõmmates koti kaele tagurpidi, nagu näidatud joonisel 1.

Võtke proov tugeva sikk-sakilise liigutusega kogu valitud pinna ulatuses, tehes seda kahes üksteisega risti suunas ja vahetades proovivõtutarviku külge. Pange proovivõtutarvik kilekotti tagasi ja sulgege see nii, et see oleks saastumise eest kaitstud, kuid niiskus säiliks ka analüüsimisel.



Joonis 1. Läbi kilekoti hoitav proovivõtutarvik

Pärast proovivõttu tuleb proovivõtuala alkoholilapiga puhastada.

12. PROOVIDE TRANSPORT, SÄILITAMINE JA ANALÜÜSIDE ALUSTAMINE

Transportige proovid jahutuskastis (8.3.), mis hoiab temperatuuri vahemikus (1 ja 8) °C.

Vajaduse korral hoidke proove laboratooriumis temperatuuril $3\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$. Uurige proove nii kiiresti kui võimalik, eelistatavalt mitte hiljem kui 24 tundi pärast nende laboratooriumisse vastu võtmist ja igal juhul mitte hiljem kui 36 tundi pärast proovivõttu vastavalt EN ISO 7218 standardile (punkt 8.3, 3. lõigu lõpus ja järgmises kiirestiriknevate toodete lõigus). Ajavahemik enne analüüsi tuleb registreerida ja märkida analüüsiaruandesse.

13. PROOVI ANALÜÜSIMINE

13.1. TAMPOONIMEETOD

Lisage piisav kogus ja vähemalt 9 ml pool-Fraseri puljongit (vaata EN ISO 11290-1) tamponiga katseklaasi nii, et tamponi ots oleks täielikult puljongiga kaetud.

Segage tamponidega katseklaaside sisu korralikult, kasutades segajat (8.5.) 30 sekundit.

Seejärel teostage *L. monocytogenes* tuvastamine standardi EN ISO 11290-1 meetodiga või valideeritud alternatiivse meetodiga.

13.2. KÄSNA/LAPI/MARLIPADJANDI MEETOD

Lisage 9-kordse niisutatud proovivõtutarviku kaalus 10.2 järgi ette valmistatud pool-Fraseri puljong (vaata EN ISO 11290-1) kilekotti, milles on proovivõtutarvik, mis peab olema täielikult puljongiga immutatud.

Töödelge kottide sisu peristaltilises homogenisaatoris (8.6) 1 minut.

Seejärel tuvastage *L. monocytogenes* standardi EN ISO 11290-1 standardmeetodiga või valideeritud alternatiivse meetodiga.

14. TULEMUSTE AVALDAMINE

Tulemused tuleb esitada järgmiselt: *L. monocytogenes* e esinemine või puudumine proovivõtukoas. Kui on teada, näidake ära proovivõtuala suurus.

15. KIRJANDUS

- [1] Carpentier B, Cerf O (2011). Review -- Persistence of *Listeria monocytogenes* in food industry equipment and premises. *International Journal of Food Microbiology*, 145:1-8.
- [2] Anonymous (2005). Commission regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union* <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026:EN:PDF> accessed 5 July 2012:26pp.
- [3] Codex alimentarius commission (2007). Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in foods. CAC/GL 61-2007. http://www.codexalimentarius.net/web/more_info.jsp?id_sta=10740 accessed 23 March 2012.
- [4] FDA (2008). Guidance for Industry: Control of *Listeria monocytogenes* in Refrigerated or Frozen Ready-To-Eat Foods; Draft Guidance. US Food and Drug Administration, Department of Health and Human Services <http://www.fda.gov/Food/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/GuidanceDocuments/FoodProcessingHACCP/ucm073110.htm> accessed 31 January 2011.
- [5] Tompkin RB, Scott VN, Bernard DT, Sveum WH, Gombas KS (1999). Guidelines to prevent post-processing contamination from *Listeria monocytogenes*. *Dairy Food and Environmental sanitation*, 19:551-62.
- [6] Anonymous (2004). ISO 18593. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs.
- [7] Chasseignaux E, Gerault P, Toquin MT, Salvat G, Colin P, Ermel G (2002). Ecology of *Listeria monocytogenes* in the environment of raw poultry meat and raw pork meat processing plants. *FEMS Microbiology Letters*, 210:271-5.
- [8] NSW (2008). Food Authority for meat processors and retail meat licensees. *Listeria Management Program NSW/FA/FI034/0809*. http://www.foodauthority.nsw.gov.au/_Documents/industry_pdf/listeria-management-program.pdf accessed 27 January 2011:40 pp.
- [9] Tompkin RB (2004). Environmental sampling: A tool to verify the effectiveness of preventive hygiene measures. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 95:45-51.
- [10] Mc Namara AM (2007). Maîtrise des contaminations *Listeria* spp des surfaces: expérience aux USA dans le secteur des produits carnés. Colloque Sécurité et qualité des aliments Paris, France, 4 décembre <http://sillikeratcommunications.com/france/html/actualities/programme07.php>, accessed 6 April 2010.
- [11] Anonymous (2011). Sampling and Testing (Chapter 5) in *Meat Hygiene Manual of Procedures of the Canadian Food Inspection Agency*. <http://www.inspection.gc.ca/food/meat-and-poultry-products/meat-hygiene-manual-of-procedures/eng/1300125426052/1300125482318> accessed 10 February 2012.
- [12] Billaux F, Boubetra A, Denis C, Garry P, Jehanno D, Kobilinsky A. Recommendation for the revival of injured microbes with intent to detect and count them (unpublished results).

- [13] Davies RH, Wray C (1996). Determination of an effective sampling regime to detect *Salmonella* Enteritidis in the environment of poultry units. *Veterinary Microbiology*, 50:117-27.
- [14] Anonymous (1997). EN 1276: Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension tests for the evaluation of bactericidal activity of chemical disinfectants and antiseptics used in the food, industrial, domestic and institutional areas - Test methods and requirements (phase 2, step 1).
- [15] Anonymous (1997). EN 1650. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of fungicidal activity of chemical disinfectants and antiseptics in food, industrial, domestic, and industrial areas - Test method and requirements (phase 2 step 1).
- [16] Anonymous (2001). EN 13697. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative non-porous surface test for the evaluation of bactericidal and/or fungicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test method and requirements without mechanical action (phase 2/step 2).
- [17] Anonymous (2002). EN 13704. Chemical disinfectants and antiseptics - Quantitative suspension test for the evaluation of sporicidal activity of chemical disinfectants used in food, industrial, domestic and industrial areas - Test and requirements (phase 2, step 1).
- [18] Espigares E, Bueno A, Fernández-Crehuet M, Espigares M (2003). Efficacy of some neutralizers in suspension tests determining the activity of disinfectants. *Journal of Hospital Infection*, 55:137-40.